

COMPARACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS AISLADAS DE LA PULPA DENTAL OBTENIDAS DE TERCEROS MOLARES DE UN SOLO DONADOR

Can Tec Jose Juan^{a,b}, Serralta Interian Angélica^a, Aguilar Ayala Fernando^b, Escalante Rendiz Diana^a, Nic Can Geovanny^{b,d}, Hernández Sotomayor Teresa^c, Rodas Junco Beatriz Adriana^{*b,d}

^aFacultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Kilómetro 33.5. Mérida, Yucatán, CP 97302.

^bLaboratorio Traslacional de Células Troncales de la Cavidad Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, calle 61^a x 90 y 92. Mérida, Yucatán, CP 97000.

^{a,c}Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, CP 97205.

^{b,d}CONACYT- Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Kilómetro 33.5, Mérida, Yucatán, CP 97203

Fecha de recepción: 29 de octubre de 2021 - Fecha de aceptación: 1o de febrero de 2022

Resumen

Actualmente, el estudio de las células troncales (CT) derivadas de la cavidad oral es de gran importancia debido a su capacidad de originar diferentes tipos celulares, por lo que podrían considerarse como una alternativa para el establecimiento de modelos de investigación *in vitro*. Particularmente, las células derivadas de la pulpa dental presentan una morfología fibroblastoide y una alta capacidad proliferativa para su diferenciación hacia múltiples linajes, lo cual las convierte en una alternativa viable para la implementación de cultivos celulares. Una de las características poco estudiadas para el establecimiento de los cultivos celulares de la pulpa dental, es el efecto de la posición del órgano dentario de donde se obtiene la pulpa para la generación de los explantes; por lo que en este estudio se comparó la proliferación celular de los terceros molares superior e inferior de un mismo paciente, observando que la proliferación celular es influenciada por la posición del diente y el tipo de raíz de éste.

Palabras clave: Células troncales, pulpa dental, tercer molar superior, tercer molar inferior, proliferación celular.

MORPHOLOGICAL COMPARISON OF CELLS ISOLATED FROM DENTAL PULP OBTAINED FROM THIRD MOLARS FROM A SINGLE DONOR

Abstract

Currently, the study of stem cells (TC) derived from oral cavity is of great importance. TC can originate different cell types and hence are considered an alternative for the establishment of *in vitro* research models. In particular, cells derived from dental pulp have fibroblast morphology and high proliferative capacity for their differentiation towards multiple lineages, which make them a viable alternative for the implementation of cell cultures. In the establishment of dental pulp cell cultures, the effect of the position in the oral cavity of the tooth used in the obtaining of pulp for the generation of explants, has been scarce studied. Therefore, in this study, the cell proliferation of the upper and lower third molars, of the same

*beatriz.rodas@correo.uady.mx

patient, was compared observing that cell proliferation was influenced by the position of the tooth and the type of root.

Key words: Stem cells, dental pulp, upper third molar, lower third molar, cell proliferation.

1. Introducción

Las células troncales mesenquimales (CTM) son células de morfología fibroblastoide que poseen una capacidad de autorrenovación y potencial de diferenciación multilínea. Estas células presentan adhesión al plástico en cultivo *in vitro*, expresan marcadores moleculares de superficie (CD73, CD90 y CD105) y son capaces de diferenciarse hacia los linajes condrogénicos, osteogénicos y adipogénicos. Las células troncales (CT) se clasifican de acuerdo con su origen como CT embrionarias (CTE), fetales (CTF) y adultas (CTA) (Jones y Matsui, 2007). Actualmente, se han reportado diversas poblaciones de CTA en el cuerpo humano como las presentes en el cartílago articular (Dowthwaite et al. 2004), el hueso trabecular (Noth et al. 2002), el músculo (Huard et al. 2003), el tejido nervioso (Gage, 2000) y la cavidad oral (Rodas-Junco et al. 2017).

La cavidad oral es de particular interés como fuente de obtención de CTM, debido a que los tejidos orales donde residen las CTM son de fácil acceso (Rodas-Junco et al., 2017). Además, presentan una alta proliferación y capacidad para diferenciarse hacia odontoblastos, cementoblastos, osteoblastos, entre otros tipos celulares (Rodríguez-Lozano et al. 2012). La pulpa dental (PD), es una de las fuentes de CTM de la cavidad oral, ésta es la porción blanda del diente, conformada por tejido conectivo, las fibras neurales, los vasos sanguíneos y los linfáticos (Liu et al. 2006). Las CT obtenidas de este tejido presentan un potencial de diferenciación hacia múltiples linajes y una capacidad de autorrenovación (Gronthos et al. 2002; Huang et al. 2009; Kawashima, 2012; Al Madhoun et al. 2021), lo que las convierte en un modelo de estudio prometedor para su aplicación en terapia celular.

Sin embargo, las células troncales de pulpa dental (CTPD) poseen una alta heterogeneidad al ser aisladas de diferentes donantes, debido a la

influencia de factores de salud, edad, genéticos y ambientales (Longoni et al. 2020; Al Madhoun et al. 2021). En ese sentido, se plantea la hipótesis respecto a si la posición de los dientes dentro de la cavidad oral también pudiera incidir, independientemente de que pertenezcan a un solo donante. Por lo tanto, para el establecimiento de cultivos celulares de CTPD es importante considerar el tipo de órgano dental, su posición en la cavidad bucal, el historial clínico del paciente y la morfometría de la pulpa dental (Guerrero-Jiménez et al. 2019).

En la actualidad no existen trabajos que aborden este enfoque, por tal motivo el objetivo de la presente investigación fue comparar las diferencias morfológicas de las células aisladas de la PD de dos dientes permanentes de un mismo donador.

2. Metodología

2.1 Obtención y transporte del órgano dentario

La PD se obtuvo de dos terceros molares sanos de un paciente femenino de 20 años con previa firma del consentimiento informado. La recolección del órgano dentario (OD) se realizó en la Clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Los OD cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión del protocolo experimental aprobado por el Comité de Investigación Ética del Centro Regional de Investigación Dr. Hideyo Noguchi, UADY (Número de Aprobación: CIE-06-2017).

Los terceros molares extraídos se transfirieron a un tubo cónico (Cornell) que contenía una solución estéril de búfer fosfato salino 1X (PBS: 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ y 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4), suplementado con una solución al 1% de antibiótico/antimicótico [penicilina (100 UI/mL)/estreptomina (100 µg/mL) (Gibco)], y se transportaron en un contenedor refrigerado al Laboratorio

Traslacional de Células Troncales-UADY para su procesamiento.

2.2 Obtención de la pulpa dental

Para la obtención de la PD, se procedió a lavar las piezas dentales con PBS 1X (pH 7.4) suplementado con 1% de penicilina (100 UI/mL) y estreptomina (100 µg/mL), con la finalidad de retirar el tejido y sangre remanente.

Posteriormente, de acuerdo con el protocolo establecido por Guerrero-Jiménez et al. (2019), se realizó un corte longitudinal a lo largo del órgano dental con la ayuda de un micromotor rotatorio con el objetivo de exponer la cámara pulpar. Seguidamente, se recuperó la PD utilizando una pinza curva de disección de punta fina para separar el tejido de la cámara pulpar.

2.3 Establecimiento y expansión de las poblaciones celulares de pulpa dental

Para establecer el cultivo celular de la PD se realizó el método de explante reportado por Rivas-Aguayo (2018). El tejido se seccionó mecánicamente con un bisturí en fragmentos de entre 1-2 mm, se colocaron en cajas Petri de 35 mm (Nest®) con medio basal D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de solución antibiótico-antimicótico (100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina) (D-MEM completo). Después, se colocó en incubación bajo condiciones estándar de 37°C y 5% de CO₂ con atmósfera húmeda.

Cuando el cultivo primario obtuvo una confluencia celular del 80%, se procedió a su tripsinización utilizando la solución de 0.25% tripsina/EDTA (Gibco) para generar la expansión celular (pase 1, P1). Para ello, se lavaron las células adherentes con PBS 1X (pH 7.4) con 1% de solución antibiótico-antimicótico. Inmediatamente, se adicionaron 750 µL de la

solución de 0.25% Tripsina/EDTA y se incubó durante 5 minutos a 37°C, con el objetivo de disociar a las células adheridas al sustrato de la caja de cultivo. Posteriormente, para inactivar la tripsina/EDTA se adicionó el mismo volumen de medio D-MEM completo.

La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para retirar el medio de cultivo con la tripsina inactivada. Después, se lavó la pastilla celular con un mL de PBS 1X (pH 7.4). Finalmente, se resuspendió la pastilla celular en un mL de medio de cultivo D-MEM completo (10% SFB, 1 % de la solución antibiótico-antimicótico). Esta suspensión celular fue inoculada en cajas de cultivo T75 (NEST®) y cultivada a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda.

2.4 Análisis morfológico de las células troncales de la pulpa dental

La morfología de las células en el P1, fue observado bajo un microscopio de fase invertida (TCM400, LABOMED).

3. Resultados

En el presente trabajo se analizaron dos terceros molares extraídos de la parte superior e inferior de la cavidad oral de un mismo paciente femenino de 20 años. En la Figura 1A, se muestra la posición radiográfica de los dientes extraídos para este estudio, donde el tercer molar inferior (TMI) presenta la raíz separada (Figura 1B) mientras que el tercer molar superior (TMS) tiene la raíz fusionada (Figura 1C). Estas diferencias en sus raíces también fueron visibles en la morfología de la PD. Por ejemplo, el tejido extraído del TMI fue amorfo mientras que la PD del TMS fue íntegro y de mayor longitud (Figura 1B-C). En ambos dientes la PD se encontraba en estado viable.

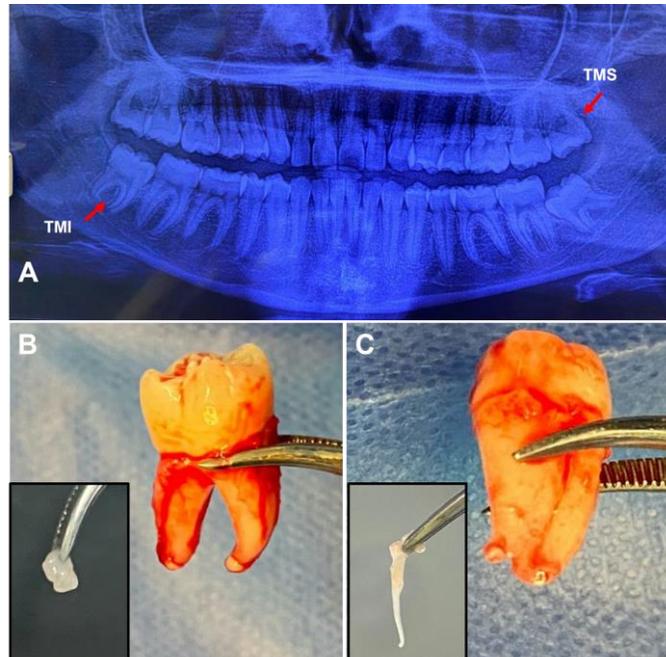


Figura 1. Posición de los órganos dentales extraídos de la cavidad oral de una paciente femenina de 20 años. (A) Radiografía de la cavidad oral con la posición de los órganos dentales extraídos (B) TMI: tercer molar inferior (C) TMS: tercer molar superior. En la parte inferior izquierda de cada imagen se señala la PD correspondiente a cada OD.

Ambos OD fueron transportados en PBS 1% (Figura 2A) y desinfectados en el medio D-MEM completo, para posteriormente ser cortados longitudinalmente para colectar la PD (Figura

2C). El establecimiento del cultivo celular de los explantes de PD se realizó como se indica en materiales y métodos.

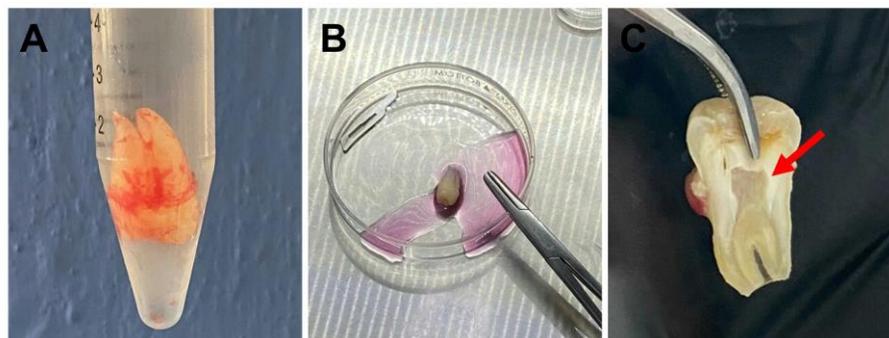


Figura 2. Desinfección del órgano dentario y colecta de la pulpa dental. (A) Órgano dentario en PBS 1x. (B) Órgano dentario en medio D-MEM completo (C) Corte del órgano dentario para la colecta de la PD.

Las primeras células emergentes de los explantes de PD se observaron a los cinco días de cultivo, sin embargo, después de este tiempo, se pudieron observar diferencias temporales en la migración celular entre ambos cultivos. Los explantes del TMS mostraron una mayor migración celular en el día 12 comparado con el explante generado del

TMI (Figura 3E). En relación con su morfología, se observó la forma fibroblastoide más definida en el día 22 de cultivo, siendo las células aisladas del TMS más alargadas comparadas con las células del TMI (Figura 3F). También se detectaron diferencias en el patrón de crecimiento *in vitro* para ambos cultivos. El cultivo celular del TMS

presentó un crecimiento paralelo (Figura 3C) mientras que el cultivo de TMI fue curvo (Figura 3F).

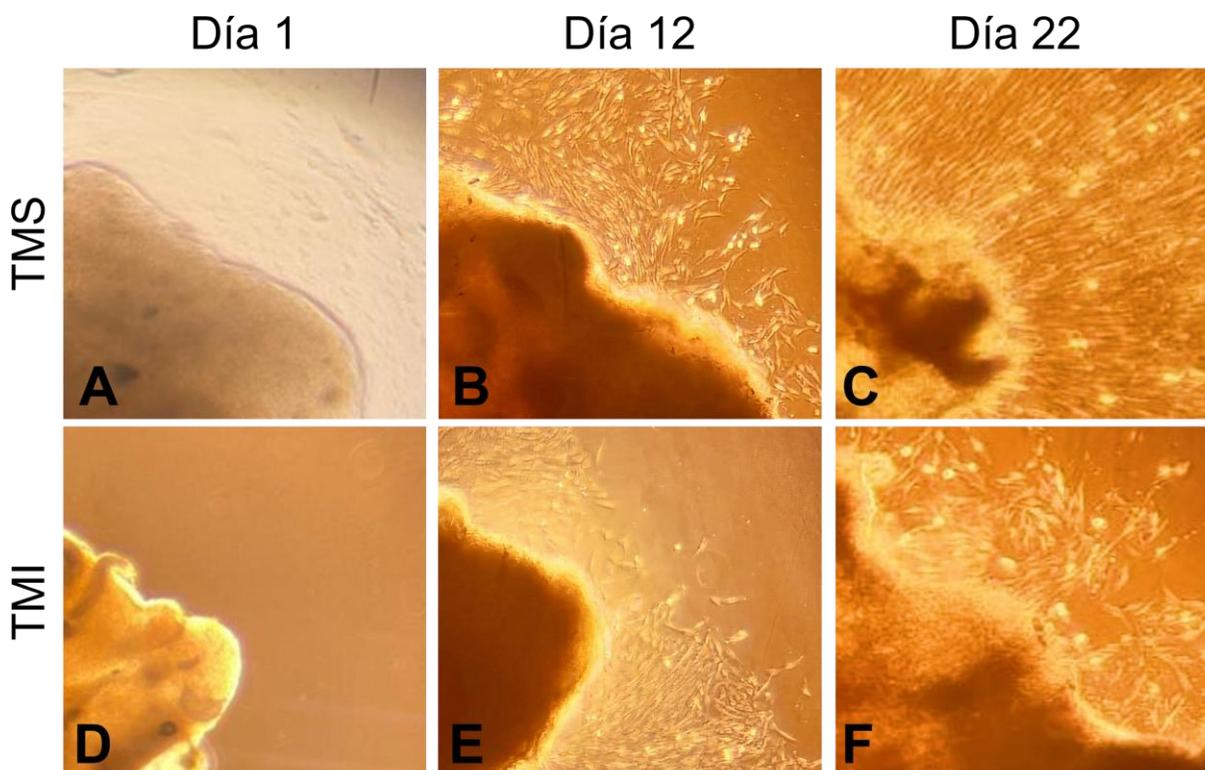


Figura 3. Microfotografías de los explantes obtenidos de dos dientes tercer molar de un mismo donador. (A, B, C) En la parte superior se observa la migración celular de los explantes generados de PD del TMS y (D, E, F) el TMI ambos a los 1, 12 y 22 días de cultivo. TMS: tercer molar superior, TMI: tercer molar inferior. Imágenes con magnificación 10x.

4. Discusión

En el presente estudio se realizó un acercamiento de los cambios morfológicos y el potencial de proliferación celular en los explantes de PD del TMS y el TMI de un mismo donador. Los datos reportados en este trabajo para las diferencias morfológicas bajo estas condiciones, no se habían evaluado anteriormente. La mayoría de las investigaciones se basan en el establecimiento de cultivos celulares de una población heterogénea de donantes y de diferente posición del OD para la obtención del tejido pulpar (Alraies et al. 2017; Kobayashi et al. 2020; Longoni et al. 2020). Sin embargo, nuestro grupo plantea que es necesario tomar en cuenta la posición del OD para el

establecimiento de los cultivos de CT de origen dental.

Asimismo, en los resultados reportados en este trabajo, se observó que los OD superior e inferior presentaban diferente tipo de raíz, fusionada y separada, respectivamente (Figura 1B y 1C). Lo anterior, es un rasgo característico debido a la posición de los dientes, ya que se ha reportado que de un 40 a 52% de los casos los TMS tienen este tipo de morfología radicular (Vázquez et al. 2014; Carvalho et al. 2015; Olguín Martínez et al. 2017). Por otro lado, los TMI se caracterizan por tener las raíces separadas lo cual se ha registrado entre un 40 al 82% de los casos (Fuentes et al. 2016; Lübbers et al. 2017; Olguín Martínez et al. 2017). La variación en el tipo de raíz del OD podría ser resultado de los cambios fisiológicos que se llevan

a cabo durante su formación y posición dentro de la cavidad oral.

Esto pudiera influir en la capacidad de proliferación celular de los explantes de PD del TMS y TMI, en donde se presentó mayor proliferación en el TMS (Figura 3B), lo cual podría deberse al tipo de raíz fusionada del OD (Figura 1C), lo que permitió la obtención de una PD íntegra y homogénea, característica que se ha reportado aumenta la tasa de éxito para la obtención de CT (Guerrero-Jiménez et al. 2019). La capacidad de proliferación celular también está relacionada con las características biológicas del donador del cual provienen, como la edad y el sexo (Mercado-Rubio et al. 2021). Siendo las edades óptimas para la obtención de CT entre 16 y 25 años (Bressan et al. 2011); por otro lado, Guerrero-Jiménez *et al.* (2019), reportaron que los porcentajes de PD en donadores femeninos con el TMS con raíces fusionadas era mayor en peso comparado con los pacientes masculinos. En tal sentido, se podría inferir que la obtención de PD de los OD superiores con raíces fusionadas de donadores femeninos, tiene una influencia positiva para el establecimiento de los cultivos celulares.

Actualmente no hay evidencia de la comparación de la proliferación celular entre los TMS y TMI en un mismo donador; sin embargo, nuestros resultados muestran que este enfoque debe profundizarse. Las evidencias actuales, señalan cambios en la proliferación celular de diferentes tejidos orales (pulpa dental, folículo dental y

papila apical) (Patil et al. 2014; Ullah et al. 2016) obtenidos de un mismo donador, pero sin profundizar en la posición o anatomía del órgano dental.

5. Conclusión

En la presente investigación se pudo observar que las células aisladas de la PD en los dos dientes terceros molares de un mismo donador presentaron diferencias morfológicas en cuanto al tamaño y patrón de migración de las células. Esta diferencia pudiera deberse al tipo de raíz que presentó cada uno de ellos (fusionadas o separadas), por lo que es probable que los TMS con raíces fusionadas sean una mejor fuente de CT que los TMI con raíces separadas.

6. Agradecimientos

La presente investigación es financiada por el CONACYT en el marco del programa Cátedras-CONACYT (No. de proyecto 1882) y al proyecto Ciencia de Frontera-Conacyt Núm. 429849. De igual forma, se agradece a la Facultad de Ingeniería Química y a la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán por el apoyo brindado. Un agradecimiento al Dr. Ricardo Peñaloza Cuevas y a la C.D. Casandra Duarte Pilgram por las piezas dentales extraídas donadas para la presente investigación.

Referencias

- Al Madhoun, A., Sindhu, S., Haddad, D., Atari, M., Ahmad, R., y Al-Mulla, F. (2021). Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2780. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.717624>
- Alraies, A., Alaidaroos, N. Y., Waddington, R. J., Moseley, R. y Sloan, A. J. (2017). Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. *BMC Cell Biology* 18(12). <https://doi.org/10.1186/s12860-017-0128-x>
- Bressan, E., Ferroni, L., Gardin, C., Pinton, P., Stellini, E., Botticelli, D.,... & Zavan, B. (2012). Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. *PloS one*, 7(11), e49146. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049146>

de Carvalho, R. W. F., de Araújo Filho, R. C. A., & do Egito Vasconcelos, B. C. (2013). Assessment of factors associated with surgical difficulty during removal of impacted maxillary third molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 71(5), 839-845. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23598549/>

Dowthwaite, G. P., Bishop, J. C., Redman, S. N., et al. (2004). The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *Journal of Cell Science*, 117(6), 889–897. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14762107/>

Fuentes, R., Borie, E., Bustos, L., y Thomas, D. (2009). Morfometría de terceros molares: un estudio de 55 casos. *International Journal of Morphology*, 27(4), 1285-1289. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022009000400050>

Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287 (5457), 1433–1438. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10688783/>

Gronthos, S., Brahim, J., Li, W. et al. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531–535. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12147742/>

Guerrero-Jiménez M, Nic-Can GI, Castro-Linares N, Aguilar-Ayala FJ, Canul-Chan M, Rojas-Herrera RA, Peñaloza-Cuevas R, Rodas-Junco BA. 2019. In vitro histomorphometric comparison of dental pulp tissue in different teeth. *Peer J* 7:e8212. <https://doi.org/10.7717/peerj.8212>

Huang G., Gronthos, S. y Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9) 792–806. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2830488/>

Huard, J., Cao, B. y Qu-Petersen, Z. (2003). Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defect Research*, 69(3), 230-237. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14671776/>

Jones, R. J. y Matsui, W. (2007). Cancer stem cells: from bench to bedside. *Biology of blood and marrow Transplantation*, 13, 47–52. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18167509/>

Kawashima, N. (2012). Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Archives of Oral Biology*, 57, 1439–1458. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22981360/>

Kobayashi, T., Torii, D., Iwata, T., Izumi, Y., Nasu, M., y Tsutsui, T. W. (2020). Characterization of proliferation, differentiation potential, and gene expression among clonal cultures of human dental pulp cells. *Human cell* 33(3), 490. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00327-9>

Liu, H., Gronthos, S. y Shi, S. (2006). Dental pulp stem cells. *Methods in Enzymology*, 419, 99–113. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17141053/>

Longoni, A., Utomo, L., van Hooijdonk, I. E., Bittermann, G., Vetter, V. C., Spanjer, E. K.,... y Gawlitta, D. (2020). The chondrogenic differentiation potential of dental pulp stem cells. *Eur. Cells Mater* 39, 121-135. <https://doi.org/10.22203/ecm.v039a08>

Lübbbers, H. T., Matthews, F., Damerau, G., Kruse, A. L., Obwegeser, J. A., Grätz, K. W., y Eyrich, G. K. (2011). Anatomy of impacted lower third molars evaluated by computerized tomography: is there an

indication for 3-dimensional imaging? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 111(5), 547-550. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20952229>

Mercado-Rubio, M. D., Pérez-Argueta, E., Zepeda-Pedreguera, A., Aguilar-Ayala, F. J., Peñaloza-Cuevas, R., Kú-González, A., Nic-Can, G. I. (2021). Similar features, different behaviors: A comparative in vitro study of the adipogenic potential of stem cells from human follicle, dental pulp, and periodontal ligament. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 738. <https://www.mdpi.com/2075-4426/11/8/738>

Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002). Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal Orthopaedic Research*, 20(5), 1060–9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12382974/>

Olgún Martínez, T. G., y Amarillas Escobar, E. D. (2017). Morfología radicular de los terceros molares. *Revista ADM*, 74(1). <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=70658>

Patil R, Kumar BM, Lee WJ, et al. (2014). Multilineage potential and proteomic profiling of human dental stem cells derived from a single donor. *Experimental Cell Research*, 320(1), 92–107. <https://europepmc.org/article/med/24162002>

Rivas-Aguayo, A. G. (2018). Establecimiento de metodologías para el aislamiento y cultivo *in vitro* de células troncales de la pulpa dental humana de terceros molares. Tesis de Licenciatura de Ing. En Biotecnología. FIQ-UADY. Mérida pp 1–85

Rodas-Junco, B. A., Canul-Chan, M., Rojas-Herrera, R. A. *et al.* (2017). Stem cells from dental pulp: what epigenetics can do with your tooth. *Frontiers in Physiology*, 8(999), 1–20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29270128/>

Rodríguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F. *et al.* (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 17(6), 1062–1067. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4499431>

Ullah, I., Subbarao, R. B., Kim, E. J. *et al.* (2016). In vitro comparative analysis of human dental stem cells from a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology. *Life Sciences*, 154, 39–51. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320516302466>

Vazquez, D., Hetch, P., & Martínez, M. E. (2012). Radicular synostosis: frequency study using panoramic x-rays as diagnostic method. *Revista Odontológica Mexicana*, 16(2). <http://revistas.unam.mx/index.php/rom/article/view/30916>