



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE PULPA DENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES

Tesis presentada por:

HERNÁN HUMBERTO PERAZA DORANTES

En opción al Grado de:

MAESTRO EN ODONTOLOGÍA INFANTIL

Directores:

DR. RICARDO PEÑALOZA CUEVAS

DRA. NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES

Mérida, Yucatán, Diciembre 2018



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE
PULPA DENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS
TRONCALES

Tesis presentada por:

HERNÁN HUMBERTO PERAZA DORANTES

En opción al Grado de:

MAESTRO EN ODONTOLOGÍA INFANTIL

Directores:

DR. RICARDO PEÑALOZA CUEVAS

DRA. NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES

Mérida, Yucatán, Diciembre 2018



UADY
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
CARRERAS DE GRADUACIÓN

UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Mérida, Yucatán, 10 de diciembre de 2018

C. HERNÁN HUBERTO PERAZA DORANTES

Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisores, le informo que la Tesis titulada "**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE PULPA DENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES**", presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Título de la Maestría en Odontología Infantil, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.

M. C. O. José Rubén Herrera Atoche
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación

Dr. Ricardo Peñalosa Cuevas
Director

Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes
Directora

M.E.E. Nelly del Carmen Castro Linares
Revisora

M. en O. Gabriel Alvarado Cárdenas
Revisor

Artículo 78 del reglamento interno
de la facultad de Odontología de la
Universidad Autónoma de Yucatán.

Aunque una tesis hubiera servido para un
examen profesional y hubiera sido aprobada
por el sínodo, solo el autor o autores son
responsables de las doctrinas en ella
emitidas.

Este trabajo se realizó en la Clínica de la Maestría en Odontología Infantil de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán y el Laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) de Mérida, Yucatán, México, bajo la dirección de la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes y del Dr. Ricardo Peñaloza Cuevas. Los resultados son parte del proyecto de investigación “Establecimiento de metodologías para el aislamiento y caracterización de células madre de pulpa dental humana” con número de registro ante el Comité de Ética en Investigación CIE- 06- 2017.

AGRADECIMIENTOS

Antes de todo, agradezco a Dios por regalarme el don de la vida y por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una existencia llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi esposa por el apoyo incondicional que me brindó durante todo el proyecto de este trabajo.

A mis padres por el amor que les tienen a sus hijos, por el apoyo que me han brindado, porque han trabajado para darme lo mejor, y así poder concluir mi maestría.

A mis directores de tesis Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes y Dr. Ricardo Peñaloza Cuevas, así como a mis asesores MEE. Nelly del Carmen Castro Linares y CDEE. Gabriel Alvarado por la paciencia, la confianza y sobre todo por sus consejos que me ayudaron a terminar este trabajo de tesis.

A la Universidad Autónoma de Yucatán, a la Facultad de Odontología, a todo el personal docente, administrativo y manual, así como al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por permitirme realizar las practicas que fueran necesarias para elaborar esta tesis.

A la Dra. Luz E. Alcántara Quintana, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por el apoyo en la realización y análisis de los resultados de citometría de flujo.

A Felipe Alonso Barredo Pool, técnico de la Unidad de Biotecnología, por la realización de cortes histológicos a la pulpa dental.

A los proyectos CONACYT 1360 (Fronteras de la Ciencia) y 248378 (Problemas Nacionales).

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a mi esposa quien ha sido mi mano derecha durante todo este tiempo, quien de manera desinteresada me ayudó a motivarme y darme su mano cuando más lo necesité, quien siempre me apoyó durante todo este proceso de mi formación profesional de maestría. Te agradezco por todo porque a pesar de los momentos difíciles siempre estuviste para levantarnos y continuar con este proyecto. Eres una gran persona y deseo tenerte a mi lado por el resto de mi vida.

RESUMEN

En el área de la salud el objetivo ha sido desarrollar estrategias que regeneren tejidos y órganos lesionados, anómalos, muertos, degenerados o perdidos por diversas causas. Es por ello que la investigación de las células troncales muestra una amplia perspectiva hacia la aplicación clínica. Debido a la facilidad de acceso de la pulpa dental a partir de la cual se obtienen células troncales, se considera candidata ideal para la investigación en áreas médicas de ingeniería de tejidos. El objetivo de este trabajo consiste en comparar la técnica de corte transversal contra la longitudinal para la obtención de células troncales de la pulpa dental. Además se realizaron pruebas de clonogenicidad, multipotencia y citometría de flujo. Para ello la muestra se obtuvo de pacientes entre 12 y 18 años que acudieron a la Clínica de la Maestría de Odontología Infantil (CMOI) y Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (FOUADY) durante el periodo agosto 2017 - junio 2018.

Este estudio fue experimental, longitudinal y prospectivo. El tamaño de la muestra fue intencionada, no probabilística. Se estudiaron 24 pulpas de premolares divididos en dos grupos: 1. Corte longitudinal 41.7% (n=10) y 2. Corte transversal 58.3% (n=14), de las cuales se comparó el rendimiento valorado mediante el peso pulpar (7.0 mg). No se encontró diferencia significativa entre los pesos obtenidos por cada técnica de corte ($p=0.472$); es decir, que el rendimiento (valorado mediante el peso pulpar) del corte transversal fue similar al del longitudinal. Se obtuvo proliferación celular a partir de las últimas 6 pulpas del grupo de corte transversal (42.9%) a las que se les realizaron pruebas de clonogenicidad, multipotencia y citometría de flujo para CD90-CD73 ($0.14\% \pm 0.01\%$) y CD90-CD105 ($0.08\% \pm 0.01\%$).

Con base en las pruebas realizadas a las 6 pulpas podemos considerar que la técnica de corte transversal pudiera ser la más viable para la obtención de células troncales. Sin embargo, se considera necesario realizar más pruebas en condiciones diferentes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
Pulpa dental de premolares	2
1. Células que conforman la pulpa	4
Células troncales	5
1. Clasificación de las células troncales de acuerdo al potencial de diferenciación	6
2. Células troncales mesenquimales	8
Técnicas de obtención pulpar	11
Técnicas de cultivo celular	13
1. Método de explante	16
Aislamiento, caracterización y potencial de diferenciación celular	16
Aplicación clínica de las células troncales de pulpa dental	17
HIPÓTESIS	20
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
DISEÑO DEL ESTUDIO	23
VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
POBLACIÓN DE ESTUDIO	24

1. Criterios de inclusión	24
2. Criterios de exclusión	24
3. Criterios de eliminación	24
4. Tamaño de la muestra	24
METODOLOGÍA	25
1. Recolección y manejo de los órganos dentarios	25
1.1. Procedimiento para la obtención del órgano dentario	25
2. Prueba piloto	26
2.1. Procedimiento para la obtención de la pulpa dental	26
2.1.1. Grupo 1 (Corte longitudinal)	26
2.1.2. Grupo 2 (Corte transversal)	26
3. Obtención de las células	27
3.1. Método de explante	27
4. Prueba experimental	28
4.1. Procedimiento para la obtención de la pulpa dental	28
4.1.1. Grupo 1 (Corte longitudinal)	28
4.1.2. Grupo 2 (Corte transversal)	28
4.2. Procedimiento para la obtención de células pulpares	29
4.2.1. Método de explante	29
4.3. Tripsinización	30
4.4. Cultivo celular	31
4.5. Criopreservación	31
4.6. Descongelación	31
4.7 Estimación de la eficiencia de obtención de células	32
4.8. Caracterización de las células troncales obtenidas	33
4.8.1. Clonogenicidad	33
4.8.2. Multipotencia	33
4.8.3. Tinción de las placas de cultivo celular para clonogenicidad	34
4.8.4. Tinción de las placas de cultivo celular para multipotencia	35
4.8.5. Tinción de Rojo Oleoso para lípidos sobre células en placa	36

4.8.6. Tinción de Rojo de Alizarina S para hueso sobre células en placa	36
4.8.7. Caracterización de marcadores de superficie celular mediante citometría de flujo	36
5. Manejo de los sujetos de estudio	37
6. Métodos de medición y estandarización	37
7. Aspectos éticos	37
8. Equipo	38
RESULTADOS	39
Prueba piloto	39
1. Rendimiento de las técnicas con base en el peso pulpar	39
Resultados de la prueba experimental	43
1. Rendimiento de las técnicas con base en el peso pulpar	43
2. Análisis de la eficiencia de la obtención de la siembra de la pulpa dental	45
3. Análisis cualitativo de la eficiencia de la obtención de la pulpa dental	46
4. Efecto del tipo de corte sobre la eficacia de obtención pulpar	46
5. Clonogenicidad	49
6. Multipotencia	52
7. Citometría de flujo	53
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tipos de cultivos celulares	14
2. Prueba piloto: Relación de la muestra por órgano dentario y técnica de corte para extracción pulpar	39
3. Prueba piloto: rendimiento de las técnicas de corte con base en el peso pulpar obtenido por cada órgano dentario	40
4. Prueba piloto: medidas de tendencia central máximos, mínimos y pruebas de normalidad para pesos pulpares (mg) por técnica de corte	41
5. Prueba piloto: estado de la pulpa posterior a la siembra	42
6. Rendimiento de las técnicas de corte con base en el peso pulpar obtenido por cada órgano dentario	44
7. Prueba piloto: medidas de tendencia central máximos, mínimos y pruebas de normalidad para pesos pulpares (mg) por técnica de corte	45
8. Promedio y desviación estándar de colonias y relación colonia/concentración	51

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Complejo dentino-pulpar	3
2. Fibroblastos teñidos con cristal violeta al 0.5%	4
3. Clasificación de células troncales de acuerdo a su potencial de diferenciación	7
4. Zonas de extracción de células troncales de origen bucal	9
5. Cultivo secundario	15
6. Corte transversal y corte longitudinal	29
7. Pulpa dental vista al microscopio	30
8. Botón celular	32
9. Conteo celular mediante la cámara de Neubauer	32
10. Placa de 24 pozos donde se muestra la manera en la que se sembró la suspensión celular de la P1, P2, P3, P4, P5, P6	34
11. Placa de 6 pozos de 3.5 cm de diámetro	35
12. Prueba piloto: porcentajes expresados de los estados de la pulpa posteriores a la siembra	42
13. Placa en posición vertical	45
14. Células saliendo del explante pulpar	47
15. Vista al microscopio de diferentes densidades y ampliaciones	48
16. Tiempo en días requerido por las células de la pulpa dental para salir del explante y alcanzar la confluencia en frascos T-25 y T-75.	49
17. Vista al microscopio de la cinética de formación de una colonia celular	50
18. Placa de 6 pozos con tinción de cristal violeta al 0.5%	51
19. Morfología y tipos celulares obtenidos tras el sembrado de células pulpaes en placa para multipotencia	53
20. Citometría de flujo para marcadores mesenquimales	54

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Carta de consentimiento informado	64
2. Lista de instrumental de cirugía	66
3. Puntos a considerar desde la extracción del órgano dentario hasta la siembra	67
4. Técnicas de corte transversal y longitudinal: ventajas y desventajas	68

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El interés en el estudio de las células troncales de origen dental (CTOD) ha aumentado, debido a la accesibilidad, plasticidad y alta capacidad proliferativa en comparación con células troncales (CT) provenientes de otras fuentes del organismo como la médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo. De igual manera han demostrado la capacidad de ser células clonogénicas adherentes que pueden diferenciarse en mesenquimales y no mesenquimales, siendo una fuente potencial, hoy en día en la medicina regenerativa, para el tratamiento de múltiples enfermedades sistémicas, actualmente tratadas con costosos medicamentos y tratamientos prolongados, que generalmente solo controlan el padecimiento. Las CTOD han demostrado ser un excelente modelo de investigación que contribuye a la generación de procedimientos como la regeneración tisular.

Es muy extensa la investigación internacional sobre el tema y constantemente se buscan técnicas, herramientas y aplicaciones para promover la regeneración de tejidos incapacitados, sin embargo, en México la aplicación clínica con terapéuticas que incluyan CTOD se está utilizando comercialmente sin bases científicas reales.

En este estudio se utilizarán las células troncales de pulpa dental (CTPD) de premolares para extracción con indicación ortodóncica ya que poseen un alto potencial de proliferación con capacidad de diferenciación de múltiples linajes y autorenovación, además de la fácil obtención con mínima invasión, dolor y morbilidad, hacen de estos dientes una valiosa fuente de células troncales mesenquimales (CTM).

Existen diversas técnicas para la extracción, caracterización, manejo y conservación de la pulpa dental, así como el cultivo y caracterización de CT. Es por ello que surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la técnica de extracción de pulpa dental más eficaz para la obtención de células troncales?

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Actualmente, las ciencias de la salud tienen como objetivo desarrollar estrategias que regeneren tejidos y órganos lesionados, anómalos, muertos, degenerados o perdidos por diversas causas, una estrategia para el desarrollo de estas estructuras dañadas, es el empleo de CTOD (1,2).

PULPA DENTAL DE PREMOLARES

Los premolares se conforman de esmalte, dentina, estructuras de soporte como el cemento y ligamento periodontal, así como de la pulpa dental, que es un tejido conjuntivo laxo sensorial único que ocupa la parte central de los dientes, de origen mesenquimatoso con células especializadas (odontoblastos). Es un sistema microcirculatorio cuyos mayores componentes vasculares son las vénulas y las arteriolas (3,4,5).

La pulpa tiene una función primaria formativa, ya que de ella derivan los odontoblastos que forman la dentina, entre sus funciones secundarias se encuentran la sensibilidad, hidratación (nutritiva) y defensa de los dientes. La pulpa deriva de la cresta neural cefálica (células ectomesenquimatosas) (3,4).

El diente se origina de la lámina dental, la cual está formada por invaginaciones que darán lugar a los gérmenes dentales deciduos, en última instancia éstos albergan a la papila dental que dará lugar a la formación de la pulpa dental. Posteriormente, la capa externa de células de la papila dental se diferencia en odontoblastos y se empieza a depositar dentina. Por otro lado, la raíz se forma por la proliferación apical de dos epitelios fusionados llamados vaina epitelial de Hertwig, mientras que la anatomía del conducto radicular varía de un diente a otro (3,4).

La pulpa dental tiene múltiples funciones en la homeostasis de los dientes, y el mantenimiento de la función del tejido pulpar es crítico para la longevidad de los mismos. El tejido pulpar contiene CT progenitoras que bajo influencia específica se diferencian en odontoblastos (6).

El órgano dentario (OD) está inervado por un gran número de fibras nerviosas mielínicas y amielínicas, así como neuronas aferentes que conducen los impulsos sensoriales, y fibras autonómicas que permiten la modulación neurogénica de la microcirculación, regulando la dentinogénesis (3).

La dentina y la pulpa forman un complejo monotisular (Figura 1). Microscópicamente se divide en zonas, en las regiones periféricas se observa la capa odontoblástica compuesta por los procesos celulares de los odontoblastos, debajo de esta capa se encuentra la Zona de Weil (pobre en células) compuesta por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y finas prolongaciones de los fibroblastos, por dentro, se encuentra la zona rica en células compuesta por una proporción abundante de fibroblastos, además de macrófagos, células dendríticas y CT y la pulpa propiamente dicha (núcleo pulpar) que contiene fibroblastos, y ramas importantes de nervios y vasos sanguíneos (3,4,7).

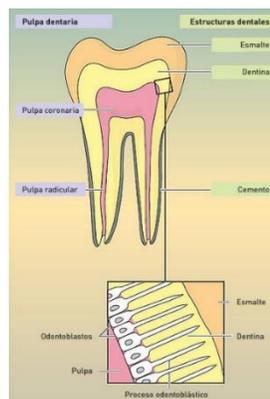


Figura 1. Complejo dentinopulpar

1. CÉLULAS QUE CONFORMAN LA PULPA

La pulpa dental se constituye por tejido conectivo laxo en el que subyacen diversas estirpes celulares, como los odontoblastos, fibroblastos, células dendríticas, linfocitos, macrófagos, mastocitos, células progenitoras (3,5).

1.1 Odontoblastos: considerados las células más características de la pulpa, entre sus funciones están la formación de una única capa periférica, sintetizan la matriz extracelular y controlan la mineralización de la dentina (3,4).

1.2. Fibroblastos: son las células más numerosas del tejido pulpar (Figura 2), se concentran en mayor número en la pulpa coronal. Su función es sintetizar y renovar la colágena tipo I, III, V y VII y la sustancia básica de la pulpa, así como modificar la estructura pulpar en procesos patológicos. En algunos estudios se sugiere que muchas de las células identificadas como “fibroblastos” pueden ser en realidad CT (3,4).

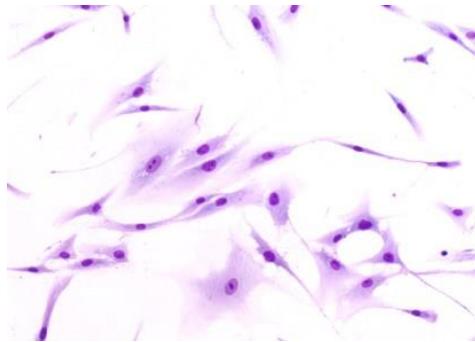


Figura 2. Fibroblastos teñidos con cristal violeta al 0.5%

1.3. Células dendríticas: elementos accesorios del sistema inmune, desempeñan una función central en la inducción de la inmunidad dependiente de las células T (3,4).

1.4. Linfocitos: células inmunitarias encargadas de iniciar respuestas inmunes (3,4).

1.5. Macrófagos: desempeñan funciones de endocitosis y fagocitosis, capaces de eliminar hematíes extravasados, células muertas y sustancias extrañas presentes en la pulpa (3,4).

1.6. Mastocitos: ocasionalmente se encuentran en tejido pulpar normal, por lo que en procesos inflamatorios se encuentran de forma sistemática (3).

1.7. Células progenitoras: también conocidas como células mesenquimatosas indiferenciadas, realizan la formación de odontoblastos cuando se produce una lesión que causa la muerte de los odontoblastos existentes. Se encuentran en todo el tejido pulpar con mayor densidad en el núcleo pulpar (3,4).

También se encuentran células sanguíneas, células de Schwan, pericitos, y células endoteliales (3,4).

CÉLULAS TRONCALES

El primer registro del término “células troncales” fue dado por Ernst Haeckel en 1868, quien la definió como “*stammzelle*” (del término alemán) (8). Célula madre, célula troncal y célula progenitora son sinónimos con los que puede nombrarse a las CT (2,9).

Las CT son tipos celulares que se renuevan durante largos periodos por división celular sin perder sus características. (7-11).

Son células indiferenciadas que tienen la capacidad de experimentar un número indefinido de divisiones celulares, es decir, de diferenciarse en células especializadas, autorrenovarse, colonizar, integrarse y originar nuevos tejidos. Las CT representan una fuente ilimitada de células potencialmente funcionales para la investigación básica, así como la aplicación clínica en medicina regenerativa, por lo tanto, son diferentes a otros tipos celulares existentes en el organismo (2,11-14).

Estas células se describieron inicialmente desde su observación en la médula ósea como poblaciones de células fibroblásticas y clonogénicas, capaces de crear depósitos de tejido óseo y cartilaginoso. Luego de su identificación en la medula ósea, se inició una búsqueda de CT en otros tejidos (15).

Las CT de la medula ósea (CTMO) se obtienen mediante punción de la medula de los huesos iliacos o del esternón. Las CT de sangre periférica se obtienen mediante aféresis, es un procedimiento doloroso y tardado. Las CT del cordón umbilical se obtienen a partir de sangre del cordón umbilical obtenida posterior al nacimiento del feto, a pesar de ser un tratamiento atraumático e indoloro para la madre y el recién nacido, está cayendo en desuso por las nuevas técnicas de mínima invasión en fuentes como los órganos dentarios (12,16).

Derivado de estas investigaciones, se develó que las CT se encuentran en diversos tejidos tanto embrionarios como adultos, como la placenta, el tejido adiposo, tejido menstrual, entre otros. Sin embargo, la procuración y manipulación de estos tejidos representa complicaciones éticas y metodológicas para la extracción de CT, por lo que los tejidos exfoliados naturalmente o indicados a extracción como los dientes premolares, representan una excelente fuente de CT, como lo es la pulpa dental (12,16).

1. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES DE ACUERDO AL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN

1.1. Células troncales totipotenciales

Células con capacidad de dar lugar a todo tipo de células del organismo, capaces de originar un embrión y un ser completo, pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo, endodermo) (3,11,12,17) incluyendo tejidos extraembrionarios como la placenta. El cigoto fecundado es la “célula totipotencial por excelencia” (2).

1.2. Células troncales pluripotenciales

Células capaces de originar tejidos u órganos correspondientes a las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), no origina el tejido extraembrionario, por lo que son incompetentes en originar a un organismo completo, se diferencian en todos los tipos de células somáticas. De este tipo de CT deriva la pulpa dental (12,17-19).

1.3. Células troncales multipotenciales

Pueden dar origen a un subconjunto de tipos celulares, de su misma capa o linaje (ectodermo, mesodermo o endodermo) de origen embrionario (Figura 3). Un ejemplo son las CT sanguíneas o hematopoyéticas que pueden originar diversos tipos celulares, pero específicamente los tipos celulares que componen la sangre (11,12,17).

1.4. Células troncales unipotenciales

Se diferencian en un solo tipo celular; como lo son las células germinales que dan origen a los gametos, y las CT develadas en tejidos adultos, como por ejemplo el hígado, las cuales poseen baja capacidad de diferenciación que les posibilita a diferenciarse exclusivamente a células hepáticas, los hepatocitos (12,17).

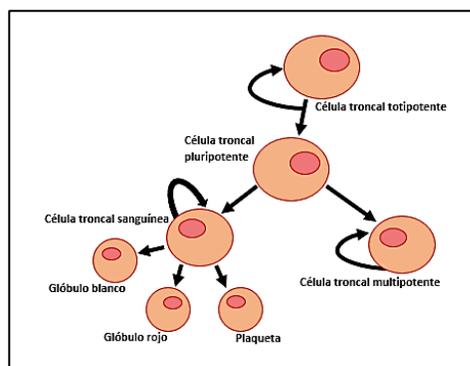


Figura 3. Clasificación de células troncales de acuerdo a su potencial de diferenciación

2. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (CTM)

Son células multipotenciales primitivas de morfología fibroblastoide, se encuentran presentes en diferentes fuentes como son la médula ósea, dermis, tejido adiposo, cordón umbilical, cerebro, pulmones, hígado, músculo esquelético y órganos dentarios tanto deciduos como permanentes (11). Se agrupan en nichos capaces de mantener las CT controlando su supervivencia, proliferación y diferenciación y de acuerdo a su capacidad para originar complejo dentinopulpar o no, las CTM adultas de la cavidad bucal se encuentran clasificadas en dos tipos: dentales y no dentales respectivamente (11,19-23).

Se clasifican en embrionarias y adultas. Comparándolas con los tipos de CT adultas manipuladas en la ingeniería de tejidos, las CTM se utilizan en su mayoría para fines terapéuticos (21,24).

2.1. Células troncales embrionarias

La masa celular interna del embrión es su origen y localización. Generan todos los tipos celulares del organismo. Son células totipotentes. La desventaja de estas células en la aplicación clínica es que tendrían que ser extraídas de su medio natural (11).

2.2. Células troncales adultas

Poseen la doble capacidad de autorrenovarse ilimitadamente mediante el proceso de diferenciación, originan otros tipos celulares especializados. Su función biológica y principal consiste en crear estructuras orgánicas durante la etapa de desarrollo. Inducen y potencian la función *in vivo* que poseen naturalmente (11).

Las CTM, primeramente fueron aisladas de la médula ósea y más tarde en diversos tejidos como el músculo esquelético, el pancreático, el adiposo, el nervioso y más recientemente en los tejidos dentales (10,11,15,20).

Las CTM posnatales provenientes de tejido pulpar actualmente son consideradas las células de mayor plasticidad y capacidad reproductiva, así como para desempeñar funciones importantes en el desarrollo, crecimiento posnatal, reparación, regeneración y homeostasis. Por tal motivo, existe un interés clínico significativo en aislarlas y caracterizarlas debido a su autorenovación y multipotencialidad (3,4,6,25,26). Estas células se caracterizan por ser adherentes, fusiformes y morfológicamente similares a los fibroblastos y fenotípicamente por expresar cualquiera de los marcadores CD90, CD29, CD73, CD105, CD44, CD166 y STRO-1 (15,16,23).

Entre las CTM dentales se encuentran las células troncales de la pulpa dental (CTPD, en inglés *dental pulp stem cells*, *DPSCs*), las células troncales de dientes deciduos exfoliados (CTDDE, en inglés *stem cells of deciduous teeth exfoliated*, *SHEDs*), y células troncales de la papila apical (CTPA, en inglés *stem cells from the apical papilla*, *SCAPs*). Mientras que las CTM no dentales incluyen; células troncales del ligamento periodontal (CTLP, en inglés *human periodontal ligament stem cells*, *PDLSCs*) y células troncales del tejido gingival (CTTG, en inglés *called granulation tissue-derived stem cells*, *GTSCs*) (10). Por otro lado, encontramos también CTM embrionarias entre las que cuentan las CTM del folículo dental (CTMFD, en inglés *dental follicle stem cells*, *DFSCs*), (Figura 4) (10,19-23).

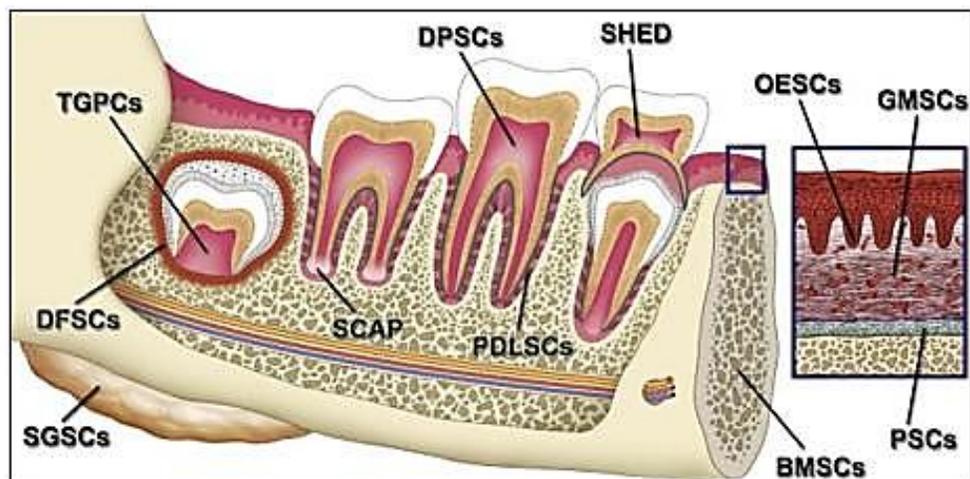


Figura 4. Zonas de extracción de células troncales de origen bucal

Las CTPD, CTDDE y CTPD comparten características similares, estos grupos celulares son el foco de las investigaciones dentales y han demostrado resultados prometedores para la regeneración de la pulpa (6,27,28) y reparación de huesos en animales y humanos (29).

Gronthos *et al.*, en el año 2000, fueron los pioneros en aislar CTPD (10), posicionando con sus investigaciones a los órganos dentarios como un excelente modelo de investigación y fuente de CT. De manera conjunta se ha demostrado que los premolares extraídos para fines de tratamiento ortodóntico contienen gran cantidad de células pluripotenciales por lo que son una fuente prometedora para la obtención de CT, así como los dientes deciduos, los terceros molares, los dientes supernumerarios, mismos que se han utilizado para la obtención de CT pluripotenciales (15,17,19,21,30-32).

Se han aislado CTPD de diferentes organismos mamíferos, como humanos, ratones, ratas, ovejas, chimpancés y cerdos (13).

Las CTPD, se consideran una atractiva fuente postnatal para la investigación en la medicina regenerativa o traslacional, debido a que se les atribuyen características potencialmente superiores a otros tipos de células troncales adultas y exhiben capacidades de proliferación, diferenciación y plasticidad que pueden dar lugar in vitro a linajes celulares de origen mesenquimal como los osteoblastos, condrocitos, adipocitos, así como células musculares estriadas, y de origen no mesenquimal como los melanocitos. Una ventaja muy importante en la obtención de estas CT es que causa mínimas molestias al paciente ya que en numerosas ocasiones los premolares se extraen por motivos ortodónticos y el tejido pulpar generalmente es descartado (15,22,25,30,33).

Bressan *et al.*, en el 2015, argumentan que los dientes deciduos cariados sin inflamación pulpar y/o periapical son una fuente más para el aislamiento de células troncales, los resultados de su estudio fueron exitosos (30). En contraste, existen estudios que muestran resultados contradictorios en los potenciales de diferenciación y

proliferación de CT de pulpas de órganos dentarios permanentes con lesiones cariosas profundas, asociadas a etapas inflamatorias del tejido pulpar (34,35).

Las CT derivadas de la pulpa dental, se obtienen a partir de diversas técnicas, sin embargo, es importante considerar que, a pesar de las diversas técnicas sobre el aislamiento y cultivo de CT, la información metodológica que se utiliza para la extracción y traslado de la pulpa dental con miras a la obtención de CT, es escasa.

TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE PULPA DENTAL

Gronthos *et al.*, aislaron poblaciones clonógenas de CTPD de terceros molares impactados de adultos de entre 19- 29 años de edad. Explican que los órganos dentarios extraídos fueron limpiados y cortados alrededor de la unión cemento-esmalte mediante la utilización de fresas de fisuras esterilizadas para exponer la pulpa de la cámara, posteriormente el tejido pulpar se separó suavemente de la corona y la raíz (10). De manera similar, Macedo de Souza *et al.*, realizaron cortes longitudinales utilizando un disco de diamante cerca de una llama de fuego en órganos dentarios permanentes y deciduos sin alcanzar la pulpa, separaron cuidadosamente tejido pulpar de la corona y la raíz con un excavador dentinario estéril (36).

Investigaciones pioneras de Mojarad *et al.*, emplearon curetas Gracey y limas endodónticas para la extracción del tejido pulpar de dientes deciduos (15). Del mismo modo que Bressan *et al.*, quienes emplearon limas endodónticas para extraer el tejido pulpar de las paredes dentinarias (31).

Por otro lado, Olávez *et al.*, extrajeron pulpa dental a partir de caninos deciduos, utilizando una técnica de corte transversal aproximadamente a ± 2 mm del ápice, en una cámara de flujo laminar y empleando una pieza de mano de baja velocidad y un disco diamantado, accedieron al conducto radicular y con la ayuda de un tiranervios estéril no. 20 retiraron de una sola intención el tejido pulpar completo (16).

Por otra parte, Piva *et al.*, aislaron CTPD a partir de terceros molares, mediante la técnica de corte transversal que consistió en cortar la corona del diente exactamente por encima de la unión cemento-esmalte hasta llegar al tejido pulpar, retirando el mismo con varios instrumentos, limpiando la cámara y los canales radiculares. Otra técnica utilizada por este grupo fue la de “rebanadas dentales”, que consistió en generar trozos de terceros molares. Los órganos dentarios se fijaron y se seccionaron transversalmente con una sierra de diamante girando a baja velocidad realizando cortes precisos refrigerados con solución salina amortiguada con fosfato. Se obtuvieron rebanadas de diente de grosor de un milímetro, posteriormente se retiró el tejido pulpar suavemente (37).

Por otro lado, Tsai *et al.*, cultivaron y aislaron CTM a partir de dientes deciduos, la técnica de extracción pulpar consistió en realizar un corte alrededor de la unión cemento-esmalte utilizando fresas dentales esterilizadas, el tejido pulpar se retiró del diente usando un excavador puntiagudo. Posteriormente colocó la pulpa ya picada en medios de cultivo basales, suplementados con 10% de suero fetal bovino, antibióticos y antimicóticos (38). De forma similar, Caballero *et al.*, con un disco de diamante estéril realizaron cortes transversales seguidos de cortes longitudinales en dientes premolares para la extracción de la pulpa dental hasta lograr su extracción completa con la ayuda de un excavador dental (39).

Gioventú *et al.*, propusieron la conservación del tejido pulpar sin extraerlo del órgano dentario, realizando perforaciones a dientes deciduos con un láser Nd:YAG (DM200 Plus, DMT, Lissone, Italia) con longitud de onda de 1064- 10600 nm y 27-90 mJ de impulso de energía, con el objetivo de formar de 2 a 4 microcanales a través del tejido del esmalte y dentina, y llegar a la pulpa sin dañarla (33).

Karamzadeh *et al.*, utilizaron discos de diamante de uso dental estériles para la extracción de la pulpa de dientes permanentes, menciona que en los protocolos existentes que se han usado para aislar el tejido pulpar de un diente humano han utilizado diversos instrumentos como fórceps, agujas, curetas de Gracey, fresas de fisura

y subraya que esos métodos consumen tiempo, además de que podrían contaminar la pulpa; en contraste, asevera que con el uso de disco de diamante para cortar el órgano dentario se hace de manera rápida, con mínima contaminación, minimizando el sobrecalentamiento de la pulpa además de que es un proceso de un solo paso (40).

TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

Cultivo celular es el conjunto de técnicas o maniobras realizadas *in vitro* en especímenes celulares animales cuyo origen proviene de órganos o de linajes celulares que permiten la supervivencia, el mantenimiento y/o multiplicación, de tal manera que se conserven al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (41).

Los cultivos celulares se realizan en placas de plástico con medios adecuados de cultivo. Existen diversos tipos de cultivos celulares (Tabla 1), son embargo, el objetivo de todos ellos es que las células sembradas puedan ser observadas y evaluadas constantemente bajo el microscopio, así como ser analizadas por técnicas bioquímicas. Asimismo, los cultivos celulares pueden multiplicarse y expandirse ya sea cultivando en la misma placa o traspasando a otras placas de mayor tamaño, logrando así que las células animales puedan vivir, multiplicarse y diferenciarse (41,42).

Tabla 1. Tipos de cultivos celulares (41).

Tipo	Descripción
Cultivo de órganos	Se representa una réplica de los tejidos de origen, conservando las interacciones histológicas, como desventaja, es de crecimiento limitado, además de que para cada experimento se necesita un nuevo explante.
Explantes primarios	Se constituyen por pequeños fragmentos de tejido u órganos que adhieren a la superficie de la placa de plástico en la que de manera general crecen las células de la periferia del explante. Se utilizan en cantidades pequeñas de tejido.
Cultivo celular primario	<p>Se establece a partir de un tejido u órgano que no tiene la capacidad de proliferar <i>in vitro</i>, en donde se pueden o no separar los tipos celulares, una ventaja de este tipo de cultivo es que se puede iniciar un cultivo secundario. <i>In vitro</i> es de crecimiento limitado, representando inhibición por contacto, la cual es generada por vías de señalización intra e intercelulares. Se clasifica en dos tipos:</p> <p>a) Cultivo en monocapa: La proliferación se detiene temporalmente, esto es a consecuencia del contacto que se hace entre las células hasta que posteriormente se subcultiva y traspa a un recipiente con medio fresco, logrando así subcultivarse durante semanas, incluso meses. Una característica de este tipo de cultivo es que las células con frecuencia mostrarán distintas propiedades en función de su linaje, como por ejemplo los fibroblastos que secretan colágeno.</p> <p>b) Cultivos en suspensión: Este tipo de cultivo se realiza en líneas celulares que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies que tienen la capacidad de crecer de manera estacionaria o en suspensión posterior a un período de adaptación. Como requerimiento, este tipo de cultivo requiere protectores de superficie, como en el caso de células hematopoyéticas.</p>
Cultivos secundarios	Se realizan por tripsinización de un cultivo primario exitoso, cultivando posteriormente la solución obtenida. Por lo general, las células obtenidas si son normales no sobreviven por mucho tiempo, por lo que luego de varios subcultivos dejan de dividirse. Son cultivos que contienen un único linaje celular, siendo homogéneas genéticamente. Es el tipo de cultivo que más se utiliza actualmente gracias a su capacidad de propagación (Figura 5).
Cultivos histotípicos y organotípicos	Se presentan cuando las células son reagrupadas recreando una estructura tridimensional muy similar a la arquitectura del tejido original, se logra realizando los mismos procedimientos antes descritos, pero combinando células de diferentes linajes que integran un órgano.

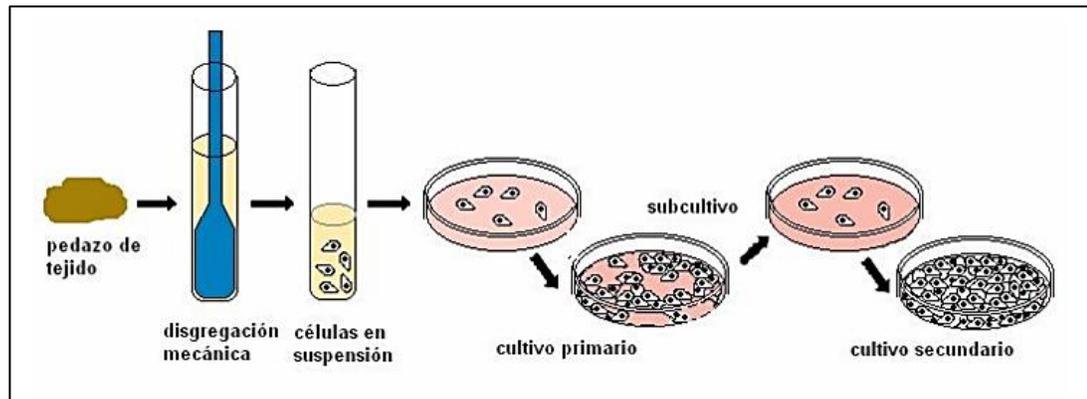


Figura 5. Cultivo secundario

Debido a que cuando se cultivan células o tejidos para hacer experimentos, estos requieren realizarse a pequeña escala, es necesario disponer de recipientes y/o contenedores, de los cuales, dependiendo de las características de las células a cultivar y de la escala deseada es el que se va a utilizar. De tal forma que se necesitan frascos óptimos para la multiplicación celular, estos frascos son de plástico y tienen una base de 25 a 175 cm², por lo que en un frasco de 175 cm² pueden obtenerse 1×10^7 células adheridas aproximadamente y 1×10^8 células cuando se realiza cultivo en suspensión (41,43).

En los recipientes T estándares resulta más complicado producir cantidades mayores de células, debido a la cantidad de tiempo invertida para los repetidos pasajes necesarios, la demanda de espacio en una incubadora y el alto costo de los insumos. Es necesario tener en cuenta que, para aumentar la escala del cultivo, deben considerarse múltiples parámetros en los que destacan la falta de nutrientes, el intercambio de gases (la escasez de oxígeno), así como la aparición de partículas metabólicas tóxicas y ácido láctico (43).

1. MÉTODO POR EXPLANTE

El cultivo por explantes primarios se realiza por medio de fragmentos pequeños de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie de un recipiente de cultivo, a la que se agregan medios de cultivo, en la que generalmente se reproducen y crecen células de la periferia del explante. Se utiliza para pequeñas cantidades de tejido (41).

Las células obtenidas se cultivan y mantienen en una incubadora celular a temperatura apropiada de 37°C y mezcla de gases que por lo general son 5% CO₂ y 95% O₂ (41).

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Las CTM han sido ampliamente estudiadas dentro del campo médico para comprender su función en desarrollo, fisiología, así como la reparación de tejido esquelético, así como a su prometedor potencial terapéutico (44).

En condiciones de cultivo estándar, las CT de dientes permanentes se presentan en grupos de diferenciación con marcadores de expresión positivos a CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, STRO-1, Oct-3/4, Sox-2, Nanog, y con marcadores de expresión negativos CD14, CD34, CD45, o moléculas de superficie de antígeno-leucocito humano DR; de igual manera estas células tienen el potencial de diferenciarse *in vitro* a linaje osteogénicos, linajes condrogénicos, adipogénicos, en hepatocitos y neuronas. En consecuencia, estudios que se encargan de caracterizar a las CTPD por lo general evalúan estos criterios, así como la clonogenicidad, la cual tiene como objetivo detectar todas las células de una población que poseen la capacidad de producir una gran progenie en forma de colonias adherentes derivadas de una sola célula, y potencial de diferenciación, para compararlos con entre sí (44,45).

En el año 2000, Grontos *et al* fueron los primeros en aislar y caracterizar células troncales de pulpa dental obtenidas de terceros molares permanentes, estas células fueron más proliferativas que las células troncales de médula ósea, sumado a que tenían la capacidad de formar depósitos minerales *in vitro* en cantidades reducidas. En un principio, en un estudio *in vitro*, se confirmó que las CTPD no se diferenciaban a células adiposas, mientras que las células troncales de médula ósea si fueron capaces de diferenciarse en adipocitos (44).

A pesar de ello, ensayos y estudios más recientes demuestran que las CTPD si tienen la capacidad de diferenciarse en adipocitos, esto se logra cuando se agregan otros suplementos al medio adipogénico. En estudios *in vivo* en humanos, se ha demostrado que algunos clones de CTPD se diferencian en linajes celulares de tipo odontoblástico, con prolongaciones orientadas hacia la formación de estructuras de reparación de tipo dentinario (44).

APLICACIÓN CLINICA DE CÉLULAS TRONCALES DE PULPA DENTAL

En tiempos actuales el conocimiento en la bioingeniería tisular para lograr regenerar un tejido posteriormente a una lesión o daño causado por accidentes, enfermedades o algún ataque bacteriano han guiado a la identificación, aislamiento y caracterización de poblaciones de CT que bajo ciertos estímulos tienen la capacidad de diferenciarse en linajes celulares específicos (41).

Se conoce que la regeneración de los tejidos corporales es causada naturalmente gracias a la presencia de CT, ya que tienen la capacidad de autorregenerarse y diferenciarse en distintos linajes celulares, es por ello que la medicina regenerativa está representada por las CTM provenientes de la cavidad bucal por ser una fuente importante de CTM y de tener la ventaja de ser de fácil acceso para el odontólogo, disminuyendo la morbilidad del paciente, aunado a esto, los nuevos descubrimientos y avances tecnológicos sobre la manipulación de las CTM han superado

los problemas éticos a los que los médicos de antaño se enfrentaban con la extracción de CT de médula ósea o de placenta (23).

Investigaciones previas demuestran que las CTOD tienen la capacidad de producir unidades formadoras de colonias (UFC), también se ha remarcado que, a diferencia de las CTMO, las CTOD sobreviven por lapsos mayores sin experimentar envejecimiento celular mostrando mayor tasa de proliferación en comparación con las CTMMO (46).

De igual manera, gran cantidad de estudios publicados han demostrado el potencial de diferenciación de las CTM en múltiples linajes *in vitro*, y que cada población celular tiene características de forma independiente de su fuente de tejido y podrían diferenciarse en células del linaje mesenquimal como osteocitos, condrocitos, adipocitos, así como los linajes odontogénicos, neurogénicos, angiogénicos y miogénicos (23,46,47).

Otras investigaciones enfocadas en la aplicación clínica de las CT en óptimas condiciones de cultivo y complementadas con el uso de biomateriales como los sustratos cerámicos (entre ellos hidroxiapatita o fosfato tricálcico) y factores de crecimiento han reconstituido el complejo dentino-pulpar cuando se trasplantan en ratones inmunocomprometidos (23,48,49), también se han empleado otro tipo de tejidos, entre ellos tejido óseo, cemento dental, vasos sanguíneos y tejidos neurales; asimismo se han realizado investigaciones sobre CTM debido a su potencial de reparación angiogénica, neurogénica, osteogénica y odontogénica (50,51,52).

Por lo tanto, el estudio e investigación de las CT despliega un amplio panorama desde su descubrimiento en el área biomédica y dental, ya que son de fácil obtención aunado a la factibilidad de que las células poseen las características de expansión por métodos *in vitro* para su posterior utilización traslacional, haciendo de las CT en ideales candidatas para posteriores investigaciones en áreas médicas de regeneración tisular e ingeniería de tejidos (42).

En tiempos venideros, con la complementación de innovados andamios junto con la nanoingeniería de tejidos biológicos se pretende alcanzar la regeneración completa de órganos y sistemas humanos a partir de una línea de CTOD para mejorar la calidad de vida de los pacientes reemplazando el órgano o sistema dañado o degenerado por las múltiples enfermedades que actualmente se presentan en el ser humano (23).

HIPÓTESIS

La obtención de células troncales de pulpa dental a partir de la técnica de corte transversal de dientes premolares, tiene mayor eficacia que la longitudinal.

JUSTIFICACIÓN

Las CTPD de los órganos dentarios han demostrado ser de utilidad en los procesos regenerativos de órganos y tejidos, presentando además menores complicaciones quirúrgicas y éticas.

Los dientes premolares son una fuente fácil y accesible para la obtención de pulpa dental y posterior aislamiento y cultivo de células troncales, ya que en numerosas ocasiones son indicados para exodoncia por motivos ortodóncicos.

Aunado a esto, a la Maestría en Odontología Infantil (MOI) y a la Clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (FOUADY) acude gran cantidad de pacientes referidos de la Clínica de Ortodoncia, para la extracción de dientes premolares, mismos que se utilizaron para el estudio y obtención de CTPD, previo consentimiento informado del tutor y asentimiento del paciente.

Para el desarrollo de este proyecto, se cuenta con los recursos humanos y técnicos de las Clínicas de Ortodoncia, Cirugía Bucal y de la Maestría en Odontopediatría, donde se llevarán a cabo los procedimientos para la obtención de los órganos dentarios. De igual forma, se cuenta con el Laboratorio Traslacional de Células Troncales de Origen Bucal, de la FOUADY que trabaja en colaboración con el de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la UADY y el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en la obtención y caracterización de las CTOD.

Los resultados obtenidos durante este proyecto, serán publicados en foros de investigación y revistas científicas del área, lo que dará proyección a los estudios de ciencia básica realizados en el área de la salud de la UADY.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Comparar la técnica de corte transversal contra la longitudinal para la obtención de células troncales de la pulpa dental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar si el peso de la pulpa, influye en la cantidad de células troncales obtenidas.
2. Analizar la eficiencia de la obtención de la pulpa dental mediante la técnica de corte longitudinal y transversal.
3. Caracterizar las CTPD mediante las pruebas de clonogenicidad, multipotencia y citometría de flujo.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental, longitudinal, prospectivo.

VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Nombre de la variable	Tipo de variable	Indicador	Escala de medición	Objetivo a cumplir	Análisis estadístico
Pulpa dental	Dependiente	Peso en miligramos	Cuantitativa Continua	#1	Estadístico Shapiro-Wilk
Técnicas de obtención pulpar	Independiente	Corte transversal Corte longitudinal	Cualitativa Dicotómica Nominal	#2	U-Mann Whitney
Células troncales	Dependiente	Marcadores de expresión	Cuantitativa Continua	#3	Correlación de Spearman. Prueba exacta de Fisher

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Premolares de pacientes con indicación para extracción referidos de la Clínica de Ortodoncia a la Clínica de la Maestría de Odontología Infantil y Cirugía Bucal de la FOUADY en el período agosto 2017 - junio 2018.

1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Premolares de pacientes de 12 a 18 años de edad, indicados para extracción, exentos de: caries, restauraciones, desgaste por bruxomanía o infecciones internas o periféricas.

Aceptación oral y escrita del tutor (en caso de ser menor) y asentimiento del paciente cuando sea necesario.

2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Órganos dentarios de pacientes con enfermedades sistémicas o infectocontagiosas.

3. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

Órganos dentarios que al momento de la extracción tengan contacto con objetos contaminados o por saliva.

4. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Veinticuatro premolares extraídos en la Clínica de la Maestría de Odontología Infantil y Cirugía Bucal de la FOUADY en el período agosto 2017 - junio 2018.

METODOLOGÍA

Para la recolección de la muestra de los pacientes de la CMOI que cumplieran con los criterios de inclusión se les invitó a participar en la investigación, se les explicó adecuadamente el protocolo y se les pidió llenar la carta de consentimiento informado.

1. RECOLECCIÓN Y MANEJO DE LOS ÓRGANOS DENTARIOS

A los pacientes con indicación para extracción ortodóntica de los dientes premolares, se les invitó a participar en el proyecto de investigación. Para ello se les explicó el objetivo del trabajo y el procedimiento de manera verbal y en caso de aceptar se le solicitó que firmara el Consentimiento Informado y voluntario (Anexo I para adultos) y en caso de ser menor de edad se le explicó al padre o tutor que si él menor estaba de acuerdo, se donará el órgano dentario a extraer.

Para la exploración clínica intrabucal, tanto el operador como el paciente contaron con las barreras de protección de acuerdo con la NOM-013-SSA2-2006 (53) y en un sillón dental (PERFORMER, Adec®) se le realizó un examen clínico con ayuda de una luz artificial directa. Para la valoración radiográfica, en caso de que no contar con radiografía panorámica del área a intervenir, se le realizó una periapical (película #2 KODAK INSIGHT, KODAK®, EU) utilizando la técnica de bisectriz con un equipo de rayos X (XMind DC 60-70, SATELEC®) de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-157-SSA1-1996 (54).

1.1 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL ÓRGANO DENTARIO

Posterior a la valoración clínica y radiográfica, se procedió a realizar la extracción. Bajo protocolo de asepsia y antisepsia con clorhexidina al 0.12% (Bexident®) durante 2 minutos, se anestesió con lidocaína/epinefrina al 2%, mediante la técnica troncular mentoniana e infiltrativa suplementaria en la mandíbula y la técnica infiltrativa del nervio alveolar medio para el maxilar superior, se debridó con periostótomo/ explorador (DENTAL USA®), se luxó con un elevador #3 (DENTAL

USA®) y se procedió a extraer con un fórceps atraumático (DENTAL USA®). Obtenido el órgano dentario se depositó en medio de transporte. A continuación con una cureta de Lucas (DENTAL USA®) se realizó la limpieza de la cavidad alveolar y finalmente se colocó una gasa hemostática. Al paciente o tutor se le explicó las indicaciones postoperatorias y se prescribió analgésico y desinflamatorio por escrito. Se les dio cita de control una semana después.

Cada órgano dentario se depositó en un tubo cónico de poliestireno de 15 mL (Corning, CentriStar®) a 4 °C conteniendo una solución salina tamponada (pH $7,2 \pm 0,2$) con fosfato de Dulbecco (DPBS, *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*) y de osmolaridad controlada ($300 \text{ mmOsm/kg} \pm 30$) (12, 34) para ser trasladados inmediatamente al Laboratorio de Biomateriales del CICY y posterior obtención de la pulpa dental.

2. PRUEBA PILOTO

2.1. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LA PULPA DENTAL

Debido a que las técnicas y métodos de experimentación para el presente trabajo no se encontraban entre las competencias del investigador, se decidió realizar como paso inicial una prueba piloto, con el objetivo de estandarizar las técnicas, a fin de mejorar y obtener un resultado lo más óptimo posible.

Una vez en el laboratorio, en un ambiente estéril mantenido con ozono (Mr.Ozono) en una campana de flujo laminar Tipo II (AirScience BioPurair®) se procedió a esterilizar con rayos ultravioleta durante 30 minutos. Posteriormente, los órganos dentarios fueron divididos en dos grupos (I. Corte longitudinal y II. Corte transversal) elegidos al azar.

2.1.1. Grupo I (Corte longitudinal)

Se realizó un corte a lo largo del órgano dentario (corte sagital, corona-raíz) con un micromotor (STRONG 90, SAESHING®) y un disco de diamante estéril a 35 mil rpm a velocidad de 8x, sin alcanzar la pulpa, e irrigación continua con solución salina estéril, se fracturó el diente manualmente hasta separar ambos lados. A continuación, con tiranervios estéril #20 se retiró la pulpa cuidadosamente con el objetivo de conservar la integridad de la misma y evitar lesionarla (36).

2.1.2. Grupo II (Corte transversal)

Se realizó un corte a nivel de la unión cemento-esmalte con un micromotor (STRONG 90) y un disco de diamante estéril a 35 mil rpm a velocidad de 8x, sin alcanzar la pulpa, e irrigación continua con solución salina estéril (Figura 6), se fracturó el diente manualmente hasta separar la corona de la raíz. A continuación, con tiranervios estéril #20 se retiró la pulpa cuidadosamente con el objetivo de conservar la integridad de la misma y evitar lesionarla (37).

3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS PULPARES

3.1. MÉTODO DE EXPLANTE

El tejido pulpar recién extraído se colocó en un tubo cónico de poliestireno de 3 mL (Corning, CentriStar®) con una solución DPBS suplementado con 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin y se procedió a pesar en una báscula analítica (OHAUS®) para registrar el peso de la pulpa. Seguidamente la pulpa dental se retiró del tubo y se colocó en una caja de petri estéril y se disgregó mecánicamente en pequeños fragmentos de aproximadamente 2 mm² con una hoja de bisturí no.12. Posteriormente se sembró en una botella T-25 y se agregó 3 mL de D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomycin y 10% de SFB (de Gibco®, Thermo Fischer, Gaithersburg, MD, EE. UU.) y se incubó en

estufa (BINDER®) a una temperatura de 37 °C, CO₂ al 5% y 90% de humedad por 7 días.

4. PRUEBA EXPERIMENTAL

4.1. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LA PULPA DENTAL

Una vez en el laboratorio, en un ambiente estéril mantenido con ozono (Mr.Ozono) en una campana de flujo laminar Tipo II (BioScience Purair®) se procedió a esterilizar con rayos ultravioleta durante 30 minutos. Posteriormente, los órganos dentarios fueron divididos en dos grupos (I. Corte longitudinal y II. Corte transversal) elegidos al azar.

4.1.1. Grupo I (Corte longitudinal)

Se realizó un corte a lo largo del órgano dentario (corte sagital, corona-raíz) con un micromotor (STRONG 90, SAESHING®) y un disco de diamante estéril a 35 mil rpm a velocidad de 8x, sin alcanzar la pulpa, e irrigación continua con solución salina estéril, se fracturó el diente manualmente hasta separar ambos lados. A continuación, con tiranervios estéril #20 se retiró la pulpa cuidadosamente con el objetivo de conservar la integridad de la misma y evitar lesionarla (36).

4.1.2. Grupo II (Corte transversal)

Se realizó un corte a nivel de la unión cemento-esmalte con un micromotor (STRONG 90) y un disco de diamante estéril a 35 mil rpm a velocidad de 8x, sin alcanzar la pulpa, e irrigación continua con solución salina estéril (Figura 6), se fracturó el diente manualmente hasta separar la corona de la raíz. A continuación, con tiranervios estéril #20 se retiró la pulpa cuidadosamente con el objetivo de conservar la integridad de la misma y evitar lesionarla (37).

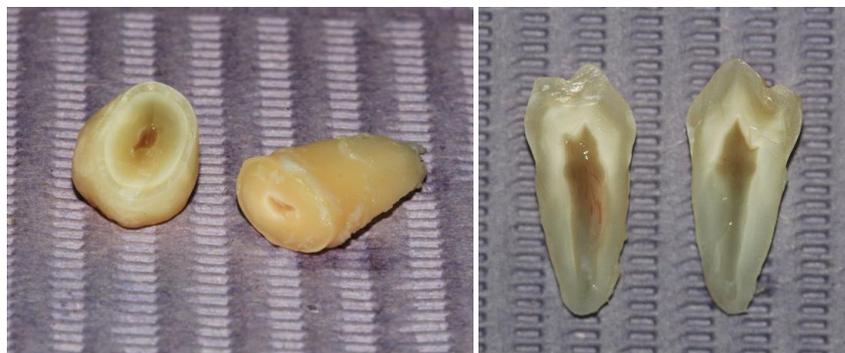


Figura 6. a) Corte transversal, b) Corte longitudinal.

Una vez obtenida la pulpa se colocó en un tubo cónico de poliestireno (Corning, CentriStar®) contenido con medio *Roswell Park Memorial Institute médium* (RPMI) suplementado con 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina, procediendo a pesarla en una báscula analítica (OHAUS®) para registrar el peso de la pulpa (36, 39). Se trabajó con un total de 24 órganos dentarios. Los resultados se vaciaron en una base de datos en el software Microsoft Excel 2016 (Redmond, EEUU).

Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk, U-Mann Whitney, Correlación de Spearman y Prueba exacta de Fisher, realizados con ayuda del programa IBM SPSS Statistics 24. Se consideró diferencia significativa con un valor $p \leq 0.05$.

4.2. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS PULPARES

4.2.1. MÉTODO DE EXPLANTE

Una vez registrado el peso de la pulpa, se retiró del tubo y se colocó en una caja de petri estéril y se disgregó mecánicamente en pequeños fragmentos de aproximadamente 2 mm² con una hoja de bisturí no.12. Posteriormente se sembró en una caja de 6 pozos y se agregó 1.5 mL de RPMI suplementado con 10% de SFB (de Gibco®, Thermo Fischer, Gaithersburg, MD, EE. UU.) se observó al microscopio invertido de campo claro (Figura 7) y se incubó en estufa (BINDER®) a una

temperatura de 37 °C, CO₂ al 5% y 90% de humedad por 14 días y se registró para cada OD el tiempo en días que tomó a las células salir del explante y alcanzar un 80% de confluencia en los pozos.

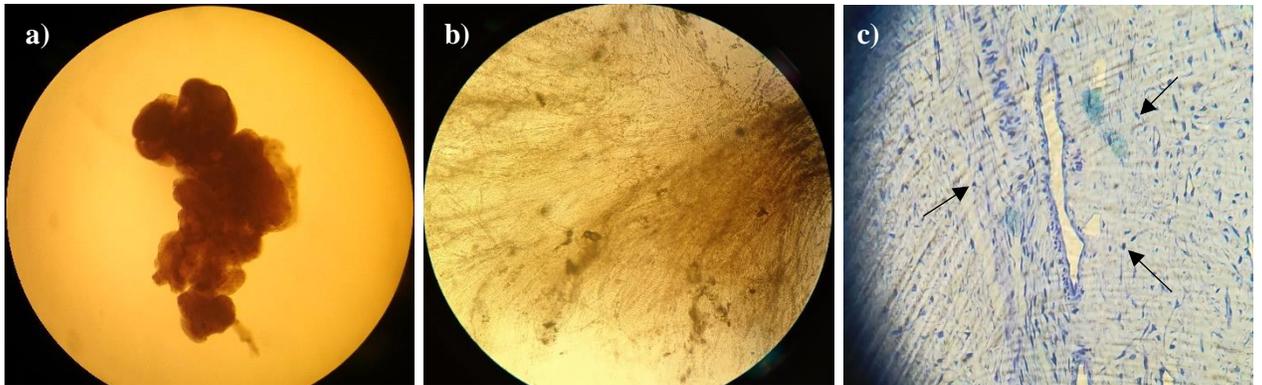


Figura 7. Pulpa dental vista al microscopio. a) 10x, b) 20x, c) Corte histológico (tinción de azul alcian) donde se aprecian los núcleos (flechas) de las células pulpares (40x).

4.3. TRIPSINIZACIÓN

La tripsina se utilizó para romper los enlaces de las proteínas, así como para despegar las células de la superficie de crecimiento para poder tenerlas en suspensión.

Ya obtenida la proliferación y el crecimiento celular en la placa de cultivo, se realizó la tripsinización decantando la botella y agregando DPBS con antibiótico y antimicótico al 1% para lavar, se decantó el DPBS y se agregaron 1.5 mL de tripsina, a continuación se incubó a 37 °C, CO₂ al 5% y 90% de humedad relativa, se esperaron un minuto con treinta segundos y se observó al microscopio el desprendimiento celular, se volvió a incubar y nuevamente se observó al microscopio hasta que se percibió que las células estén completamente desprendidas y en suspensión, (este paso no debe sobrepasar los 5 minutos ya que causaría daño y/o muerte celular), se aspiró el contenido de la botella y se colocó en un tubo de polipropileno de 15 mL con medio RPMI suplementado con SFB al 10%, a continuación se centrifugó (CENTURION®) a 1200 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se llevó a la campana de flujo laminar Tipo II, se decantó el líquido y se agregó 1 mL de medio RPMI con SFB al 10%, por último se realizó

conteo celular manual para posteriormente sembrar las células en placas de 6 y 24 pozos y botellas de cultivo T-25 y T-75.

4.4. CULTIVO CELULAR

La suspensión celular se sembró en una botella de cultivo T-25 y se incubó a 37 °C con humedad relativa del 90% en una atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas, al día siguiente y cada tercer día se realizaron cambios de los medios de cultivo para garantizar el crecimiento celular y se valoró diariamente la confluencia y la ausencia de contaminación bacteriana o fúngica por medio del microscopio óptico invertido de campo claro, contraste de fases y fluorescencia (iVu5000, LABOMED®) durante 14 días (3,10,15,16,22,36).

4.5. CRIOPRESERVACIÓN

Los sobrenadantes se colocaron en microtubos de 1.5 mL y se complementaron con dimetil sulfóxido (DMSO) y SFB a concentración del 10% y 90%, respectivamente, inmediatamente se introdujeron en ultracongelador (Arctiko®) a -80°C para su criopreservación.

4.6. DESCONGELACIÓN

Los viales se descongelaron a temperatura ambiente. Se tomó toda la muestra y se depositó en un tubo cónico de poliestireno de 15 mL, se agregó 1 mL de RPMI suplementado con SFB al 10% y centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos a 25 °C. Una vez obtenido el botón celular (Figura 8) se decantó el sobrante para eliminar residuos de DMSO y se agregaron 2 mL de RPMI suplementado con SFB al 10%. Las células se resuspendieron y sembraron en cajas de 6 pozos, la suspensión se incubó a una temperatura de 37 °C, CO₂ al 5% y 90% de humedad relativa. Se realizó cambio de medio a las 24 horas, posteriormente cada 3 días durante 14 días hasta observar crecimiento y proliferación celular.



Figura 8. Botón celular (flecha)

4.7. ESTIMACIÓN DE LA EFICACIA DE OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS

La eficacia se evaluó mediante pruebas de viabilidad celular y la cantidad de tinción vital (azul de tripán. Para ello, se tomaron 10 μL de la suspensión celular, se adicionaron 10 μL del colorante y 20 μL de PBS con antibiótico + antimicótico al 1%. La muestra se resuspendió y de la suspensión coloreada resultante se tomaron 20 μL que se visualizó al microscopio óptico de campo claro mediante una cámara de Neubauer (Figura 9). Finalmente se realizó un conteo manual de células de vivas y muertas, así como de la cuantificación de la concentración celular obtenida de cada técnica.

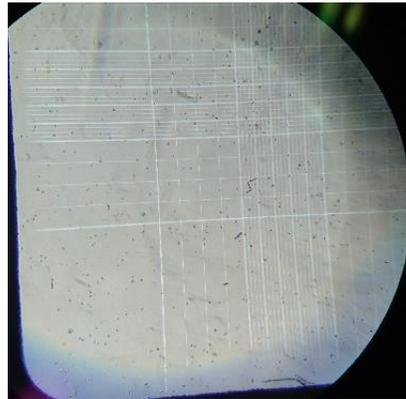


Figura 9. Conteo celular mediante la cámara de Neubauer.

4.8. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS

4.8.1. CLONOGENICIDAD

La suspensión celular del tercer pase de las pulpas 3 (P3), 4 (P4) y 5 (P5) se diluyó en 1 mL de medio RPMI con SFB al 10%, y se sembró en diferentes concentraciones, a saber 175, 350, 1750 y 3500 células por triplicado, teniendo un total de 9 pozos por cada concentración y 12 pozos por cada pulpa, a continuación se aplicaron 500 μ L de medio RPMI con SFB al 10% en caja de 6 pozos de 3.5 cm de diámetro, con un total de 36 pozos. Posteriormente, se incubó a 37 °C, CO₂ al 5% y 90% de humedad relativa. Transcurrido el tiempo de incubación de 24 horas y cada tercer día se realizaron cambios de medio con 700 μ L de medio RPMI con SFB al 10% a todos los pozos para garantizar el crecimiento celular, nuevamente se incubó durante 14 días a las mismas concentraciones de temperatura, dióxido de carbono y humedad antes mencionadas. Se valoró diariamente la confluencia y la ausencia de contaminación bacteriana o fúngica por medio del microscopio óptico invertido. (3,10,15,22,36).

4.8.2. MULTIPOTENCIA

Se sembró la suspensión celular, proveniente del tercer pase de la pulpa 1 (P1), pulpa 2 (P2), P3, P4, P5 y pulpa 6 (P6) con densidad de 5000 células por pozo en una placa de 24 pozos: 6 pozos adicionados con medio adipogénico, 6 pozos con medio osteogénico y 6 pozos con RPMI con SFB al 10% siendo el medio control (Figura 10). Al día siguiente y cada tercer día se realizaron cambios de medio con 300 μ L de medio adipogénico [(una concentración de 50 mL de medio adipogénico contiene: 50 mL de DMEM con SFB al 10%, 10 μ L de suspensión de DPBS con indometacina (en 10 mL de DPBS agregar 25 mg de indometacina) y 0.0038 g de xantina)] osteogénico (una concentración de 50 mL de medio osteogénico contiene: 50 mL de DMEM con SFB al 10%, 0.001 g de ácido ascórbico, 0.1082 g de glicerol fosfato y 0.49 mg de dexametasona) o RPMI con SFB al 10% a todos los pozos para garantizar el crecimiento celular. Se valoró diariamente la confluencia y la ausencia de contaminación bacteriana

o fúngica por medio del microscopio óptico invertido y se incubó durante 14 días a las mismas concentraciones de temperatura, CO₂ y humedad antes mencionadas.

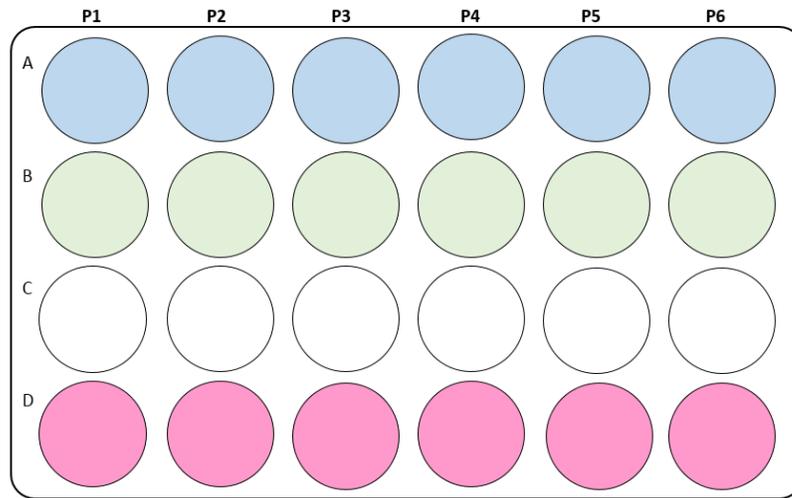


Figura 10. Placa de 24 pozos donde se muestra la manera en la que se sembró la suspensión celular de la P1, P2, P3, P4, P5, P6. Con el medio de crecimiento correspondiente. A, medio osteogénico. B, medio adipogénico. C, sin sembrado celular. D, medio RPMI con SFB 10% (control).

4.8.3. TINCIÓN DE PLACAS DE CULTIVO CELULAR PARA CLONOGENICIDAD

Catorce días posteriores al sembrado celular en las placas de 6 pozos (Figura 11), se procede a teñirlas con cristal violeta al 0.5%.

Se aspiró y desechó toda la suspensión, posteriormente se lavó con 500 μ L de DPBS, una vez lavado cada pozo se desechó el DPBS, y a continuación se adicionaron 200 μ L de cristal violeta al 0.5%. Transcurridos 5 minutos se lavó con agua destilada 2 veces y se procedió a observar con microscopio óptico invertido; para un conteo de colonias preciso se realizó un cuadrículado en la superficie externa de los pozos para el conteo manual. El porcentaje de células con capacidad clonogénica se calculó como el número de colonias formadas/número de células sembradas x 100. Por lo tanto, la capacidad clonogénica refleja la habilidad de autorenovación de las células troncales (45).

Finalmente, se determinó el promedio y la desviación estándar de cada concentración celular ($n=3$), así como la “Relación colonias/concentración” resultante del cociente entre el promedio de las colonias formadas y la concentración celular inicial.

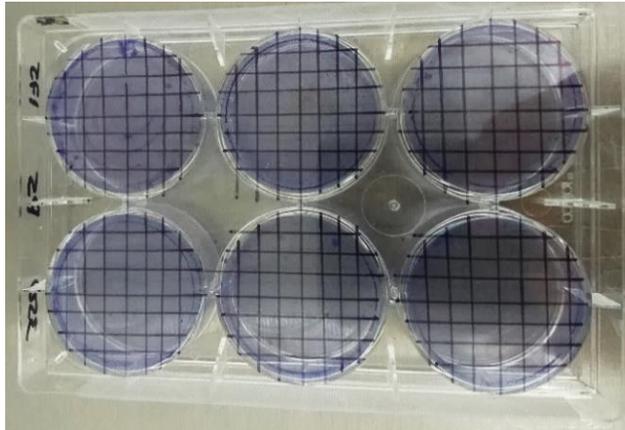


Figura 11. Placa de 6 pozos de 3.5 cm de diámetro, con cuadrículado para facilitar el conteo de células

4.8.4. TINCIÓN DE PLACAS DE CULTIVO CELULAR PARA MULTIPOTENCIA

Con el fin de demostrar si las células obtenidas preservan la capacidad de diferenciarse hacia diversos linajes celulares, las células cultivadas con medio adipogénico y osteogénico por 14 días, para generar tejido adiposo y hueso respectivamente, se lavaron las células con DPBS 1x y se fijaron con 500 μ L de paraformaldehído (PFA) al 4% durante hora y media. Posteriormente se lavó con PBS una vez y se procedió a realizar la tinción específica a cada línea celular.

Catorce días posteriores al sembrado celular en la placa de 24 pozos, se procedió a teñir las células con Rojo Oleoso para evidenciar la diferenciación adipogénica, y con Rojo de Alizarina S para la diferenciación osteogénica y cristal violeta al 0.5% para el medio control.

4.8.5. TINCIÓN DE ROJO OLEOSO PARA LÍPIDOS SOBRE CÉLULAS EN PLACA

Posterior a que las células se fijaron y lavaron, se continuó con el siguiente protocolo: se lavaron las células con 250 μ L de isopropanol al 60% durante 1 minuto, posteriormente se tiñeron con 250 μ L de solución de Rojo Oleoso durante 5 minutos, a continuación, se lavaron con 250 μ L de isopropanol al 60% durante 1 minuto dos veces para luego lavar los pozos con 300 μ L de agua destilada durante 5 minutos y por último, se observó al microscopio óptico invertido.

4.8.6. TINCIÓN DE ROJO DE ALIZARINA S PARA HUESO SOBRE CÉLULAS EN PLACA

Posterior a que las células se fijaron y lavaron con 500 μ L de DPBS 1x 2 veces, se tiñeron con 500 μ L de Rojo de Alizarina S al 2% durante 4 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada por 5 minutos 3 veces y se observaron al microscopio óptico invertido.

4.8.7. CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Se separaron las CT mediante tripsinización, para ello, se usó una solución de 0.25% de tripsina/1 mL EDTA y se procedió a fijarlas durante 30 minutos en 2% de formaldehído a temperatura ambiente. Posterior a la fijación, se lavaron las una vez con 0,05% de PBS. Después se realizó bloqueo de la unión no específica incubando las células con inmunoglobulina humana al 20% durante 3 minutos en hielo y se incubaron alícuotas de $0,1 \times 10^6$ células con MAb conjugado con ficoeritrina (PerCP) contra CD73, CD90 conjugado con FITC y CD105 conjugado con PE-Cy5 durante 1 hora a 25 °C en ambiente oscuro. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se insertó el tubo al citómetro y se procedió el análisis. Por último, se calcularon los niveles de expresión de los marcadores de superficie usando software para adquisición y análisis de datos (55).

5. MANEJO DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

Los pacientes de los que se obtuvieron los órganos dentarios, se les dio cita a los 7 días para revisión de la cavidad bucal, en caso de no presentar alteraciones en la cicatrización se les dio de alta, no siendo necesario el seguimiento posterior.

6. MÉTODOS DE MEDICIÓN Y ESTANDARIZACIÓN

Se recolectaron, organizaron, analizaron e interpretaron los datos. Se utilizó estadística descriptiva para la elaboración de los resultados. Los resultados se plasmaron en tablas y gráficas.

1. Carta de Consentimiento Informado y Voluntario (anexo I). El tutor del paciente proporcionó el consentimiento de participar en el estudio así como el niño.

Una vez obtenidas las células pulpares, se realizaron pruebas de clonogenicidad, multipotencia y citometría de flujo.

Los residuos biológicos se desecharon de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (56).

7. ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se realizó conforme a lo dispuesto en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de investigación (Secretaría de Salud 1987), donde en los apartados del artículo 14 fracción V, VII y VIII se exigió el consentimiento informado y por escrito de los participantes. De igual manera como marca el artículo 16, que habla sobre la confidencialidad, se protegió la privacidad de cada uno de los participantes y de los datos proporcionados por ellos, no se vinculó la identidad de alguno de ellos y los resultados no fueron utilizados para perjuicio alguno. Además, como establece el artículo 58, en su Fracción I y II, se aclaró a los pacientes que los resultados se publicarán de forma general, única y exclusivamente con fines científicos. Asimismo, se

cumplieron los principios éticos de la Asamblea Medica Mundial de Helsinki y del Código Internacional de Ética Médica (57), así como lo establecido en las disposiciones y lineamientos de la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA) 2011, con los principios de Beneficencia, no Maleficencia, Justicia y Autonomía.

Consecutivamente el área de tratamiento, el equipo y el instrumental se prepararon con técnicas asépticas, de acuerdo con la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-2006, para la prevención y control de enfermedades bucales, el operador usó gorro, guantes y cubre bocas desechables, instrumental estéril, lentes y bata desechable de manga larga durante todos los procedimientos de atención clínica de los pacientes (53).

El presente trabajo se realizó con el número de registro ante el Comité de Ética en Investigación CIE- 06- 2017.

8. EQUIPO

8.1. Clínicas de la Maestría en Odontología Infantil y Cirugía bucal de la FOUADY donde se obtuvieron los dientes: Sillones dentales (PERFORMER Adec®), instrumental para la exploración clínica y procedimientos quirúrgicos (DENTAL USA®, ANEXO 2).

8.2. Laboratorio de células troncales de la FOUADY: microscopio de fluorescencia (Leika® 2500), campana de flujo laminar tipo I (Ulbrecht®), báscula analítica (Citizen CX220®), micromotor (STRONG 90, SAESHING®), disco de diamante, mandril, jeringas para irrigar, tubos cónicos de polipropileno de 15 ml (CORNING®).

8.3. Laboratorio de Biomateriales de CICY: incubadora (BINDER®), campana de flujo laminar Tipo II (BioScience Purair®), microscopio óptico invertido de campo claro, contraste de fases y fluorescencia (iVu5000, LABOMED®), centrifuga refrigerada (CENTURION®), lector multimodal de absorbancia y fluorescencia (CYTATION3, BioTek®), micromotor (STRONG 90, SAESHING®), tubos cónicos de polipropileno de 15 ml (CORNING®), autoclave (ALLAMERICAN®), potenciómetro (OAKTON®), balanza (OHAUS®), ultracongelador (Arctiko®).

RESULTADOS

PRUEBA PILOTO

Se trabajó con un total de 20 órganos dentarios. En la tabla 2 se presenta la distribución del total con base en la técnica de corte y el órgano dentario (OD). Para la extracción pulpar se empleó exactamente el mismo número de OD en cada técnica de corte: 10 para transversal y 10 para longitudinal. De acuerdo al porcentaje, los OD 14 y 24 fueron los más empleados, con un 35% (n = 7) para el primero y 30% (n = 6) para el segundo; el OD menos empleado fue el 34, presentándose en un 15% (n = 3). El OD 14 trabajado mediante el corte longitudinal fue el más empleado, representando al 20% (n = 4) del total (n = 44).

Tabla 2. Prueba piloto: relación de la muestra por órgano dentario y técnica de corte para extracción pulpar.

OD	Técnica de corte [% (n)]		Total por OD [% (n)]
	Transversal	Longitudinal	
14	15 (3)	20 (4)	35 (7)
24	15 (3)	15 (3)	30 (6)
34	5 (1)	10 (2)	15 (3)
44	15 (3)	5 (1)	20 (4)
Total por tipo de corte [% (n)]	50 (10)	50 (10)	100 (0)

1. RENDIMIENTO DE LAS TÉCNICAS CON BASE EN EL PESO PULPAR

En la tabla 3 se presenta el rendimiento de las técnicas de corte con base en el peso pulpar (en miligramos) obtenido por cada OD. Se observó que la obtención de pulpa dental fue muy variada en cada corte, sin alguna tendencia apreciable a primera vista.

Tabla 3. Prueba piloto: rendimiento de las técnicas de corte con base en el peso pulpar obtenido por cada órgano dentario.

Número	Corte transversal		Número	Corte longitudinal	
	OD	Peso pulpar (mg)		OD	Peso pulpar (mg)
1	24	6	7	34	5
2	14	7	8	14	19
3	44	7	9	24	5
4	14	7	10	44	9
5	24	5	11	14	11
6	44	5	13	34	9
12	14	5	16	14	7
14	34	32	17	24	10
15	44	8	19	14	5
18	24	8	20	24	6

En la tabla 4, se presentan las medidas de tendencia central (máximos, mínimos y prueba de normalidad) para la distribución de los pesos pulpares provenientes de la tabla 3. Con la técnica de corte transversal se obtuvo un promedio de 9.0 mg de pulpa, mientras que con el longitudinal el promedio fue menor, de 8.6 mg; sin embargo, la desviación estándar del primero fue mayor (8.2 vs 4.3), presentándose por tanto mayor variabilidad. No obstante, la prueba de normalidad indicó que la distribución de los pesos para ambos cortes no cumplió con criterio de normalidad ($p < 0.001$ para corte transversal y $p = 0.018$ para corte longitudinal, según el estadístico Shapiro-Wilk). Al realizar la comparación de grupos, no se encontró diferencia significativa entre los pesos pulpares de cada uno (U de Mann-Whitney = 58.5; $p = 0.529$); es decir, que el rendimiento (valorado mediante el peso pulpar) del corte transversal fue similar al del longitudinal.

Tabla 4. Prueba piloto: medidas de tendencia central, máximos, mínimos y prueba de normalidad para pesos pulpaes (en mg) por técnica de corte.

Parámetro	Transversal (n = 24)	Longitudinal (n = 20)
Media	9.0	8.6
Desviación estándar	8.2	4.3
Mediana	7.0	8.0
Máximo	32.0	19.0
Mínimo	5.0	5.0
Normalidad (valor p)	0.50 (< 0.001)	0.81 (0.018)

Se empleó el estadístico Shapiro-Wilk como prueba de normalidad.

En la tabla 5 se expresan los estados del tejido pulpar posterior a la siembra, así como los porcentajes resultantes (Figura 12): 1. Sin adherencia, sin contaminación (SASC) (n=6), 2. Sin adherencia, con contaminación (SACC) (n=11), 3. Con adherencia hasta el séptimo día y después se desprendía del fondo de la botella, sin contaminación (CASC) (n=2), 4. Con adherencia hasta el séptimo día, después se desprendía del fondo de la botella y con contaminación (CACC (n=1). De acuerdo al porcentaje, SACC fue el más frecuente con el 55%, seguido de SASC con el 30%, CASC tuvo un 10%, y el menos frecuente fue CACC con un 5%.

Tabla 5. Prueba piloto. Estado de la pulpa posterior a la siembra.

Número	Corte transversal		Número	Corte longitudinal	
	OD	Estado		OD	Estado
1	24	SACC	7	34	SACC
2	14	SACC	8	14	SACC
3	44	SACC	9	24	SACC
4	14	SACC	10	44	SACC
5	24	SACC	11	14	CASC
6	44	SACC	13	34	SASC
12	14	SASC	16	14	SASC
14	34	CASC	17	24	SASC
15	44	SASC	19	14	CACC
18	24	SASC	20	24	SACC

Del total de órganos dentarios de la prueba piloto (n = 20), en ninguna de las dos técnicas de corte se obtuvo proliferación celular, por lo que, se decidió modificar la técnica de cultivo.

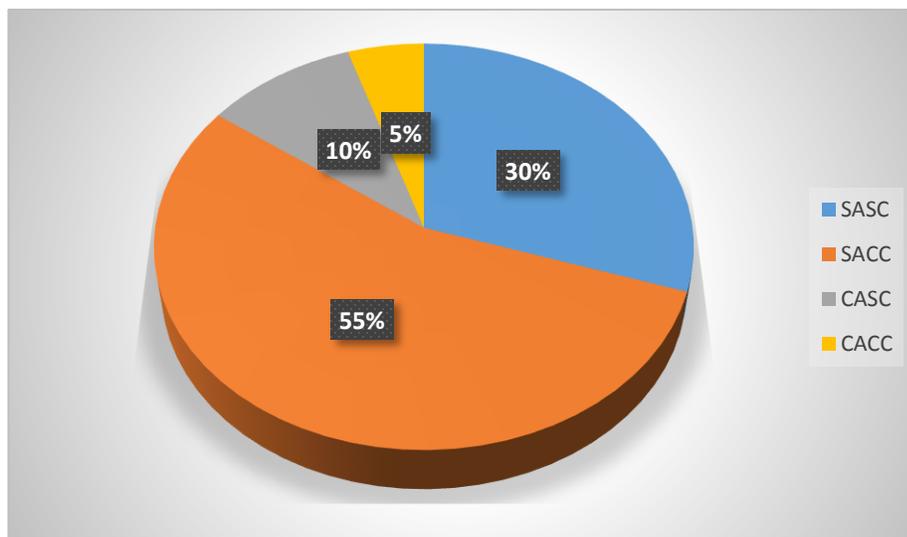


Figura 12. Prueba piloto: Porcentajes expresados de los estados de la pulpa posteriores a la siembra.

RESULTADOS DE LA PRUEBA EXPERIMENTAL

A continuación se estudiaron 24 pulpas de premolares. Grupo 1. Técnica de corte longitudinal 41.7% (n=10) y Grupo 2. Técnica de corte transversal 58.3% (n=14). Los premolares fueron obtenidos en las clínicas de la MOI y de cirugía de la FOUADY. La obtención de las pulpas se realizó en el laboratorio de Biomateriales del CICY bajo condiciones estériles.

1. RENDIMIENTO DE LAS TÉCNICAS CON BASE EN EL PESO PULPAR

En la tabla 6 se presenta el rendimiento de las técnicas de corte con base al peso pulpar (expresado en mg) obtenido por cada OD. Se observó que independientemente de la técnica utilizada (transversal/longitudinal) la cantidad de pulpa obtenida no era estándar, sin embargo, en promedio (15.8mg) la técnica longitudinal registró mayor peso. Del total de órganos dentarios trabajados mediante la técnica de corte transversal (n = 14) se obtuvo proliferación celular en el 42.9% (n = 6); este porcentaje corresponde a las 6 últimas piezas (números 19 a 24). No se obtuvo proliferación celular de ninguna pulpa obtenida mediante la técnica de corte longitudinal. De ese modo, se observó una asociación significativa entre la técnica de corte transversal y la proliferación celular (prueba exacta de Fisher, $p = 0.024$).

Tabla 6. Rendimiento de las técnicas de corte con base en el peso pulpar obtenido por cada órgano dentario.

Número	Corte transversal		Número	Corte longitudinal	
	OD	Peso pulpar (mg)		OD	Peso pulpar (mg)
1	34	6	5	44	5
2	24	5	6	44	81
3	34	7	7	34	6
4	34	5	9	44	23
8	24	7	13	34	6
10	14	7	14	44	7
11	24	5	15	14	10
12	14	8	16	24	7
19	14	7	17	34	7
20	24	7	18	44	6
21	34	7	-	-	-
22	44	6	-	-	-
23	14	7	-	-	-
24	24	7	-	-	-

En la tabla 7 se presentan las medidas de tendencia central (máximos, mínimos y prueba de normalidad) para la distribución de los pesos pulpares provenientes de la tabla 6. Con la técnica de corte transversal se obtuvo un promedio de 6.5 mg de pulpa, mientras que con el longitudinal el promedio fue mayor, de 15.8 mg; sin embargo, la desviación estándar del primero fue considerablemente menor (0.9 vs 23.5), presentándose por tanto menor variabilidad. No obstante, la prueba de normalidad indicó que la distribución de los pesos para ambos cortes no cumplió con criterio de normalidad ($p = 0.005$ para el corte transversal y $p < 0.001$ para longitudinal, mediante el estadístico Shapiro-Wilk) dado lo anterior, se eligió a la mediana como mejor parámetro de comparación (7.0 mg). En consecuencia, no se encontró diferencia significativa entre los pesos obtenidos por cada técnica de corte (U de Mann-Whitney = 82.5; $p = 0.472$); es decir, que el rendimiento (valorado mediante el peso pulpar) del corte transversal fue similar al del longitudinal.

Tabla 7. Medidas de tendencia central, máximos, mínimos y prueba de normalidad para pesos pulpares (en mg) por técnica de corte.

Parámetro	Transversal (n = 14)	Longitudinal (n = 10)
Media	6.5	15.8
Desviación estándar	0.9	23.5
Mediana	7.0	7.0
Máximo	8.0	81.0
Mínimo	3.0	5.0
Normalidad (valor p)	0.80 (<0.005)	0.50 (<0.001)

Se empleó el estadístico Shapiro-Wilk como prueba de normalidad.

2. ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE LA OBTENCIÓN Y SIEMBRA DE LA PULPA DENTAL

Adherencia: una vez situada la pulpa en la placa de cultivo de 6 pozos, se colocó en posición vertical de 7 a 10 minutos (Figura 13) con el propósito de forzar a las células a que buscaran adherirse al plástico. Una vez confirmada la adherencia, se colocó en posición horizontal y se agregó el medio de cultivo.

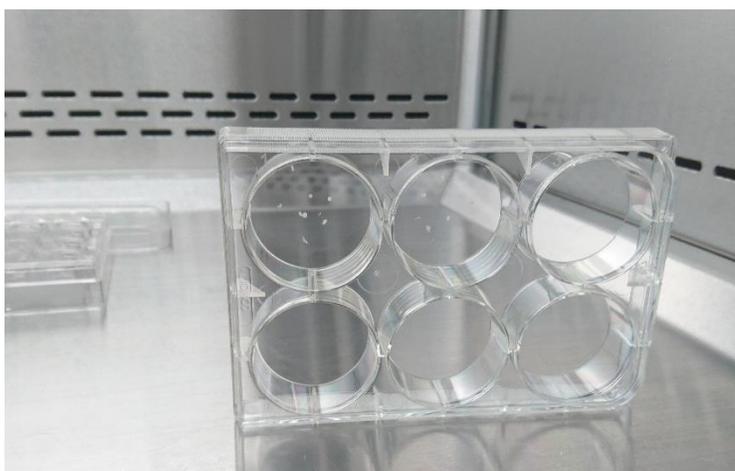


Figura 13. Placa de 6 pozos en posición vertical

Contaminación de la pulpa: para evitarla, se modificaron únicamente: 1. Siembra del tejido pulpar (adherencia), 2. Cambio de medio de cultivo de D-MEM por RPMI.

A partir de estas modificaciones se lograron resultados satisfactorios en las últimas 6 pulpas estudiadas, provenientes del grupo de corte transversal. En el caso de la contaminación bacteriana y fúngica, con la constante práctica y ensayos en la técnica de corte, así como en los cambios de medio de cultivo y mejoras en la manipulación (ANEXO 3), ésta se hizo menor hasta que se evitó por completo.

3. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA EFICIENCIA DE LA OBTENCIÓN DE LA PULPA DENTAL

Al momento de retirar la pulpa dental de la cámara y conductos radiculares de los premolares extraídos, se valoró visualmente que el tejido pulpar saliera lo más completo posible provocando el menor trauma, realizando de manera cuidadosa la toma del tejido con tiranervios #20. Sin embargo, el tipo de técnica de corte utilizado influyó, ya que las pulpas extraídas de los dientes mediante la técnica de corte transversal se encontraban más completas que las pulpas extraídas de dientes mediante la técnica de corte longitudinal. En la técnica de corte longitudinal frecuentemente la pulpa salía en fragmentos (ANEXO 4). Ya sea que la pulpa extraída en dientes cuyos cortes hayan sido por técnica transversal o longitudinal se segmentara en dos o más fragmentos o saliera completa, se utilizaba para el estudio y se continuaba el procedimiento.

4. EFECTO DEL TIPO DE CORTE SOBRE LA EFICIENCIA DE OBTENCIÓN PULPAR

El análisis cualitativo realizado para comparar la eficiencia de obtención de pulpa entre los dos cortes, mostró resultados similares, sin embargo, en el caso de la extracción por corte longitudinal, todas las pulpas, o no se adhirieron o se contaminaron, siendo desechadas. En contraste, el corte transversal, permitió la obtención completa de la pulpa

y la proliferación celular, sin producirse contaminación (n= 6), es por ello, que fue en este tipo de corte con el que se continuó el estudio.

De las pulpas de donde hubo proliferación celular (n = 6), se registró mediante microscopía óptica, el progreso de la migración celular de la pulpa hacia la placa de cultivo (Figura 14).

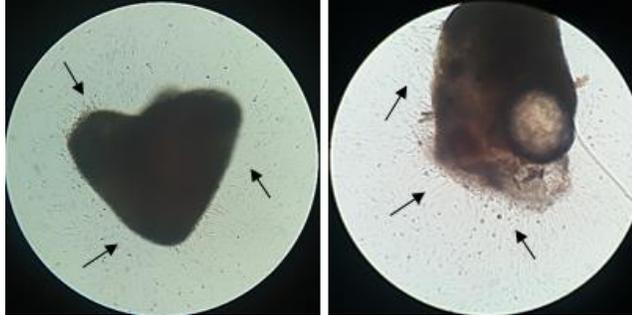


Figura 14. Células saliendo del explante pulpar (flechas) (10x).

En la figura 15 se presentan algunas imágenes correspondientes a las células obtenidas de las pulpas dentales, resaltadas mediante tinción cristal violeta al 0.5% para visualizar la morfología de las células resultantes.

Se obtuvieron aproximadamente 400 mil células por pozo (área de cultivo: 9.61cm^2). Las células observadas al microscopio invertido de campo claro tenían morfología fusiforme, también se observaron células con morfología romboide o estrellada.

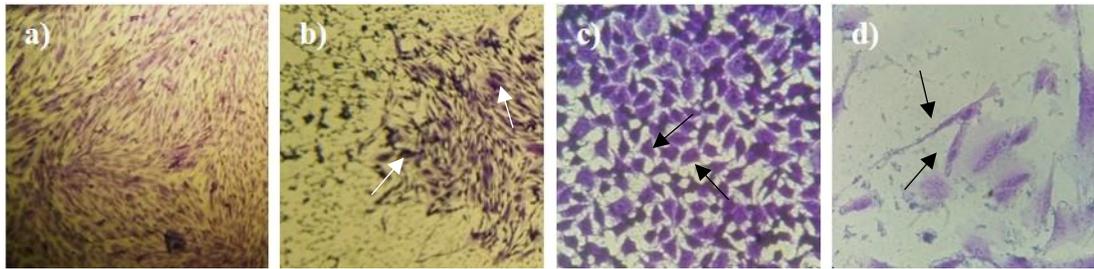


Figura 15. Vista al microscopio invertido de campo claro de diferentes densidades y ampliaciones de células pulpares teñidas con cristal violeta al 0.5%. a) Uniones de varias colonias celulares (4x), b) Colonia celular, se observa el núcleo de la célula de color más denso (10x), c) Numerosas células presentando morfología romboide (20x), d) Células con morfología fusiforme característica de fibroblastos (40x).

Se registró en la figura 16 el tiempo, en días, requerido por las células de la pulpa dental para salir del explante y alcanzar la confluencia. Este registro permitió observar que, para la salida de las células a partir del explante (Figura 16a) el 33.3% (n = 2) de los cultivos requirió de 3 días, mientras que el 66.7% (n = 4) restante requirió 4. Posteriormente, al tiempo estimado para alcanzar el 80% de confluencia en una botella de cultivo T-25 (Figura 16b), el 16.7% (n = 1) de los cultivos lo completó al día 6, el 33.3% (n = 2) al día 7 y el 50.0% (n = 3) restante al día 8. Posterior a la confluencia alcanzada en las botellas T-25, las células fueron tripsinizadas y subcultivadas en botellas T-75, la confluencia en esta botella se distribuyó como lo muestra la figura 16c. El 16.7% (n = 1) de los cultivos requirió de 10 días, el 66.6% (n = 4) requirió 11 y al 16.7% (n = 1) restante le tomó 12 días.

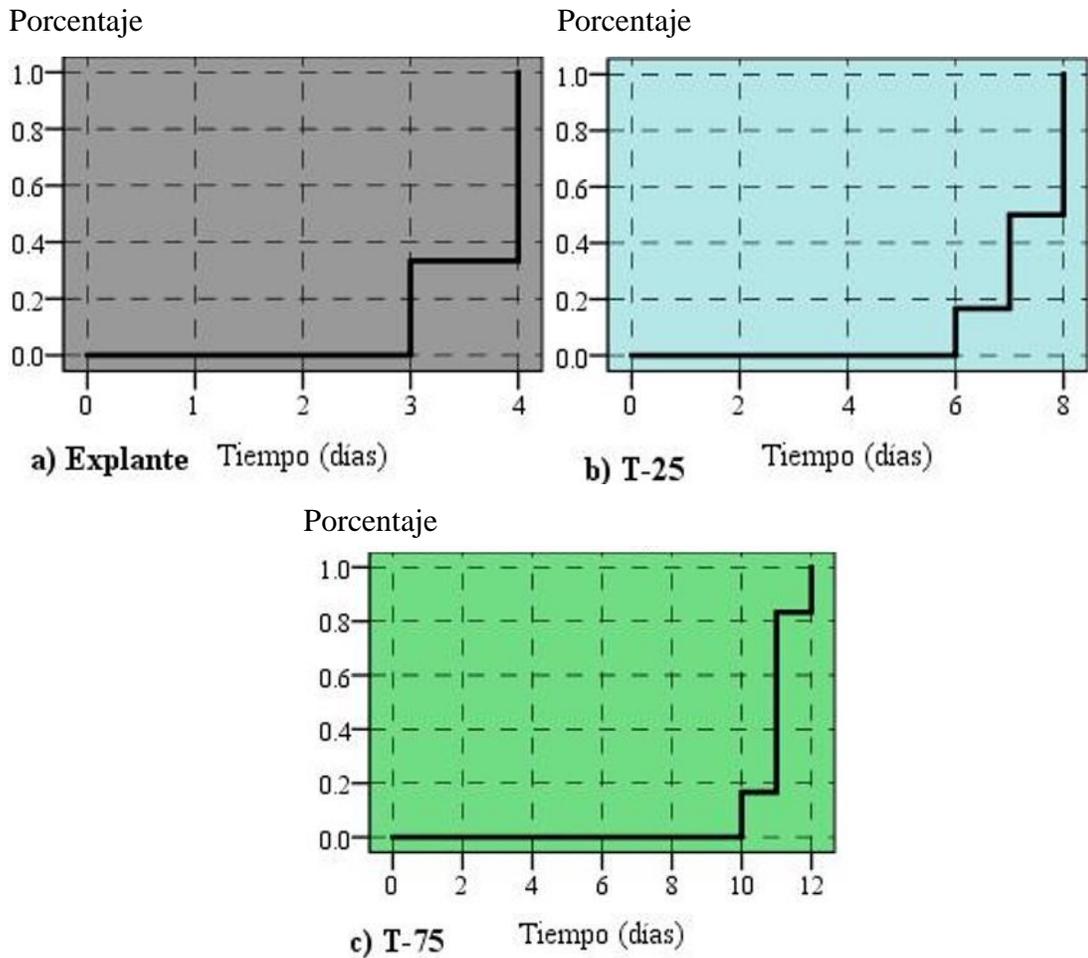


Figura 16. Tiempo en días requerido por las células de la pulpa dental para salir del explante y alcanzar la confluencia en frascos T-25 y T-75. El eje de las ordenadas representa la proporción total de pulpas cultivadas ($n = 6$). Un decimal (0.1) equivale al 10% del total.

Se obtuvieron aproximadamente 1 millón de células por frasco T-25 (área de cultivo: 25cm^2)

5. CLONOGENICIDAD

En la figura 17 se presenta la cinética de formación de una colonia, este patrón de crecimiento en cultivo, es característico de las células troncales.

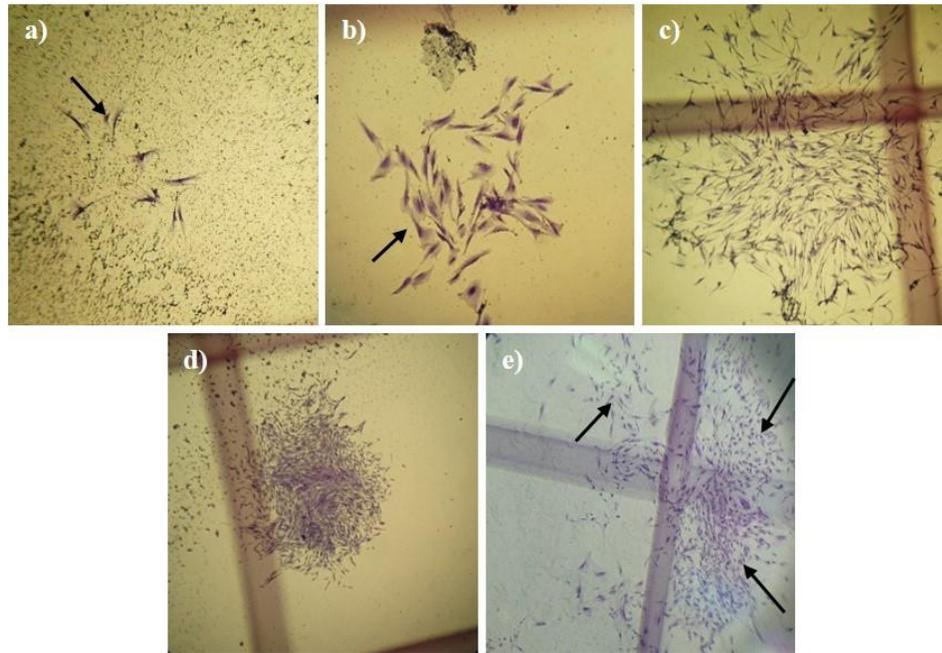


Figura 17. Vista al microscopio de la cinética de formación de una colonia celular. Microscopio invertido de campo claro, tinción con cristal violeta al 0.5%. a. Las células (flecha) se han adherido e inician mitosis (10x). b. Se da lugar a la proliferación y multiplicación celular; la progenie alcanza un número de 60 células (flecha) a los 5 días posteriores a ser sembradas (10x). c. Colonia formada a los 8 días (4x). d. La colonia adquiere mayor número de células (4x). e. Posterior a 13 días inicia la confluencia de colonias (flechas) (4x).

A través del ensayo de clonogenicidad, fue posible observar el crecimiento y proliferación de células de morfología fusiforme de los explantes de tejido pulpar, esto se observó a los 3 días de haberlos sembrado en placas de cultivo. Las células sanas del tejido explantado tenían forma de huso y permanecieron unidas al fondo del pozo. Por otro lado, las células dañadas o muertas parecían arrugadas y se encontraban separadas del fondo de la placa o flotando en el medio, exhibiendo una morfología esférica. La morfología característica de los fibroblastos se confirmó posteriormente por medio de la tinción con cristal violeta al 0.5%. La tinción se realizó a todos los pozos de la placa (Figura 18).

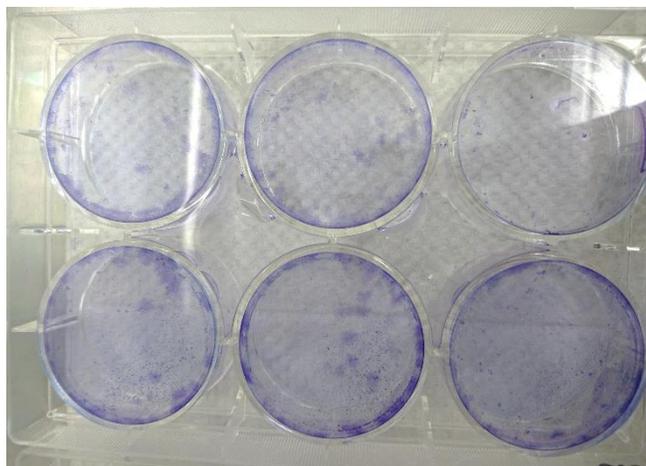


Figura 18. Placa de 6 pozos con tinción de cristal violeta al 0.5%

Como se aprecia en la tabla 8, las células obtenidas, exhiben la capacidad de formar colonias a diversas concentraciones celulares, lo cual es una característica asociada a las células troncales. De manera conjunta, se observa que no existe correlación significativa entre la cantidad obtenida de colonias por célula (Prueba de Spearman, índice $\rho=-0.800$; $p=0.200$). Este fenómeno es una respuesta típica de esta estirpe celular, ya que a bajas concentraciones de células, éstas pueden proliferar en forma de colonias, las cuales, se expandirán por toda el área de cultivo. En contraste, conforme aumenta la concentración de células, éstas proliferan más rápido al compartir señales mitogénicas (que inducen división celular), por lo que se expanden con rapidez en el área de cultivo, en consecuencia, la observación de colonias es escasa.

Tabla 8. Promedio y desviación estándar (DE) de colonias y relación colonias/concentración.

Concentración (células/ μ L)	P3 (OD 34)	P4 (OD 44)	P5 (OD 14)	Promedio	DE	Relación colonias/concentración
175	6.7	9.0	25.3	13.7	10.1	0.078
350	9.3	18.3	22.0	16.5	6.5	0.047
1750	41.0	139.3	150.7	123.9	6.5	0.071
3500	41.0	191.3	154.0	128.8	78.3	0.037

De un total de 6 pulpas (P1-P6) se emplearon 3 (P3-P5). El número presentado por pulpa representa un promedio de 3 pozos, pues se realizó un cultivo por triplicado para cada concentración. El promedio y la desviación estándar de cada concentración representan a un total de 9 pozos. La columna “Relación colonias/concentración” resulta del cociente entre las columnas “Promedio” y “Concentración”

6. MULTIPOTENCIA

Las CT provenientes de la pulpa dental, lograron proliferar en los 3 distintos medios (control, osteogénico y adipogénico), resultado que se observó posterior a 8-10 del sembrado en la placa multipotencia.

De acuerdo a las características morfológicas (figura 19), en los pozos con el medio de control se encontraron células fusiformes, concordantes con la forma fibroblastoide de las CT (Figura 19-a); en los pozos con medio osteogénico se presentaron células aplanadas (Figura 19-b), correspondientes a la forma de osteoblastos; y en pozos con medio adipogénico se observaron células redondeadas (Figura 19-c), concordantes con la forma de adipocitos. Posteriormente, estos tres tipos celulares fueron confirmados a través de tinción con inductores: cristal violeta al 0.5% para evidenciar morfología en general (Figura 19-d), Rojo de alizarina S para osteoblastos (Figura 19-e) y Rojo oleoso para adipocitos (Figura 19-f), las células mostraron positividad para los inductores analizados.

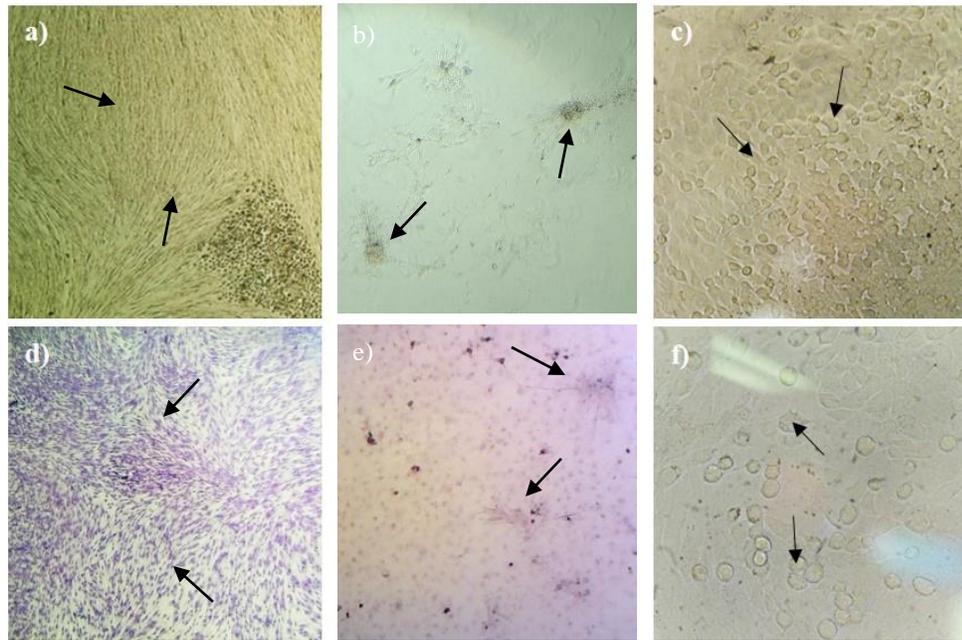


Figura 19. Morfología y tipos celulares obtenidos tras el sembrado de células pulpares en placa para multipotencia.

Las características morfológicas se definieron después de 8-10 días del sembrado. Microscopio invertido de campo claro. a) Células fusiformes (flechas) en medio de control DMEM con SFB al 10% (10x). b) Células aplanadas (flechas) en medio osteogénico (10x); c) Células redondeadas (flechas) en medio adipogénico (20x). d) Fibroblastos; tinción cristal violeta al 0.5% (4x). e) Osteoblastos; tinción rojo de alizarina (10x). f) Adipocitos; tinción rojo oleoso (20x).

7. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para determinar la presencia de células troncales (CT) se empleó la citometría de flujo (Figura 20). La población celular obtenida resultó positiva para los marcadores mesenquimatosos CD90-CD73 ($0.14 \pm 0.01\%$) y CD90-CD105 ($0.08 \pm 0.01\%$). Lo que indica que, el porcentaje de células troncales mesenquimales obtenidas de las pulpas es alrededor del 0.11%.

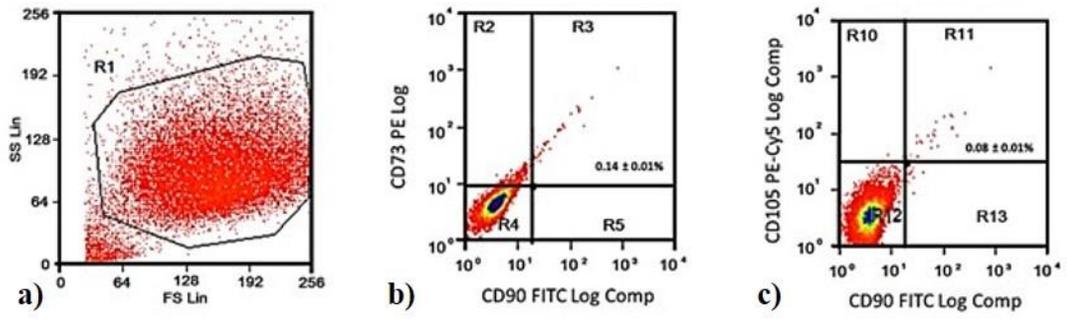


Figura 20. Citometría de flujo para marcadores mesenquimales.

a) Distribución celular. b) CD73-CD90. c) CD105-CD90.

DISCUSIÓN

Las dos técnicas analizadas en este trabajo mostraron ser efectivas para la obtención de la pulpa dental, como ha sido reportado previamente (39,40,42,58). Sin embargo, en contraste con lo reportado de Caballero y cols. no se logró la expansión de células a partir de las pulpas obtenidas por corte longitudinal, observándose problemas de adherencia y contaminación. Esto probablemente se deba a que el corte del órgano dentario, mediante la técnica longitudinal, experimenta mayor fricción, pudiendo generar daño celular. En contraste, la técnica de corte transversal demostró ser eficaz para la obtención de pulpa dental, cultivo y proliferación celular (39).

Las células obtenidas a través de la técnica transversal, presentaron una morfología fusiforme, capacidad de autorrenovarse a diferentes concentraciones celulares (clonogenicidad) y ser positivas para marcadores mesenquimales CD90-CD73 ($0.14 \pm 0.01\%$) y CD90-CD105 ($0.08 \pm 0.01\%$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mohamadreza y cols. para los marcadores CD31 conjugado con FITC, CD33, CD45, CD90, CD105 y PE conjugado con CD11b, CD34, CD44, CD56, CD73 y CD19, a partir de células de pulpa dental de terceros molares, realizando un corte del órgano dentario similar al reportado en este trabajo (58). De igual manera, Magallanes y cols. reportaron la obtención de la pulpa dental utilizando pieza de alta velocidad para garantizar no dañar el tejido pulpar (no mencionan tipo de corte). Mediante inmunocitoquímica en pulpas de premolares, obtuvieron marcadores positivos a CD-44 y STRO-1 (42). Karamzadeh y cols. utilizaron discos estériles de diamante, de uso dental en premolares, a los que se les realizó prueba de multipotencia con Rojo de Alizarina S para demostrar la presencia de osteoblastos. Además mediante qPCR, demostraron la presencia de genes relacionados con mineralización de odontoblastos, (DSPP, MEPE, ALP, DPSC-ED y DPSC-OG diferenciados) (40).

Para determinar el porcentaje de células mesenquimales presentes en las muestras, se realizó un estudio específico en busca de grupos de diferenciación CD73,

DC90 y CD105. Sin embargo, el bajo porcentaje de células positivas para marcadores mesenquimales registradas en la citometría de flujo, puede atribuirse a que la mayor población de células en la pulpa, pueden estar comprometidas a un linaje específico, lo que no se sabe y es interesante analizarlo.

CONCLUSIONES

Los cuidados y la destreza que se maneje durante los procesos son la base para que se obtengan buenos resultados.

En las condiciones de trabajo y ambiente del laboratorio donde se realizaron las pruebas la técnica de corte transversal es la única eficaz, aceptando la hipótesis.

Se demostró que las células de la pulpa dental de premolares contienen linajes celulares, entre los cuales se originan subpoblaciones comprometidas a osteoblastos y adipocitos, así como células progenitoras que expresan marcadores, identificándolas como CT. Lo que indica que tienen la capacidad de ser clonogénicas y multipotenciales.

Aunque existen metodologías documentadas para los diferentes procesos y manejos de las CT siempre será necesario hacer pruebas piloto para ajustarlas a las condiciones ambientales y destrezas de los investigadores.

El estudio de CT sigue generando grandes retos a nivel de ciencia básica y en especial, aplicada. Por lo que se sugiere realizar estudios con muestras estandarizadas de mayor tamaño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Piva E, Silva A, Nör J. Functionalized Scaffolds to Control Dental Pulp Stem Cell Fate. *JOE*. 2014;40(4S):S33-S40.
2. Gil-Loyzaga P. Cultivo de células animales y humanas. Aplicación en medicina regenerativa. Visión Libros. España: 2011.
3. Cohen S, Hargreaves K. Vías de la pulpa. 9a edición. Elsevier Mosby; España: 2008:480-487.
4. Torabinejad M, Walton R. Endodoncia principios y práctica. 4a edición. Elsevier Saunders; España: 2010:7-15.
5. Soares I, Goldberg F. Endodoncia Técnica y fundamentos. 2 ed. Panamericana; Argentina: 2012.
6. Kanth R *et al.* Pulp regeneration with stem cells. *Journal of international oral health*. 2015;7(10):102-106.
7. Jucht D, Rujano R, Romero M, Rondón L. Utilización de células madre en el ámbito odontológico. Revisión de la literatura. *Acta Bioclinica*. 2014;1(1):101-123.
8. Santos M. On the Origin of the Term “Stem Cell”. Elsevier Inc. 2007;1(1):35-38.
9. Cauich Rodriguez J, Rosales Ibañez R. Ingeniería Tisular de la Articulación Temporomandibular. *Odontología Actual*. México: 2017.
10. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*. 2000;97(25):13625–13630.
11. Ascencio D. Medicina regenerativa e ingeniería tisular. Del laboratorio a la clínica. México: Alfil; 2009.
12. Merce L. Células madre. Panamericana. España: 2009.
13. La Noce M *et al.* Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry*. 2014;42:761-768.
14. Mojarad F, Amiri I, Rafatjou R, Janeshin A, Farhadian M. The effect of 1^α,25(OH)₂D₃ on osteogenic differentiation of stem cells from dental pulp of exfoliated deciduous teeth. *J Dent Shiraz Univ Med Sci*. 2016;14(4):348-353.

15. Salehi R, Aghazadeh M, Rashidi MR, Samadi N, Salehi S, Davaran S Samiei M. Bioengineering of Dental Pulp Stem Cells in a Microporous PNIPAAm- PLGA Scaffold. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2014;63(15):767-776.
16. Olávez D, Salmen S, Padrón K, Lobo C, Díaz N, Berrueta L, Solórzano E. Aislamiento y cultivo de células madre posnatales de dientes primarios. *Univ Odontol*. 2014;33(70):187-193.
17. Soto E, Vargas L, Oropeza M, Cano P, Moran A, García M. Células pluripotenciales de la pulpa dental humana. *Odontología Actual*. 2014;11(130):4-14.
18. Hou P, *et al*. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *SCIENCE*. 2013;341:651-654.
19. Giordano G, Lamonaca G, Annibali S, Ciconetti A, Ottolengui L. Stem from oral niches: A review. *Ann Stomatol*. 2011;2(1-2):3-8.
20. Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven B. Concise review: Dental pulp stem cells: A novel cell therapy for retinal and central nervous system repair. *STEM CELLS*. 2017;35:61-67.
21. Cea-Sanhueza M, Sánchez-Sanhueza G. Células madre mesenquimales orales: Estado del arte en Odontología. *Avances en odontoestomatología*. 2016;32(2):97-105.
22. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG *et al*. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(10):5807-5812.
23. Tatullo M, Marrelli M, Paduano F. The regenerative medicine in oral and maxilofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci*. 2015;12(1):72-77.
24. Mojarad F, Amiri I, Rafatjou R, Janeshin A, Farhadian M. The effect of $1^{\alpha},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on osteogenic differentiation of stem cells from dental pulp of exfoliated deciduous teeth. *J Dent Shiraz Univ Med Sci*. 2016;14(4):348- 353.
25. Lindemann D *et al*. Effects of cryopreservation on the characteristics of dental pulp stem cells of intact deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. 2014;59(9):970-976.

26. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016;45(1):124-131.
27. Nakashima M, Iohara K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. *JOE.* 2014;40(4S):26- 32.
28. Rosa V, Zhang Z, Grande RHM, Nör J. Dental pulp tissue engineering in full-length human root Canals. *J Dent Res.* 2013;92(11):970-975.
29. Kaigler D *et al.* Bone engineering of maxillary sinus bone deficiencies using enriched CD90+ stem cell therapy: A randomized clinical trial. *JBMR.* 2015;30(7):1206-1216.
30. Bressan *et al.* Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clin Oral Invest.* 2016;20(1):75-81.
31. Kushnereva E, Shawcrossb SG, Hillarbyc MC, Yatesd JM. High-plasticity mesenchymal stem cells isolated from adult-retained primary teeth and autogenous adult tooth pulp- A potential source for regenerative therapies? *Arch Oral Biol.* 2016;62:43-48.
32. Romero G, Aldape BC. Bioingeniería dental ¿El futuro de la terapia en odontología? *ADM.* 2011;4(78):169-174.
33. Gioventú S *et al.* A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfusion and Apheresis Science.* 2012;47:199–206.
34. Ma D, Gao J, Yue J, Yan W, Fang F, Wu B. Changes in proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from deep caries in vitro. *J Endod.* 2012;38(6):796- 802.
35. Pereira LO, Rubini MR, Silva JR, Oliveira DM, Silva IC, Poças Fonseca MJ. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int Endod J.* 2012;45(12):1080-1090.
36. Macedo de Souza L *et al.* Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent pulp. *Braz J Oral Sci.* 2010; 9(4):427-433.

37. Piva *et al.* Dental Pulp Tissue Regeneration Using Dental Pulp Stem Cells Isolated and Expanded in Human Serum. JOE. 2017;43(4):568-574.
38. Tsai A *et al.* Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp. BioMed Research International. 2017;2017:1-9.
39. Caballero *et al.* Evaluación de la fibroína de seda como biomaterial de soporte para el crecimiento de células mesenquimales estromales de pulpa dental. ARS MÉDICA. 2016;41(1):5-13.
40. Karamzadeh R, Baghaban M, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. JOVE. 2012;9(1):1-10.
41. Gili A *et al.* Aplicaciones del cultivo celular en odontología. RAAO. 2016;55(1):49-53.
42. Magallanes M, Carmona B, Álvarez M. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. Revista Odontológica Mexicana. 2010;14(1):15-20.
43. Segretin ME. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). ArgenBio. [acceso el 12 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>
44. Saito M *et al.* Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. World J Stem Cells. 2015;7(2):399-407.
45. Shah D *et al.* Comparative evaluation of the clonogenic capacity of periodontal ligament fibroblasts in Hank's balanced salt solution and egg albumen: An in vitro study. Dental Traumatology. 2018;34(4):278-283.
46. Bakopoulou A, About I. Stem cells of dental origin: current research trends and key milestones towards clinical application. Stem Cells Int. 2016;2016:1-20.
47. Tatullo *et al.* Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med. 2015;9:1205-1216.
48. Ki S *et al.* "In vivo experiments with dental pulp stem cells for pulp-dentin complex regeneration," MEDIAT INFLAMM. 2015;78:1-6.

49. Fawzy El-Sayed K *et al.* Stem cell transplantation for pulpal regeneration: a systematic review. *Tissue Engineering*. 2015;21(5):451-460.
50. Morad G, Kheiri L, Khojasteh A, Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literatura. *Archives of Oral Biology*, 2013;58(12):1818-1827.
51. Bronckaers A *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther*. 2014; 143(2):181-196.
52. Saghiri M, Asatourian A, Sorenson C, Sheibani N. Role of angiogenesis in endodontics: contributions of stem cells and proangiogenic and antiangiogenic factors to dental pulp regeneration. *J Endod*. 2015;41(6):797-803.
53. Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-2006, Para la prevención y control de enfermedades bucales. [documento en internet] [acceso el 7 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m013ssa24.html>.
54. Norma Oficial Mexicana NOM-157-SSA1-1996, Salud ambiental, protección y seguridad radiológica en el diagnostico medico con rayos X. [documento en internet] [acceso el 7 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/157ssa16.html>.
55. Rodríguez N *et al.* Isolation of human mesenchymal stem cells and their cultivation on the porous bone matrix. *J. Vis. Exp*. 2015;96:1-7.
56. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental, residuos peligrosos biológicos, infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. [documento en internet] [acceso el 10 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
57. Apéndice F Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. [acceso el 14 de marzo de 2018]. Disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/678186/RI_12_10.pdf?sequence=1

58. Eslaminejad M, Nazarian H, Shariati M, Vahabi S, Falahi F. Isolation and *in vitro* Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Pulp Tissue of Human Third Molar Tooth. Iran J Med Sci. 2010;35(3):216-225.

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Comparación de dos técnicas de extracción de pulpa dental para la obtención de células troncales”

Expediente: _____ Folio: _____ Fecha: _____

Investigador responsable: CD. Hernán Humberto Peraza Dorantes

Estoy de acuerdo en participar en el proyecto de investigación titulado “Comparación de dos técnicas de extracción de pulpa dental para la obtención de células troncales”. El objetivo general de este trabajo es comparar la eficacia de dos técnicas de extracción de pulpa dental de premolares, con indicación de extracción, para la obtención de células troncales que sean extraídos en la clínica de la Maestría en Odontología Infantil y la clínica de Cirugía.

Esto permitirá generar investigación en el desarrollo de nuevas líneas de células troncales para su posible uso en la regeneración de tejido u órganos dañados.

Yo, _____, tutor(a) de _____

estoy de acuerdo en participar en el proyecto y autorizo la donación de los dientes que por motivos odontológicos sean extraídos. Se me ha informado que los datos personales serán confidenciales. De igual manera en las fotografías, que también autorizo, que sean tomadas con fines de academia y publicación, no aparecerá el rostro completo para así proteger la identidad. De igual manera se me informó el diagnóstico y tratamiento quirúrgico al que será sometido, los riesgos y posibles complicaciones que no serán inherentes a la donación.

Reconozco que no estamos obligados a participar en este proyecto y que podremos retirarnos del mismo en cualquier momento sin condicionamientos ni recibir ninguna clase de penalización. También se me informó que no recibiremos ninguna remuneración económica.

Los investigadores se han comprometido a darme información oportuna sobre los procedimientos, así como a responder y aclarar dudas. Finalmente se me informó que cualquier diagnóstico y tratamiento adicionales que se requiera, posterior a la intervención me serán informados.

En caso de que acepte, la información se tendrá de manera confidencial y se resguardará en una base de datos propia del investigador

Para cualquier aclaración comunicarse con el CD. Hernán Humberto Peraza Dorantes al siguiente teléfono: 9991551047 o al correo electrónico: hernan_perazadorantes@hotmail.com.

Yo, voluntariamente estoy de acuerdo en firmar y doy libremente mi consentimiento para que mi tutorado participe en este estudio.

Firma o huella del tutor

Firma o huella del testigo

Firma del investigador responsable

ANEXO 2

LISTA DE INSTRUMENTAL DE CIRUGÍA

- Material quirúrgico
- Cepillo para lavado de manos
- Espejo
- Pinza de algodонера
- Separador de Z
- Separador de farabeu mediano
- Separador de Minesota
- Riñonera
- Pinza de anillos
- Pinza de campo
- Cánula de aspiración frazier
- Manguera para succión
- Jeringa carpul con arpón
- Explorador
- Mango de bisturí # 3
- Elevador de periostio o 7a
- Fresa quirúrgica 560, 703 cilíndricas
- Pieza de baja velocidad
- Elevador recto #3
- Cureta de lucas
- Porta agujas de 20 o 25 cm
- Pinza de disección con dientes o adson
- Tijera de mayo
- Tijera de metzenbawn
- Lima para hueso
- Pinza hemostática de mosco curva
- Enjuague con clorhexidina

Instrumental extra

- Elevadores de ápice
- Elevadores de Poot
- Elevadores de bandera
- Cíncel recto
- Martillo
- Fresón
- Cucharillas de dentina

ANEXO 3

PUNTOS A CONSIDERAR DESDE LA EXTRACCIÓN DEL ÓRGANO DENTARIO HASTA LA SIEMBRA

Punto	Descripción
Barreras de protección	Uso obligatorio de bata clínica, guantes, cubrebocas y gorro en todo momento de la investigación, desde la exodoncia hasta los cambios de medios de cultivo. Trabajo en condiciones estériles.
Extracción dental	Previo a la extracción, el paciente se enjuagó con clorhexidina al 0.12% durante 2 minutos. Posterior a la extracción, el diente no deberá tocar con nada externo a excepción del fórceps con el que fue extraído.
Almacenamiento y transporte al laboratorio	Inmediatamente posterior a la exodoncia, el diente se colocará en un tubo de polipropileno estéril con DPBS. Y se transportará al laboratorio de cultivo a temperatura de 4-8 °C.
Técnica de corte dental y extracción de pulpa	La técnica de corte dental transversal deberá ser precisa y siempre con irrigación de agua estéril con un disco de diamante a 35 mil rpm en velocidad 8x. Es indispensable cambiar de disco de diamante cuando se presente mayor fricción de corte y calentamiento dental. La extracción del tejido pulpar deberá realizarse de manera suave con tiranervios #20, de tal manera que se provoque el menor desgarre o fragmentación de la pulpa. El tiempo de corte hasta llegar a la pulpa es de 10 segundos.
Adherencia de la pulpa a la placa (técnica de explante)	Se tiene que adherir primero la pulpa a la placa. Colocar la pulpa en el fondo de la placa o botella de cultivo, esperar 1 minuto, colocar la placa o botella en sentido vertical y esperar de 3 a 7 minutos, posteriormente aplicar el medio de cultivo.
Manejo de material	Todo material empleado para cultivo celular debe esterilizarse por calor en la autoclave o por radiación UV con la lámpara del cuarto de cultivo o de la campana.
Medios de cultivo	Deberá aplicarse de manera suave y no directamente a la pulpa, deberá cubrirla ligeramente, no exceder. El medio de cultivo deberá encontrarse libre de partículas externas a su composición, por lo que siempre se deberá verificar las condiciones del mismo, que no presente precipitados ni cambio de coloración o turbidez, en caso de encontrarse deberá desecharse. Se abrirá el tubo o botella de almacenamiento estrictamente dentro de la campana de flujo laminar ya estéril y deberá cerrarse antes de retirarlo de la campana. La temperatura para su almacenamiento deberá ser de 4 °C.
Cambio de medio de cultivo	Deberá cambiarse estrictamente al día siguiente del sembrado pulpar y cada tercer día hasta completar 14 días de cultivo.

ANEXO 4

TÉCNICAS DE CORTE TRANSVERSAL Y LONGITUDINAL: VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Técnica	Ventajas	Desventajas
Transversal	<p>a) Menor tiempo de corte (10 segundos).</p> <p>b) Menor calentamiento del diente al tacto.</p> <p>c) Corte más preciso.</p> <p>d) Mejor agarre al momento de la odontosección.</p> <p>e) Extracción sencilla de la pulpa.</p> <p>f) Extracción completa de la pulpa.</p>	<p>a) Salpicaduras de todo el lugar en donde se hace el corte.</p>
Longitudinal	<p>a) Si se realiza un corte preciso, mejor exposición del tejido pulpar para su extracción.</p>	<p>a) Salpicaduras de todo el lugar en donde se hace el corte.</p> <p>b) Mayor tiempo de corte (18 segundos).</p> <p>c) Mayor calentamiento del diente.</p> <p>d) El corte depende de la habilidad del operador.</p> <p>e) Dificultad en el agarre para el corte.</p> <p>f) La pulpa puede no salir completa.</p> <p>g) Frecuentemente se fractura el diente exponiendo la pulpa.</p>