



UNIVERSIDAD  
**Finis Terrae**  
VINCE IN BONO MALUM

UNIVERSIDAD FINIS TERRAE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE FENOTIPO MIOFIBROBLÁSTICO DE  
CÉLULAS MADRE DE LA PAPILA APICAL DE DIENTES CON  
FORMACIÓN RADICULAR INCOMPLETA.**

MARÍA PÍA ROSENBERG PÉREZ  
NIVIA VELÁSQUEZ SANTANDER

Tesis presentada a la Escuela de Odontología de la Universidad Finis Terrae, para  
optar al título de Cirujano Dentista.

Profesor Guía: Dr. Alejandro Oyarzún Droguett

Santiago, Chile

2016

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a nuestras familias por todo el apoyo a lo largo de la carrera, y además a todas las personas de la facultad de odontología que se dedican día a día a formar odontólogos con ética y amor por la profesión.

De forma especial agradecemos al Doctor Alejandro Oyarzún por la dedicación y vocación a la docencia que el tiene. Para nosotras ha sido un privilegio realizar éste trabajo de investigación bajo su gran experiencia. .

## ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>6</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>7</b>
1. Selección de la muestra .....	7
2. Localización inmunohistoquímica de CD-146 y actina muscular (alfa-SMA) <sup>25</sup> .	8
3. Microscopía.....	9
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Localización inmunohistoquímica de CD1456 y Alfa-SMA.....</b>	<b>9</b>
A) Inmunoperoxidasa.....	9
B) Inmunofluorescencia indirecta.....	10
C) Inmunoperoxidasa (Controles).....	11
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>25</b>

## RESUMEN

**Objetivo:** En el presente estudio pretenderemos observar la distribución de las CM de la papila apical de dientes permanente jóvenes, utilizando marcadores específicos de CM mesenquimales y además estudiar la coexpresión de epitopos de musculo liso, para poder determinar un posible fenotipo miofibroblástico de estas células en la papila apical de dientes con formación radicular incompleta.

**Metodología:** selección de 20 premolares humanos sanos y con formación radicular incompleta e incluidos en parafina histológica. Como control positivo se utilizarán cortes histológicos de cordón umbilical y de melanomas orales. Se realizarán cortes longitudinales de 6  $\mu\text{m}$  de cada espécimen seleccionado los que se montarán en portaobjetos silanizados. Los cortes de todos los especímenes se incubaran en suero de cabra no inmune al 5% durante 30 min para bloquear los sitios inespecíficos.

La reacción antígeno anticuerpo se realizará mediante el sistema biotina-streptavidina-peroxidasa o mediante un anticuerpo especie-específico conjugado con FITC para el caso de actina muscular o TRITC para el caso de CD-146.

**Resultados:** CD146 se asocia con capilares y vasos sanguíneos de mayor calibre, en papila y pulpa dentaria, en cambio la actina muscular sólo se asocia a vasos sanguíneos de mayor calibre.

**Conclusión:** No existe colocalización de los epítomos estudiados, lo que revela que las CM de la papila y pulpa dental no presentan fenotipo miofibroblástico en condiciones de normalidad.

**Palabras clave:** Células Madre, CD146, actina muscular, plexo subodontoblastico, papila dental y cordón umbilical.

## INTRODUCCIÓN

Las células troncales o célula madre (CM) son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y que presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse, es decir, de formar células idénticas a las células de origen, y tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo<sup>1</sup>. Dependiendo de su origen, las células troncales pueden dividirse en células troncales embrionarias y somáticas<sup>2</sup>. Las células troncales embrionarias (CTE) son células pluripotenciales, es decir, cada una de ellas es capaz de generar todos los tipos celulares del organismo. Por su parte, las células troncales somáticas son, en su mayoría, multipotenciales ya que pueden generar una gran variedad de tipos celulares dentro de un tejido específico<sup>3</sup>.

Dentro del grupo de células troncales de adulto, las células troncales hematopoyéticas han sido las más estudiadas (desde de los años 50's), y en la actualidad se tiene un panorama bastante claro de su estructura y su biología<sup>4</sup>. La investigación sobre células troncales de otros tejidos ha sido más reciente. Particularmente, el estudio de las células troncales mesenquimales (MSC: mesenchymal stem cells) comenzó en la década de los 70's y estuvo enfocado primordialmente al conocimiento de su papel en la formación del estroma hematopoyético<sup>2</sup>. Gracias a diversos estudios que han demostrado el amplio potencial de diferenciación de las MSC hacia tejidos neuronales y musculares. Estas células han cobrado mayor importancia durante la última década<sup>5</sup>.

Las MSC se localizan principalmente en la médula ósea y tienen la capacidad de dar origen a diversos tipos celulares, como los fibroblastos medulares o células reticulares, adipocitos, osteoblastos y condrocitos<sup>6</sup>. Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado la plasticidad de estas células, dando origen a células no hematopoyéticas como miocitos y células nerviosas, entre otras<sup>2</sup>.

Morfológicamente, las MSC se caracterizan por presentar una morfología fusiforme, con la presencia de un núcleo alargado, central, que contiene de dos a tres nucléolos<sup>2</sup>.

En la actualidad las células madre constituyen un modelo para estudiar los mecanismos de diferenciación, ya que tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo y de autorrenovarse, es decir generar células idénticas a las células de origen<sup>2</sup>.

Las células madre se pueden clasificar según su potencial para formar células especializadas en:

- Células Totipotenciales (CTP)
- Células Pluripotenciales (CPP)
- Células Multipotenciales (CMP)

Las CTP son aquellas células en que bajo condiciones apropiadas son capaces de formar un individuo completo; las CPP tienen la habilidad de diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias; las CMP pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes<sup>7</sup>.

Las MSC han sido aisladas de la sangre del cordón umbilical, de la vena umbilical subendotelial y la gelatina de Wharton<sup>8</sup>. Las células madre del estroma del cordón umbilical (UCSSC) están surgiendo como una interesante alternativa de células madre mesenquimales derivadas de medula ósea que se obtienen por medios no invasivos. De acuerdo con un estudio realizado por Virginia AF y col<sup>8</sup>, en el cual las UCSSC expresaron actina de músculo liso (alfa-SMA) y bajo el adecuado estímulo éstas se comportaron como miofibroblastos, se ha propuesto que la CM de origen mesenquimático son esencialmente miofibroblastos<sup>8</sup>.

Dentro de algunas funciones de los miofibroblastos encontramos que participan en la remodelación activa de la matriz extracelular en el tejido de granulación durante la reparación y regeneración de heridas<sup>9</sup>.

Las CM de la cavidad bucal son células que poseen un potencial de multidiferenciación y por tanto pertenecen al grupo de células madre adultas con la capacidad para formar células con carácter osteodontogénico, adipogénico y neurogénico<sup>10</sup>.

La pulpa dental posee células mesenquimáticas indiferenciadas que derivan del ectomesénquima diferenciado durante la gastrulación y formación del tubo neural, constituyendo una verdadera reserva celular; poseen capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos según el estímulo que actúe sobre ella. Por otra parte, éstas células han demostrado autorrenovación, clonogenicidad y patrón de expresión de marcadores de superficie específicos<sup>11</sup>.

La literatura odontológica ha reportado la presencia de CM en distintos tejidos provenientes de odontones humanos y de animales de experimentación. Es así como, estas células madre han sido identificadas como:

- Células Madre del folículo dental (DFSC) de dientes en período preeruptivo.<sup>11-14</sup>
- Células Madre de la papila apical en dientes con formación radicular incompleta (SCAP)<sup>29-13-14</sup>
- Células Madre de pulpa de dientes temporales en exfoliación (SHED)<sup>12-13-14-15</sup>
- Células Madre de pulpa de dientes permanentes (DPSC)<sup>13-15-17-16</sup>
- Células Madre asociadas al ligamento periodontal (PDLSC)<sup>13-15</sup>.

Se ha determinado que las CM de origen mesenquimático presentan en su membrana plasmática diversos marcadores moleculares, que han permitido su identificación y caracterización. Los marcadores superficiales más estudiados para caracterizar a las células madre son: CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD146 y STRO-1.<sup>17</sup>

Uno de los marcadores moleculares más estudiados es la proteína CD146, también conocida como molécula de adhesión de melanomas. Esta macromolécula, es un marcador de superficie que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa en todos los tipos de células endoteliales del sistema cardiovascular y varios reportes indican que las DPSC expresan CD146<sup>18</sup>.

El sistema cardiovascular es un sistema de transporte que conduce la sangre y linfa hacia y desde los tejidos de un organismo vertebrado. Este sistema está conformado por el corazón, vasos sanguíneos y vasos linfáticos.

El sistema arterial proporciona una red de distribución a la microcirculación periférica. En ella los capilares y las vénulas post capilares son los lugares principales de intercambio de gases y metabolitos entre los tejidos y la sangre. El sistema venoso devuelve la sangre desde los capilares al corazón<sup>19</sup>.

Todo el aparato circulatorio tiene una estructura básica común:

- Un revestimiento interno, la túnica íntima, formado por una única capa de células epiteliales extraordinariamente aplanadas llamadas endotelio, apoyadas en una membrana basal y un delicado tejido conjuntivo.
- Una capa intermedia principalmente muscular, la túnica media.
- Una capa externa de tejido de sostén llamada túnica adventicia.

En los vasos de mayor calibre, la túnica media está formada, entre otras cosas, por células musculares lisas. Estas células musculares lisas, expresan actina muscular en su citoplasma y son identificadas inmunocitoquímicamente mediante el anticuerpo anti-alfa SMA<sup>20</sup>. Estas células musculares lisas se relacionan también con la pared externa de arteriolas y vénulas.



Los capilares conforman una red vascular de menor calibre, no presentan capa muscular ni adventicia. Morfológicamente existen tres tipos de capilares: capilares continuos, capilares fenestrados y capilares discontinuos o sinusoidales. En algunos capilares continuos y vénulas postcapilares, el endotelio puede estar relacionado con pericitos. Estos pericitos se relacionan con el endotelio íntimamente y están rodeados por una lámina basal que es continua con la del endotelio. Los pericitos tienen propiedades contráctiles, expresan actina muscular en su citoplasma y proporcionan soporte y estabilidad al endotelio.

En la pulpa dental adulta y embrionaria existe una compleja red vascular, en donde podemos encontrar diferentes clases de capilares dependiendo de su estado embrionario, los capilares continuos se encuentran cercanos a los odontoblastos durante la formación temprana del diente (inicio de dentinogénesis). Con la expresión activa de la dentina primaria, los capilares continuos son reemplazados por capilares fenestrados, los que forman una red densa adyacente a la capa odontoblastica<sup>21</sup>. Cuando la morfogénesis dentaria está casi completa los capilares fenestrados permanecen en una posición interodontoblástica, cerca de la predentina. Los capilares continuos se localizan finalmente en un plexo vascular subodontobástico<sup>21</sup>.

Estudios celulares e inmunocitoquímicos de alta resolución han determinado que los pericitos expresan la proteína CD 146, sugiriéndose que células perivasculares se pueden comportar como poblaciones totipotenciales con capacidad de diferenciación<sup>22-23</sup>.

Considerando que la pulpa dental y los tejidos periapicales son tejidos conectivos de origen ectomesenquimático, sería importante conocer si las células que expresan algún marcador molecular de CM presentan también un fenotipo miofibroblástico, que permita explicar el comportamiento normal y patológico de la región.

## **HIPÓTESIS**

Las células madre de la papila apical y pulpa dental de dientes con formación radicular incompleta presentan un fenotipo miofibroblástico.

## **OBJETIVO GENERAL**

1. Determinar el fenotipo miofibroblástico de las células madre de la papila apical y pulpa dental de dientes con formación radicular incompleta

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Observar la distribución tisular de las células que expresan la proteína CD146 en dientes con formación radicular incompleta, mediante técnicas inmunohistóquímicas
2. Observar la distribución tisular de las células que expresan alfa-SMA en dientes con formación radicular incompleta, mediante técnicas inmunohistóquímicas
3. Colocalizar la expresión de alfa-SMA y CD146 en dientes con formación radicular incompleta, mediante técnicas inmunohistóquímicas

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **1. Selección de la muestra**

Del archivo de muestras del Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae, se seleccionarán 20 premolares humanos sanos y con formación radicular incompleta e incluidos en parafina histológica. Los especímenes fueron obtenidos anónimamente en el Servicio Dental de Urgencias del Hospital Roberto del Río entre los años 1990 y 2000. Los especímenes seleccionados deberán estar libres de caries y presentar formación radicular incompleta a la inspección histológica con técnica de H&E.

Como control positivo se utilizarán cortes histológicos de cordón umbilical y de melanomas orales<sup>19</sup> obtenidos desde el Archivo del Servicio de Anatomía Patológica e Histopatología de la Facultad de Odontología de la Universidad Mayor (Prof.Dr. Benjamín Martínez).

Las muestras antiguas de tejidos humanos obtenidos anónimamente e incluidos en parafina en la mayor parte de los archivos anatomopatológicos del mundo carecen de documentación de consentimiento informado para actividades de investigación y no existe consenso ni regulaciones específicas para el uso de cortes de tejidos incluidos en parafina en los distintos países del orbe<sup>24</sup>.

## **2. Localización inmunohistoquímica de CD-146 y actina muscular (alfa-SMA)<sup>25</sup>**

Se realizarán cortes longitudinales de 6  $\mu\text{m}$  de cada espécimen seleccionado los que se montarán en portaobjetos silanizados

Los cortes se tratarán con pepsina al 0,4% en HCL 0.1 N durante 30 min a 37°C. Luego de lavados sucesivos en agua corriente y PBS (buffer fosfato salino). Los cortes de todos los especímenes se incubaran en suero de cabra no inmune al 5% durante 30 min para bloquear los sitios inespecíficos.

Posteriormente un corte de cada espécimen se incubará en un anticuerpo policlonal de cabra anti CD-146 (R&D Systems, USA) en una concentración 1:100. Un corte consecutivo de cada espécimen se incubará en un anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina muscular (alfa-SMA) (Sigma Chemicals, USA) en una concentración de 1:800. Ambos anticuerpos se incubaran durante 12 horas a 4 °C en cámara húmeda

La reacción antígeno anticuerpo se realizará mediante el sistema biotina-streptavidina-peroxidasa o mediante un anticuerpo especie-específico conjugado con FITC para el caso de actina muscular o TRITC para el caso de CD-146.

Los núcleos celulares serán contrastados con hematoxilina de Mayer en la técnica de inmunoperoxidasa o con Hoetchst 33258 en la técnica de inmunofluorescencia.

La colocalización de ambos epitopos se realizará mediante una inmunofluorescencia doble, en la cual el mismo corte se incubará con ambos anticuerpos de acuerdo con lo expresado anteriormente.

Las técnicas de inmunohistoquímica se realizarán de acuerdo con los métodos reportados por Oyarzún y col<sup>25</sup>.

### **3. Microscopía**

Los tejidos inmunomarcados serán observados en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiostar (Germany) y fotografiados con una cámara digital enfriada Qimaging Micropublisher, las imágenes se guardarán como archivos JPEG o TIFF.

## **RESULTADOS**

### **1. Localización inmunohistoquímica de CD1456 y Alfa-SMA**

#### **A) Inmunoperoxidasa**

Se observa que para ambos epitopos la reacción inmunohistoquímica se aprecia como un precipitado café amarillento en el espesor de los tejidos.

Con bajos aumentos se observa que la reacción inmunohistoquímica se detecta asociada a estructuras con vasos sanguíneos de diverso calibre, tanto en la pulpa como en la papila. (Ver fig. 1 a) Con alto aumento se observa que la proteína CD146 se relaciona con células endoteliales de capilares en el seno de la pulpa dental y con capilares en el plexo subodontoblastico. (Ver fig. 2 a)

La inmunoreacción anti alfa-Sma se detecta solamente asociada a vasos sanguíneos de mayor calibre, presumiblemente vénulas o arteriolas (Ver fig. 1b), no se aprecia inmunoreacción asociada con capilares de la pulpa dental ni del plexo odontoblastico. Con mayores aumentos se observa inmunopositividad en

células que rodean el endotelio vascular, por lo que las células endoteliales son negativas a la inmunoreacción. (Ver fig. 2b)

Con mayores aumentos se observa con nitidez la inmunoreacción que detecta la proteína CD146 se asocia con capilares y vasos sanguíneos de mayor calibre en papila y pulpa dentaria, en cambio la actina muscular sólo se asocia a vasos sanguíneos de mayor calibre.

## **B) Inmunofluorescencia indirecta**

Con la técnica de inmunofluorescencia indirecta se observa que, la proteína CD146 se expresa como áreas color rojo (Ver fig. 4 a, 4 c, 6 a, 6 c) y la actina muscular se observa como áreas de color verde. (Ver fig. 5 a, 5 c, 7 a, 7 c, 8 a, 8 c).

La proteína CD146 se observa estrechamente vinculada con los capilares de la pulpa dental y plexo subodontoblastico (Ver fig. 4 a, y 4 c), así como en relación al endotelio de vénulas y arteriolas de la papila y pulpa dental (no mostrado)

La actina muscular se expresa asociada a vasos sanguíneos de gran calibre en la papila dental (Ver fig. 5 a y 5 c) y de la pulpa dental (no mostrado).

Una observación importante es que la inmunoreacción no se observa relacionada con el endotelio vascular.

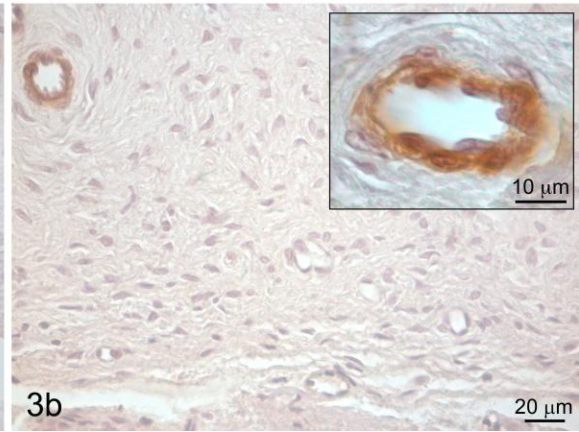
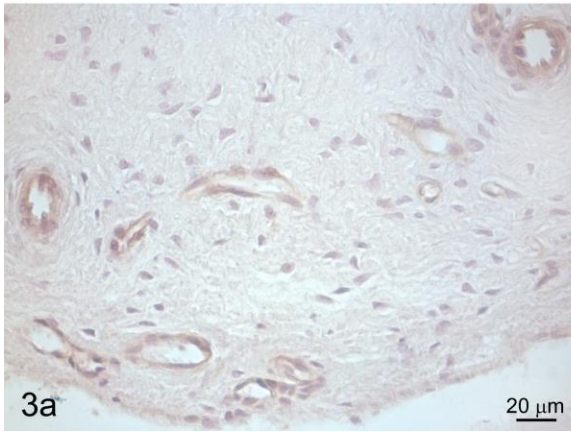
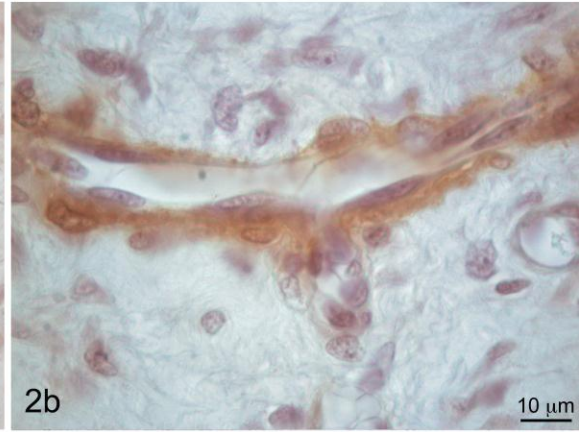
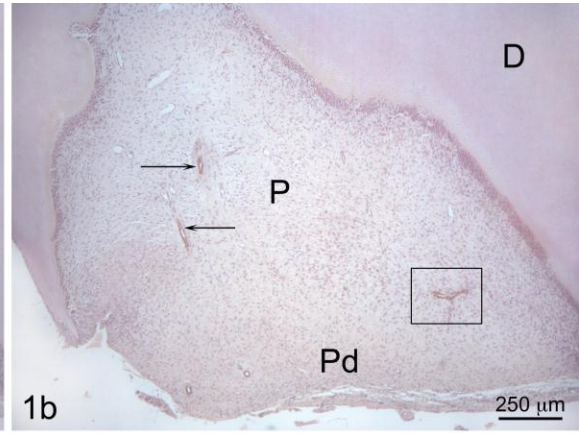
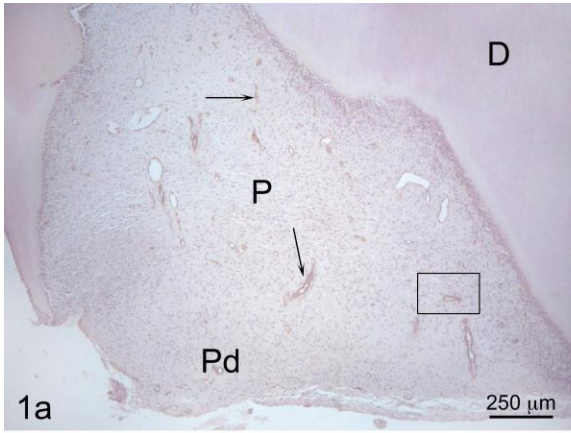
En el cordón umbilical la inmunoreaccion se expresa fuertemente en todas las células musculares lisas que componen la túnica media (Ver fig. 7 a, 7 c, 8 a, 8 c)

Con mayores aumentos se pudo identificar que el endotelio de vena y la arteria umbilicales son negativos a la inmunofluorescencia indirecta anti alfa SMA (Ver fig. 8 a y 8 c).

### **C) Inmunoperoxidasa (Controles)**

En las muestras control positivo de melanoma bucal se observa un aumento de la inmunoreacción asociada a anti CD146 asociadas con células melánicas infiltrantes en el espesor del tejido conectivo (Ver fig. 9 a)

La especificidad de la inmunoreaccion se pone de manifiesto en las muestras control negativo en las cuales no se evidencia reacción color café.





## **Leyenda de Figuras**

### **Lámina 1**

#### **Fig 1 a**

Inmunoperoxidasa. Anti CD146

En esta fotografía con bajos aumentos se observa inmunopositividad en los vasos sanguíneos de la pulpa dental como de la papila dental (flechas). D: dentina; P: pulpa; Pd: papila dental

#### **Fig 1b**

Inmunoperoxidasa anti alfa SMA.

En esta fotografía con bajos aumento se observa inmunopositividad sólo en vasos sanguíneos de mayor calibre tanto de la pulpa dental como de la papila dental (flecha) D: dentina; P: pulpa; Pd: papila dental

#### **Fig. 2 a**

Inmunoperoxidasa, anti CD146

Obsérvese un mayor aumento del recuadro mostrado en la fig 1a en la cual las células endoteliales manifiestan una inmunoreacción evidente de color café amarillento

### **Fig. 2 b**

Inmunoperoxidasa anti alfa SMA

Se observa un mayor aumento del recuadro mostrado en la fig1b, la inmunoreaccion es evidente en las poblaciones celulares que rodean el endotelio vascular, las células endoteliales son negativas a la inmunoreacción.

### **Fig. 3 a**

Inmunoperoxidasa anti CD 146

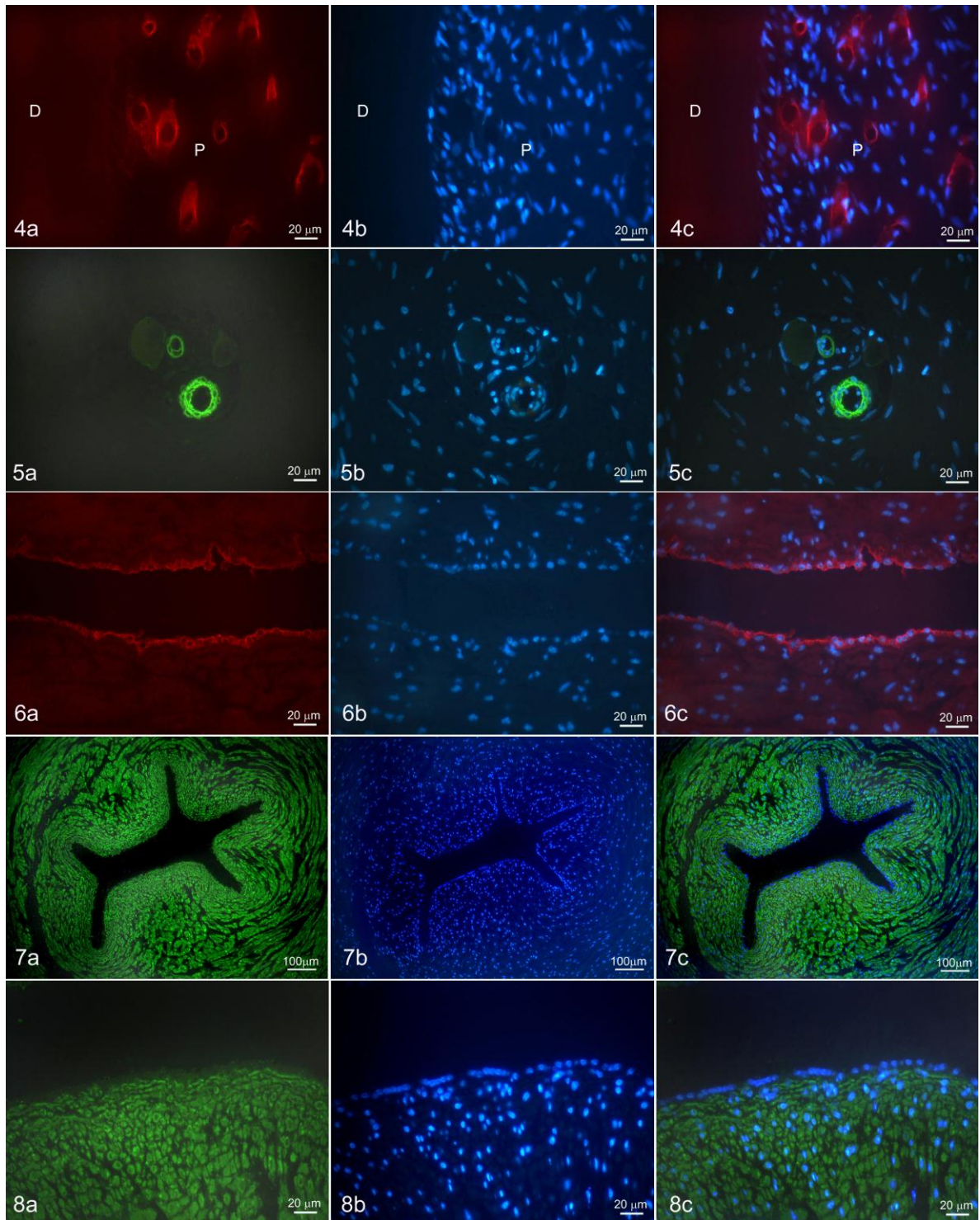
En esta fotografía con aumentos intermedios se observa que todas las células endoteliales de los capilares sanguíneos de la papila dental presentan una inmunoreacción débil

### **Fig. 3 b**

Inmunoperoxidasa anti alfa SMA.

En esta fotografía con aumentos intermedios se observa que solo los vasos sanguíneos en la papila dental, de mayor calibre presentan inmunoreacción positiva en las células que rodean el endotelio vascular.

El recuadro muestra con mayor aumento un vaso sanguíneo de mayor calibre en el cual el endotelio vascular se observa negativo a la inmunoreacción y las células periféricas a éste muestran una marcada inmunoreactividad



## **Leyenda de Figuras**

### **Lámina 2**

#### **Fig. 4 a, 4 b, 4 c**

Inmunofluorescencia indirecta anti CD146

Obsérvese con aumento mediano una inmunoreacción marcada de color rojo en el endotelio vascular asociado a los odontoblastos y pulpa dental. En la fig. 4 b se observa los núcleos celulares contrastados con Hoetchst, en la fig. 4 c, se observa la superposición de las imágenes 4 a y 4 b

#### **Fig. 5 a, 5 b, 5 c**

Inmunofluorescencia indirecta anti alfa SMA

Observase con aumento mediano una inmunoreacción marcada de color verde en vaso sanguíneo de mayor calibre en el espesor de la pulpa o de la papila dental. Fig. 5 b se observa los núcleos celulares contrastados con Hoestsh, en la fig. 5 c, se observa la superposición de las imágenes 5 a y 5 b

#### **Fig. 6 a, 6 b, 6 c**

Inmunofluorescencia indirecta anti CD 146. Cordón umbilical

Fig. 6 a se observa nítidamente que el epitopo estudiado se distribuye exclusivamente en el endotelio vascular de la arteria umbilical. Las células musculares lisas de la túnica media son negativas a la inmunoreacción, en la fig. 6 c se observa la superposición de las imágenes 6 a y 6 b

### **Fig. 7 a, 7 b, 7 c**

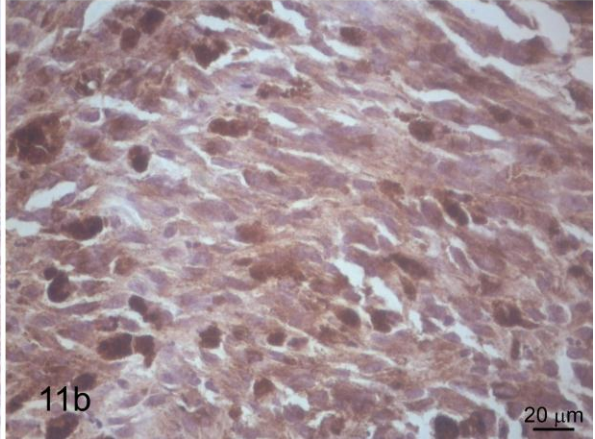
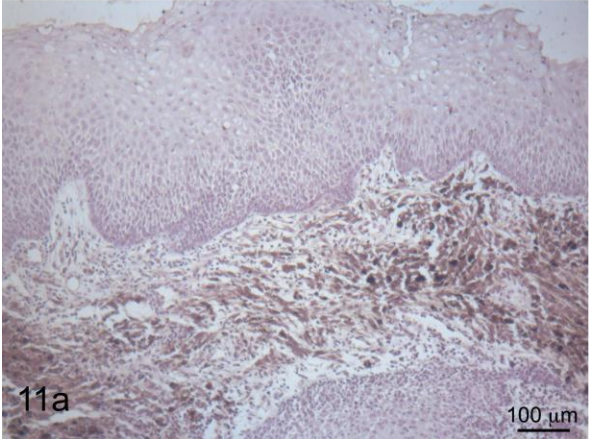
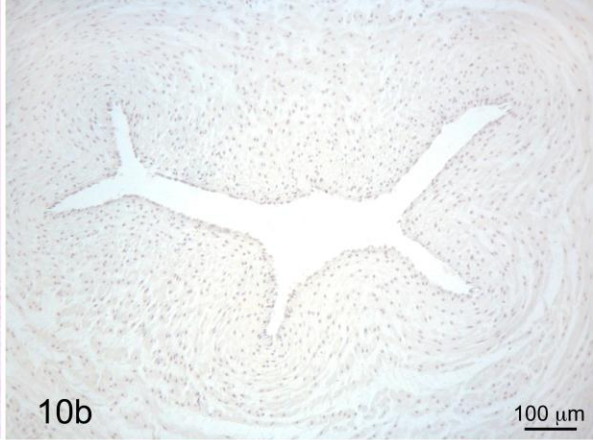
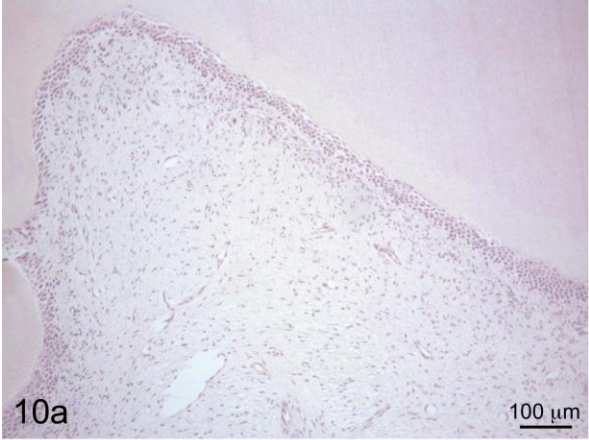
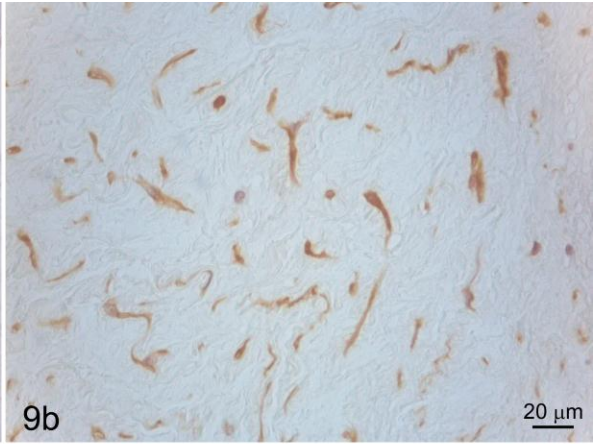
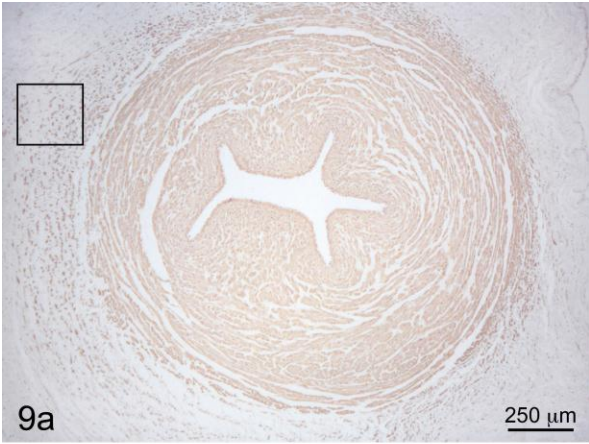
Inmunofluorescencia indirecta anti alfa SMA

En la fig. 7 a se observa con bajo aumento en lumen y la túnica media de la arteria umbilical, nótese una inmunoreacción evidente en las células musculares lisas de la túnica media. Fig. 7 b se observa los núcleos celulares contrastados con Hoetchst, en la fig. 7 c se observa la superposición de las imágenes 7 a y 7 b

### **Fig. 8 a, 8 b, 8 c**

Inmunofluorescencia indirecta anti alfa SMA

En la fig. 8 a se observa con aumento intermedio que el endotelio vascular es completamente negativo a la inmunoreaccion. El anticuerpo utilizado reacciona sólo con las células musculares lisas de la túnica media de la arteria umbilical. Fig. 8 b se observa los núcleos celulares contrastados con Hoetchst, en la fig. 8 c se observa la superposición de las imágenes 8 a y 8 b.



## Leyenda de Figuras

### Lámina 3

#### **Fig. 9 a**

Inmunoperoxidasa anti alfa SMA. Cordón umbilical

Nótese inmunopositividad en la túnica media de la arteria umbilical.

#### **Fig. 9b**

Esta fotografía corresponde al recuadro mostrado en la fig 9 a, en él se observan células de la gelatina de wharton de aspecto estrellado o fusiforme que presenta una inmunoreactividad evidente.

#### **Fig. 10 a y 10 b.**

Control negativo.

La omisión del anticuerpo primario permitió observar la ausencia total de inmunoreacción en la pulpa dental (fig. 10 a) y en el cordón umbilical (fig. 10 b)

#### **Fig. 11 a**

Inmunoperoxidasa. Control positivo. Melanoma

Nótese una inmunoreactividad evidente en tejido conectivo subepitelial de la lesión.

**Fig. 11 b**

Obsérvese una zona con mayor aumento de las células melánicas en el espesor del tejido conectivo con una inmunoreacción profusa y que dificulta la observación del núcleo celular



## DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación se relaciona con la localización del antígeno CD146 en la pulpa y papila dental, de dientes humanos con formación radicular incompleta, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Por otra parte se localiza la expresión de actina muscular (Alfa Sma) con el propósito de estudiar, si las células que expresan la proteína CD146 son CM que presentan un fenotipo mioblástico o miofibroblástico<sup>26</sup>.

La literatura odontológica ha reportado la presencia de CM en distintos tejidos provenientes de odontones humanos y de animales experimentales. Es así como, estas células madre han sido identificadas como:

- Células Madre de la papila apical en dientes con formación radicular incompleta (SCAP)<sup>27-14-28</sup>
- Células Madre de pulpa de dientes temporales en exfoliación (SHED)<sup>14-28-29</sup>
- Células Madre de pulpa de dientes permanentes (DPSC)<sup>28-27-29</sup>
- Células Madre asociadas al ligamento periodontal (PDLSC)<sup>28-29</sup>

Dentro de los marcadores de CM que se han utilizado para caracterizar células totipotenciales en tejidos dentales podemos mencionar a las proteínas CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD146, CD29 y STRO-1,<sup>17</sup>. De éstos marcadores, STRO-1, CD271 y CD146, son los que han recibido gran atención por la comunidad científica<sup>30</sup>.

La proteína CD146 que también es conocida como molécula de adhesión de melanoma, es un marcador molecular que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas<sup>31</sup>. Es una proteína clave para la adhesión celular de células endoteliales y fenómenos de angiogénesis<sup>32</sup>. El antígeno CD146 es uno de los

marcadores celulares más promisorios para la identificación de CM mesenquimales en los tejidos. Además identifica CM mesenquimales con capacidad secundaria para hematopoyesis<sup>30</sup>.

Estudios previos indican que el CD146 es un buen marcador para identificar CM mesenquimales, expresándose en todos los tipos de células endoteliales humanas. Desde una perspectiva odontológica existen reportes que relacionan la expresión de CD146 con DPSC<sup>17-29</sup>.

Estudios realizados mediante cultivos celulares, citometría de flujo e inmunohistoquímica de tejidos demostraron que, la proteína CD146 se distribuye en relación con los vasos sanguíneos de la papila y pulpa dental, sugiriendo que, las CM en éstos tejidos están en la pared de los vasos sanguíneos. Nuestras observaciones en las cuales la proteína CD146 se localiza en los capilares sanguíneos de la pulpa dental y en el endotelio de vénulas y arteriolas están en concordancia con observaciones preliminares<sup>31-32</sup>

Por otra parte, utilizamos alfa-SMA, una proteína del citoesqueleto que se localiza en las células del músculo liso vascular y pericitos<sup>33</sup>, así como algunas células madre<sup>34</sup>. Esta proteína es también conocida como un marcador de miofibroblastos, que se encuentran en diversos tejidos durante la reparación de heridas y la regeneración de lesiones<sup>35</sup>.

V.A Farias *et al*<sup>8</sup> Reportaron que las CM de la gelatina de Wharthon expresa actina muscular específica en su citoplasma lo que le confiere a estas células un fenotipo miofibroblástico. En nuestro estudio, el anticuerpo anti alfa-SMA utilizado reacciona positivamente con las células de la gelatina de Wharthon del cordón umbilical utilizado como control positivo. Además el anticuerpo reacciona positivamente con las células musculares lisas de la túnica media de la arteria y vena umbilical.

En nuestro estudio a través de inmunofluorescencia indirecta pudimos detectar que no existe la colocalización entre el antígeno CD146 y Alfa-Sma, ya

que el primer epitopo lo encontramos en el endotelio de vasos de la papila y la pulpa dental, y el segundo lo encontramos en las células que rodean al endotelio en vasos de mayor calibre como las vénulas y arteriolas.

## **CONCLUSIÓN**

No existe colocación de los epítomos estudiados, lo que revela que las CM de la papila y pulpa dental no presentan fenotipo miofibroblástico en condiciones de normalidad

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mayani HA. Glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concept, and clinical relevance. *Arch med res.* 2003; 34(1):3-15.
2. Flores–Figuroa F, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev. invest. clín.* 2006; 58(5):498-511.
3. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts and assays. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(4):313–319.
4. Prósper F, Gaviria JJ, Herreros J, Rábago G, Luguin R, Moreno J et al. Cell transplant and regenerative therapy with stem cells. *Anales Sis San Navarra.* 2006; 29(2):219-34.
5. Mena R, Fernández N, Garmendía F. Use of regenerative medicine for the treatment of the carpal tunnel syndrome. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2011; 27(3):309-314.
6. Bourin P, Gadelorge M, Peyrafitte J, Fleury-Cappellesso S, Gomez M, Rage C. Mesenchymal Progenitor Cells: Tissue Origin, Isolation and Culture. *Transfus Med Hemother.* 2008; 35(3): 160–167.
7. Hernández P, Dorticós E. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana Hematología.* 2004; 20(3):30-36
8. Farias VA, Linares-Fernández JL, Peñalver JL, Payá Colmenero JA, Ferrón GO, Duran EL et al. Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. *Placenta.* 2011; 32(1):86-95.

9. Ramos C, Becerril C, Cisneros-lira J, Montaña. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex].* 2004; 17(3):215-231.
10. Gutiérrez-Ventura F. Stem cells in dentistry: reality or illusion. *Rev Estomatol Herediana.* 2014; 24(2):61-2.
11. Brizuela CC, Galleguillos GS, Carrión AF, Cabrera PC, Luz CP, Inostroza SC. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Dental Pulp and Follicle. *Int. J. Morphol.* 2013; 31(2):739-746.
12. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, W. Fisher L, Gehron P et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS.* 2002; 100(10): 5807–5812.
13. Yao L, Li-Hong S, Ming Y, Wen-Yong D, Jun-Jun L, Guang-Dong Z et al. Adult stem cell-based apexogenesis. *World J Methodol.* 2014; 4(2):99-108.
14. Hoon Chung J, Hoon Choung P , Lim K, Choung Jong H. Scaffolds for Human Dental Stem Cells to Regenerate Cementum. En: Jong HC et al. *Stem Cells and Cancer Stem Cells.* M.A. Hayat. South Korea: Springer Science+Business Media; 2012. pp.161-170.
15. Betancourt E, Barciela J, Guerra J, Cabrera N. Uso de células madre en el complejo bucofacial. *AMC.* 2012; 16(5): 651-661.
16. Wang Y, Yan M, Wang Z, Wua J, Wang Z. Dental pulp stem cells from traumatically exposed pulps exhibited an enhanced osteogenic potential and weakened odontogenic capacity. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(11):1709-1717.

17. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration?. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(11):1439-1458.
18. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Comparative characterization of STRO-1neg/CD146pos and STRO-1pos/CD146pos apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(10):1556-1568.
19. Ross M, Wojciech P. *Histology: A text and atlas, with correlated Cell and Molecular Biology.* 6<sup>th</sup>. ed . Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2010.
20. Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Yoshida K, Yoshida N, Nakaya H et al. Immunohistochemical Localization of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin During Rat Molar Tooth Development. *JHC.*2006; 54(12): 1371–1378
21. Yoshida S, Ohshima H. Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts. *Anat Rec.* 1996; 245(2):313-326.
22. Crisan M, Corselli M, Chen W, Peault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16(12):2851-2860.
23. James A, Zara J, Zhang X, Askarinam A, Goyal R, Chiang M. Perivascular Stem Cells: A Prospectively purified Mesenchymal Stem Cell Population for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1(6):510-519.
24. Catherine M, Evers D, Mason J. Regulatory and ethical issues on the utilization of FFPE tissues in research. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues.* Fahd Al-Mulla. Kuwait: Humana Press; 2011.

25. Oyarzún A, Rathkamp H, Dreyer E. Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of the effects of phosphoric acid etching on dentin proteoglycans. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(6):546-554.
26. Claudia BC, Sussy GG, Flavio CA, Carolina CP, Patricia LC, Carolina IS. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Dental Pulp and Follicle. *Int. J. Morphol.* 2013; 31(2):739-746.
27. Chen k, Xiong H, Huang Y, Liu C. Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs). *Arch Oral Biol.* 2013; 58(8):997-1006.
28. Li Y, Shu LH, Yan M, Dai WY, Li JJ, Zhang GD. Adult stem cell-based apexogenesis. *World J Methodol.* 2014; 4(2):99-108.
29. Kenia BG, Julio BC, Julio GM, Nereyda CC. Uso de células madre en el complejo bucofacial. *AMC.* 2012; 16(5): 651-661.
30. Feng J, Rocky T, Kenneth C, Leung V. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2014; 32(6):1408–1419.
31. Crisan M, Solomon Y, Casteilla L, Chen C, Corselli M et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell.* 2008; 3:301-313.
32. Yildirim S. *Dental pulp Stem Cells.* Turkey: Springer; 2013.
33. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in



tumors. Am J Pathol.2002; 160(3):985–1000.

34. Kinner B, Zaleskas JM, Spector M. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. Exp Cell Res. 2002; 278(1):72–83.

35. Chaponnier C, Gabbiani G Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. J Pathol. 2004;204(4):386–395.