

## Información Importante

La Universidad Santo Tomas, informa que el (los) autor (res) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea del CRAI-Biblioteca y el respectivo institucional en la página Web de la CRAI-Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nuncios paraíso usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el **artículo 30 §3 la ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decision Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomas informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienable “.**

**Centro de Recursos para el Aprendizaje y la investigación, CRAI-Biblioteca**

**Universidad Santo Tomas, Bucaramanga**

Bucaramanga Diciembre 15 de 2017

Señores:  
BLIOTECAS  
Universidad Santo Tomas  
Bucaramanga.

Estimados Señores

Nosotros Viviana Buitrago, Andrea Bustos, Alexandra Lamprea, Lina Pulido, Jeniffer Sterling No 1.016.016.446, 52.956.981, 52.918.596, 1.016.013.404, 1.017.020.448, autores del trabajo de grado titulado **“COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES AISLADAS DE PAPILA APICAL Y PULPA SANA TRAS INTERCAMBIO DE SUS MEDIOS CONDICIONADOS”**, presentado y aprobado en el año 2017 como requisito para optar al título de **ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**, autorizó al CRAI- Biblioteca de la Universidad Santo Tomas, Bucaramanga para que con fines académicos, muestra al mundo la producción intelectual de la universidad representado en este trabajo de grado, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado a través del catálogo en línea del CRAI-Biblioteca y el repositorio institucional pirticus en la página Web de la CRAI-Biblioteca, así como en las redes d información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Santo Tomas.

Se permite la consulta, reproducción parcial, total o cambio de formato confines de conservación, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tenga finalidad académica, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 §3 la ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “los derechos Morales sobre el trabajo son propiedad de los autores “, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, o embargables e inalienables

Cordialmente,

Viviana Buitrago

Andrea Bustos

Alexandra Lamprea.

C.C. 1.016.016.446

C.C 52.956.981 Bogotá

CC. 52.918.596. Bogotá

[Viviana.buitrago10@gmail.com](mailto:Viviana.buitrago10@gmail.com)

[yuanbuva@hotmail.com](mailto:yuanbuva@hotmail.com)

[alexalamprea1985@gmail.com](mailto:alexalamprea1985@gmail.com)

Lina Pulido

Jeniffer Sterling

CC.1.016013404

C.C.1.017.020.448

[lin\\_dadoc@hotmail.com](mailto:lin_dadoc@hotmail.com)

[jesterbau@hotmail.com](mailto:jesterbau@hotmail.com)

Bucaramanga 15 de Diciembre del 2016

El trabajo de grado, **“COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES AISLADAS DE PAPILA APICAL Y PULPA SANA TRAS INTERCAMBIO DE SUS MEDIOS CONDICIONADOS.”**

Realizado por las Doctoras: Viviana Buitrago, Andrea Bustos, Alexandra Lamprea, Lina Pulido, Jeniffer Steeling; ha sido aprobado como requisito para optar al título de especialistas en Endodoncia.

---

Dr. Cristian Camilo Galindo

MSc Bioquímica

---

Dra. Diana Parra Galvis

Especialista en Epidemiología

Bucaramanga 15 de Diciembre del 2016

SEÑORES

UNIVERSIDAD SANTO TOMAS  
Ciudad

Respetada Señores:

Por medio de la presente nos permitimos presentarle el trabajo de tesis titulado: **“COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES AISLADAS DE PAPILA APICAL Y PULPA SANA TRAS INTERCAMBIO DE SUS MEDIOS CONDICIONADOS.”** Realizado por las Doctoras: Jeimi Viviana Buitrago Ayala, Yury Andrea Bustos Valero, July Alexandra Lamprea Sierra, Lina Marcela Pulido Rangel, Jennifer Sterling Bautista Residentes del Programa de Endodoncia de la Universidad Santo Tomas- Federación Odontológica Colombiana Seccional Bogotá; como requisito para optar el título de especialista en Endodoncia. Dirigido por el Doctor: Cristian Camilo Galindo Universidad Santo Tomas, asesor científico y la Dra. Diana Parra como asesora metodológica.

Atentamente

---

Dr. Cristian Camilo Galindo

---

Dra. Diana Parra

---

Dra. Viviana Buitrago

---

Dra. Andrea Bustos.

---

Dra. Alexandra Lamprea

---

Dra. Lina Pulido

---

Dra. Jeniffer Sterling



**COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES AISLADAS DE  
PAPILA APICAL Y PULPA SANA TRAS INTERCAMBIO DE SUS MEDIOS  
CONDICIONADOS.  
MESENQUIMAL STEM CELLS ISOLATED FROM APICAL PAPILA AND HEALTHY  
PULP AFTER EXCHANGE OF CONDITIONED MEDIA**

**Jeimi Viviana Buitrago Ayala  
Yury Andrea Bustos Valero  
July Alexandra Lamprea Sierra  
Lina Marcela Pulido Rangel  
Jennifer Sterling Bautista**

**Trabajo de grado para optar el título de  
Especialista en Endodoncia**

**Asesor científico  
Dr. Cristian Camilo Galindo**

**Asesor Metodológico  
Dra. Diana Parra Galvis  
Docente Investigación.  
Posgrado Endodoncia**

**Universidad Santo Tomás Bogotá  
Facultad de Odontología  
Posgrado de Endodoncia  
2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestros agradecimientos especiales a Dios, a la universidad la cual nos abrió sus puertas para excelente formación, a su cuerpo de docentes por transmitirnos sus conocimientos.

Y a todas nuestras familias que siempre estuvieron acompañándonos y apoyándonos en este trascurso profesional.

# CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
1.1	Planteamiento del problema.....	10
1.2	Justificación .....	11
<b>2</b>	<b>Marco teórico</b> .....	<b>14</b>
2.1	Células madre de origen dental.....	15
2.2	Células madre de la pulpa (CSPD). .....	15
2.3	Células madre del ligamento periodontal (CMLP) ( <i>Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSC)</i> ).....	17
2.4	Células madre de dientes temporales exfoliados (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED)). .....	17
2.5	Células madre de la papila dental (Stem Cells from the Apical Papilla (SCAP). .....	18
2.6	Células madre del folículo dental (Dental Follicle Precursor Cells (DFPC)).....	18
2.7	Medios de cultivo.....	19
2.8	Obtención y procesamiento de la pulpa.....	22
2.9	Criopreservación .....	23
2.10	Aplicaciones de ingeniería tisular en odontología.....	24
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
3.1	Hipótesis .....	26
3.2	Objetivo General.....	26
3.3	Objetivos específicos .....	26
<b>4</b>	<b>MÉTODO</b> .....	<b>27</b>
4.1	Tipo de estudio.....	27
4.2	Material Objeto De Estudio .....	27
4.3	Muestra .....	27

4.4	Criterios de selección.....	27
4.4.1	Selección del paciente.....	28
4.4.2	Selección del diente.....	28
4.5	Extracción del diente.....	28
4.6	Etapa de laboratorio.....	29
4.6.1	Aislamiento:.....	30
4.6.2	Ensayos de diferenciación.....	31
4.7	Operacionalización de variables.....	34
4.8	Análisis estadístico.....	34
4.9	Aspectos Éticos.....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
6.1	CONCLUSIONES.....	53
6.2	RECOMENDACIONES.....	54
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>55</b>
7.1	ANEXO 1.....	55
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Muestras para intercambio de medios condicionados .....	31
Tabla 2. Variables de estudio .....	34
Tabla 3. Registro de viales y células por vial criopreservadas para los diferentes aislados .....	39
Tabla 4. Muestras para intercambio de medios condicionados .....	40

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía. 1. Pellet o precipitado celular al momento de realizar un pase del aislado 8.....	32
Fotografía. 2. Muestra 8, células de pulpa dental en pase 2. ....	43
Fotografía. 3. Fragmento de pulpa dental migrando, muestra de pulpa 8. ....	44
Fotografía. 4. Diferenciación osteogénica Cultivo de pulpa dental 13.....	46
Fotografía. 5. Diferenciación adipogénica de la muestra 8 de papila apical. ....	47
Fotografía. 6. Diferenciación adipogénica muestra 11 de papila apical .....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Muestras analizadas.....	36
Figura 2. Aislados de papila.....	37
Figura 3. Aislados de pulpa .....	38
Figura 4 Viabilidad de los diferentes aislados durante los primeros pases.....	39
Figura 5. Cinética de crecimiento pulpa 6 cultivo de papila 7.....	40
Figura 6. Cinética de crecimiento pulpa 8 cultivo de papila 8.....	40
Figura 7. Cinética de crecimiento pulpa 13 cultivo de papila 11.....	41
Figura 8. Cinética de crecimiento papila 7 cultivo de pulpa 6.....	41
Figura 9. Cinética de crecimiento papila 8 cultivo de pulpa 8.....	41
Figura 10. Cinética de crecimiento papila 11cultivo de pulpa 13.....	42
Figura 11. Cinética de crecimiento papila 12 cultivo de pulpa 4.....	42
Figura 12. Cinética de crecimiento pulpa 4 cultivo de papila 12.....	42
Figura 13. Porcentaje de viabilidad después de cultivar con medios condicionados .....	43
Figura 14. Expresión del marcador CD105 de Pulpa 13 .....	44
Figura 15. Blanco del marcador CD105 .....	44
Figura 16. Expresión de marcadores CD73 .....	45
Figura 17. Expresión de marcadores CD105 .....	45
Figura 18. Expresión de marcadores CD90 .....	46
Figura 19. Porcentaje de diferenciación hacia osteocitos .....	46
Figura 20. Porcentaje de diferenciación hacia antes y tras intercambio .....	47
Figura 21. Porcentaje de diferenciación hacia osteocitos antes y tras el intercambio .....	48

## COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES AISLADAS DE PAPILA APICAL Y PULPA SANA TRAS INTERCAMBIO DE SUS MEDIOS CONDICIONADOS.

### MESENQUIMAL STEM CELLS ISOLATED FROM APICAL PAPILA AND HEALTHY PULP AFTER EXCHANGE OF CONDITIONED MEDIA

Galindo C<sup>i</sup>  
Buitrago J, Bustos Y, Lamprea J, Pulido L, Sterling J<sup>ii</sup>  
Parra D<sup>iii</sup>.

**Resumen:** La última década ha sido profundamente marcada por los persistentes intentos de utilizar células madre mesenquimales (MSC) expandidas y manipuladas ex vivo, como una herramienta en diferentes tipos de terapia regenerativa. **Objetivo:** Evaluar la proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación tras el intercambio de medios condicionados obtenidos de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares. **Resultados:** Se logró aislar células madre mesenquimales de papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares. Fueron colectadas 37 muestras, 16 (43,3%) fueron de papila y 21 (56,7%) de pulpa. Se observó una tasa de crecimiento del 24,73%. Todos los aislados que crecieron se tardaron en promedio 22,2 días en llegar a confluencia. Se obtuvieron 9 medios condicionados, 4 de papila y 5 de pulpa. El porcentaje de diferenciación hacia osteocitos estuvo entre el 70% y 50% y para adipocitos fue menor al 30%, tras el intercambio. **Conclusiones:** Los resultados del estudio proporcionan pruebas que la pulpa dental de premolares y las papilas provenientes de terceros molares contienen una población de células madre multipotentes. Estas células madre pueden ser aisladas y expandidas in vitro, además, su capacidad de proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación hacia osteocitos varían al ser cultivadas tras el intercambio de medios condicionados respecto a las células no intercambiadas.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales (MSC), medios condicionados, papila, pulpa.

**Abstract:** The last decade has been deeply marked by persistent attempts to use mesenchymal stem cells (MSCs) ex vivo expanded and manipulated, as a tool in different types of regenerative therapy. **Objective:** To evaluate the proliferation, viability and differentiation potential after conditioned media exchange obtained from mesenchymal stem cells isolated from the third molar apical papilla and healthy premolar pulp. **Results:** It was possible to isolate Mesenchymal stem cells from apical papilla of third molars and healthy premolar pulp. 37 samples were collected, 16 (43.3%) were papillae and 21 (56.7%) were pulp. A growth rate of 24.73 was observed. All the isolates that grew took an average of 22.2 days to reach confluence. It was obtained 9 conditioned medias, 4 of papilla and 5 of pulp. The percentage of differentiation towards osteocytes was between 70% and 50% and for adipocytes was less than 30%, after the exchange. **Conclusions:** The results of the study provide evidence that the premolar dental pulp and papilla from third molars contain a population of multipotent stem cells. These stem cells can be isolated and expanded in vitro, in addition, their proliferation, viability and differentiation potential towards osteocytes vary as they are cultivated after the conditioned media Exchange regarding to the non-exchanged cells.

**Key words:** mesenchymal stem cells (MSCs), conditioned media, papilla, pulp.

---

<sup>i</sup> Asesor científico

<sup>ii</sup> Residentes especialización en Endodoncia

<sup>iii</sup> Asesor metodológico



**Resumen:** La última década ha sido profundamente marcada por los persistentes intentos de utilizar células madre mesenquimales (MSC) expandidas y manipuladas ex vivo, como una herramienta en diferentes tipos de terapia regenerativa. **Objetivo:** Evaluar la proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación tras el intercambio de medios condicionados obtenidos de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares. **Resultados:** Se logró aislar células madre mesenquimales de papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares. Fueron colectadas 37 muestras, 16 (43,3%) fueron de papila y 21 (56,7%) de pulpa. Se observó una tasa de crecimiento del 24,73%. Todos los aislados que crecieron se tardaron en promedio 22,2 días en llegar a confluencia. Se obtuvieron 9 medios condicionados, 4 de papila y 5 de pulpa. El porcentaje de diferenciación hacia osteocitos estuvo entre el 70% y 50% y para adipocitos fue menor al 30%, tras el intercambio. **Conclusiones:** Los resultados del estudio proporcionan pruebas que la pulpa dental de premolares y las papilas provenientes de terceros molares contienen una población de células madre multipotentes. Estas células madre pueden ser aisladas y expandidas in vitro, además, su capacidad de proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación hacia osteocitos varían al ser cultivadas tras el intercambio de medios condicionados respecto a las células no intercambiadas.

**Palabras clave:** células madre mesenquimales (MSC), medios condicionados, papila, pulpa.

**Abstract:** The last decade has been deeply marked by persistent attempts to use mesenchymal stem cells (MSCs) ex vivo expanded and manipulated, as a tool in different types of regenerative therapy. **Objective:** To evaluate the proliferation, viability and differentiation potential after conditioned media exchange obtained from mesenchymal stem cells isolated from the third molar apical papilla and healthy premolar pulp. **Results:** It was possible to isolate Mesenchymal stem cells from apical papilla of third molars and healthy premolar pulp. 37 samples were collected, 16 (43.3%) were papillae and 21 (56.7%) were pulp. A growth rate of 24.73 was observed. All the isolates that grew took an average of 22.2 days to reach confluence. It was obtained 9 conditioned media, 4 of papila and 5 of pulp. The percentage of differentiation towards osteocytes was between 70% and 50% and for adipocytes was less than 30%, after the exchange. **Conclusions:** The results of the study provide evidence that the premolar dental pulp and papilla from third molars contain a population of multipotent stem cells. These stem cells can be isolated and expanded in vitro, in addition, their proliferation, viability and differentiation potential towards osteocytes vary as they are cultivated after the conditioned media Exchange regarding to the non-exchanged cells.

**Key words:** mesenchymal stem cells (MSCs), conditioned media, papilla, pulp.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Planteamiento del problema

La última década ha sido profundamente marcada por los persistentes intentos de utilizar células madre mesenquimales (MSC) expandidas y manipuladas *ex vivo*, como una herramienta en diferentes tipos de terapia regenerativa. La mayoría de ellos se han centrado en las enfermedades y lesiones del sistema músculo-esquelético, así como la resolución de problemas de la odontología<sup>1</sup>, como por ejemplo, la recuperación de tejidos periodontales, regeneración dental, reconstrucción de la ATM, reparación de los huesos craneofaciales e incluso la sustitución o regeneración de los tejidos orales (ingeniería del tejido)(1,2).

Las células *stem* son definidas como aquellas que tienen una capacidad de renovación ilimitada o prolongada, pueden reproducirse muchas veces sin diferenciarse, o dar origen a células *stem* de transición con capacidad ilimitada de proliferar, de las cuales pueden derivar una variedad de células altamente diferenciadas. Se conocen como células progenitoras, precursoras o troncales, sin embargo, el termino más ampliamente conocido es células *stem* (3).

Todas las células *stem* pueden crear células especializadas y específicas además, son capaces de dividirse y de renovarse durante extensos períodos de tiempo. Cuando se presenta la creación de células madre especializadas se pueden observar células musculares cardíacas, sanguíneas o nerviosas por medio de un proceso conocido como diferenciación (4).

Las células *stem* mesenquimales (MSC) poseen propiedades inmunosupresoras asociadas a la producción de factores inducibles que inhiben la activación de respuestas efectoras inmunes. Tienen potencial antiinflamatorio e inmunosupresor y su aplicación se ha extendido a la medicina regenerativa, la atención se ha centrado en su mecanismo de acción, en particular porque sus propiedades inmunológicas son transcendentales para su eficacia en la medicina regenerativa (4,5).

Estas células producen y liberan diferentes factores de crecimiento (FC), los cuales permiten que las MSC tengan capacidad de reparación de tejidos no hematopoyéticos. Estos FC son liberados, por medio de un mecanismo paracrino, al medio de cultivo convirtiéndose así en un medio condicionado (MC), o medio de cultivo condicionado, el cual se refiere a un medio de cultivo

que comprende los compuestos secretados por las células que se encuentran en dicho medio pero no las células que los han excretado. Es decir, es el medio que comprende los compuestos secretados por las células al espacio extracelular siendo fundamentalmente proteínas pero no exclusivamente, los cuales pueden ser empleados en tratamientos para promover proliferación de fibroblastos, células epidérmicas y la generación de nuevos vasos sanguíneos, mejorando y acelerando el proceso de cicatrización de una herida, sin embargo, a pesar de las investigaciones dirigidas a determinar combinaciones de citoquinas y factores hematopoyéticos que permitan la expansión *in vitro* de las células madre progenitoras (HSPCs), con el fin de obtener HSPCs en número suficiente para poder afrontar el trasplante con garantías, no se ha logrado la capacidad de implantar y reconstituir la hematopoyesis en el receptor (6,7)

Con lo anterior, se observa que existen numerosos trabajos relacionados con el manejo de células madre al igual que de los medios condicionados, sin embargo, actualmente no se han realizado estudios para analizar los efectos de estos medios condicionados tras su intercambio, de esta manera surge este proyecto investigativo donde se pretende comparar su capacidad de diferenciación esperando aportar alternativas en la regeneración de tejidos en el campo odontológico facilitando y ampliando resultados terapéuticos favorables.

¿Cuál es el comportamiento *de* células *stem* mesenquimales aisladas de la papila apical y pulpa sana tras el intercambio de sus medios condicionados?

## **1.2 Justificación**

Se ha señalado un interés especial en la caracterización de las poblaciones de células madre que se pueden encontrar en la pulpa dental de dientes humanos deciduos exfoliados y papila apical de terceros molares, por el hecho de que se obtienen fácilmente. En lugar de desechar piezas dentales específicas, podrían ser criopreservadas y si es necesario, ser utilizadas para el tratamiento autólogo o alogénico (8).

Los Medios de cultivo para las células *Stem* contienen componentes biológicamente activos obtenidos a partir de células previamente cultivadas que actúan como sustento para estas, las células alimentadoras (*feeders*) más empleadas para el cultivo de las células *Stem* son los Fibroblastos Murinos Embrionarios (MEFs). Estas células liberan nutrientes (Factores de

crecimiento- FC) al medio y forman una monocapa, donde serán colocadas las células para su posterior crecimiento (7).

Los *feeders* no humanos, debido a su alto grado de agentes tóxicos y virus *murinicos* se han ido descartando y se han ido introduciendo sistemas más humanizados donde tanto los *feeders* como el medio condicionado por estos sean de origen humano, como por ejemplo, HEFs (fibroblastos embrionarios humanos). Otros avances son el desarrollo de medios de cultivo sin suero (*serumfree*) y en algún caso sin componentes xenobióticos (*xenofree*) (2)

La búsqueda investigativa por encontrar alternativas en la regeneración de tejidos, ha llevado a ampliar el campo en la odontología dirigiéndose al uso de células *Stem* ya que podrían tener potencial de crecer indefinidamente y diferenciarse en un medio ambiente experimental o de laboratorio en múltiples tipos celulares y/o tejidos. Estas células encierran un enorme potencial terapéutico (7).

Por otra parte, se ha reportado que cuando las células *Stem* se encuentran bajo condiciones micro ambientales adecuadas, pueden diferenciarse en otros tipos de células especializadas, tanto morfológica como funcionalmente, logrando que una población pequeña de células madre pueda en unos meses proliferar hasta dar origen a millones de ejemplares con las mismas características de sus predecesoras (5).

Algunos estudios indican que las células madre de la pulpa dental tienen ventajas sobre otro tipo de células madre humanas o HSCs (derivadas de médula ósea o sangre de cordón umbilical, entre otras) en experimentos *in vivo*, ya que su fuente son los dientes extraídos por indicación terapéutica (usualmente dientes permanentes como terceros molares incluidos o premolares por indicación ortodóntica), lo cual acarrea muy baja morbilidad y mínimas implicaciones éticas (8).

A pesar de los múltiples avances en la ingeniería tisular, no se ha observado la aplicación clínica de las células madre en tratamientos odontológicos, aunque el tema ha sido revisado, en la actualidad existen investigaciones que necesitan ser conocidos por parte del gremio odontológico, por tanto, se espera que en el futuro puedan ser usadas en odontología regenerativa para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades.

El propósito de la investigación fue realizar un proyecto de investigación científica que permita evaluar la capacidad de proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación de las células *stem*

mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares, y así contribuir a la apertura de una nueva línea de investigación a la universidad Santo Tomas para profundizar sobre el estudio de células *stem* mesenquimales y llevar a la generación de un banco de dichas células que permita a la comunidad, realizar proyectos en el campo de la odontología biomédica e ingeniería de tejidos, mediante futuros ensayos.

## 2 MARCO TEÓRICO

Las células madre tienen la habilidad para dividirse constantemente (auto replicarse) o producir células especializadas que pueden diferenciarse en varios tipos de células o tejidos (diferenciación multilínea), dependiendo de su potencialidad, las células madre se clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes.

Totipotentes: son aquellas que en condiciones apropiadas logran formar un individuo completo, pues producen tejido embrionario y extra-embrionario, se derivan de la masa celular interna del blastocisto (7-14 días).

Pluripotentes: son las que se diferencian en tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias originan todos los tipos de células y tejidos del organismo sin lograr por sí mismas generar un organismo nuevo. Multipotentes, son las que pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos (9).

Fueron aisladas por primera vez en aspiraciones de médula ósea. Hoy en día sus marcadores continúan siendo la clave en cuanto al aislamiento de células madre. Puesto que las células mesenquimales y hematopoyéticas comparten marcadores similares, su identificación específica es importante para su aislamiento, siendo el STRO-1, el antígeno más importante para su identificación (7).

Estas células embrioblásticas son denominadas multipotenciales y van a diferenciarse en las distintas líneas de células pluripotenciales, que se multiplicarán a su vez en las estirpes celulares para las que están predeterminadas y que darán lugar a los distintos órganos en el embrión. Algunas células pluripotenciales permanecen en los distintos sistemas del adulto con la función de regeneración específica de la línea celular a que pertenecen (10).

Las células "stem" mesenquimales (CSM) son células adultas multipotentes capaces de autorrenovarse, generar diversas células diferenciadas y sustentar el proceso de la hematopoyesis. Las CSM tienen morfología fibroblastoide, son adherentes *in vitro* y tiene la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos (7).

Las células madre presentan un proceso de diferenciación, regulado por un conjunto de factores transcripcionales; la señalización ejercida por estos factores activa una serie de genes específicos directores de un linaje determinado (10).

Se han identificado cuatro esquemas que explican los posibles mecanismos que llevan a las células madre adultas a diferenciarse a células de un tejido diferente al original en respuesta a cambios del microambiente o procesos de reparación tisular; el primero se refiere a la diferenciación celular en donde la célula progenitora restringida hacia un solo linaje da origen a células de su misma estirpe. El segundo se refiere a la capacidad que tiene las células madre adultas de diferenciarse en progenitores más activos en el ciclo celular que pueden dar origen a su vez a células de linajes celulares diferentes. En el tercer modelo, conocido como trans-diferenciación, las células madre de un tejido particular bajo condiciones de un microambiente diferente al original, generan células de muy diversos linajes. El cuarto esquema se refiere a la capacidad que poseen las células madres de diferenciarse y re-diferenciarse a células del mismo tejido que le dio origen o a un tejido diferente (7).

Dentro de la clasificación de Células Madre Dentales (C.M.D.): Son C.M. que poseen potencial de multidiferenciación y por tanto pertenecen al grupo de C.M. adultas, teniendo la capacidad de formar células con carácter osteo/odontogénico, adipogénico y neurogénico (5).

## **2.1 Células madre de origen dental**

Existen diversos tipos de células madre de origen dental. En el tejido postnatal oral se han identificado 5 grupos principales de células madres en la cavidad bucal, de sus tejidos específicos: Células madre de la pulpa (*Dental Pulp Stem Cells (DPSC)*), Células madre del ligamento periodontal (*Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSC)*), Células madre de dientes temporales exfoliados (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED)*), Células madre de la papila dental (*Stem Cells from the Apical Papilla (SCAP)*) y Células madre del folículo dental (*Dental Follicle Precursor Cells (DFPC)*).

## **2.2 Células madre de la pulpa (CSPD).**

Fueron las primeras células madre dentarias que se aislaron (Gronthos 2000). Debido a la similitud con las células madre de la médula, fue considerada la posibilidad de la existencia de

una comunidad de células multipotenciales en el tejido pulpar de dientes maduros (6). Posteriormente, se les relacionó con características endoteliales y vasculares, hasta años después se aislaron, determinando sus características (6,11).

La producción de CSPD es reducida (1 x 100 de todas las células) y su disponibilidad va reduciéndose conforme avanza la edad. Las más estudiadas han sido las células que provienen de terceros molares y dientes supernumerarios. Se ha registrado que, si son aisladas durante la formación de la corona, las CSPD son más proliferativas que si se aíslan posteriormente. Se ha demostrado que el acceso al lugar donde se encuentran estas células es fácil y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular., sin embargo, el origen y localización exacta de estas células sigue siendo incierto (12).

Estas células poseen una extrema capacidad de regenerar el complejo pulpa-dentina compuesto por una matriz mineralizada con túbulos lineales, con odontoblastos y tejido de contenido fibroso, rico en vasos sanguíneos, con semejante disposición al complejo dentina-pulpa adulto. Por otra parte, las CSPDs son capaces, de expresar marcadores óseos, tales como: sialoproteínas óseas, fosfatasa alcalina, colágeno tipo I y osteocalcina. La diferenciación a esta línea ósea es regulada por la familia osteoreguladora de TGF $\beta$  y las citoquinas. Así existe gran similitud entre la expresibilidad genética de las células madres de pulpas de dientes permanentes y las células madres de estroma medular, precursoras de los osteoblastos (13).

Los terceros molares permanentes son la principal fuente de células madres adultas, extraíbles entre los 15 y 29 años de edad por diferentes razones. Estas células madres tienen la ventaja de ser autógenas y de baja inmunogenicidad. Se ha demostrado que las CSPDs, pueden experimentar adipogénesis, a pesar de que en la pulpa dental estos elementos tisulares no se presentan (11).

Algunos estudios experimentales adelantados en ratas, demostraron la capacidad de diferenciación de las CSPD, donde se observó su potencial terapéutico para la reparación de un infarto de miocardio inducido tras ligadura de las arterias coronarias. Siete días después, estas células fueron inyectadas intramiocárdicamente en los animales y a las 4 semanas, las ratas sometidas a este tratamiento celular mostraron una mejora en su función cardíaca (10).

### **2.3 Células madre del ligamento periodontal (CMLP) (*Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSC)*).**

La presencia de distintos tipos de células en el periodonto sugiere que este tejido contiene las llamadas *PDLSC (Periodontal Ligament Stem Cells)*, células que mantienen la homeostasis y la regeneración del tejido periodontal, por lo cual, la reparación del ligamento periodontal parece involucrar células madres presentes en el mismo para la formación de fibroblastos, cementoblastos y osteoblastos. Varios estudios afirman que el ligamento periodontal tiene poblaciones de células que pueden diferenciarse tanto hacia cementoblastos como hacia osteoblastos, estas células aparecen en racimos cercanos a los vasos sanguíneos periodontales y presentan características semejantes a las células madres embrionarias.

Algunos estudios *in vivo* realizados en ratones inmunocomprometidos, sugirieron la participación de estas células en la regeneración de hueso alveolar al iniciar la formación de una fina capa de tejido muy similar al cemento que contaba con fibras colágenas, permitiendo la asociación íntima al hueso alveolar próximo al periodonto regenerado (14).

Por otra parte, fibras colágenas generadas *in vivo* en humanos, fueron capaces de unirse con la nueva estructura de cemento formada, simulando la unión fisiológica de las fibras de *Sharpey*. Por lo anterior, se ha sugerido que las PDLSC podrían contener un subgrupo de células capaces de diferenciarse hacia cementoblastos/cementocitos así como hacia células formadoras de colágeno (5).

### **2.4 Células madre de dientes temporales exfoliados (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED)).**

Han sido aisladas células de la pulpa remanente de los dientes deciduos exfoliados, denominadas SHED. Las SHED se consideran una importante fuente de células madre de fácil obtención. Al comparar las SHED con las DPSC, se encontró una mayor velocidad de proliferación y una mayor capacidad de especialización en las SHED. Se ha reportado la presencia de células epiteliales en la pulpa de estos dientes, por lo cual, se estudia la posibilidad de que jueguen un papel importante en la composición epitelial para la reparación o regeneración del diente, puesto que sus características morfológicas corresponden con el fenotipo de células madre epiteliales, pudiendo expresar marcadores epiteliales. Diferentes estudios revelaron que la pulpa dental de

dientes deciduos, contenía una población de células madre multipotenciales diferentes a las aisladas anteriormente de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSC) (15).

Por otra parte, las SHED poseen un alto potencial para diferenciarse en células angiogénicas, cuya capacidad de inducción es fundamental para la regeneración con tejido conjuntivo. Es necesario el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) para que las SHED se diferencien hacia células endoteliales (16).

Estudios experimentales en ratones han permitido comprobar, la capacidad osteoinductora de las SHED, se ha observado que pueden reparar defectos de formación ósea. Así, “los dientes deciduos no sólo favorecerían la guía eruptiva de los dientes permanentes, también pueden estar involucrados en la inducción ósea durante la erupción del permanente” (17).

## **2.5 Células madre de la papila dental (Stem Cells from the Apical Papilla (SCAP)).**

Parece que las SCAP ubicadas entre la papila apical y la pulpa (La papila apical hace referencia al tejido blando situado en los ápices del diente permanente que se está formando) son las precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular, mientras que las células madre de la pulpa (DPSC) son, probablemente, las precursoras de los odontoblastos que forman la dentina reparativa, además, contienen un mayor componente vascular y celular que las SCAP. (16)

Se ha observado que, “sin estimulación neurológica, las SCAP se muestran positivas para varios marcadores neurológicos, pero cuando se someten a estimulación neurológica, el número de marcadores aumenta notablemente” (15).

## **2.6 Células madre del folículo dental (Dental Follicle Precursor Cells (DFPC)).**

Las DFPC se encuentran en los folículos dentales de los terceros molares impactados. Se asemejan otras células madre de origen dental pero constituyen colonias clonogénicas de menor número que los demás tipos. El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación, contiene células madre, que son las que forman el periodonto, constituido por cemento, ligamento, hueso alveolar y encía (15).

El trasplante de las DFPC genera una estructura constituida de tejido fibroso rígido, sin embargo, no se ha observado dentina, cemento, ni formación ósea en el trasplante *in vivo*, al respecto, distintos autores han explicado la posibilidad de que sea debido al reducido recuento celular en los cultivos. *In vitro*, estas células muestran una morfología típica de fibroblastos, después de inducción, presentan diferenciación osteogénica (5).

## **2.7 Medios de cultivo**

El cultivo celular hace referencia al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células '*in vitro*', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, existen cuatro tipos de cultivo celular (14):

El primer método es el cultivo de órganos, el cual permite mantener, la arquitectura característica del tejido "*in vivo*". Se conservan las interacciones histológicas con lo cual, este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados, representando una buena réplica del tejido de origen. Sin embargo, no crecen mucho (la proliferación celular se limita a las células embrionarias de la periferia) y no se pueden propagar. Se requiere un nuevo explante para cada experimento generando una limitada reproducibilidad de la muestra, por lo cual, cuantificar es difícil y la cantidad de material que se puede cultivar es reducida (14).

El segundo método son los explantes primarios, los cuales se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas (la disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos), consiste en colocar un fragmento de tejido o de órgano en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie y las células de la periferia del explante migran y proliferar por la superficie del soporte. Dentro de las complicaciones se encuentra que, en estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular, aun así, las células logran proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia, en donde las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que realizar un subcultivo o pase que consiste en trasplantar las células a un nuevo soporte (14).

El tercer método son los cultivos histotípicos y organotípicos, los cuales son cultivos de un solo tipo celular que consigue alcanzar una elevada densidad celular, constan de varios tipos celulares que interaccionan entre sí asemejándose lo más posible a la original. El objetivo final de este tipo de cultivos es la creación “*in vitro*” de tejidos u órganos funcionales que puedan ser utilizados en injertos o en trasplantes. Los cultivos organotípicos constituyen la base de una nueva disciplina denominada ingeniería de tejidos (14).

El cuarto tipo de cultivo son los Medios Condicionados (MC), representados por los medios en los que se han cultivado células por un determinado tiempo, por lo cual, contienen factores de crecimiento y citoquinas secretados por las células cultivadas y liberadas al medio, responsables de la actividad biológica de los mismos y que promueven el crecimiento de nuevas células, imitando efectos reguladores de las células stem en células inmuno competentes (15).

Para condicionar un medio se suelen usar células modificadas genéticamente que alteren la concentración de uno o más componentes en el medio y así expresar o introducir una nueva proteína, y el medio se procesa según su propósito de utilización, por otra parte, puede ser suplementado con componentes necesarios para soportar el crecimiento de las células. Estas células, pueden ser de reserva hepáticas, células madre neurales, células madre pancreáticas y/o ESC estromales, MSC, y cultivadas en monocapas, esferas o en constructos tridimensionales y por cualquier medio, creciendo en monocapas sobre un sustrato artificial (15).

Para procesar el sobrenadante resultante se realiza la remoción de las células del MC, este proceso incluye la concentración por un dispositivo de filtración por flujo de agua o usando productos para aislamiento y purificación, para remover proteasas, cromatografía en gel, entre otros. El método depende de la aplicación a la que se destine el MC, sin embargo, siempre se deben mantener las medidas de esterilidad del MC para preservar la actividad biológica requerida (14).

Una vez el medio de cultivo es condicionado con metabolitos celulares y proteínas secretadas por las células, se puede utilizar en cualquier estado físico y puede ser formulado con un transportador farmacológicamente aceptado; así mismo, el MC puede ser concentrado o reducido a uno o más factores o componentes contenidos dentro del medio.

En laboratorio se ha observado que el MC de células madre provenientes de tejido adiposo, aumenta la secreción de IL-10 anti-inflamatorio de las células T -auxiliares *in vitro*. Por otra

parte, el medio condicionado de células estromales de la médula ósea (BMSC-CM) puede inducir la formación de hueso nuevo y de cemento con infiltración mínima de células inflamatorias (14).

Las MSC cultivadas también secretan factores de crecimiento a los medios de cultivo, los cuales pueden promover la proliferación celular y la angiogénesis, mejorando y acelerando la curación de la herida, estos factores de crecimiento que secretan las MSC, junto con las citoquinas, permiten que presenten una gran capacidad de reparación y regeneración de tejidos no hematopoyéticos. Los MC de dichas células, *in vivo* pueden regular la migración celular de fibroblastos acelerando el cierre de las heridas al incrementar la producción de colágeno por parte de los fibroblastos. Estos efectos se han evidenciado tanto con MC de MSC de médula ósea como de tejido adiposo (15).

El término "factor de crecimiento" hace referencia a una proteína, polipéptido o complejo de polipéptidos que son producidos por una célula y pueden tener efecto sobre la misma célula o sobre otras. Generalmente, los factores de crecimiento afectan al crecimiento y/o diferenciación de las células. El factor de crecimiento se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse: factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), factor de crecimiento transformadores alfa y beta (TGF- $\alpha$  y  $\beta$ ), factor de crecimiento derivado del hueso (BDGF), factor de crecimiento derivado del cartílago (CDF), factor de crecimiento del esqueleto humano (hSGF) o proteína morfogénica ósea (BMP) entre otros. Preferiblemente el factor de crecimiento es bFGF (del término en inglés "*basic fibroblast growth factor*", también conocido como FGF2 o FGF- $\beta$ ) (6).

Se puede decir que la ventaja de la utilización de estos Medios Condicionados, incluye: la reducción de la probabilidad de efectos indeseados como la angiogénesis tumoral en estados patológicos, la cual se puede presentar por la utilización de MSC, ya que estas pueden migrar desde su sitio de implantación a otros y producir tales efectos, semejan el ambiente de curación normal de una herida mostrando un aumento en la proliferación de estas células comparadas con MC de fibroblastos, por lo cual mejoran y aceleran el cierre de las heridas comparados con medios de control o con MC de fibroblastos, pueden condicionarse estos medios con células

maduras adultas que pueden ser modificadas genéticamente para la obtención de MC específicos para heridas de tejidos especializados o para que presenten una proteína o un elemento específico de interés según el propósito de utilización del MC, finalmente, una vez obtenido el MC, puede ser empleado en diferentes presentaciones y enriquecido con otros componentes farmacológicos para potenciar el efecto terapéutico (14).

Buján, 2011, realizó un estudio donde usaron un medio de cultivo condicionado por células madre mesenquimales para la diferenciación de células madre pluripotentes humanas. Uso un medio de cultivo condicionado por células madre mesenquimales (CMM) procedentes de tejido adiposo, para la diferenciación de células madre pluripotentes (CMP) a células hematopoyéticas así como a otras células mesodérmicas. Evaluaron un método para la diferenciación de dichas CMP, que comprende cultivar CMP en un medio de cultivo condicionado por las CMM procedentes de tejido adiposo, hasta obtener entre el 70% y 100% de confluencia en el cultivo, preparar los cuerpos embrionarios (EB) y tratar los EBs con al menos un agente inductor de la diferenciación celular, el estudio pone de manifiesto el claro efecto inductor del CMM-CM en la generación de células hematopoyéticas a partir de CMP (6).

Rosales, 2014, realizó un estudio en el que se cultivaron células de pulpa de terceros molares humanos con técnica de disgregaciones mecánicas y cultivadas en medio DMEM, se observaron diariamente bajo microscopio de contraste de fases. Se identificaron células con características de MSC, como su capacidad de adherirse a las placas de cultivo, formar colonias clonogénicas, morfología fusiforme y las pruebas inmunohistoquímicas indicaron expresión de marcadores de superficie características de las células madre mesenquimales adultas de pulpa dentaria y no expresaron CD45 marcador de células hematopoyéticas (18).

## **2.8 Obtención y procesamiento de la pulpa**

Se reportan en la literatura distintos procedimientos para la obtención de la pulpa, como el corte CEJ, el uso de fórceps para fracturar corona, así como el uso de fórceps para fracturar raíces y obtener pulpa de conductos a través del forámen mediante el uso de instrumentos endodónticos en condiciones estériles, antes de extraer pulpa se debe colocar en clorhexidina gel al 0,3% la corona por 2 minutos, luego con cucharilla o cureta gracey se retira la pulpa. En otros estudios los dientes recibieron varios lavados en PBS estéril, seguido por inmersión en 1% de

yodopovidona durante 2 minutos, inmersión en tiosulfato de sodio 0.1% en PBS durante 1 minuto y otro lavado en PBS estéril, posteriormente se realiza un corte CEJ y se extrae la pulpa (19).

Respecto al procesamiento de la pulpa, existen distintas opiniones sobre los requerimientos necesarios para procesarla de manera adecuada, algunos autores indican que se debe sumergir el tejido pulpar digerido en 3mg/ml colagenasa TI y 4mg/ml dispasa a 37°C/1 hora, después pasa a través de una malla 7° µm para obtener las células. Otros autores, sugieren la suspensión del tejido en medio de cultivo mínimo esencial (MEM) con 25% de FBS inactivado, 200U/ml de penicilina, 200µg/ml estreptomina, 2,5µg/ml anfotericina B a 37 C Y 5% CO2 hasta que las células se separen de los explantes, la capa celular debe ser removida por digestión enzimática 0,1% tripsina EDTA a 37°C., luego la pulpa se coloca en un baño enzimático compuesto de colagenasa TI y II con termolisina como la proteasa neutral, se incuban a 37°C durante 40 minutos para digerir el tejido y liberar las células. Una vez completa la digestión, se añade a un volumen final de 1.5x el volumen de digestión para neutralizar las enzimas de la digestión. Esta mezcla se centrifuga a 500 g por 5 minutos y el sobrenadante se aspira (21).

## **2.9 Criopreservación**

Respecto a la conservación de las células madre provenientes de la pulpa de dientes exfoliados para garantizar su viabilidad Ma et al (17) indica que la criopreservación resulta ser un método altamente recomendado para dicho propósito. En dicho estudio, se realizó primero la separación del tejido pulpar de las piezas dentales para luego someter la mitad de la muestra a un tratamiento con un medio criopreservante (medio compuesto en un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y en un 90% de suero fetal bovino FBS) a 4° C para luego pasar la noche a -80° C. Al día siguiente fueron colocados en nitrógeno líquido y almacenado durante dos años para ser descongelado posteriormente de forma rápida a 37° C. Por otro lado, la mitad restante de la muestra fue sometida de forma inmediata y fresca al proceso de aislamiento de sus células madre, el estudio demostró que las células criopreservadas conservaron los atributos necesarios para ser cultivadas en laboratorio (20).

Seo BM y colaboradores, 2005, conservaron la pulpa dental extraída de terceros molares a 4 ° C y luego la almacenaron directamente en el líquido nitrógeno. Después de haber sido congelados

durante 3 y 6 meses, los tejidos se descongelado rápidamente a 37 ° C en un baño de agua y posteriormente digerido en una solución de 3 mg / ml de colagenasa tipo I (Worthington Biochem, Freehold, NJ, EE.UU.) y 4 mg / ml de dispasa (Roche, Mannheim, Alemania) durante 1 hora a 37 °C (21).

En el estudio realizado por Viña, 2013, una vez extraída la pulpa dental, se almacenó en tubos de 15 mL estériles con medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle® con suplemento bajo de glucosa (1mg/mL) y antibióticos (Penicilina 100U/ml y Estreptomina 100 µg/ml). La pulpa se transportó a temperatura ambiente en un tubo desde la Clínica Odontológica hasta el Departamento de Fisiología. Entre la extracción de la pulpa y su cultivo hubo un rango de tiempo de entre una y veinticuatro horas. Durante este tiempo se guardó a 4°C (22).

## **2.10 Aplicaciones de ingeniería tisular en odontología**

En las últimas décadas han sido múltiples los usos que se le ha dado a las células madre en ingeniería tisular, por ejemplo, en procedimientos reconstructivos de los huesos de la región facial para defectos postraumáticos, tumorales o congénitos, en reconstrucciones condilares, reconstrucciones radiculares dentarias, entre otras (23).

Velilla, 2006, valoró la eficacia del implante de células madre pluripotenciales adultas y de tejido adiposo (células mesenquimales) en la rehabilitación funcional y estética del aparato estomatognático de pacientes con insuficiencia ósea máxilo-mandibular, reportó que el crecimiento óseo fue altamente satisfactorios en 8/9 casos totales, en todos los casos se consiguió hueso cortical, se consiguió crecimiento de hueso vertical en los tratamientos realizados con células progenitoras mesenquimales, así como también en los tratados con concentrado de aspirado medular (24).

Uno de los primeros modelos de piezas reconstructivas es el minipig. Esta estructura conformada se colocó en un biorreactor y fue incubada por 10 días en suplementos y medios osteogénicos. Examinado previamente en animales, se crearon cuatro defectos de 2x2 cm en mandíbulas porcinas y se dispusieron en los defectos los tableros creados con sus contenidos celulares. Después de 6 semanas se evaluó el proceso reparativo. Se apreció radiográficamente una zona de radiolucidez con focos de radiopacidad. Histológicamente se determinaron osteoblastos y osteocitos maduros con una red fibrilar colágena densa y focos de endotelio vascular (25)

La articulación témporo-mandibular resulta muy susceptible de afecciones traumáticas, infecciosas o degenerativas que produzcan la destrucción de sus elementos articulares. Para su reparación se han implementado numerosas técnicas e introducido novedosos biomateriales, realizado estudios en ratas, con el objetivo de lograr mediante el uso de células madres mesenquimatosas, un cóndilo mandibular, semejante al humano, encapsulado en un polímero biocompatible (26)

Finalmente, el trabajo de ingeniería tisular, publicado por la revista Plos One de la Public Library Science, norteamericana, sostiene que es posible la regeneración dental a partir de células madres, el resultado final del estudio es la formación de un muñón radicular dental incisivo que puede servir de soporte para una corona sintética de porcelana (24).

## 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1 Hipótesis

**Ho.:** No existe relación entre el tipo de tejido y el crecimiento celular, por lo cual, se observará un registro idéntico en la proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación de las células cultivadas tras el intercambio de medios condicionados respecto a las células no intercambiadas independientemente de la proveniencia de la muestra (papila o pulpa).

**Ha.:** sí existe relación entre el tipo de tejido y el crecimiento celular, por lo cual, se observará un mayor registro de la proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación de las células cultivadas tras el intercambio de medios condicionados respecto a las células no intercambiadas.

### 3.2 Objetivo General

Evaluar la proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación tras el intercambio de medios condicionados obtenidos de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares.

### 3.3 Objetivos específicos

- Aislar células madre mesenquimales de papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares.
- Obtener medios condicionados de cultivos de células madre mesenquimales.
- Evaluar la proliferación, potencial de diferenciación y viabilidad de células madre mesenquimales, tras el intercambio de medios de cultivo condicionados.

## **4 MÉTODO**

### **4.1 Tipo de estudio**

Cuasi experimental *in vitro*.

### **4.2 Material Objeto De Estudio**

Comportamiento de las células madre tras el intercambio de medios condicionados.

### **4.3 Muestra**

Se realizó el protocolo para aislar y generar cultivos de 16 especímenes de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y 21 especímenes pulpa sana de premolares extraídos por indicación ortodóntica, de estos cultivos, se escogieron los más representativos, en términos de proliferación de células.

Finalmente fueron producidos 9 lotes de medios condicionados de las células madre mesenquimales. Estos medios fueron usados en un intercambio entre los dos tipos celulares, de tal forma que los medios producidos con células de la papila apical fueron aplicados a los cultivos de células de premolares y viceversa. Después de algunos días de cultivo se evaluaron los cambios observados tras la inducción con los medios condicionados.

### **4.4 Criterios de selección**

Todos los pacientes seleccionados fueron informados de las características del estudio, y mediante consentimiento informado aceptaron libremente hacer parte del estudio, aportando el diente extraído, el cual en todos los casos fue extraído por motivos ajenos a esta investigación. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Santo Tomás.

De la historia clínica del paciente se registraron datos como la edad y el género, la identificación de los pacientes se mantuvo anónima con fines de protección de datos del mismo.

#### **4.4.1 Selección del paciente**

Con aprobación del comité de ética para el desarrollo del estudio y el consentimiento- asentimiento del paciente para el mismo (ver anexo), se eligieron pacientes en edades entre 15 y 22 años, de ambos géneros sistémicamente sanos, que no refirieron consumo de alcohol, drogas y/o cigarrillo, ni presencia de patologías orales.

Previo a la extracción dental se preguntó acerca de enfermedades sistémicas y se realizó una exploración en búsqueda de infecciones orales, los pacientes que participaron en el estudio fueron sometidos a procedimiento de higiene oral previo a la intervención, mediante el uso de clorexhidina.

##### **4.4.1.1 Criterios de inclusión**

Fueron incluidas para el cultivo, aquellas pulpas y papilas de dientes que no presentaron clínica y/o radiológicamente ningún signo o síntoma de inflamación y/o infección.

##### **4.4.1.2 Criterios de exclusión**

Se excluyeron todas aquellas pulpas y papilas de dientes que durante la extracción presentaran fracturas que afectaran a la pulpa dental o si se realizó la odontosección del mismo.

#### **4.4.2 Selección del diente**

El diente del que se extrajo el tejido pulpar se encontraba libre de enfermedades. El tejido pulpar se obtuvo de la pulpa dental de terceros molares incluidos, que son de fácil obtención ya que son extraídos por indicación ortodóntica, así como pulpa des premolares.

#### **4.5 Extracción del diente**

**Extracción de piezas dentales:** se realizó enjuague con clorhexidina al 0,12% durante un minuto, se realizó procedimiento estándar para extracción simple o quirúrgico según el caso. Todas las extracciones fueron realizadas por Cirujana y patóloga oral.

**Extracción de pulpa dental:** Una vez realizadas las extracciones de las piezas dentales, estas fueron sumergidas en solución salina.

Los premolares fueron seccionados con un disco de diamante a nivel de la unión amelo-cementaria (0,5-1mm de profundidad sin llegar al tejido pulpar), luego con un elevador recto la corona fue fraccionada separándola de la raíz. Posteriormente se obtuvo la pulpa extrayéndola con lima # 15 estéril.

Para los terceros molares una vez obtenida la pieza dental, la papila fue extraída con pinza algodонера estéril para ser conservada. Las estructuras dentales fueron desechadas posterior a la extracción de los tejidos en bolsas rojas, siguiendo la norma de bioseguridad de los consultorios donde se realizaron los procedimientos.

El tiempo entre la exodoncia y la extracción de los tejidos fue inmediato.

**Conservación de muestras:** Los tejidos fueron almacenados en tubos estériles de 1,5 ml con medio DMEM y antibióticos (penicilina-estreptomicina al 1%) antimicótico.

Una vez extraídas las muestras, estas fueron embaladas, etiquetadas (fecha, hora, número de diente y número de muestra correspondiente) y transportadas a temperatura ambiente en el mismo medio, para ser entregadas al laboratorio.

#### **4.6 Etapa de laboratorio**

Previo a la realización de este proyecto se hizo una prueba piloto con el objetivo de establecer ciertas medidas o parámetros que permitieran el adecuado desarrollo de esta investigación.

Para la realización de la presente investigación se utilizó un diseño cuasi experimental *in vitro* donde fueron analizadas 37 muestras provenientes de papila apical de terceros molares incluidos, así como pulpa sana de premolares.

Para la obtención de las muestras, previa firma de consentimiento o asentimiento informado, se realizó una desinfección de la cavidad oral utilizando enjuague con clorhexidina al 0,12% durante un minuto antes del procedimiento, para la extracción simple o quirúrgica se utilizó el proceso estándar ya establecido según el caso. Todas las extracciones fueron realizadas por un operador experto.

#### **4.6.1 Aislamiento:**

Todos Los ensayos fueron hechos en una cabina de flujo laminar marca Labconco (cabina de bioseguridad clase II).

Una vez la muestra llegó al laboratorio, fue retirada del tubo, disponiéndola en una caja de petri estéril de vidrio en la que se procedió a cortar el tejido con ayuda de una cuchilla estéril. La muestra fue fraccionada en 2 o 3 partes de más o menos 0.2x0.2x0.2 cm cada una.

**Medio de cultivo:** Una vez cortado el tejido, se adicionó tripsina y se obtuvieron células en suspensión, estas células junto con el fragmento de tejido fueron sembradas en una caja de cultivo de seis pozos. Se les adicionó 2ml de medio DMEM y 10% suero fetal bovino (SFB). Las células se incubaron (incubadora marca Revco®) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El cultivo se observó cada 3 o 4 días en un microscopio invertido hasta observar el crecimiento. Se cambió el medio cada 3 o 4 días.

Al observar la confluencia se retiró el medio que las células tenían en ese momento y se les adicionó de 0,5 a 1ml de solución de tripsina-EDTA. Las células con la tripsina se introdujeron en la incubadora y fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, se dejaron por unos minutos dependiendo de qué tan adheridas se encontraban. Algunos cultivos se separaron del sustrato en 3 minutos y otros en más de 5 minutos.

A esta suspensión de células en tripsina se les adicionó 1ml de medio DMEN sigma Aldrich® completo con 10 % de (SFB) Sigma Aldrich®, este se inactivó antes de ser usado mediante incubación por 30min a 57°C y agitación cada 10 minutos (El SFB 1x fue preparado a partir de un stock 10x marca Thermo Scientific®).

Esta mezcla fue centrifugada para luego retirar el sobrenadante y dejar sólo el precipitado de células. El tiempo de tripsinización fue variable dependiendo de cada muestra. Lo que definió que una muestra se dejara o parara de tripsinizar fue la observación de que se desprendieran células abundantes de la muestra. Después de hacer uno o dos pases se criopreservó.

Para establecer el crecimiento en cultivo de los distintos aislados se midió el porcentaje promedio de viabilidad celular usando la técnica de exclusión de azul de tripan y la cámara de Neubauer durante los primeros 3 pases de cada aislado.

Las células se caracterizaron como células madre mesenquimales mediante la citometría de flujo y la expresión de marcadores de superficie (CD73, CD90 y CD105). Aproximadamente dos semanas después se hicieron pruebas de citometría de flujo se incubaron con los medios de diferenciación.

#### 4.6.2 Ensayos de diferenciación

En una caja de 24 pozos se sembraron 100.000 células en 6 diferentes pozos por cada muestra. Estas células fueron cultivadas por 21 días en las condiciones estándares de cultivo previamente mencionadas.

Los medios de cultivo para diferenciación hacia adipocitos y osteocitos fueron de Sigma Aldrich®, (estos medios están enriquecidos con varios factores de diferenciación hacia los linajes mencionados), durante los 21 días se les adicionó 0,5ml de medio cada 3 días para reemplazar el que se perdía por evaporación. Luego de los 21 días se procedió a realizar la tinción con rojo de alzarina para la detección de osteocitos (mineralización) y aceite rojo para la detección de adipocitos (depósitos de grasa en vacuolas).

**Producción de los medios condicionados:** Una vez producidos los medios condicionados se realizó el intercambio de 4 medios por tipo de cultivo, los medios fueron mezclados 1ml del medio de cultivo de una de las células, con 50.000 células de la otra muestra.

Los medios condicionados se intercambiaron como lo indica la siguiente tabla:

*Tabla 1. Muestras para intercambio de medios condicionados*

Papila apical	Pulpa Dental
7	6
8	8
11	13
12	14

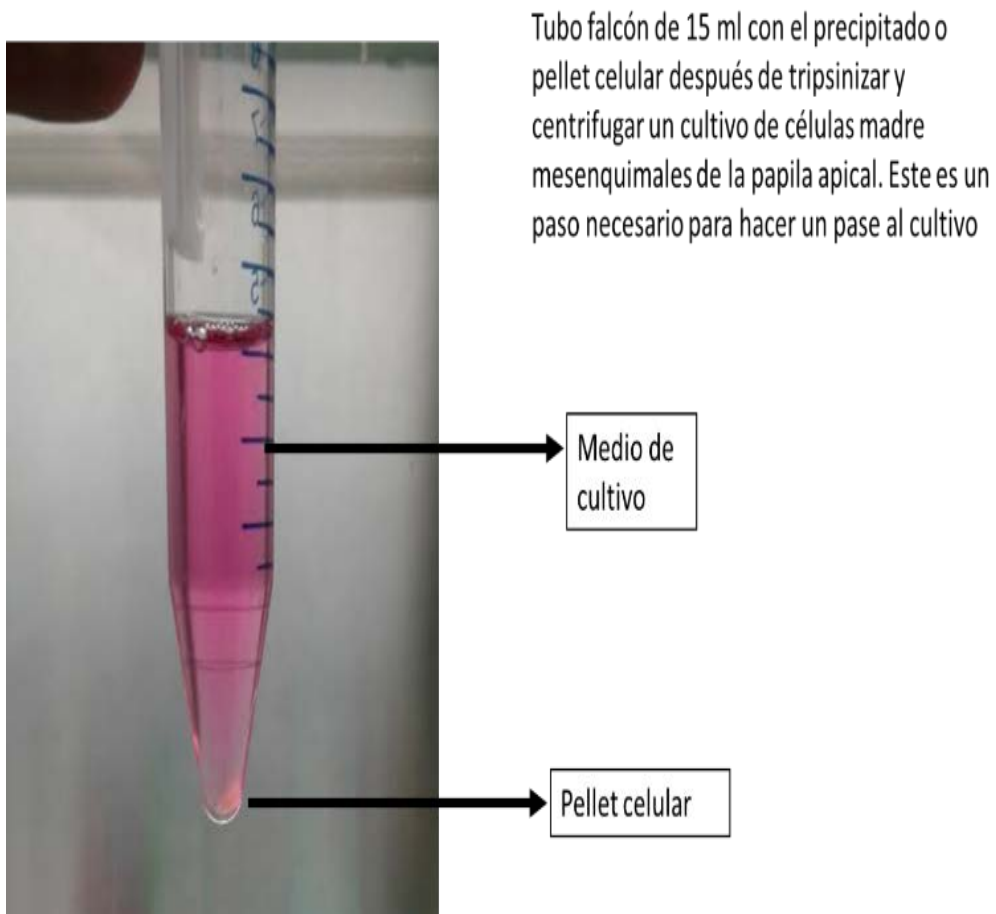
Para la producción de los medios condicionados, se usaron 2 cajas de 25cm<sup>2</sup> es decir se cultivaron las células con 6ml de medio sin (SFB) por 24 horas con cada uno de los aislados

escogidos. Estos medios fueron colectados y guardados por 48 o 72 horas a 4°C hasta su uso. En total se produjeron 12ml de medio condicionado de cada aislado (6 ml por caja de 25cm<sup>2</sup>).

Al momento de colectar los medios estos fueron centrifugados a 2000g por 15 minutos para limpiar los detritos. Se asumió que estos medios contenían vesículas extracelulares secretadas por las células previamente cultivadas en ellos.

Las células fueron cultivadas por 12 días. Cada 3 días se cambió el medio por 1 mililitro de medio condicionado fresco. Se observó el porcentaje de confluencia de las células cada 3 días, posteriormente se realizó el control del experimento con células cultivadas sin medio condicionado por el mismo periodo de tiempo finalmente la viabilidad celular fue evaluada en el día 12.

Fotografía. 1. Pellet o precipitado celular al momento de realizar un pase del aislado 8.



Caracterización invitro y medios condicionados: En este experimento se sembraron igual número de células iniciales (80.000) en 6 cajas de 25cm<sup>2</sup> tratadas para adhesión. Cada dos días las células fueron tripsinizadas para ser contadas en cámara de Neubauer y azul de tripan en un microscopio óptico de luz en aumento de 10x (27).

Datos de citometría: Para el análisis de citometría, se usó el Citómetro FACSCanto II, y el software de adquisición fue el FACSDiva. Los datos de citometría fueron analizados y graficados con el programa FlowJo V.10.

Para la citometría:  $6 \times 10^5$  células fueron desprendidas del sustrato de cultivo mediante incubación por 3 a 5 minutos a temperatura ambiente con Tripsina 1% EDTA 0.05 M (Invitrogen). Posteriormente la tripsina fue inactivada con medio completo. La suspensión celular fue lavada mediante centrifugación por 10min a 300g. El pellet se resuspendió con 600ul de PBS 1x estéril. Esta suspensión fue dividida en 3 tubos de citometría mediante la dispensación de 200ul a cada uno.

A un tubo se le añadió 4ul del anticuerpo anti-CD73 conjugado con PE-Cy7. A otro tubo 4ul de anticuerpo anti-CD90 conjugado con APC., y al otro tubo 4ul del anticuerpo anti-CD105 conjugado con PE. Todos los anticuerpos fueron marca Biolegend®, las muestras se incubaron por 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente fueron leídas en el citómetro previamente mencionado. Se adquirieron entre 50.000 y 100.000 eventos.

Para la expresión de marcadores se analizó la Fluorescencia media de cada marcador después de intercambio del medio condicionado dividido en la fluorescencia media de cada marcador antes del intercambio, cada resultado se multiplicó por 100 para obtener un valor porcentual.

De esta forma si el resultado era igual a 100 significaba que la expresión del marcador no cambiaba, si era menor significaba que la expresión del marcador disminuía y si era mayor a 100 significaba que la expresión del marcador aumentaba.

El descarte de los cultivos y de las muestras de papila y pulpa que no fueron exitosos para la obtención de cultivos fueron desechados en el laboratorio de la universidad Nacional de Colombia, siguiendo las normas de bioseguridad del mismo, en bolsas rojas marcadas como desechos anatomopatológicos descartada en un contenedor (caja de cultivo o tubo falcón de

15ml) previamente sellado; los residuos fueron recogidos por el servicio de aseo de la universidad, según el cronograma establecido previamente, para su posterior incineración.

#### 4.7 Operacionalización de variables

**Tabla 2. Variables de estudio**

Nombre de la variable	Clase	Definición	Tipo	Escala de medición o indicador
<b>Edad</b>	Independiente	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	cuantitativa	Entre 15 a 22 años
<b>Género</b>	Independiente	Formas de agrupación de los seres vivos según las características que comparten.	Cualitativa	Femenino Masculino
<b>Tiempo de cultivo</b>	independiente	Tiempo transcurrido desde el inicio de la siembra y la observación.	Cuantitativa	3 días 8 días 15 días
<b>Tipo de célula</b>	Dependiente	Unidad anatómica fundamental de todos los organismos vivos.	Cualitativa	Células madre provenientes de: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Papila apical de terceros molares.</li> <li>▪ Pulpa de premolares</li> </ul>
<b>Proliferación</b>	Dependiente	incremento del número de células por división celular	Cuantitativa	Número de colonias
<b>Viabilidad</b>	Dependiente	Proporción de células que sobreviven en condiciones de cultivo.	cuantitativa	Porcentual
<b>Potencial de diferenciación</b>	Dependiente	capacidad de una célula para diferenciarse en tipos celulares	cuantitativa	Porcentual

#### 4.8 Análisis estadístico

Para identificar relaciones de dependencia entre variables cualitativas se realizaron pruebas ANOVA. Con la prueba de Mann-Whitney se examinó si al menos en uno de los días de cultivo el porcentaje de confluencia fue diferente entre el cultivo con el medio condicionado y el cultivo sin el medio.

Con la prueba Kruskal wallis se valoró la discrepancia entre la diferenciación celular sin y con medios condicionados y finalmente se utilizó la prueba de Ad hoc para establecer la diferencia entre las medias.

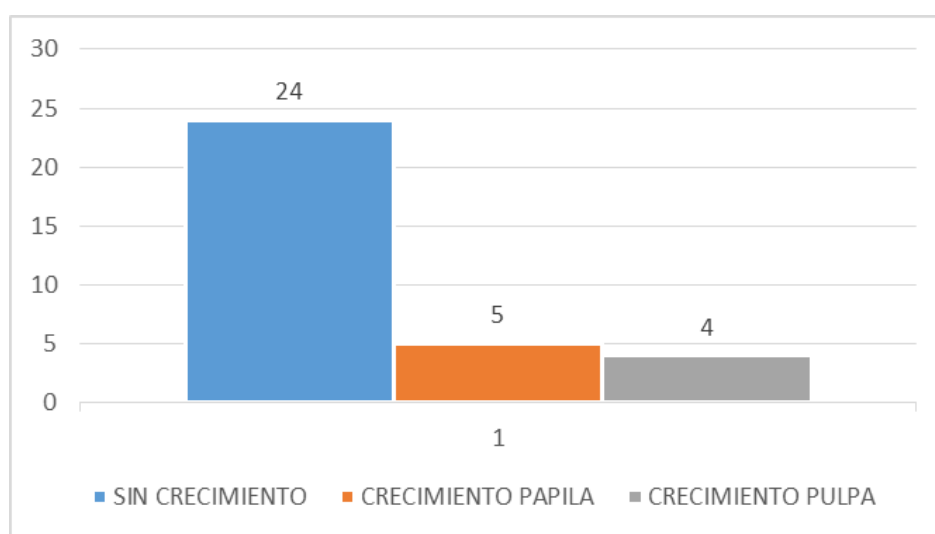
#### **4.9 Aspectos Éticos**

Según la Resolución Numero 8430 de 1993 el presente estudio se clasifica en Riesgo mínimo.

## 5 RESULTADOS

Se logró aislar células madre mesenquimales de papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares. Fueron colectadas 37 muestras provenientes de pacientes de ambos sexos 13 hombres (35%) y 24 mujeres (65%), con edades comprendidas entre 13 y 27 años y promedio de 17,2 años de edad. De 37 muestras 16 (43,3%) fueron de papila y 21 (56,7%) de pulpa, una tasa de crecimiento del 24,73%.

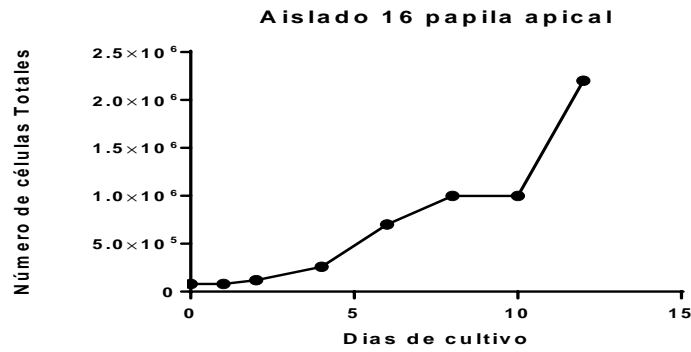
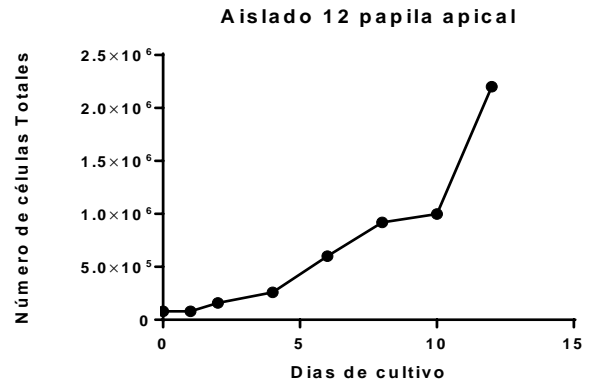
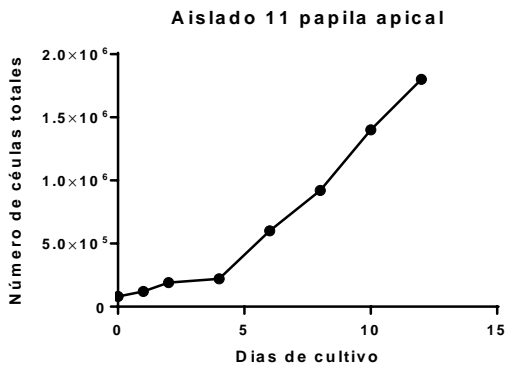
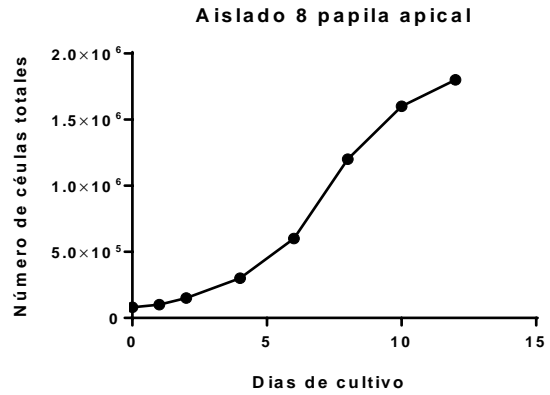
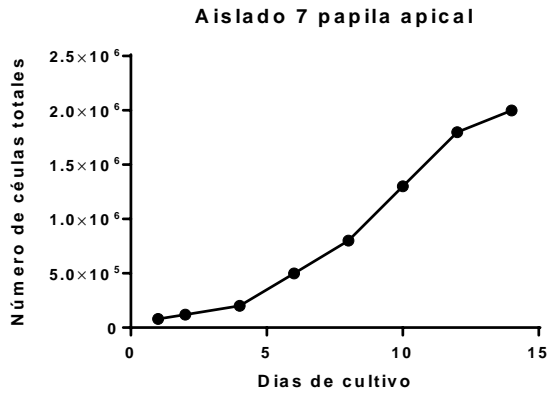
**Figura 1. Muestras analizadas**



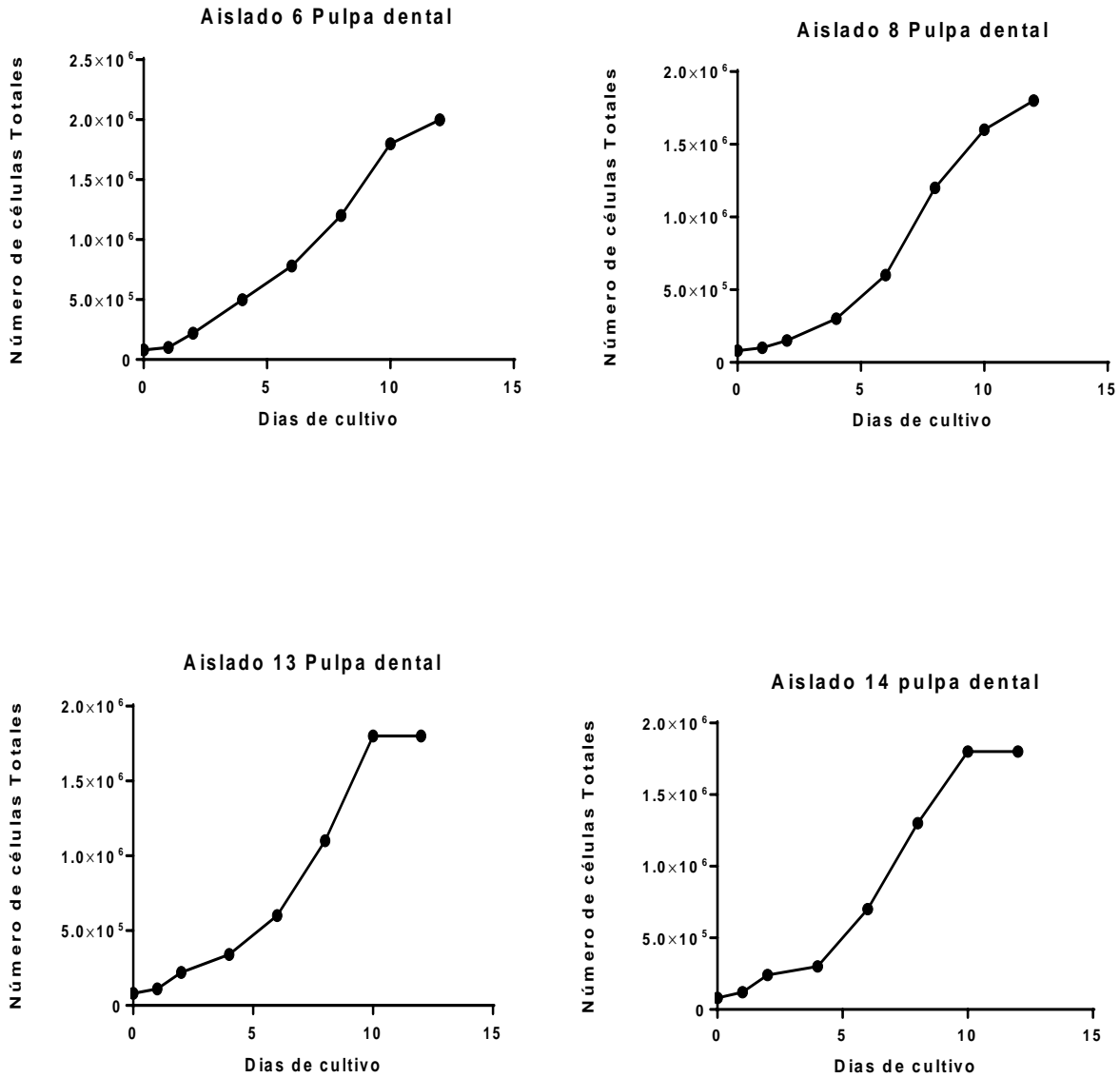
Todos los aislados que crecieron se tardaron en promedio 22,2 días en llegar a confluencia por primera vez, además ambos tipos de muestras crecieron de forma similar y la confluencia fue alrededor de 2 millones de células. Por otra parte se estableció que se requirió un promedio de 13 días para llegar a confluencia en caja de 25cm<sup>2</sup>.

En las Figura 2 y 3 se describen el crecimiento en cultivo de los 5 aislados que crecieron de papila apical y 4 de pulpa dental para un total de 9 muestras exitosas. Como lo reflejan las siguientes gráficas, los aislados que presentaron crecimiento, tienen un comportamiento similar en cultivo.

Figura 2. Aislados de papila

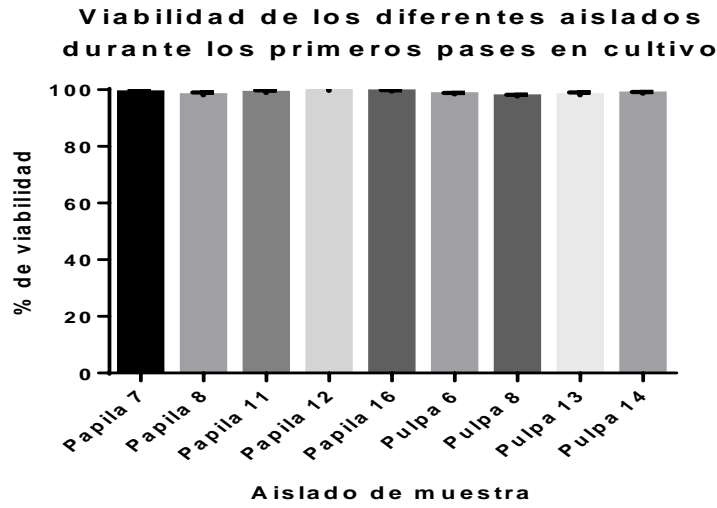


**Figura 3. Aislados de pulpa**



Se encontró que el crecimiento en cultivo de los distintos aislados fue similar llegando más o menos a 2 millones de células aproximadamente en 12 días de cultivo. La viabilidad de estas células siempre estuvo por encima del 98% (Figura 4)

Figura 4 Viabilidad de los diferentes aislados durante los primeros pases



Para los ensayos de caracterización y para la producción de los medios condicionados y su intercambio, se seleccionaron las muestras 7, 8, 11 y 12 de papila apical y 6, 8, 13 y 14 de pulpa por haber presentado las condiciones apropiadas para el análisis y haber crecido en menor tiempo.

En relación al número de células, se observó que el promedio es de  $1.3 \times 10^6$  células, con un mínimo de  $1.2 \times 10^6$  y máximo de  $1.6 \times 10^6$ .

Tabla 3. Registro de viales y células por vial criopreservadas para los diferentes aislados

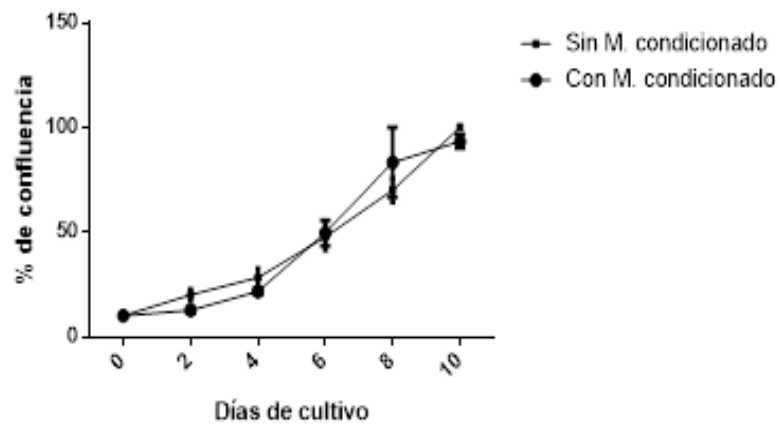
Aislado	Tipo de MSC	Pase criopreservado	Número de Viales criopreservados	Número de células en el criovial $\times 10^6$
7	Papila	2	2	1,2
8	Papila	2	2	1,0
11	Papila	3	2	1,5
12	Papila	1	1	1,5
6	Pulpa	2	2	1,6
8	Pulpa	2	2	1,3
13	Pulpa	2	1	1,2
14	Pulpa	2	1	1,2
16	Papila	2	1	1,2

El crecimiento con o sin medio condicionado presentó un comportamiento similar para las muestras de pulpa y papila, llegando a confluencia entre el día 10 y 13 en todos los casos, como se observa en la figuras 5 a 13.

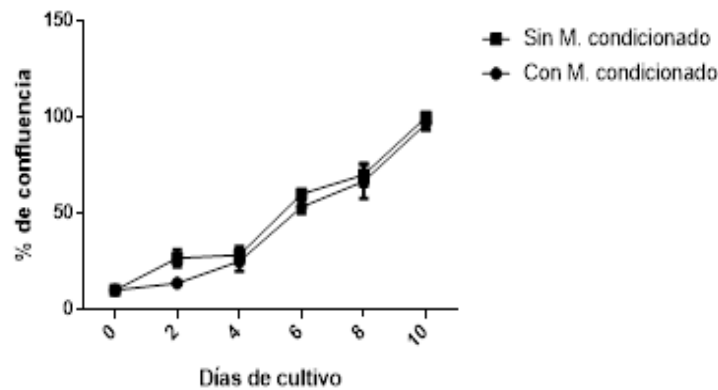
**Tabla 4. Muestras para intercambio de medios condicionados**

Muestra de papila apical	Muestra de Pulpa Dental
7	6
8	8
11	13
12	14

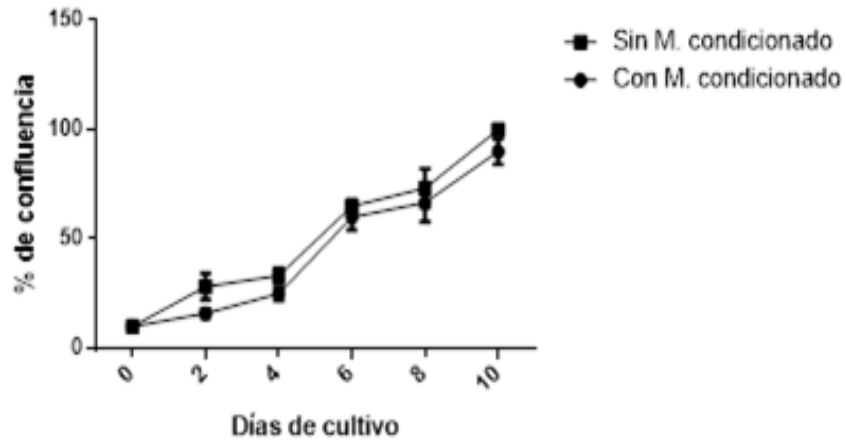
**Figura 5. Cinética de crecimiento pulpa 6 cultivo de papila 7**



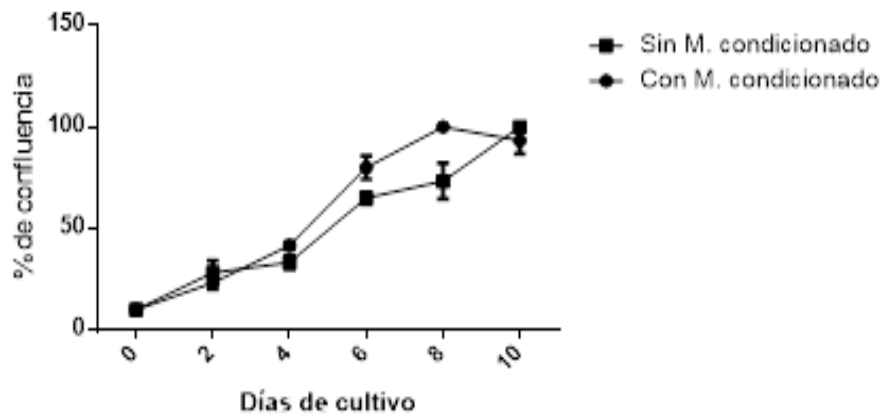
**Figura 6. Cinética de crecimiento pulpa 8 cultivo de papila 8**



**Figura 7. Cinética de crecimiento pulpa 13 cultivo de papila 11**



**Figura 8. Cinética de crecimiento papila 7 cultivo de pulpa 6**



**Figura 9. Cinética de crecimiento papila 8 cultivo de pulpa 8**

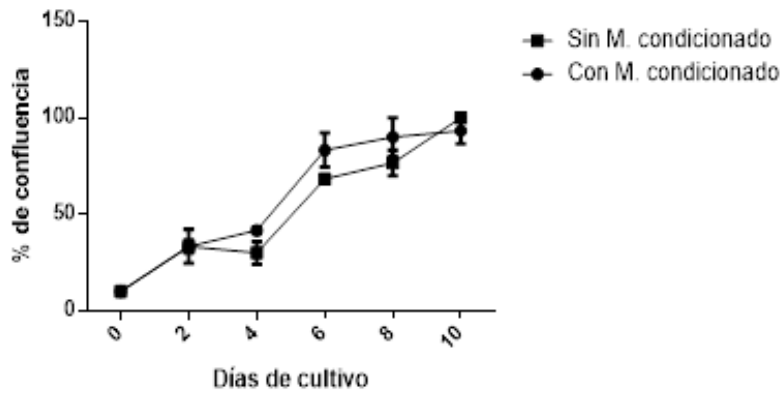


Figura 10. Cinética de crecimiento papila 11cultivo de pulpa 13

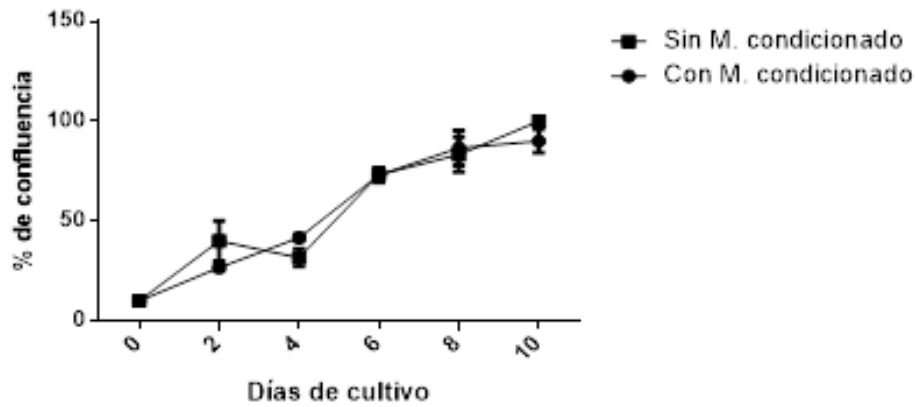


Figura 11. Cinética de crecimiento papila 12 cultivo de pulpa 4

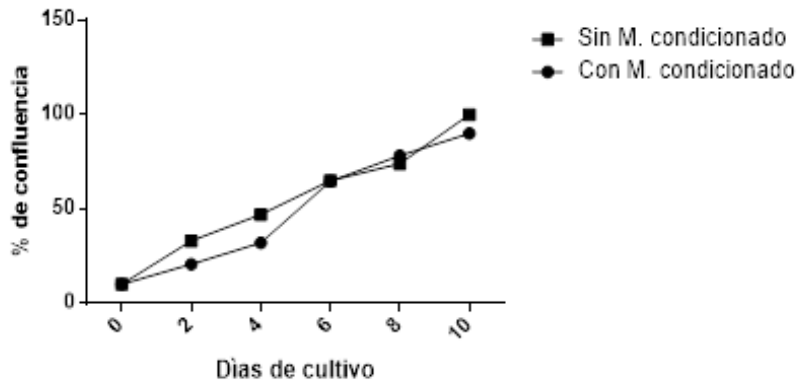
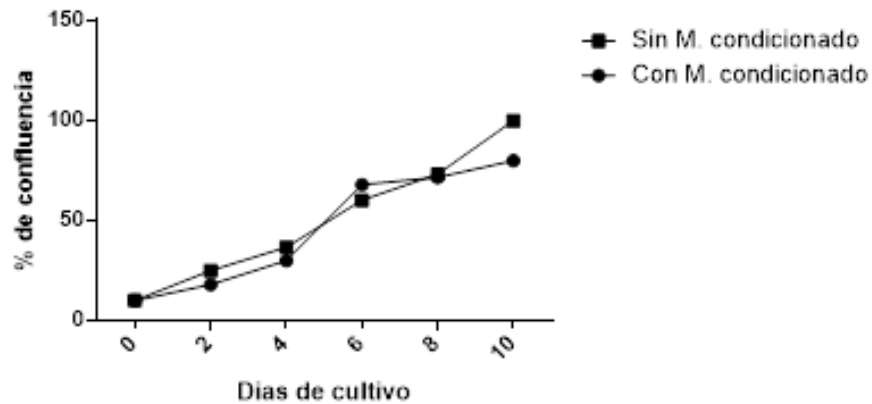
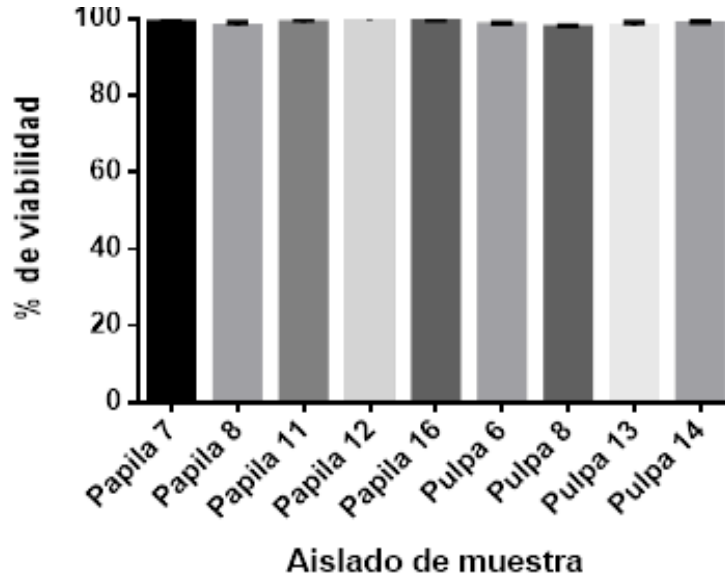


Figura 12. Cinética de crecimiento pulpa 4 cultivo de papila 12



Al igual que en los primeros pases, la viabilidad de estas células estuvo por encima del 98% como muestra la siguiente figura:

**Figura 13. Porcentaje de viabilidad después de cultivar con medios condicionados**



La imagen de microscopio invertido reveló distintos grados de confluencia celular en los cultivos como se observa en la Fotografía. 2.

Fotografía. 2. Muestra 8, células de pulpa dental en pase 2.

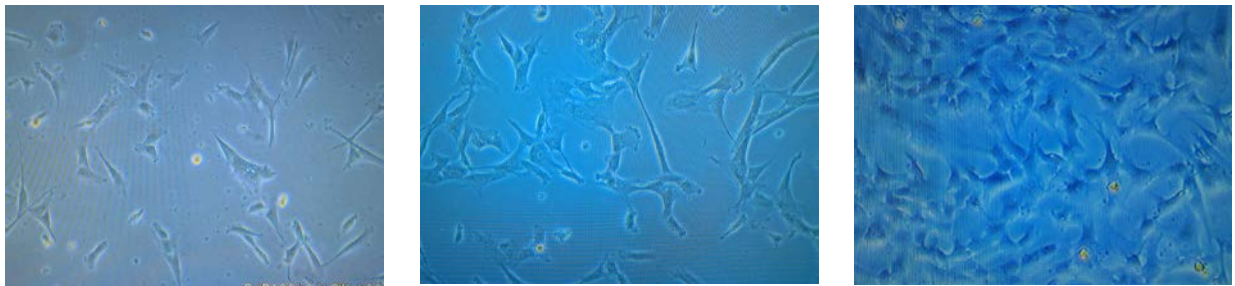


Imagen en microscopio invertido de 40x, muestra confluencia de las células de pulpa en el pase 2

Se observa un pequeño cambio en la expresión del marcador CD105 para algunas de las muestras, específicamente las pulpas 8,13 y 14.

Fotografía. 3. Fragmento de pulpa dental migrando, muestra de pulpa 8.

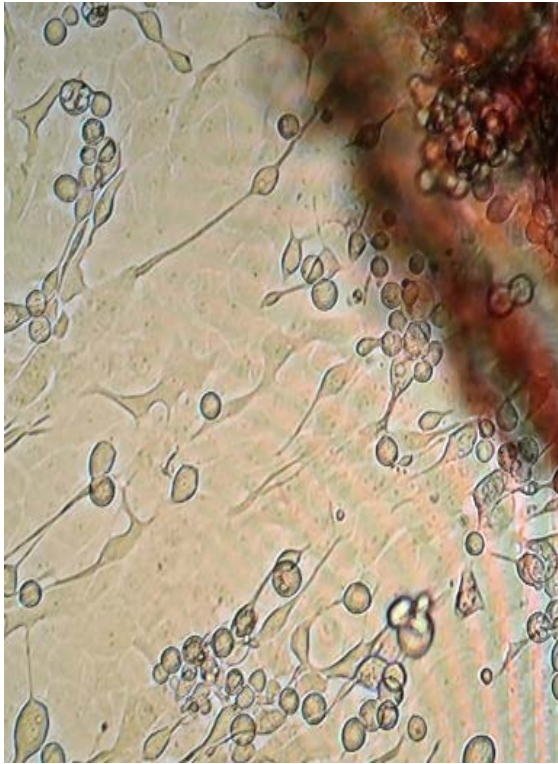


Figura 14. Expresión del marcador CD105 de Pulpa 13

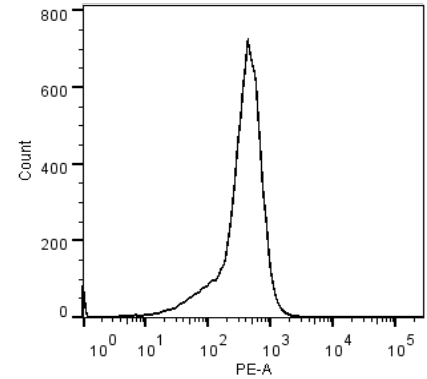


Figura 15. Blanco del marcador CD105

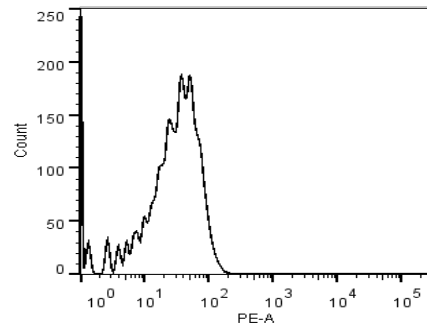
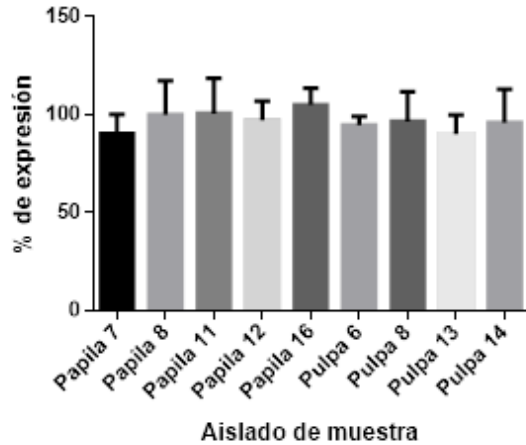


Imagen en 40x de MSC migrando desde un fragmento de pulpa dental, 21 días después de iniciar el cultivo de las MSC con medios de diferenciación enriquecidos con factores de diferenciación.

En general la expresión de los marcadores no cambió significativamente tras el intercambio, todos los valores se mantuvieron cercanos al 98%. La única expresión que cambió es CD105 en las pulpas 8 y 13.

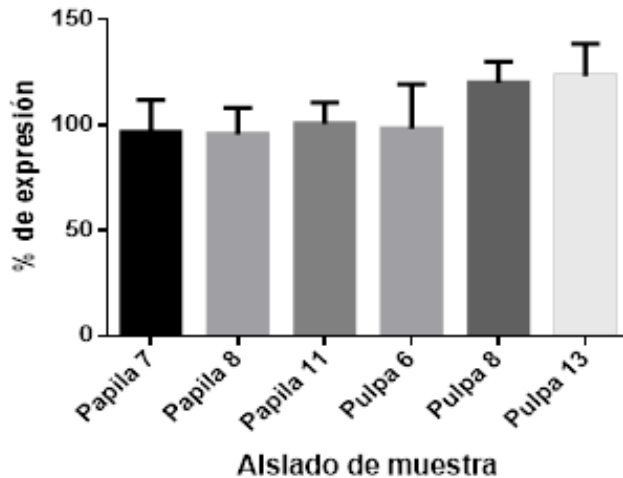
En relación a los resultados de cinética de crecimiento con medios condicionados, se observó que en las citometrías de flujo no se aprecia un cambio notable en la expresión del marcador CD 73 respecto al nivel basal tras el intercambio (Figura 16).

Figura 16. Expresión de marcadores CD73



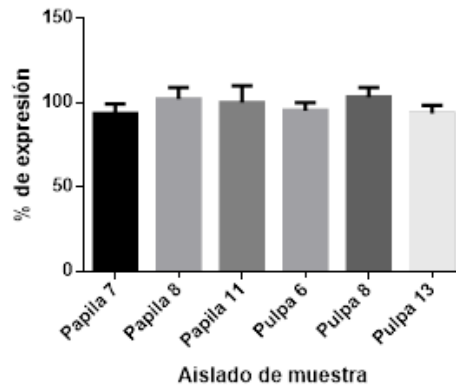
En relación a los resultados de cinética de crecimiento con medios condicionados, se observó que en las citometrías de flujo la expresión del marcador CD105 estuvo siempre sobre el 98%, no se aprecia un cambio notable en la expresión del marcador CD 105 respecto al nivel basal tras el intercambio, a excepción de los datos de la pulpa 8 y 13. (Figura 15).

Figura 17. Expresión de marcadores CD105



En relación a los resultados de cinética de crecimiento con medios condicionados, se observó que en las citometrías de flujo no se aprecia un cambio notable en la expresión del marcador CD 90 respecto al nivel basal tras el intercambio, sin embargo la expresión estuvo en todos los casos sobre el 98% (Figura 18).

Figura 18. Expresión de marcadores CD90



Los ensayos de diferenciación hacia osteocitos mostraron que, el porcentaje de diferenciación hacia osteocitos se encuentra por debajo del 70%, pero en general se encontró por encima del 50%.(Fotografía. 4)

**Fotografía. 4. Diferenciación osteogénica Cultivo de pulpa dental 13.**

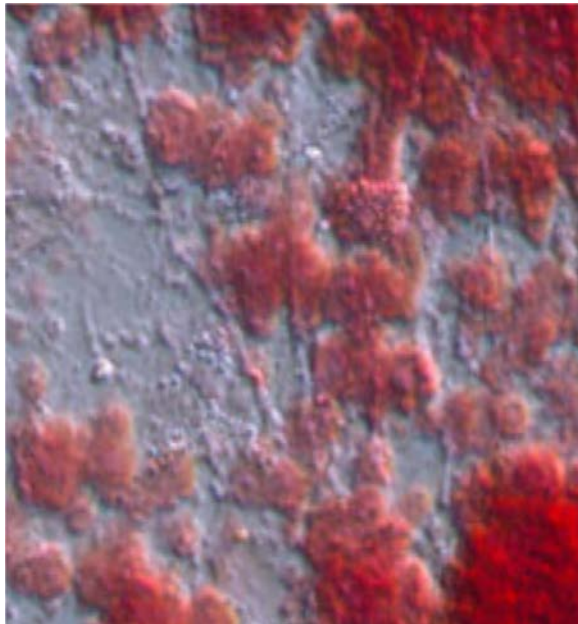
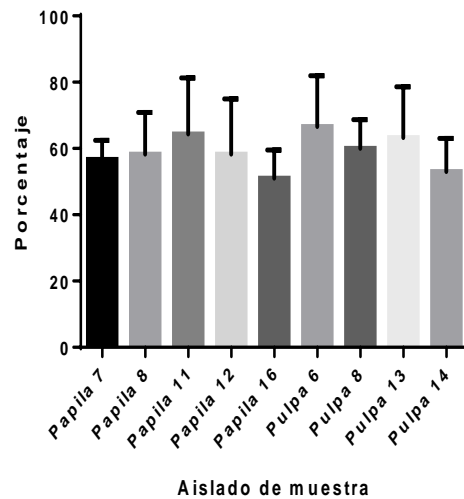


Imagen 40x microscopio invertido. Tinción con alzarina para diferenciación osteogénica.

Figura 19. Porcentaje de diferenciación hacia osteocitos

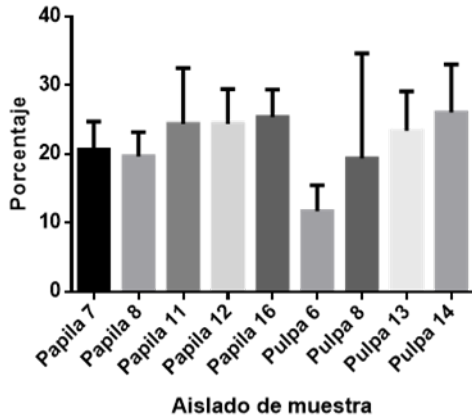
Porcentaje de diferenciación hacia osteocitos



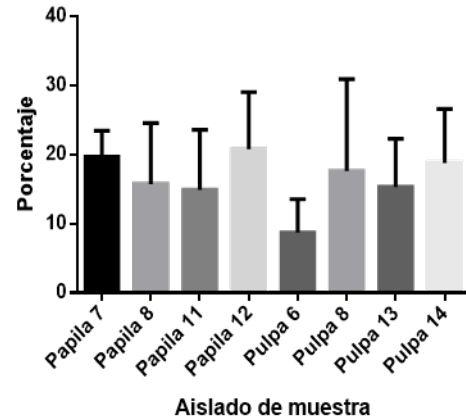
En relación al porcentaje de diferenciación hacia adipocitos se observó que este se encuentra por debajo del 30%, en todos los casos, como se observa en la Figura 20.

Figura 20. Porcentaje de diferenciación hacia antes y tras intercambio

Porcentaje de diferenciación hacia adipocitos



Porcentaje de diferenciación hacia adipocito tras el intercambio de los medios condicionados



En las células cultivadas por 21 días en medio de diferenciación adipogénico, las vesículas con moléculas lipídicas se tiñeron con aceite rojo, observándose que en general el porcentaje de diferenciación hacia adipocitos no fue mayor al 30%. (Fotografía. 5, Fotografía. 6)

Fotografía. 5. **Diferenciación adipogénica de la muestra 8 de papila apical.**

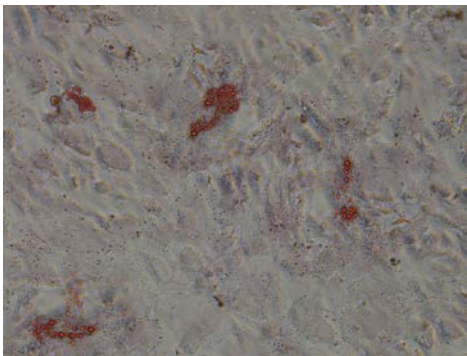


Imagen 40x microscopio invertido.

Fotografía. 6. **Diferenciación adipogénica muestra 11 de papila apical**

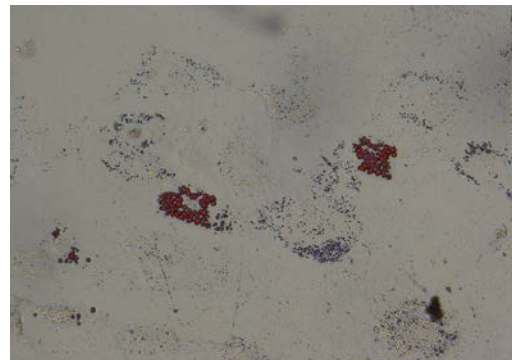
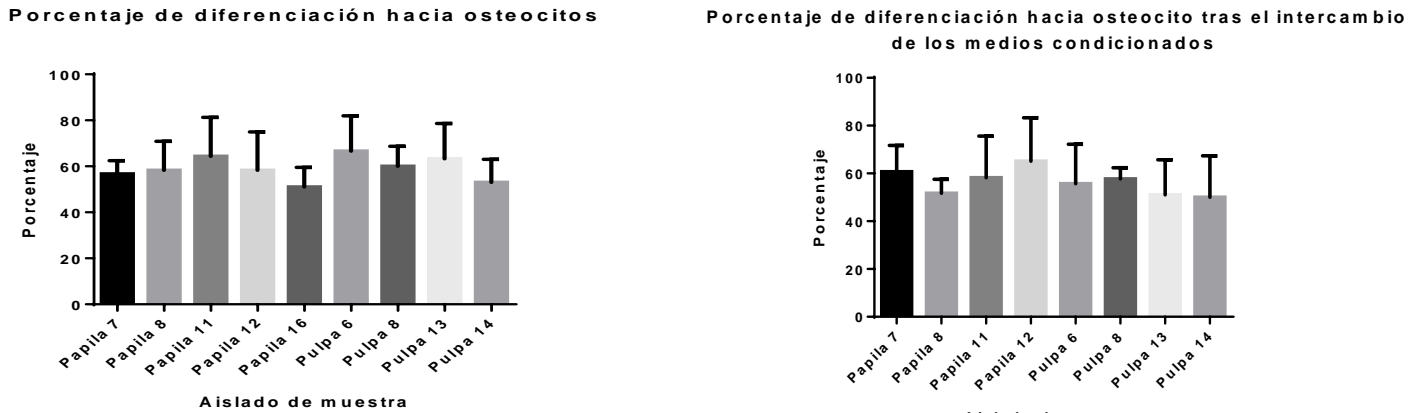


Imagen en 10x de microscopio invertido

Al comparar el porcentaje de diferenciación hacia osteocitos con el porcentaje de diferenciación hacia adipocitos tras el intercambio de medios condicionados, se observó que es mayor para los osteocitos, así mismo, se encontró que la diferenciación es mayor para las muestras provenientes de papila (Figura 21)

Figura 21. Porcentaje de diferenciación hacia osteocitos antes y tras el intercambio



Para analizar la viabilidad de los cultivos se realizó un ANOVA y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.7$ ).

Con la prueba de Mann-Whitney se encontró que para la pulpa 6 cultivada en medio condicionado de papila 7 ( $p = 0.2$ ), fue la única que no presentó diferencia significativa entre la proliferación celular del cultivo con el medio condicionado y el cultivo sin el medio. Los demás cultivos si presentaron diferencias estadísticas significativas con  $p=0.1$ ,  $0.02$  y  $0.04$ .

Para la diferenciación hacia osteocitos, con una prueba Kruskal Wallis no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, respecto al nivel basal si hay diferencia significativa y pruebas ad hoc mostraron que hay diferencia entre pulpa 12 y pulpas 6, 8 y 13, luego del intercambio del medio condicionado.

Con relación a la diferenciación hacia adipocitos, con una prueba Kruskal Wallis se observaron diferencias significativas ( $p= 0.03$ ) pruebas ad hoc mostraron que hay diferencia entre pulpa 6 y papilas 7, 8, 12 y 16 y pulpa 13 respecto al nivel basal y hay diferencia entre pulpa 8 y pulpas 13, 14 y papila 11 tras el intercambio del medio condicionado.

En las pruebas de citometría de flujo no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los análisis realizados.

Con relación a la diferenciación hacia adipocitos, con una prueba *Kruskal Wallis* se observaron diferencias significativas ( $p= 0.03$ ) pruebas *ad hoc* mostraron que hay diferencia entre pulpa 6 y papilas 7, 8, 12 y 16 y pulpa 13 respecto al nivel basal y hay diferencia entre pulpa 8 y pulpas 13, 14 y papila 11 tras el intercambio del medio condicionado.

En las pruebas de citometría de flujo no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los análisis realizados.

## 6 DISCUSIÓN

La biología de las células madre es un campo importante para comprender la regeneración tisular. La utilidad de las células madre mesenquimales en aplicaciones clínicas depende de la accesibilidad al tejido de origen, tasa de proliferación y de su potencial de diferenciación (28).

Casagrande (2011), sostiene que utilidad de las células madre mesenquimales en aplicaciones clínicas depende de la accesibilidad al tejido de origen, tasa de proliferación y de su potencial de diferenciación (10,29).

El objetivo de la investigación fue el de evaluar la proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación tras el intercambio de medios condicionados obtenidos de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares.

Los resultados del estudio proporcionan pruebas de que la pulpa dental de premolares y la papila provenientes de terceros molares contienen una población de células madre multipotentes teniendo en cuenta que los marcadores CD90, CD73 y CD105 son considerados como requisitos mínimos para clasificación de una célula, como célula madre (30), y que es posible cultivarlas *in vitro*, coincidiendo con autores como Carrillo y cols, (2014), Suárez (2013).

Así como la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció que para definir las células como células madres en cultivo se debe demostrar su morfología fibroblastoide y la adherencia al plástico (31).

Conforme a lo reportado en la literatura, en donde se indica que las células obtenidas de papila son más accesibles, altamente proliferativas, fáciles de aislar y preservar, los resultados del estudio indican de las 9 muestras que presentaron crecimiento 5 (55,5%) son de papila apical y 4 (44,5%) de pulpa dental, esto podría deberse a la composición diferente que presentan los tejidos.

Al aislar células madre mesenquimales de papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares, se encontró que la tasa de éxito fue de un 24,73%, coincidiendo con los resultados obtenidos por Carrillo y colaboradores, (2015), quienes encontraron que la tasa de migración positiva de células madre fue de 24,07%, sin embargo los resultados del presente estudio difieren

de lo reportado por Carrillo (2015), quienes indican que el sitio de origen de extracción (pulpa vs ligamento periodontal) es una variable que afecta el porcentaje de migración de células madre siendo mayor en este estudio la migración de células de origen pulpar, pues no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los dos tipos de muestra ( $p=0,7$ ).

En el registro fotográfico de las células vistas en microscopio invertido de luz se observó como a los 14 días de cultivo, se presentó un número reducido de células que salen del tejido, coincidiendo con el estudio adelantado por Suárez (2013), en el cual se registra que las líneas celulares sembradas a una densidad de 100 células por placa de 35 mm ( $8,8 \text{ cm}^2$ ) formaron un número mayor de colonias  $> 50$  células, además de los agregados de 10 a 40 células, también hubo una línea celular que formó una monocapa a los 14 días.

La formación de colonias ocurre solo cuando la siembra se desarrolla a una cierta densidad inicial óptima de células, en caso de excesivo número de células por unidad de superficie los fibroblastos forman una monocapa, mientras en caso de insuficiente densidad ellas fallan en crecer (13). Los resultados del estudio mostraron que, a los 25 días de cultivo, se evidenció una serie de células que forman una monocapa coincidiendo con el estudio de Brizuela y cols (2013), en el cual se encontró que a las 4 semanas de cultivo se observó la presencia de células madres mesenquimales.

Con relación a la viabilidad de las células antes y tras el intercambio se encontró que ésta siempre estuvo por encima del 98%, lo que puede deberse a la densidad de siembra de las células, datos similares fueron reportados por Oláves y cols (2014) quienes reportaron una viabilidad celular del 95% y el conteo total de células aisladas fue de  $5 \times 10^5$  cel/ml, en condiciones similares a las del presente estudio (32).

Con relación a la proliferación celular, Gronthos y cols (2000), observaron que las células madre aisladas de papila apical de terceros molares exhiben una alta tasa de proliferación, esto puede ser atribuido al estado de desarrollo del tejido respectivo, los terceros molares son los últimos dientes permanentes en completar su desarrollo y hacer erupción y están en un temprano estado de desarrollo comparado con otras fuentes de estas células como la médula ósea adulta. En el presente estudio se observó que tanto las células de la pulpa como de la papila, cultivadas bajo específicas condiciones logran ser proliferativas, llegando más o menos a 2 millones de células aproximadamente en 12 días de cultivo, sin diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,7$ ). Sin

embargo, algunas muestras presentaron diferencias significativas en relación al medio condicionado encontrándose valores  $p=0,01$  hasta  $p=0,04$ , lo que podría indicar que el tipo de intercambio está relacionado con el nivel de proliferación celular, aunque no necesariamente sea para aumentar la proliferación (2).

En el presente estudio no se apreció un cambio notable en la expresión de alguno de los marcadores, las únicas muestras que cambiaron luego de ser cultivadas en medios condicionados es la del marcador CD105 en las pulpas 8 y 13, lo cual permite inferir que el medio de las papilas induce la expresión de este marcador, algunos autores sugieren que las células madres comparten un perfil de expresión similar de marcadores celulares, incluido el CD105 (33).

En los resultados de este estudio, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre muestras de pulpa y papila, pero si hay diferencia significativa respecto al nivel basal, especialmente entre pulpa 12 y pulpas 6, 8 y 13, luego del intercambio del medio condicionado, lo que sugiere que los medios condicionados provenientes de papila podrían influir en la diferenciación hacia osteocitos de células madre provenientes de pulpa (16).

Para los ensayos de caracterización y para la producción de los medios condicionados y su intercambio, se seleccionaron las muestras 7, 8, 11 y 12 de papila apical y 6, 8, 13 y 14 de pulpa por haber presentado las condiciones apropiadas para el análisis y haber crecido en menor tiempo, así, la metodología empleada para obtener medios condicionados de cultivos de células madre mesenquimales resultó apropiada para generar dichos medios, sin embargo, no existe hasta el momento estudios que permitan comparar el comportamiento de los cultivos tras la siembra en medios condicionados, pero, sí se ha reportado la gran relevancia de los medios condicionados en la terapia tisular Núñez, (2010), por ejemplo, reportó la regeneración total de tejidos deteriorados en roedores luego de ser tratados con medios condicionados (34) al respecto, Álvarez (2009), sostiene que la diferenciación hacia un linaje deseado se puede lograr a través de medios condicionados con factores de crecimiento (35).

Por otra parte, los ensayos mostraron que, el porcentaje de diferenciación hacia osteocitos se encuentra por debajo del 70%, pero en general se encontró por encima del 50%, coincidiendo con Pineda y Londoño (2009) quienes reportan que las células fueron inducidas a diferenciación osteogénica hasta por 23 días; durante este tiempo, las células en presencia de los factores de diferenciación mostraron cambios morfológicos, pasando de una configuración alargada a una

configuración poligonal, consistente con la morfología osteoblástica producto de la osteogénesis, alcanzando una confluencia del 70%,(36).

Los resultados muestran que el porcentaje de diferenciación hacia adipocitos se encuentra por debajo del 30%, lo que pudo deberse al número de muestras y la variación entre los valores obtenidos, es posible que la diferenciación hacia osteocitos requiera menor tiempo de cultivo que hacia adipocitos.

La diferenciación hacia adipocitos presentó diferencias estadísticas significativas ( $p= 0.03$ ) con relación al nivel basal, y hay diferencia especialmente entre pulpa 8 y pulpas 13, 14 y papila 11 tras el intercambio del medio condicionado, lo que podría indicar que el medio condicionado proveniente de papilas también influye en la diferenciación hacia adipocitos de las células madre provenientes de pulpa dental, autores como Nuñez (2010), resaltan el papel de los medios condicionados en la ingeniería celular, el autor sugiere que los tratamientos con células y medio condicionado favorecen la recuperación motora.

La citometria de flujo permitió caracterizar las poblaciones celulares obtenidas en este estudio, permitiendo identificar marcadores CD90, CD105 y CD73, indispensables para la identificación de células madre en tejidos y coincidiendo con los resultados reportados por Carrillo (2015), quien identificó valores positivos para el marcador CD90 y CD 105 entre otros.

Dentro de las dificultades presentadas en la investigación se relacionan la contaminación de las muestras y poca documentación relacionada con el tema específico y la falta de reactivos para llevar a cabo la diferenciación a linaje condrogénico, Respecto al primer aspecto, de las 37 muestras cultivadas 4 (10,8%) se contaminaron, de estas 2 (50%) fueron muestras enviadas en envases sin antibióticos, lo que pudo haber afectado el crecimiento celular, de acuerdo con Suárez, et al (2013), el mayor obstáculo para el establecimiento exitoso del cultivo de las células mesenquimales de la pulpa dentaria humana es la desinfección de los dientes y el manejo antibiótico para prevenir la contaminación.

## **6.1 CONCLUSIONES**

De acuerdo a la metodología empleada en este estudio, se logró aislar células madre multipotentes, con un crecimiento alrededor de 2 millones de células para cada muestra.

El medio condicionado de las células de la papila apical de terceros molares indujo positivamente a las células de la pulpa dental de premolares, principalmente con el marcador CD105.

La viabilidad de las células tras el intercambio se mantuvo por encima del 98%, la diferenciación de las células hacia osteocitos fue mayor al 50% y hacia adipocitos menor 30%.

Tras el intercambio de medios condicionados las células con mayor proliferación fueron las de pulpa dental de premolares.

## **6.2 RECOMENDACIONES**

Los resultados de este estudio sugirieron que los medios condicionados, especialmente los de células madre mensquimales de papila apical podrán tener efectos en el crecimiento y diferenciación de células madre obtenidas de pulpa dental. Para poder corroborar este fenómeno de una forma más directa se podría evaluar el efecto de ambos tipos de medios condicionados sobre otros tipos células diferentes como fibroblastos, odontoblastos, osteoblastos y demás.

Dar uso a las células madre criopreservadas, presentes en el banco de células del laboratorio de parasitología de la facultad de medicina en la Universidad Nacional de Colombia.

Se recomienda usar las células aisladas para responder preguntas comúnmente evaluadas por otros proyectos en el posgrado como el efecto de cementos, resinas o compuestos naturales sobre las células de la pulpa dental.

La escasa bibliografía relacionada con el comportamiento de las células madre luego de ser cultivadas en medios condicionados, dificultó la interpretación y comparación de los hallazgos de la investigación. Se requieren más estudios que permitan evaluar en una muestra mayor, si existe diferencia entre la respuesta de las células madre extraídas de pulpa dental y papila apical tras el cultivo en medios condicionados, para su posible utilización en el futuro.

Las células madre obtenidas están criopreservadas en el laboratorio de parasitología de la Universidad Nacional de Colombia, allí estarán por un año a disposición de la comunidad académica del posgrado para su uso.

## 7 ANEXOS

### 7.1 ANEXO 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO MENORES DE EDAD

TÍTULO DEL PROYECTO: Proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación de las células *stem* mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares, mediante intercambio de medios condicionados. In vitro.

INVESTIGADORES: Jeimi Viviana Buitrago Ayala, Yury Andrea Bustos Valero, July Alexandra Lamprea Sierra, Lina Marcela Pulido Rangel y Jennifer Sterling Bautista.

FECHA: Septiembre de 2016

Su representado menor de edad, está siendo invitado a participar en el proyecto de investigación titulado: **PROLIFERACIÓN, VIABILIDAD Y POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES AISLADAS DE LA PAPILA APICAL DE TERCEROS MOLARES Y PULPA SANA DE PREMOLARES TRAS EL INTERCAMBIO DE SUS MEDIOS CONDICIONADOS.** Si usted decide autorizar la participación de su representado menor de edad en este estudio, debe firmar este consentimiento informado. Su firma quiere decir que se la ha explicado y ha entendido en qué consiste la participación del menor en el estudio. Esta investigación no representa ningún riesgo o molestia adicional al tratamiento odontológico que los profesionales que lo están atendiendo le han informado.

Este estudio es una investigación que se considera estudio *invitro*. El estudio se realizará en Bogotá, con la aprobación del Posgrado de Endodoncia de Bogotá de la Universidad Santo Tomás y el Comité de ética en investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Santo Tomás.

El objetivo de este estudio es: Evaluar la proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación tras el intercambio de medios condicionados obtenidos de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares.

El estudio al que su representado menor de edad está siendo invitado a participar consiste en: el cultivo en laboratorio de 15 especímenes de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y 15 de pulpa sana de premolares extraídos por indicación ortodóntica, de estos cultivos, se analizarán los 5 (de cada grupo) más representativos respecto a la proliferación de células, finalmente se realizará el intercambio de 3 cultivos (de cada tipo de célula) y se observará el crecimiento, viabilidad de los nuevos cultivos.

Es importante que usted sepa que esta investigación no le genera ningún riesgo, por tratarse de usar solamente la información clínica y muestra de la papila de los dientes que serán extraídos por motivos ortodónticos para el correspondiente estudio.

El grupo investigador lo invita a donar los dientes extraídos de su representado menor de edad, para ser utilizados dentro de este proyecto de investigación. Los dientes serán conservados adecuadamente y serán utilizados únicamente con fines de investigación.

Los datos de este estudio serán publicados. La información publicada no incluirá el nombre del menor o cualquier otra forma de identificación. De requerirse no serán utilizados sin su expresa autorización. La historia clínica del menor podrá ser consultada por el investigador para el estudio. Usted puede hablar con los investigadores en cualquier momento y hacer cualquier pregunta que tenga en relación con el estudio dirigiéndose a los investigadores:

Yo \_\_\_\_\_ (Nombre del participante) menor de edad declaro que se me ha explicado en qué consistirá mi participación en el estudio y acepto participar en él.

Firma del participante: \_\_\_\_\_

Yo \_\_\_\_\_ (Nombre del representante legal) identificado con C.C. \_\_\_\_\_ declaro que:

- Me han dado una copia de este consentimiento informado.
- Me ha sido dada la oportunidad de hacer todas las preguntas sobre la investigación y estas han sido respondidas.
- He entendido perfectamente que se utilizará la información para reportar el seguimiento del tratamiento que le fue practicado a mi representado menor de edad durante la investigación y estoy de acuerdo con que mi representado participe en el estudio.
- Autorizo que los resultados obtenidos del presente estudio sean publicados.

- Autorizo además que el material aislado de las muestras de mi representado pueda almacenarse para ser usado en otras investigaciones

**DATOS DEL PARTICIPANTE MENOR DE EDAD**

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

**DATOS DEL REPRESENTANTE LEGAL**

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**DATOS DE LOS INVESTIGADORES**

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**DATOS DE LOS TESTIGOS**

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Parentesco con el participante: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROYECTO: comportamiento de células *stem* mesenquimales aisladas de papila apical y pulpa sana tras intercambio de sus medios condicionados.

INVESTIGADORES: Jeimi Viviana Buitrago Ayala, Yury Andrea Bustos Valero, July Alexandra Lamprea Sierra, Lina Marcela Pulido Rangel y Jennifer Sterling Bautista.

FECHA: Septiembre de 2016

Usted, está siendo invitado a participar en el proyecto de investigación titulado: **COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS STEM MESENQUIMALES AISLADAS DE PAPILA APICAL Y PULPA SANA TRAS INTERCAMBIO DE SUS MEDIOS CONDICIONADOS**. Si usted decide autorizar su participación en este estudio, debe firmar este consentimiento informado. Su firma quiere decir que se la ha explicado y ha entendido en qué consiste la participación en el estudio. Esta investigación no representa ningún riesgo o molestia adicional al tratamiento odontológico que los profesionales que lo están atendiendo le han informado.

Este estudio es una investigación que se considera estudio *invitro*. El estudio se realizará en Bogotá, con la aprobación del Posgrado de Endodoncia de Bogotá de la Universidad Santo Tomás y el Comité de ética en investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Santo Tomás.

El objetivo de este estudio es: Evaluar la proliferación, viabilidad y potencial de diferenciación tras el intercambio de medios condicionados obtenidos de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares.

El estudio al que está siendo invitado a participar consiste en: el cultivo en laboratorio de 15 especímenes de células madre mesenquimales aisladas de la papila apical de terceros molares y pulpa sana de premolares extraídos por indicación ortodóntica, de estos cultivos, se analizarán los 5 (de cada grupo) más representativos respecto a la proliferación de células, finalmente se realizará el intercambio de 3 cultivos (de cada tipo de célula) y se observará el crecimiento, viabilidad de los nuevos cultivos.

Es importante que usted sepa que esta investigación no le genera ningún riesgo, por tratarse de usar solamente la información clínica y muestra de la papila de los dientes que serán extraídos por motivos ortodónticos para el correspondiente estudio.

El grupo investigador lo invita a donar los dientes extraídos, para ser utilizados dentro de este proyecto de investigación. Los dientes serán conservados adecuadamente y serán utilizados únicamente con fines de investigación.

Los datos de este estudio serán publicados. La información publicada no incluirá el nombre o cualquier otra forma de identificación. De requerirse no serán utilizados sin su expresa autorización. La historia clínica del menor podrá ser consultada por el investigador para el estudio. Usted puede hablar con los investigadores en cualquier momento y hacer cualquier pregunta que tenga en relación con el estudio dirigiéndose a los investigadores:

Yo \_\_\_\_\_ (Nombre del participante) con c.c. \_\_\_\_\_ declaro que se me ha explicado en qué consistirá mi participación en el estudio y acepto participar en él, declaro que:

- Me han dado una copia de este consentimiento informado.
- Me ha sido dada la oportunidad de hacer todas las preguntas sobre la investigación y estas han sido respondidas.
- He entendido perfectamente que se utilizará la información para reportar el seguimiento del tratamiento que le fue practicado a mi representado menor de edad durante la investigación y estoy de acuerdo con que mi representado participe en el estudio.
- Autorizo que los resultados obtenidos del presente estudio sean publicados.
- Autorizo además que el material aislado de las muestras de mi representado pueda almacenarse para ser usado en otras investigaciones

#### DATOS DEL PARTICIPANTE

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

#### DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**DATOS DE LOS TESTIGOS**

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Parentesco con el participante: \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Parentesco con el participante: \_\_\_\_\_

## 8 BIBLIOGRAFIA

---

- 1 Debeljak J, Francuski J, et al. Characterization of deciduous teeth stem cells isolated from crown dental pulp. *Vojnosanit Plegl.* 2014; 71(8): 735–741.
- 2 Yadav S, et al. Stem Cells: Milestone in Regenerative Dentistry. *International Journal of Oral Health Dentistry.* 2015; 1(2):69-71
- 3 Yao S, Pan F. Stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008; 87 (8): 767 – 771.
- 4 Martin J. Expectativas clínicas del uso de las células madre. *The Lancet* 2005; 365; 2070-2071.
- 5 Graciano A, Dáquino R. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008; 4 (1):21-6.
- 6 Buján P, Mejía V, Luna P, inventores; Real Fundación Progreso y Salud. Uso de un medio de cultivo condicionado por células madre mesenquimales para la diferenciación de células madre pluripotentes humanas. Fundación Progreso y Salud. EP. WO2011124741 A1. Patente, 2011 octubre 13.
- 7 Gronthos M, Mankani J, Brahim P, Gehron R, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *PNAS.* 2000; 97 (25): 13625–30.
- 8 Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytogfr.* 2009; (20): 435-440
- 9 Suardita, K. El Potencial De Aplicación De Células Madre En Odontología. *Dent. J.* Oct–Dec. 2006; 39(4): 177–180.
- 10 Prates, A. Células Madre En Odontología. *Revista Odontológica De Ortodoncia y Ortopedia Facial, Cielo. Dental Press Editora Ltda., 2008; 15- 21*
- 11 Miura M, Gronthos S. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 2003; 100 (10): 5807–5812
- 12 Jamal M, Chogle S. Periodontal Ligament in dentistry. *Journal of Medical Sciences.* 2011; 4: 53-61

- 
- 13 Raghavendra M. Shetty, P. A new source of stem cells in dentistry. *Journal of Health Sciences*. September. 2013; 1 (1): 1 – 3
- 14 Seo, B et al. Recuperación de células madre para la criopreservación del ligamento periodontal. *J Dent Res*. 2005; 84(10):907-912
- 15 Gandhi A, Gandhi T, Madan N. Dental pulp stem cells in endodontic research: a promising tool for tooth tissue engineering. *RSBO*. 2011; 8, (3): 335-40
- 16 Munévar J. Aspectos celulares y moleculares de las células madre involucradas en la regeneración de tejidos. *Acta odontol Ven*. 2008; 46 (3): 1 – 17
- 17 Al-Sharabi, Niyaz, et al. "Conditioned medium from human bone marrow stromal cells attenuates initial inflammatory reactions in dental pulp tissue." *Dental Traumatology*.2017; 33(1): 19-26.
- 18 Rosales R, Cano J, Jiménez A. Obtención de células madre mesenquimales de pulpa dental por medio de la técnica de explante. *JADA*. 2014;7(4): 52-56.
- 19 Riaño N, Vera J. Aislamiento, caracterización y potencial de diferenciación de células madre mesenquimales caninas derivadas de tejido adiposo. *Rev Fac Med Vet Zoot*. 2014; 61(2), mayo – agosto: 115-133.
- 20 Cea M, Sánchez G. Células madre mesenquimales orales: Estado del arte en Odontología. *Av. Odontoestomatol*. 2016; 32 (2): 97-105
- 21 Seo, B, Miura M, Sonoyama W, Coppe G, Stanyon R, Shil S. Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. *J Dent Res*. 2005; 84(10):907-912.
- 22 Flores E, Montesinos J, Mayani H. "Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica." *Revista de investigación clínica*. 2006; 58.5: 498-511.
- 23 Dager S, et al. "Ventajas y usos de las células madre en estomatología." *MediSan*. 2014;18.9: 1282-1292.

- 
- 24 Velilla L, Molina M, Miralles M, García L, Reina P, Castellarnau C. Células madre adultas (mesenquimales y nucleadas). Aplicación al campo de la regeneración ósea maxilar en implantología. *Gaceta dental: Industria y profesiones*. 2006;173:76-95.
- 25 Pérez A, Casado F. "Stem cells: limitations and opportunities in Peru." *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*. 2015; 32.4: 777-786.
- 26 Shi S, Bartold P, Miura M, Robey M, Gronthos S. La eficacia de Células mesenquimatosas de tallo para regenerarse y reparar la estructura dental. *Odontol craneofacial*.2005; 32(2): 994 - 998.
- 27 Magallanes M, Carmona B, Álvarez M. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Revista Odontológica Mexicana*. 2010; 14(1): 15- 20.
- 28 Brizuela C, et al. Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano. *International Journal of Morphology*. 2013; 31 (2): 739-746
- 29 Casagrande, L.; Cordeiro, M. M.; Nör, S. A. & Nöör, J. E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 99(1):1-7, 2011
- 30 Carrillo N, García D, Otero L. Aislamiento y capacidad de osteodiferenciación de las células madre provenientes del ligamento periodontal y pulpa dental. *Rev. CES Odont*. 2015; 28(2): 20-34.
- 31 Riaño N, Vera J. Aislamiento, caracterización y potencial de diferenciación de células madre mesenquimales caninas derivadas de tejido adiposo. *Rev Fac Med Vet Zoot*. 2014; 61(2): 115-133.
- 32 Olávez, D, Salmen S, Padrón K, et al. Aislamiento y cultivo de células madre posnatales de dientes primarios. *Universitas Odontológica*. 2014; 33(70): 187-193.
- 33 Zhang Q, Shi S, Liu Y, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J. Immunol*. 2009; 183(12):7787-98

---

34 Núñez D. Evaluación del efecto de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y de medios condicionados en la recuperación motora de ratas con lesión [Tesis doctoral]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de odontología, 2010

35 Álvarez Barreto, J. F. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios, 1(2).

36 Pineda C, Londoño P. Obtención de células madre del tejido adiposo y su potencial de diferenciación osteogénico. Revista Ingeniería Biomédica. 2009; 3(5): 58-65.