

## BIOADHESIVIDAD CELULAR IN VITRO.

## CELLULAR BIOADHESIVITY IN VITRO.

Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología  
Facultad de Odontología - UNLP  
Calle 50 e/ Av. 1 y 115 La Plata (1900). Bs. As. Argentina.  
karinamayocchi@hotmail.com  
Financiamiento: Universidad Nacional de La Plata

• Merino G; Mayocchi K; Blasetti N; Mayocchi M; Echeverría N; De Vita L; Darrigran L. •

**RESUMEN** Los cultivos 2D presentan limitaciones en su capacidad de simular lo que sucede *in vivo*. En la ingeniería de tejidos, se necesita afianzar la adhesividad y proliferación celular. El objetivo de este trabajo fue estudiar la adhesión *in vitro* de las células madre en cultivo 2D y la reorganización celular mediada por matriz extracelular. Se extrajeron pulpas de terceros molares con indicación de exodoncia, según protocolo del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología y Comité de Bioética. Los explantes obtenidos se cultivaron en condiciones estándar, que las células alcanzaron un 80% de confluencia. Se realizó el conteo de células y se determinó la proliferación celular a partir del tercer subcultivo. Los cultivos seleccionados fueron fijados con metanol y coloreados con HE. El análisis morfológico fue efectuado mediante microscopio invertido de contraste de fases (Leica DM IL LED). Las Células Madre Pulpares aisladas mostraron un óptimo crecimiento. Se observó morfología típica de fibroblastos fusiformes. En algunos subcultivos, se observó la presencia de agregados celulares y mostraron cambios morfológicos sugerentes a posible diferenciación espontánea. Zonas de matriz extracelular se observó en subcultivos de los últimos pasajes. Coincidimos con otros autores sobre la diferenciación espontánea de las Células Madre Pulpares sin añadir un medio inductor, siendo la bioadhesividad el factor primordial.

**Palabras clave:** CULTIVOS - BIOADHESIVIDAD - MORFOLOGÍA

**SUMMARY** 2D cultures have limitations in their ability to simulate what happens *in vivo*. In tissue engineering, it is necessary to strengthen cell adhesiveness and proliferation. The objective of this work was to study the *in vitro* adhesion of stem cells in 2D culture and cell reorganization mediated by extracellular matrix. Pulpas were extracted from third molars with indication for extraction, according to the protocol of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology and the Bioethics Committee. The obtained explants were cultured under standard conditions, that the cells reached 80% confluence. Cells were counted and cell proliferation was determined from the third subculture. The selected cultures were fixed with methanol and stained with HE. Morphological analysis was carried out using an inverted phase contrast microscope (Leica DM IL LED). Isolated Pulp Stem Cells showed optimal growth. Typical morphology of spindle fibroblasts was observed. In some subcultures, the presence of cell aggregates was observed and they showed morphological changes suggestive of possible spontaneous differentiation. Extracellular matrix areas were observed in subcultures of the last passages. We agree with other authors on the spontaneous differentiation of Pulp Stem Cells without adding an inducing medium, being bioadhesiveness the primary factor.

**Palabras clave:** CULTURES - BIOADHESIVENESS - MORPHOLOGY

## INTRODUCCIÓN

El cultivo celular es la herramienta básica que se utiliza en biología celular. Se utiliza para investigación básica, en la industria, en estudios clínicos y en terapias avanzadas. La evolución de las técnicas de cultivo ha llevado a tener cultivos celulares más productivos, de alta calidad y con alto rendimiento. Sin embargo, los cultivos clásicos en dos dimensiones (cultivos 2D), presentan limitaciones en cuanto a su capacidad de simular lo que sucede *in vivo* (1). Los cultivos celulares, en general, se han clasificado como adherentes o en suspensión. La adherencia hace referencia a la necesidad de unión de las células a un sustrato para su supervivencia y multiplicación. En cuanto al cultivo de células adherentes, siempre se ha considerado en dos dimensiones, es decir, en monocapas de células adheridas a una superficie de crecimiento, donde las células adheridas se distribuyen de forma más compleja. La mayoría de los cultivos 2D son dependientes del sustrato, y necesitan un anclaje para sobrevivir. Tanto las células primarias como las líneas celulares inmortalizadas se han cultivado durante décadas en soportes plásticos de poliestireno en los que las células crecen formando adherencias focales (3). Un requisito para el cultivo eficiente de células *in vitro* es que el ambiente de cada tipo celular correspondiente se imite lo más exactamente posible. Para las células en cultivo, la superficie del recipiente de cultivo desempeña un papel esencial, ya que muchos tipos de células sólo pueden sobrevivir, crecer y diferenciarse después de adherirse con éxito. En la ingeniería de tejidos, se aplican principios biológicos, físicos y químicos para la restauración, reparación y regeneración de tejidos vivos utilizando biomateriales, células y señalizadores (3,4). Para obtener una regeneración tisular sobre un andamiaje, se necesita afianzar la adhesividad y proliferación celular. Las integrinas son receptores encargados de la adherencia celular y los proteoglicanos producidos por las células actúan como correceptores para la formación de matriz extracelular. Las técnicas de cultivo celular en 3D surgen como una apuesta por reflejar con mayor fidelidad lo que está ocurriendo *in vivo* y obtener resultados que lo simulen con mayor fidelidad (1,6). Las células se comportan estructural y funcionalmente de forma diferente cuando están sembradas en sustrato 2D que cuando están sembradas en una capa gruesa de moléculas poliméricas en 3D, que imita más fielmente su ambiente natural. Los cultivos en 3D muestran mayor grado de complejidad y de homeostasis estructural, de forma análoga a lo que ocurre en tejidos y órganos. Crecen en microambientes tridimensionales (3D) en los que la perfusión de entrada de nutrientes y salida de desechos es continua. El uso de cultivos 3D con una organización espacial concreta es imprescindible para la creación de estructuras tisulares complejas a cierta escala. El cultivo en 3D es más heterogéneo. Y se han desarrollado diferentes estructuras o tipos de cultivos como la agregación, el cultivo en esferas, los cultivos en hidrogel, los biorreactores rotantes con agregados celulares o microcarriers o los cultivos organotípicos. Cada tipo de cultivo difiere en términos de dispersión celular y capacidad de preservar la función tisular. Los cultivos 3D van a ser fundamentales para entender las interacciones y el comportamiento de las células. (1,6) En la mayoría de los cultivos en 3D se utilizan células disociadas que se reorganizan en función del tipo celular, el medio de cultivo y su capacidad de adherencia. Los cultivos organotípicos son, básicamente, láminas de tejido en las que se mantiene la estructura y se preservan las interconexiones en el plano de corte. Los cultivos agregados o en esferas son buenos modelos para el

estudio de las interacciones célula-célula, a pesar de las limitaciones en el control de los componentes extracelulares y de la distribución de nutrientes. Mientras que los organotípicos son más empleados como modelos tisulares dada su estructura. La hipótesis de este trabajo es que las CM adheridas pueden producir matriz extracelular por un proceso de diferenciación espontánea sin la presencia de señalizadores cuando deja de ser cultivo monocapa (2D) y se reorganiza en agregados celulares (3D).

### OBJETIVO

- *Estudiar la adhesión in vitro de las células madre en cultivo 2D y la reorganización celular mediada por matriz extracelular.*

### MATERIAL Y MÉTODO

Se extrajeron pulpas de terceros molares con indicación de exodoncia, según protocolo del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología (LBMB) y Comité de Bioética. Los explantes obtenidos se cultivaron en placas de Petri de 9 cm<sup>2</sup> en condiciones estándar de cultivo, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio fue renovado cada 5 días hasta que las células alcanzaron un 80% de confluencia. Se realizaron entre 2 y 4 pasajes utilizando tripsina para despegar las células. Una vez obtenidos los cultivos, se realizó el conteo de células y se determinó la proliferación celular a partir del tercer subcultivo. Los cultivos seleccionados fueron fijados con metanol durante 5 min. y se colorearon con HE. El análisis morfológico fue efectuado mediante microscopio invertido de contraste de fases (Leica DM IL LED) acoplado a un sistema de registro fotográfico y MO. Cuando los cultivos en pasaje 2-4 alcanzaron el estado de semiconfluencia, las células fueron resuspendidas y caracterizadas por citometría de flujo (Citometer BD FACSCalibur) para los marcadores CD73, CD90, CD105 y CD146. Para la determinación de la proliferación y adhesividad se utilizaron dos métodos: el conteo de las células en cámaras de Neubauer utilizando el colorante de exclusión Azul Tripiano, y la observación por MO con técnica de HE y su registro fotográfico.

### RESULTADOS

Las Células Madre Pulpares aisladas mostraron un óptimo crecimiento. Se observó la morfológica típica de fibroblastos fusiformes, con finas extensiones citoplasmáticas (A). En algunos subcultivos, además de la gran proliferación celular se observó la presencia de agregados celulares (B) y mostraron algunos cambios morfológicos sugerentes a una posible diferenciación espontánea (C). Zonas de matriz extracelular se observó en subcultivos de los últimos pasajes (D).

## CONCLUSIONES

La obtención de líneas celulares altamente proliferativas permitiría su utilización en la Odontología regenerativa. Coincidimos con otros autores sobre la diferenciación espontánea de las Células Madre Pulpares sin añadir un medio inductor, siendo la bioadhesividad el factor primordial. Las investigaciones sobre biología celular básica se seguirán investigando a partir de cultivos celulares 2D, pero cabe destacar las alternativas 3D, que serían fundamentales para entender las interacciones entre las células y el comportamiento de las mismas en relación a su matriz. Esta proyección permitiría la creación de estructuras tisulares complejas (matrices) y el uso de cultivos 3D con una organización espacial muy concreta para la reingeniería tisular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.24683/pdf>
2. Camejo Suárez, M; Merentes Díaz, E; Establecimiento de cultivo, eficiencia de formación de colonias y proliferación celular de las células Mesenquimales de la pulpa dentaria humana. *Acta Odontológica Venezolana*.20013. Volumen 51, No. 4.
3. Merino, G; Dewey RA; Mayocchi, K; Blasetti, N; Basal R; Butler, T; Paggi, R, Dorati, P; Micinquevich, S. Puesta a Punto del Proceso de Expansión de Células derivadas de Tejidos dentales. *Publicación Informativa y Científica. Ed. Especial. Caicyt-Conicet*.2018. ISNN.1514-6898. Pág. 26-29.
4. Merino, Graciela; Dewey Ricardo A; Mayocchi, Karina; Blasetti; Nahuel; Basal Roxana; Dorati, Pablo; Butler, Teresa; Darrigran, Lucas; De Vita, Lucas -Caracterización morfofuncional de células madre de tejidos dentales en cultivo. *Bioestimulación con láser. Ensayo "IN VITRO". Publicación Informativa y Científica. Ed. Especial. Caicyt-Conicet*.2019. ISNN.1514-6898. Pág. 39-42
5. Vernekar VN, Zapatero JT, Cullen DK. Culturas neuronales tridimensionales. En: Berthiaume F, JR de Morgan, editores. *Métodos en bioingeniería: ingeniería del tejido 3D*. Casa de Artech, Norwood, 2010; págs. 187-204.
6. Hess MW, Pfaller K, HL de Ebner, cerveza B, Hekl D, Seppi T. 3D comparado con el 2.o cultivo celular: Implicaciones para la microscopia de Electrom. En: *Microscopia electrónica de Müller-Reichert T. de los sistemas modelo. Prensa académica (Elsevier)*, 2010; págs. 649-671.

