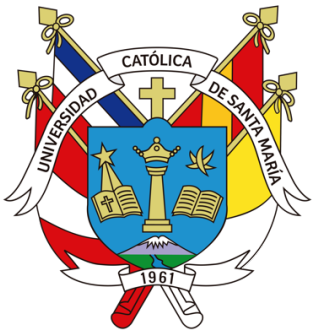
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Doctorado en Ciencias de la salud



AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS DEL QUISTE RADICULAR INFLAMATORIO Y EXPRESIÓN DEL GEN P53

Tesis presentada por el maestro:
Jácobo Valdivia Francis Wendell
para optar el Grado Académico de
Doctor en ciencias de la salud

Asesor:
Dr. Bernabé Ortiz Julio Cesar

Arequipa- Perú

2022

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ESCUELA DE POSTGRADO

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 26 de Agosto del 2022

Dictamen: 001475-C-EPG-2022

Visto el borrador del expediente 001475, presentado por:

2017011061 - JACOBO VALDIVIA FRANCIS WENDELL

Titulado:

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS DEL QUISTE RADICULAR INFLAMATORIO Y EXPRESIÓN DEL GEN P53

Nuestro dictamen es:

APROBADO

0913 - GUTIERREZ ARANIBAR ROXANA JACQUELINE
DICTAMINADOR

1051 - VILLANUEVA SALAS JOSE ANTONIO
DICTAMINADOR

1884 - FERNANDEZ FERNANDEZ FERNANDO
DICTAMINADOR

3308 - CHAVEZ FUMAGALLI MIGUEL ANGEL
DICTAMINADOR

6432 - PACHECO ARANIBAR JANI
DICTAMINADOR

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Epígrafe

Si podemos poner a un hombre en la luna y secuenciar el genoma humano, deberíamos ser capaces de diseñar algo parecido a una biblioteca pública digital universal.

Peter Singer

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Dedicatoria

Este trabajo es dedicado a Dios, por seguir encaminando mi destino, a mi padre quien en vida influyó sobre mi formación, a mi familia por ser siempre mi motivación para alcanzar mis logros.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Agradecimientos

A mi asesor el Dr. Julio C Bernabé y los doctores Javier Valero, Ivo palomino y Wilmer Bardarrago que me apoyaron para la ejecución de esta tesis.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

La presente tesis fue financiado por fondos internos para la investigación UCSM,
RESOLUCIÓN 27144-R-2020

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

RESUMEN

El quiste radicular inflamatorio es considerado como una de las lesiones odontogénicas más frecuentes dentro del campo odontológico, presentando sus características clínicas y radiográficas particulares. En la histopatología encontramos gran cantidad de fibroblastos de los cuales, presentan cúmulos de colonias celulares. El objetivo de esta investigación es el aislamiento y cultivo de células madre del quiste radicular inflamatorio, para su caracterización a un nivel morfológico y molecular. Esta investigación partió desde la hipótesis de saber si las células madre del quiste radicular inflamatorio presentan alteración en su ADN y en la búsqueda de la presencia de la sobre expresión de P53. Los protocolos de aislamiento en el transcurso de la investigación tuvo modificaciones por la necesidad de la búsqueda del mejor método de cultivo, esto permitió su comparación con otros.

En la metodología se usó un protocolo modificado que se extrajo de la modificación de varios protocolos para obtener el más apropiado para el aislamiento de nuestras células madre junto con la técnica de viabilidad celular. La expresión de p53 se evaluó por inmunofluorescencia y para la búsqueda de mutaciones se utilizó el software IGV.

Las células madre de quiste son células alargadas, planas, de apariencia fibroblástica, sobre expresan la proteína p53 y presentan mutaciones que por primera vez se reportan en esta tesis. El protocolo modificado evidencia una buena viabilidad celular al momento de aislar células madre. Las mutaciones se encontraron en posiciones específicas la presencia de mutación en la secuencia del exón 1 chr 17: 7675089 (GrCh38) de variante missense en los alelos de G > C y con 7 mutaciones en el exón 4 en el chr 17: 7673787 con alelo G > A, el chr 17: 7673782 con alelo T > C, chr 17: 7673780 con alelo T > A y chr 17: 7673743 con alelo C > T, chr 17: 7673783 con alelo C > G y el chr 17: 7673780 con el alelo T > C y chr 17: 7673786 con alelo G > A, estas 3 últimas mutaciones, no se encuentran mencionadas en la literatura, lo que indica que por primera vez reportamos este tipo de mutación para p53

Se puede determinar un aislamiento de células madre del quiste radicular inflamatorio por medio de un protocolo modificado o adaptado a nuestras necesidades de cultivo. También a través de un análisis de la viabilidad celular, la eficacia del método, descripción morfológica de las colonias de células fibroblásticas, la presencia de p53 en el núcleo como en el citoplasma y las mutaciones de p53 a nivel del exón 1 y 4.

Palabras clave: Viabilidad celular, Quiste radicular, p53, células madre.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ABSTRACT

The inflammatory radicular cyst is considered one of the most frequent odontogenic lesions in the dental field, presenting its particular clinical and radiographic characteristics. In histopathology we find a large number of fibroblasts, of which they present clusters of cell colonies. The objective of this research is the isolation and culture of stem cells from the inflammatory radicular cyst, for their characterization at a morphological and molecular level. This research started from the hypothesis of knowing if the stem cells of the inflammatory radicular cyst have alterations in their DNA and in the search for the presence of P53 overexpression. The isolation protocols in the course of the investigation had modifications due to the need to search for the best culture method, this allowed its comparison with others.

In the methodology, a modified protocol was used that was extracted from the modification of several protocols to obtain the most appropriate for the isolation of our stem cells together with the cell viability technique. The expression of p53 was evaluated by immunofluorescence and the IGV software was used to search for mutations.

Cyst stem cells are elongated, flat cells with a fibroblastic appearance that overexpress the p53 protein and present mutations that are reported for the first time in this thesis. The modified protocol shows good cell viability when isolating stem cells. The mutations were found in specific positions the presence of mutation in the sequence of exon 1 chr 17: 7675089 (GrCh38) of missense variant in alleles of G > C and with 7 mutations in exon 4 in chr 17: 7673787 with allele G > A, chr 17: 7673782 with allele T > C, chr 17: 7673780 with allele T > A and chr 17: 7673743 with allele C > T, chr 17: 7673783 with allele C > G and chr 17: 7673780 with allele T > C and chr 17: 7673786 with allele G > A, these last 3 mutations are not mentioned in the literature, which indicates that for the first time we report this type of mutation for p53

An inflammatory radicular cyst stem cell isolate can be determined by a protocol modified or adapted to our culture needs. Also through an analysis of cell viability, the efficacy of the method, morphological description of the fibroblastic cell colonies, the presence of p53 in the nucleus as well as in the cytoplasm, and p53 mutations at the level of exons 1 and 4.

Keywords:, Cell viability, Radicular cyst, p53, stem cells.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ÍNDICE

DICTAMEN APROBATORIO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

EPIGRAFE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 3

HIPÓTESIS 3

OBJETIVOS 3

Objetivo general 3

Objetivos específicos 3

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO 4

1. Marco teórico 4

1.1. Quiste Radicular Inflamatorio 4

1.1.1. Características Clínicas Y Radiográficas 5

1.1.2. Características Histopatologicas. 5

1.2. Aislamiento celular. 6

1.2.1. Método de explantes: 7

1.2.2. Disgregación mecánica celular 7

1.2.3. Métodos de digestión enzimática: 8

1.2.4. Muestras líquidas: 8

1.2.5. Muestras sólidas: Tejidos de origen embrionario o adulto, sano o tumoral: 8

1.3. Cultivo Celular 8

1.3.1. Obtención de los cultivos celulares 9

1.3.2. Tipos de cultivos celulares 9

1.3.3. Subcultivo y líneas celulares 9

1.3.3.1. Propagación 9

1.3.3.2. Terminología. 10

1.3.3.3. Designación 11

1.3.3.4. Selección. 11

1.3.3.5. Rutina de mantenimiento. 12

1.3.3.6. Morfología celular 12

1.3.3.7. Reemplazo del medio. 12

1.3.3.8. Subcultivo 13

1.3.3.9. Ciclo de crecimiento 14

1.3.3.10. Propagación en suspensión 15

1.3.4. Diferencias entre cultivos primarios y cultivos de líneas celulares. 15

1.3.4.1. Cultivos primarios: 15

1.3.4.2. Líneas celulares: 15

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos

En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.3.4.3. Uso de los cultivos 15
1.3.4.4. Ventajas de realizar un cultivo 16
1.3.4.5. Desventajas para realizar un cultivo 16
1.3.4.6. Dificultades en la implantación de cultivos de organismos vivos. 16
1.3.5. Medios y suplementos 16
1.3.5.1. Desarrollo de los medios de cultivo 16
1.3.5.2. Propiedades fisicoquímicas de los medios de cultivo 16
1.3.5.3. Soluciones salinas balanceadas 17
1.3.5.4. Medio completo 17
1.3.5.5. Suero 18

1.4. Células madre 18
1.4.1. Células madre embrionarias (células ES) 18
1.4.2. Las células madre adultas (CMA) 19
1.4.2.1. Características de las células madre adultas 19

1.5. Marcadores moleculares de células. 20
1.5.1. Marcadores de superficie celular para células. 20

1.6. El gen P53 20
1.6.1. Función de p53 22
1.6.2. Relación de la p53 en el ciclo celular. 22
1.6.3. Evaluación de la Expresión De P53 24
1.6.3.1. RT-PCR 24
1.6.3.2. Inmunofluorescencia 24
1.6.3.2.1. Tipos de inmunofluorescencia 25
1.6.3.2.1.1. Inmunofluorescencia directa: 25
1.6.3.2.1.2. Inmunofluorescencia Indirecta: 25

1.7. Métodos para la determinación de la viabilidad celular. 26
1.7.1. Evaluación de la integridad de la membrana celular 26
1.7.1.1. Métodos de sustancias colorantes o fluorescentes: 26
1.7.1.2. Métodos basados en la liberación de sustancias al medio extracelular: 27
1.7.2. Ensayos funcionales 27
1.7.2.1. Cuantificación de los niveles de adenosintrifosfato: 27
1.7.2.2. Síntesis del nuevo ADN: 28
1.7.2.3. Detección de proteínas: 28

1.8. Secuenciamiento del transcriptoma - Illumina. 29
1.8.1. Transcriptoma. 29
1.8.2. Secuenciación de Illumina 29
1.8.2.1. Preparación de la biblioteca. 29
1.8.2.2. Generación de cluster. 29
1.8.2.3. Secuenciación 31
1.8.2.3.1. Primera Lectura 31
1.8.2.3.2. Segunda Lectura. 31
1.8.2.3. Análisis de datos. 32

CAPÍTULO II METODOLOGÍA 33

2. Metodología 33

2.1. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación 33
2.1.1. Ubicación Espacial. 33

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.1.2. Ubicación Temporal 33
2.1.3. Unidades de Estudio 33
2.1.4. Materiales, equipos y reactivos: 33
2.1.4.1. Materiales 33
2.1.4.2. Equipos 34
2.1.4.3. Reactivos 34
2.2. Muestra y selección de la muestra. 35
2.3. Cultivo celular 35
2.4. Aislamiento enzimático de células. 35
2.5. Aislamiento mecánico de células. 36
2.6. Viabilidad celular 36
2.6.1. Cámara Neubauer 36
2.6.2. Cámara Neubauer para el recuento celular: 37
2.7. Caracterización de las células. 38
2.8. Estudio de la expresión de la proteína p53 por inmunofluorescencia. 38
2.9. Secuenciación masiva de última generación (Rna – Seq) 39
2.10. Métodos de determinación de la expresión génica 39
2.10.1. Rna – seq. usando la plataforma de Illumina. 39
2.10.1.1. Cobertura genética. 40
2.10.1.2. Flujo de trabajo 40
2.10.1.3. Procedimiento. 40
2.11. Secuenciación de nucleótidos. 41
2.11.1. Técnicas de secuenciación. 42
2.11.1.1. Frangmentación de ADN: 42
2.11.1.2. Métodos de amplificación mediante PCR: 42
2.11.1.3. Secuenciación del material genético: 42
2.11.1.4. Creación de archivos: 42
2.12. Criterios para el manejo de resultados 42
2.10.1. Plan de procesamiento de Datos. 42
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN 43
3. Resultados y discusión 43
3.1. Protocolo de aislamiento de células a partir quiste radicular inflamatorio 43
3.1.1. Aislamiento mecánico 43
3.2. Cultivo celular 44
3.2.1. Medio de cultivo modificado 44
3.3. Evaluación y caracterización de las células madre aisladas de quiste radicular inflamatorio. 44
3.3.1. Caracterización morfológica. 44
3.3.2. Viabilidad celular 47
3.3.3. Evaluación de Mutaciones para p53. 52
DISCUSIÓN 61

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CONCLUSIONES 64

RECOMENDACIONES 65

REFERENCIA 66

ANEXOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Propiedades de las líneas celulares continuas y finitas). _____ *11*

*Tabla 2.Comparación de los tipos de aislamiento.*_____ *43*

Tabla 3.Comparación de medios de cultivo. _____ *44*

Tabla 4.Mutaciones puntuales de p53 Exon 1. _____ *53*

Tabla 5.Mutaciones puntuales de p53 Exon 4. _____ *60*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Extracción del quiste radicular inflamatorio _____ *4*

Figura2. Radiografía panorámica en el diagnóstico del quiste periapical inflamatorio. _____ *5*

Figura3. Micrografía de contraste de fases que muestra el crecimiento epitelial a partir de un explante primario después de 10 días (67X). _____ *7*

Figura4. Vacuolación y granulación en las células epiteliales. _____ *12*

Figura5. Curva de crecimiento. _____ *13*

Figura6. Ciclo de crecimiento. _____ *14*

Figura7. Cronología de la expresión del marcador de células germinales. _____ *19*

Figura8. P53 en el ciclo celular. _____ *23*

Figura9. Etiquetado y adición de motivos. _____ *29*

Figura10. Célda de flujo. _____ *30*

Figura11. Amplificación clonal. _____ *31*

Figura12. Cámara de Neubauer – llenado. _____ *36*

Figura13. Retícula de recuento. _____ *37*

Figura14. Cámara Neubauer para el recuento celular. _____ *37*

Figura15. Software IGV, secuenciación masiva de última generación. _____ *39*

Figura16. Cultivo y proliferación celular en placas de cultivo. _____ *45*

Figura17. Cultivo y proliferación celular en los pozos de cultivo. _____ *46*

Figura18. Viabilidad celular – recuento de células viables y no viables. _____ *47*

Figura19. Viabilidad celular por cuadrantes. _____ *48*

Figura20. Comparación de las técnicas de aislamiento por medio de viabilidad celular con azul de tripán. _____ *49*

Figura21. Aislamiento mecánico con diferentes casos de medicación. _____ *50*

Figura22. Inmunofluorescencia indirecta. _____ *51*

Figura23. Mutaciones en p53 exon 1, cromosoma 17: 7675089, G>C en quiste radicular inflamatorio. _____ *52*

Figura24. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673787, G>A en quiste radicular inflamatorio. _____ *54*

Figura25. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673786, G>A en quiste radicular inflamatorio. _____ *55*

Figura26. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673783, C>G en quiste radicular inflamatorio. _____ *56*

Figura27. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673782, T > C en quiste radicular inflamatorio. _____ *57*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Figura28. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673780, T > A, T > C, en quiste radicular inflamatorio. _____ *58*

Figura29. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673743, C > T, en quiste radicular inflamatorio. _____ *59*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN	: Acido ribonucleico
C	**:** Citocina
CD13	: Grupo de diferenciación 13
CD133	: Grupo de diferenciación 133
CD24	: Grupo de diferenciación 24
CD271	: Grupo de diferenciación 271
CD90	: Grupo de diferenciación 90
cDNA	: DNA complementario
CM	: Células madre
CMA	: Células madre adultas
DMEM	: Medio Eagle modificado de Dulbecco's
DNA	: Acido disoxirribonucleico
DNasa	: Acido disoxirribonucleasa
EDTA	: Acido etilendiaminotetracético
ES	: Células Embrionarias
G	**:** Guanina
G1	: Gap 1
GF-AFC	: Sustrato peptídico fluorogénico permeable a las células
H3	: Tritio
IGV	: Visor genómico Integrador
Ki-67	: Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67
MHC	: Complejo principal de mayor histocompatibilidad
NAD	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NHB1	: Línea celular primera fuente
NHB1-1	: Copia Primera línea celular
NHB2	: Copia segunda línea celular
NGS	: Secuenciación de próxima generación.
OMS	: Organización mundial de la salud
Cr.17 P13	: Cromosoma 17, brazo p. banda 13.
P53	: Proteína 53
PBS	: Solución tampon de fosfato
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PIOCs	: Carcinoma escamocelular intraóseo primario
QRI	: Quiste radicular inflamatorio
SFB	: Suero Fetal de Bovino
SOX 2	: Factor de transcripción para el mantenimiento de la renovación de células
SPSS	: Software estadistico
SSEA4	: Antígeno embrionario específico de etapa 4
T	: Tiamina
TAE	: Tampon Tris Acetato EDTA
VS40	: Virus Simian 40
WAF1	: Alias CDKN1A Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INTRODUCCIÓN

Una de las lesiones odontogénicas predominantes de la cavidad oral es el quiste radicular inflamatorio (QRI), secuela directa de un granuloma periapical. El origen de los quistes radiculares inflamatorios son residuos de Malassez de la vaina radicular epitelial de Hertwig, estas son células que se encuentran alrededor de las raíces y forman el tejido periodontal para desempeñar funciones como: el mantenimiento del espacio del ligamento periodontal, la regeneración del tejido periodontal, la regeneración del cemento y otros que se encuentran en investigación. Sin embargo, las células que forman estas lesiones no se encuentran del todo caracterizadas.

Por otro lado, los quistes odontogénicos de origen inflamatorio conforman el 11.26%; de los cuales el quiste radicular está representado en el 46.06% seguido del queratoquiste odontogénico 15.02%, el quiste dentígero 14.04% y el quiste paradental 13.55% Todos los anteriores se presentan con mayor prevalencia en la dentición permanente. En los dientes temporales representa solamente del 0.5 al 3.3% del total de los quistes radiculares inflamatorios y se presenta mayormente en varones (56.73%) con mayor porcentaje en el maxilar superior (60%), siendo el sector anterior de la cavidad oral la zona más frecuente.

En el estudio radiográfico se observa un área radiolúcida periapical de forma redondeada o forma de pera, unilocular, con límites definidos y corticalizados. El quiste puede desplazar el diente adyacente o causar reabsorción parcial de la raíz; sin embargo, distinguir entre un granuloma y un quiste es complicado mediante un estudio radiográfico. Por lo tanto, se recomienda como diagnóstico definitivo realizar una biopsia para su diferenciación histopatológica.

El diagnóstico histopatológico muestra una inflamación crónica, cerrada, limitada parcial o completamente por un epitelio escamoso estratificado, no queratinizado, con presencia de contenido líquido o semifluido, donde el tejido conectivo fibroso subyacente se encuentra inflamado con distintos grados de infiltrado celulares y pequeños vasos sanguíneos.

Por último, la proteína tumoral humana p53, es un gen supresor de tumores que su función es el control del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. Para la parte fisiológica, los niveles de p53 celular son bajos y la proteína tiene una vida media relativamente corta, pero cuando se daña el ADN su concentración aumenta y prolonga su vida media, es por

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

esto, que la célula se detiene en la fase G1 del ciclo celular dando el tiempo suficiente para intentar reparar el DNA.

Normalmente, podemos encontrar otras descripciones como los casos de ameloblastoma o el queratoquiste y su relación con la p53 no obstante, son pocos los estudios de la relación del p53 con el quiste radicular. Hay resultados donde muestran un 0.2% de malignidad, pudiendo desencadenar un PIOCs.

Métodos que puedan plantearse de este quiste nos van a permitir estudiar más sobre estas células y conocer las proteínas involucradas del quiste y su desarrollo. Para buscar futuros blancos de terapia biológica y poder controlarlos, para de esta forma evitar su efecto como es el daño a la pulpa de la pieza dental.

En este sentido, en la presente tesis nos proponemos a buscar un método que permita aislar células madre del quiste inflamatorio radicular y cultivar para caracterizar su morfología y la expresión de p53.

P53 es una proteína, regulatoria del ciclo celular y su sobrexpresión debido a mutaciones, está asociada en muchos casos a neoplasias. Es posible que el crecimiento descontrolado del quiste esté asociado a la expresión de esta proteína, la cual se puede evaluar directamente en las células madre.

Para este estudio utilizaremos biopsias del quiste radicular inflamatorio con diferentes métodos de aislamiento y cultivo de sus células madre, las cuales serán caracterizadas basadas en su morfología y expresión de p53.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Dado que, el gen p53 se sobre expresa cuando hay daño en el ADN, para que la célula active su mecanismo de reparación genética. Es probable que el aislamiento y cultivo de las células del quiste radicular inflamatorio presenten alteración en su ADN, evidenciándose en la sobre expresión de P53.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el aislamiento y cultivo de células del quiste radicular inflamatorio y expresión del gen p53

Objetivos específicos

- Establecer una técnica para el aislamiento de células del quiste radicular inflamatorio
- Establecer una técnica para el Cultivo de células del quiste radicular inflamatorio
- Caracterizar la morfología de las células aisladas del quiste radicular inflamatorio
- Evaluar la viabilidad del cultivo de las células del quiste radicular inflamatorio.
- Evaluar la expresión p53 con inmunofluorescencia del quiste radicular inflamatorio.
- Conocer la secuenciación de p53 de células del quiste radicular inflamatorio.
- Identificar las mutaciones para P53 con el software IGV (Integrative Genomics Viewer)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Marco teórico

1.1. Quiste Radicular Inflamatorio

Los quistes radiculares se forman a partir de residuos epiteliales (restos de Malassez) en el ligamento periodontal (1), como resultado de periodontitis apical posterior a la necrosis pulpar. Aunque también, se pueden desarrollar a partir del epitelio crevicular, epitelio sinusal o recubrimiento epitelial de un tracto fistuloso (2). El quiste radicular es el quiste odontogénico más frecuente (3).

Su incidencia varía entre 52 y 75% y constituyen el 6 al 55% de las lesiones periapicales (4). Después viene un 9% con los quistes verdaderos que rápidamente pueden solucionarse con un tratamiento endodóntico. Su prevalencia es mayor en mujeres y se presenta en edad adulta, aunque aún hay disputa por parte del sexo.

Clínicamente, se presentan asintomáticos y no producen expansión ósea y cuando se manifiesta se suele presentar en la zona vestibular. Tampoco presentan cambios en los tejidos blandos, pero si pueden llegar a provocar dolor y fistulización como se muestra en la Fig. 1.

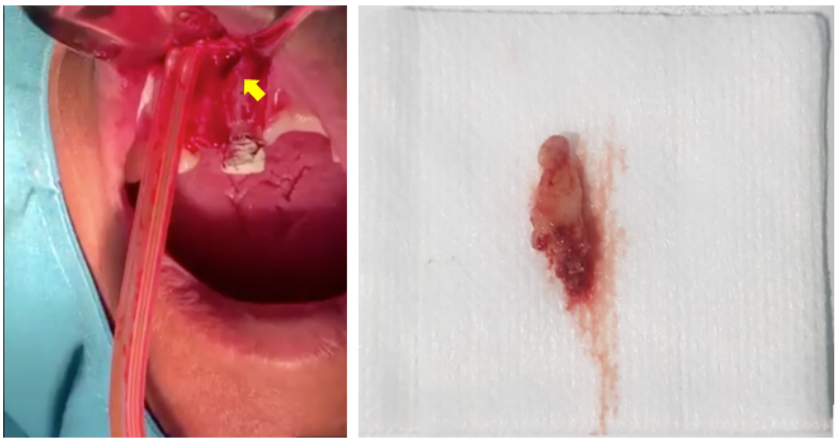


Figura 1. Extracción del quiste radicular inflamatorio

Su crecimiento se cree que es por reabsorción ósea por la presión quística, producción de colagenasas y prostaglandinas. Para el diagnóstico se realiza mediante el análisis de sus síntomas, su radiografía panorámica más el estudio histopatológico. La OMS clasifica a los quistes odontogénicos como en 2 partes según su patogenicidad (5).

- Primero, están los quistes radiculares de origen inflamatorio

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Segundo, las lesiones producidas por el desarrollo odontogénico y no odontogénico (6)

1.1.1. Características Clínicas Y Radiográficas

Según Rosenberg(8) dentro de los criterios utilizados para evaluar y diagnosticar, radiográficamente, una radiolucidez periapical como quiste, se encuentran: bordes corticalizados uniformes y bien definidos, resorción ósea alrededor de los dientes adyacentes, de forma ovalada o globo, lumen con radiolucidez uniforme, perforación de la tabla cortical, desplazamiento de raíces dentales adyacentes, tamaño mayor a 20 mm (7). Radiográficamente, es idéntico a un granuloma periapical, lesión considerada como el origen de la formación del quiste radicular (8).

Radiográficamente, se observa un ensanchamiento del espacio periodontal, una zona radiolúcida redondeada u oval con línea ósea de condensación periquística reaccional, como se muestra en la Fig. 2. La mayor parte de los casos se observa en el sexo masculino y suele localizarse en la región anterior del maxilar superior.(9–11)

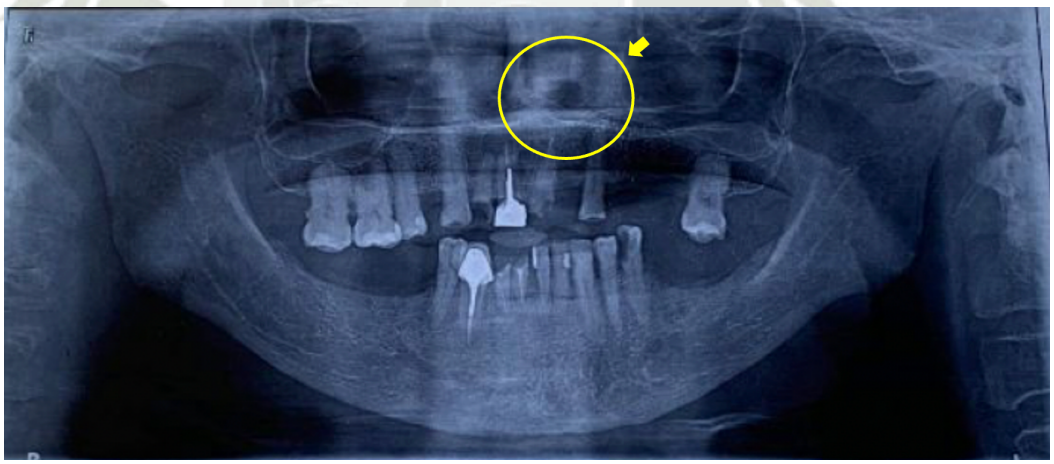


Figura 2. Radiografía panorámica en el diagnóstico del quiste periapical inflamatorio.

1.1.2. Características Histopatológicas.

El quiste periapical está recubierto por un epitelio escamoso estratificado, el cual puede presentar exocitosis, espongiosis o hiperplasia, también es posible encontrar escasas células mucosas o áreas de epitelio respiratorio. En ocasiones,

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

el epitelio tiene calcificaciones lineales o circulares conocidas como cuerpos de Rushton.(12)

Las paredes de la lesión varían de extremadamente delgadas a un grosor de 5 mm y la superficie interna es suave o corrugada. El fluido interno se puede observar de color café, como resultado de la presencia de sangre y cristales de colesterol, los cuales se observan de un color dorado brillante(13)

El infiltrado celular inflamatorio en los bordes epiteliales proliferativos consiste predominantemente en leucocitos poliformonucleares, mientras que el infiltrado inflamatorio de la cápsula fibrosa adyacente consiste en infiltrado inflamatorio celular crónico.

El lumen puede estar lleno de fluido, detritos celulares, calcificaciones distróficas, células gigantes multinucleadas, eritrocitos, hemosiderina, entre otros. La pared quística está compuesta de tejido conectivo fibroso denso, con infiltrado inflamatorio que contiene una mezcla variable de linfocitos, neutrófilos, células plasmáticas, histiocitos y eosinófilos

El tratamiento de estas lesiones es variable a veces es suficiente con un procedimiento endodóntico o procedimientos quirurgicos. Cuando estos procedimientos no resultan se debe combinar con la enucleacion o apicectomías (14).

1.2.Aislamiento celular.

Encontramos 4 tipos de aislamiento celular:

- Método de explantes
- Disgregación mecánica
- Digestión enzimática y química
- Inmunoselección(15)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.2.1. Método de explantes:

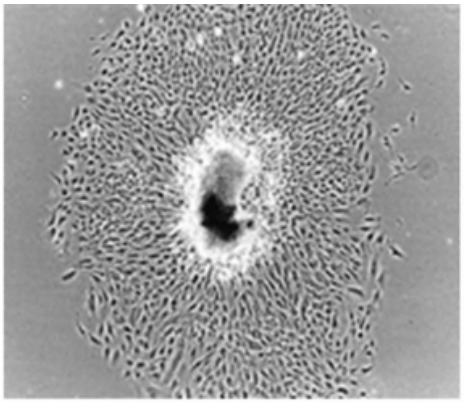


Figura 3. Micrografía de contraste de fases que muestra el crecimiento epitelial a partir de un explante primario después de 10 días (67X) (16).

La tecnica de explantes fue el método original para iniciar el cultivo de tejido (17). Consiste en tomar un fragmento de tejido y embeberlo en plasma coagulado mezclado con extracto embrionario para mantenerlo fijo y visualizarlo con el microscopio observese en la Fig. 3. La desventaja de este metodo es la pobre adhesividad de algunos tejidos y la selección celular (18).

1.2.2. Disgregación mecánica celular

Es un proceso que ayuda a separar las células entre sí, manteniendo la viabilidad celular (19). Para lograrlo es necesario romper la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que las mantiene unidas y conseguir la ruptura proteolítica.

- Manual: Se necesita el empleo de material quirúrgico esterilizado, pinzas, tijeras, bisturí, pipetas, etc. Necesario triturar, fragmentar, cortar, picar, cribar los fragmentos de tejido (15).
- Automatizada: Se utilizan herramientas como agitadores magnéticos o de rodillos para facilitar la disgregación del tejido, así como, la liberación de las células al medio de digestión. Es muy usado para tejidos voluminosos.

  Los trozos de tejidos obtenidos se colocan en una placa petri y luego de su adhesión a la placa se coloca medio nutritivo y se incuba a 37°C con atmosfera húmeda al 5% de CO_2.

  Es un proceso que ayuda a separar las células entre sí manteniendo la viabilidad celular. Para lograrlo es necesario romper la malla de proteínas que forman la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

matriz extracelular que las mantiene unidas y conseguir la ruptura proteolítica (15).

1.2.3. Métodos de digestión enzimática:

El procedimiento de degradación de tejido más simple es el método enzimático, que va desde un proceso de digestión simple hasta una solución más compleja, que variará según el tipo de tejido (20). Las enzimas que descomponen los componentes de la matriz extracelular o las uniones intracelulares se utilizan para tratar tejidos con proteasas activas. El procedimiento depende de la cantidad de tejido y del uso previsto de las células obtenidas. Las enzimas son preparaciones primitivas de tripsina, colagenasa I, colagenasa IV, elastasa, piranasa, dipasa, papaína, DNasa y hialuronidasa. Independientemente del método, se debe comprobar la calidad y viabilidad de la célula, de modo que se acepte al menos un 80-90% (21).

1.2.4. Muestras Líquidas:

Esta tecnica de separación dependen del: tamaño celular, densidad celular, carga superficial específica, química superficial celular, dispersión total de la luz por célula, emisión de fluorescencia. Por ejemplo, las células de la sangre pueden separarse con relativa facilidad, pero solo los leucocitos son capaces de expandirse en un cultivo in vitro (22).

1.2.5. Muestras sólidas: Tejidos de origen embrionario o adulto, sano o tumoral:

Se utiliza la hidrólisis enzimática con o sin ayuda mecánica, la cual utilizan enzimas que degradan la matriz extracelular.

1.3. Cultivo Celular

El cultivo celular ha sido considerado como una mezcla de ciencia y arte (23). Antes era considerada como una técnica difícil de aplicar, hoy en día estas dificultades fueron superadas por los medios de composición, disponibilidad de antibióticos, instalaciones asépticas y los dispositivos de cultivos.

El material genético está compuesto por 100 billones de células, pero a su vez también guarda el secreto de muchas enfermedades de cada individuo. El cultivo

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

celular se desarrolló en 1900, por primera vez, para estudiar el comportamiento de las células (24).

1.3.1. Obtención de los cultivos celulares

Estos pueden ser obtenidos a partir de explantes de biopsias, por perfusión de un órgano, disgregación de tejidos o por fluidos orgánicos (19).

1.3.2. Tipos de cultivos celulares

- **Cultivos de órganos:** En este tipo de cultivo mantiene todas las características histológicas del tejido original. Esta se mantiene en un medio líquido del que se extrae los nutrientes y se elimina los desechos (25). Este tipo de cultivo es muy difícil de mantener durante un tiempo prolongado debido a las diferencias potenciales de crecimiento (26).
- **Explantes primarios:** Constituidos por fragmentos pequeños de tejido plegándose a la superficie, creciendo así las células más periféricas. Este cultivo también se le conoce con el nombre de cultivo primario porque no llegan a pasar por una fase de crecimiento y cultivo secundario cuando procede de una fase de crecimiento previo (27).
- **Cultivo de Células:** Este tipo de cultivo está formado por células dispersas disgregadas de un tejido vivo, mediante procedimientos mecánicos, químicos o enzimáticos (28). Solo contienen un tipo de células. Homogéneas genéticamente. Tipo de cultivo más utilizado en la actualidad (29).

1.3.3. Subcultivo y líneas celulares

1.3.3.1.Propagación

Es el subcultivo más importante. El cultivo primario ha ocupado todo el sustrato disponible. La proliferación celular ha llegado a ser una característica importante y después de este primer pase, la fracción celular en crecimiento es alta, hasta del 80%. De un cultivo primario muy heterogéneo, emerge una línea celular más homogénea, cuya importancia práctica es que ahora se puede propagar, caracterizar y almacenar (30).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.3.3.2.Terminología.

Este término implica la presencia de varios linajes celulares de fenotipos distintos o similares algunos tipos puenden observarse en la tabla 1. Si una línea celular es seleccionada por tener cierta propiedad específica, esta línea celular se convierte entonces en una cepa celular (31). Si una línea celular se transforma in vitro, da lugar a una línea celular continua y si esta es clonada y caracterizada, entonces es conocida como cepa celular continua (32). Es vital confirmar la identidad de la línea celular para 80 excluir la posibilidad de contaminación cruzada (30). A continuación se hablará sobre los tipos de crecimiento de las líneas celulares:

- **El crecimiento en monocapa:** Se adhieren al sutrato iniciando su proliferación. Este es el modo común de crecimiento celular de la mayor parte de las células, excepto las células hematopoyéticas maduras (33).
- **El crecimiento en suspensión:** No necesitan de un sustrato para poder proliferar ya que, son independientes al anclaje. Propio de células hematopoyéticas y células tumorales (34).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 1. Propiedades de las líneas celulares continuas y finitas (16).

Propiedades	**Finita**	**Continua**
Ploidía	Euploide, diploide	Aneuploide
Transformación	Normal	Inmortal, tumorigénico
Dependencia de anclaje	Si	No
Inhibición por contacto	Si	No
Limitación por densidad	Si	Reducida o perdida
Modo de crecimiento	Monocapa	Monocapa o suspensión
Mantenimiento	Cíclico	Posible estado estacionario
Requerimiento de suero	Alta	Baja
Eficiencia de clonación	Baja	Alta
Marcadores	Específico de tejido	Antigénico, enzimático, cromosómico
Funciones especiales	Frecuentemente perdidas	Pueden ser conservadas
Tasa de crecimiento	Lenta (24-96 h)	Rápida (12-24 h)
Rendimiento celular	Bajo	Alto
Parámetros de control	No. de generación, marcadores específicos de tejido	Características de cepa

1.3.3.3.Designación

A las líneas celulares nuevas se les debe de asignar un código, por ejemplo NHB, si varias líneas celulares se obtuvieron de la misma fuente NHB1, NHB2, etc., y si fue clonada, el número de clona NHB1-1, NHB1-2, etc. En general, las iniciales del donante no se usan por razones de confidencialidad (30,35).

1.3.3.4.Selección.

Si no es importante la especie, es preferible escoger no humanas, porque requieren menos permisos y podría ser más accesible la obtención de tejido original (36). Si se escoge una línea finita, verificar si hay suficientes en el stock. Si escoges líneas continuas, verificar que haya disponibilidad (32). Si estás usando una transfectante, verificar que se tenga el equivalente normal disponible y pensar que tan estable será como sus características de crecimiento (37).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.3.3.5.Rutina de mantenimiento.

En el proceso de crecimiento y formación de las colonias, el cultivo celular necesita un cambio de medio periódico, seguido de un eventual subcultivo, si las células lo requieren. Aún en los cultivos no proliferativos se requiere el cambio periódico de medio, porque las células lo metabolizan (38).

1.3.3.6.Morfología celular

Siempre es recomendable estar pendiente examinar el cultivo y confirmar ausencia de contaminación, como granularidad perinuclear, vacuolación citoplasmática y redondeamiento con despegamiento del sustrato Véase en la Fig. 4. Esos signos pueden indicar que el cultivo requiere un cambio de medio, o podrían indicar un problema más serio, como medio o suero tóxico o inadecuado, contaminación microbiana o senescencia (16,19). Las deficiencias en el medio pueden iniciar apoptosis y este proceso es difícil de revertir por la muerte celular (39,40).

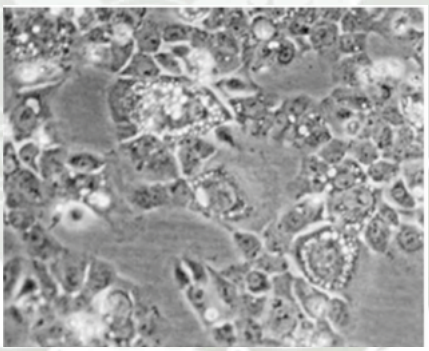


Figura 4. Vacuolación y granulación en las células epiteliales (16).

1.3.3.7. Reemplazo del medio.

Encontramos 4 los factores que indican el reemplazar el medio:

- El pH: Se da cuando estamos en un pH entre 7 a 6.5 deteniéndose el crecimiento celular y perdiendo viabilidad entre 6.5 y 6 (41).
- La concentración celular: La tasa de descenso, si cae 0.1 unidades/día, no hay prisa para cambiar el medio, pero si cae 0.4 unidades/día, si es necesario (42).
- El tipo celular: Las células normales paran de dividirse a alta densidad, se bloquean en fase G1 y se deterioran poco, pero las células transformadas y algunas embrionarias, se deterioran rápidamente a altas densidades.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- El deterioro morfológico celular: Este debe ser anticipado a través del examen visual o familiaridad con la línea celular (43).

1.3.3.8. Subcultivo

Cuando se percibe que un cultivo está creciendo lentamente, puede ser mejor remover solo la mitad de su medio de cultivo y reemplazarlo por medio fresco. Cuando una línea celular es subcultivada, el crecimiento de las células hasta el momento del siguiente subcultivo usualmente sigue un patrón estándar Véase en la Fig.5. Un período de latencia conocido como la fase lag, después del sembrado, es seguido por un período de crecimiento exponencial, la fase log (42).

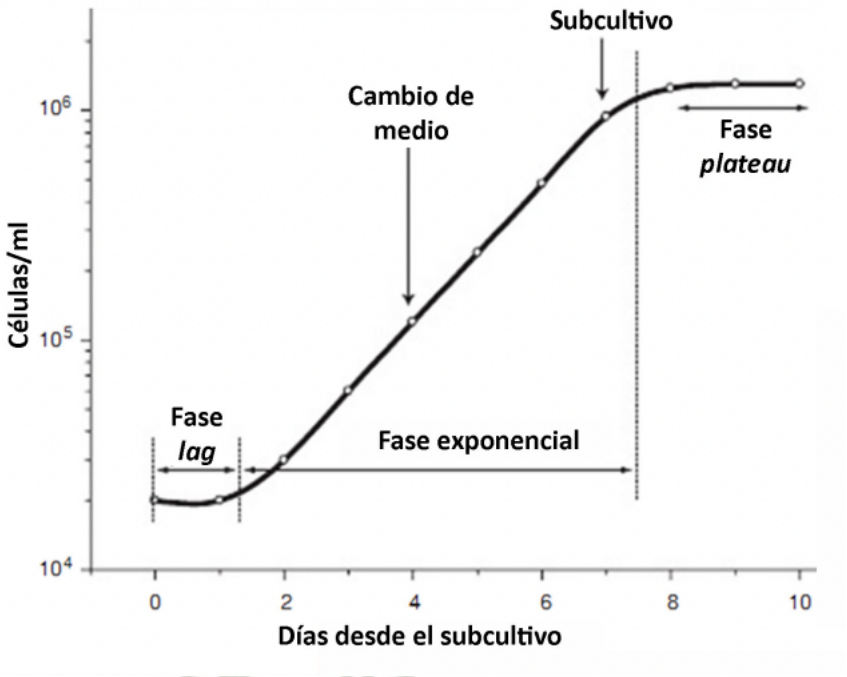


Figura 5. Curva de crecimiento (16).

Cuando la densidad celular alcanza un nivel en que toda la superficie disponible está ocupada o cuando la concentración celular excede la capacidad del medio, el crecimiento cesa o se reduce. Entonces el medio debe ser cambiado o el cultivo debe dividirse (44).

Para una línea celular adherida, el subcultivo implica remover del medio y separar de las células en la monocapa con tripsina (45). Entonces, para subcultivar una monocapa se realiza los siguientes criterios:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

a) Densidad del cultivo: las células no transformadas deben subcultivarse tan pronto como alcancen la confluencia. Las células se deteriorarán después de 2 doblajes y la eficiencia del resembrado declinará (24).

b) Agotamiento del medio de cultivo: El cambio de pH es un indicador para el cambio de medio, pero también puede ser contaminación microbiana.

c) Es recomendable establecer subcultivos rutinarios bajo un estricto programa, para que el comportamiento celular sea reproducible (46).

d) Requerimientos experimentales: Cuando las células se requieren para propósitos diferentes a la propagación rutinaria, deben ser subcultivadas para incrementar el stock o para cambiar el tipo de recipiente de cultivo o el medio. Nunca debe hacerse en el periodo de latencia, lo más recomendable es que se realice entre la segunda mitad de la fase log y antes de entrar a la fase plateau. Cuando se subcultivan diferentes líneas celulares a la vez, estas deben manejarse separadamente, por el riesgo de la contaminación cruzada (30).

1.3.3.9.Ciclo de crecimiento

Cuando las células crecen correctamente, deben alcanzar su concentración celular después del mismo tiempo en cada ciclo dado (47). Es altamente recomendable familiarizarse con el ciclo de crecimiento de cada línea celular, ya que este controla la concentración de sembrado, la duración de crecimiento antes del subcultivo, la duración de los experimentos y los tiempos apropiados para el muestreo (34). Véase en la Fig. 6.

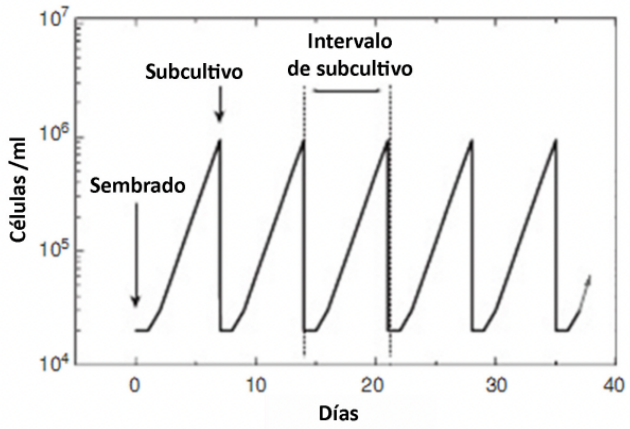


Figura 6. Ciclo de crecimiento (16).

La concentración celular que debemos utilizar para subcultivar debe ser la mínima que permita entrar rápidamente a la fase de crecimiento logarítmico (48), pero que

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

alcanzará la fase de plateau justo en el momento que sea conveniente para el siguiente subcultivo (49).

1.3.3.10. Propagación en suspensión

Los cultivos en suspensión tienen la ventaja de no requerir proteasas para realizar subcultivos, lo que significa que el proceso es menos traumático. Tampoco requieren reemplazo total del medio de cultivo. Cuando se realiza el subcultivo en suspensión, se puede mantener en el mismo frasco, pero aumenta la probabilidad de contaminación (16).

1.3.4. Diferencias entre cultivos primarios y cultivos de líneas celulares.

1.3.4.1.Cultivos primarios:

- Se obtiene de un animal recién sacrificado
- Cariotipo original
- Formado por células indiferenciadas.
- Duración de 7 días aproximadamente
- 1 solo pasaje (50).

1.3.4.2.Líneas celulares:

- Provienen de un cultivo primario
- Aneuploides
- Están formado por células que se diferencian genéticamente
- Proliferan de forma ilimitada
- Varios pasajes (32).

1.3.4.3.Uso de los cultivos

- Estudios virales
- Producción de vacunas
- Ingienería de proteínas
- Estudios de Interacción
- Producción para Trasplantes
- Reproducción in vitro de plantas de interes comercial.
- Ensayo de nuevos medicamentos
- Estudio de toxinas (30).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.3.4.4.Ventajas de realizar un cultivo

- Control del entorno y caracterización
- Economía
- Motivaciones éticas (30).

1.3.4.5.Desventajas para realizar un cultivo

- Personal preparado
- Desdiferenciación celular.
- Variabilidad genética (28).

1.3.4.6.Dificultades en la implantación de cultivos de organismos vivos.

- Proliferación
- Diferenciarse en los tipos celulares deseados
- Sobrevivir en el receptor tras el implante
- Integrarse en el tejido circundante
- Funcionar apropiadamente durante toda la vida del receptor
- No producir daño al receptor (51).

1.3.5. Medios y suplementos

1.3.5.1.Desarrollo de los medios de cultivo

Comenzaron con la aparición del medio basal de Eagle en 1955 y después del medio esencial mínimo de Eagle (MEM) en 1959 para después ser ampliamente adoptada en la mayoría de los laboratorios de cultivo celular. Luego aparecieron más líneas celulares, siempre requerían la optimización del medio MEM. La mayoría de los cultivos celulares se pueden mantener en un medio MEM, medio MEM modificado por Dulbecco DMEM en 1959 o RPMI en 1967 suplemento con suero (52).

1.3.5.2.Propiedades fisicoquímicas de los medios de cultivo

La mayoría de las líneas celulares crecen en un pH de 7.2, pero en realidad el pH óptimo para una determinada línea celular puede variar. Por ejemplo, las lineas celulares de los fibroblastos normales crecen mejor a intervalos de 7.4 a 7.7 y las células transformadas crecen en un intervalo de 7.0 a 7.2 (53).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Para obtener resultados reproducibles se debe contar con una temperatura adecuada de 0.5°C (54). Las puertas de la incubadora deben mantenerse cerradas y no abiertas y no por tiempos largos que los estrictamente necesarios (55). La distribución de la temperatura dentro de la incubadora debe ser uniforme, permitiéndose que el aire circule, por lo que no se debe amontonar los recipientes uno sobre otro (54). La temperatura también influye en el pH del medio de cultivo, ya que una baja temperatura el CO_2 se disuelve más (54).

La viscosidad del medio de cultivo está influenciada por el suero y en la mayoría de los casos produciendo poco efecto sobre el crecimiento celular. Sin embargo, si agitamos la suspensión celular con poco suero o sin él produciremos espuma en los medios creando desnaturalización de proteínas y su riesgo a contaminarse (56).

1.3.5.3.Soluciones salinas balanceadas

Se encuentran compuestas de sales inorgánicas y pueden incluir bicarbonato de sodio y en algunos casos, glucosa. Forman la base de muchos medios completos. Medio completo. Tenemos en este campo a las sales balanceadas en Earle, sales de Hank y el PBS (57).

1.3.5.4.Medio completo

Este termino indica que se han agregado todos los constituyentes y suplementos necesarios como aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, proteínas, elementos traza, glucosa entre otros (58). Los aminoácidos que se agregan son los esenciales pero no pueden ser sintetizados por las células, pero en ocasiones también se agregan los aminoácidos no esenciales para compensar cualquier tipo de partícula celular para producir los sueros (59). Las sales son los principales componentes que contribuyen a la osmolaridad y dependiendo del medio, su concentración puede varias (60). La glucosa es la principal fuente de energía en la mayoría de los medios, se metaboliza por medio de la glucólisis formando piruvato, que puede ser convertido a lactato (61). También en el medio se le pueden agregar antibióticos para reducir la frecuencia de contaminación (62), pero no es aconsejable su uso rutinario porque promueve la aparición de organismos resistentes, enmascara contaminantes cripticos oculta infecciones de micoplasma y promueve una técnica aseptica pobre (63).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.3.5.5.Suero

El suero contiene los factores de crecimiento promoviendo la proliferación celular y factores de adhesión y actividad antitripsina. Es una fuente de minerales, lípidos y hormonas. La mayoría de los sueros usados en los cultivos son de ternera, caballo o bovino adulto. Este ultimo suero es el más utilizado (SFB) para líneas celulares más exigentes y para clonación (64).

Sus proteínas principales son la albúmina, la fibronectina que promueve la adhesión celular, la alfa 2 macroglobulina que inhibe la tripsina y la transferrina que transporta hierro haciendolo biodisponible y menos tóxico. Las proteínas del suero aumentan la viscocidad del medio. También en el suero están presentes diferentes hormonas como la hidrocortisona e insulina, nutrientes, metabolitos, lipidos, minerales e inhibidores de proliferación celular.(65)

1.4.Células madre

La célula madre es un tipo específico de célula en el cuerpo que tiene el potencial de formar muchos tipos diferentes de células. Estas células madre pueden dividirse en dos tipos (66).

1.4.1. Células madre embrionarias (células ES)

Son células pluripotenciales de la masa celular interna del blastocisto. Estas células madre embrionarias pueden convertirse en neuronas, músculos, huesos, sangre u otros tipos de células. A pesar de su enorme conocimiento sobre su potencial, es limitado la exploración de vías terapéuticas basadas en células ES Los marcadores de las células germinales podemos encontrarlos en la Fig. 7 (67).

Se observa un panel de marcadores de células germinales en puntos de tiempo definidos para impulsar la diferenciación de la línea germinal in vivo.

El panel de marcadores de células madre embrionarias humanas está diseñado para la validación y caracterización de líneas de células madre humanas (ES). Este panel contiene cinco anticuerpos contra marcadores bien conocidos de células ES humanas (Oct4, Nanog, SOX2, SSEA4 y tra-1-60). Estas células se aíslan en la masa celular interna del blastocisto temprano. Poseen 2 propiedades que las caracterizan como únicas:

- Pueden autorrenovarse.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Son pluripotentes, pueden diferenciarse en las tres capas (ectodermo, mesodermo y endodermo) (68).

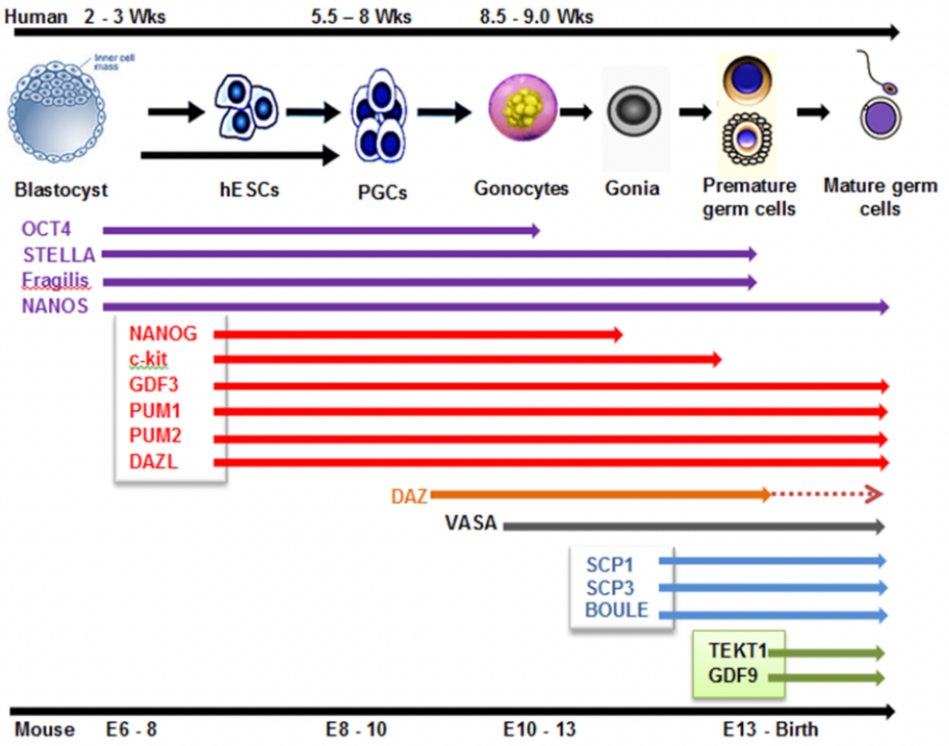


Figura 7. Cronología de la expresión del marcador de células germinales (67).

1.4.2. Las células madre adultas (CMA)

Son células multipotenciales, ya que generan los tipos celulares del mismo tejido. Son capaces de generar todos los tipos celulares de la sangre, del sistema inmune, piel, tejido adiposo, ligamentos periodontales, membranas sinoviales, hueso trabecular, sistema nervioso (69).

1.4.2.1. Características de las células madre adultas

a. División celular simétrica y asimétrica: Las Células madre se mantendrá si se lleva a cabo la división celular simétrica y la producción de una. La división simétrica provee un mecanismo para incrementar la población de células madre después de una pérdida de estas, aunque también puede llevarnos a una lesión parecida a los tumores.
b. Auto-renovación: Las células madre tienen sus telómeros mucho más largos que cualquier otro tejido embrionario. Gran capacidad de auto-renovación se debe a la actividad de la telomerasa.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

c. Pluripotencialidad: Se refiere a la capacidad que tienen los blastómeros y las células de la masa celular interna del blastocisto para generar diversos tejidos embrionarios, líneas germinales, o como ya se ha citado antes, la capacidad que tiene una célula madre para diferenciarse en otro tipo de célula.

d. Estrategias cito-protectoras: Muchas células han adquirido la habilidad de resistir agentes citotóxicos mediante un sistema de detoxificación basado en enzimas o por su habilidad de exportar nexobióticos nocivos.

e. Inmunogenicidad: Se ha demostrado que la respuesta inmune de las células madre embrionarias es baja en comparación a las células madre adultas alogénicas, debido a la baja expresión del complejo principal de histocompatibilidad I y la falta de expresión de MHC II (69).

1.5. Marcadores moleculares de células.

Hay varios marcadores para abordar la identificación o el aislamiento de células madre. Estos incluyen reacciones basadas en enzimas. (fosfatasa alcalina y telomerasa), moléculas pequeñas (lectinas o péptidos cortos) y puntos cuantitativos o colorantes fluorescentes.

1.5.1. Marcadores de superficie celular para células.

En la superficie celular, las CSC expresan ciertos receptores, a saber CD44, CD133, CD24,CD90, CD271,, CD49r y CD13.

La CD44 es una glicoproteína transmembrana, es uno de los marcadores más destacados y se utiliza para identificar CSC de diversos tumores sólidos (67).

1.6. El gen P53

En 1979. Científicos dentro de ellos Lionel Crawford, David P. Lane, Arnold Levine y Lloyd Old, descubrieron una nueva proteína que inicialmente se etiquetó como oncogén, pero su verdadera entidad como gen supresor fue descubierta en Baltimore. Es un importante regulador del ciclo celular(70). Esta proteína, que puede unirse a una proteína que se está transformando (antígeno grande T) de virus Simian 40 (VS40), era más prevalente en células transformadas (inmortalizadas y potencialmente tumorigénico) por este virus que en células normales. La proteína y su gen correspondiente fueron nombrados p53, en referencia a la masa de la proteína

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

(53 kilodaltons). El gen p53 se encuentra en el cromosoma 17 en la posición p13 (71).

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear, descubierta por Lane et al en 1979 por estudios en células transformadas por infección con VS40, en las cuales se precipitaba el antígeno T grande formando un complejo con una proteína celular de 53-kDa (72) Posteriormente esta fosfoproteína p53 se encontró asociada con la proteína E1b del adenovirus tipo 5 (73) y con la proteína E6 de los papilomavirus tipo 16 y 18 que también están ligados a la proteína p53 (74) sugiriendo que estos virus ADN tenían como objetivo común en la célula la proteína p53.

El gen p53 (o TP53) fue descubierto en 1979 y hasta la fecha es uno de los más importantes genes relacionados con el cáncer (75). Este gen, localizado en el cromosoma 17, produce una proteína que funciona como factor de transcripción. Los genes controlados por el p53 están involucrados en la división y viabilidad celular (76). Como otros supresores de tumores, la proteína p53 funciona previniendo el crecimiento irregular de la célula (77).

La proteína p53 interactúa directamente con el ADN (76). También interactúa con otras proteínas que dirigen acciones celulares (78). Cuando el ADN se daña o algún otro malfuncionamiento es detectado, el p53 tiene el poder de accionar la muerte celular o apoptosis (49). El papel crucial del p53 en mantener el funcionamiento apropiado de los procesos celulares. Se reafirma por el hecho de que el gen p53 está defectuoso en cerca de la mitad de todos los tumores, sin importar de que tipo sean o su origen (2).

La p53 puede activarse por dos factores:

- Por una agreción al ADN
- Por factores pro – oncogénicos

Esta p53 se encarga en sí de detener la proliferación o activar la apoptosis, en su forma negativa evita que la célula llegue a la Fase S bloqueando la fase de transición G1 – S del ciclo celular (78).

Esta proteína se ubica en el citoplasma y ya en su forma natural controla el ciclo celular durante la transcripción o la replicación del DNA, por eso es conocido como el gurdián del Genoma(79).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Todo daño al ADN y el estrés oncogénico están vinculados al cáncer (80). Por eso, la ausencia de la función de p53 es un defecto usual en el 50% del cáncer sobre todo de los más frecuentes. La p53 en sí nos protege del cáncer a lo largo de toda nuestra vida.

Por otro lado el Gen p53 está también relacionado con el envejecimiento (77), ya que si aumenta los niveles de p53 excesivamente puede acelerarlo por la apoptosis producida (79).

1.6.1. Función de p53

La proteína p53 toma un rol integral dentro de la célula y se encuentra normalmente en todos los tipos de célula. La proteína está localizada en el núcleo donde funciona como factor de transcripción. La proteína p53 se encuentra en el centro de una larga red de proteínas que "perciben" la salud de la célula y del ADN celular. La proteína p53 es la conductora de un sistema bien coordinado que detecta y controla cualquier daño celular. Cuando se percibe algún daño, la actividad de la proteína p53 asiste a la decisión entre reparación y la iniciación de la muerte celular (apoptosis) (81).

Como factor de transcripción, la p53 estimula la transcripción de un grupo de genes blanco. Entre ellos, el más importante es el *p*53. El producto del gen *p21* es un regulador negativo de quinasas dependientes de ciclina, enzimas críticas para el avance del ciclo celular y la división de la célula (82).

1.6.2. Relación de la p53 en el ciclo celular.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Las etapas son: G_1-S-G_2 y M. El estado G_1 quiere decir «GAP 1» (Intervalo 1). El estado S representa la «síntesis», en el que ocurre la replicación del ADN. El estado G_2 representa «GAP 2» (Intervalo 2). El estado M representa «la fase M», y agrupa a la mitosis o meiosis (reparto de material genético nuclear) y la citocinesis (división del citoplasma). Las células que se encuentran en el ciclo celular se denominan proliferante y las que se encuentran en fase G_0 se llaman células quiescentes como toda célula deriva de otra ya existente al dividirse y originar dos células (83).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La p53 no es detectable en células normales por su corta vida media de 20 min, mientras la p53 mutada tiene una vida media de aproximadamente 24 h (84) La localización celular de la proteína p53 varía durante el ciclo celular: durante la fase G1 se encuentra en el citoplasma, luego entra en el núcleo en la transición G1/S allí permanece hasta el final de la fase G2/M(9) Como norma, en células transformadas o tumorales, la proteína p53 es estrictamente nuclear, pero se han observado algunas excepciones, este ciclo celular podemos observarlo en la Fig. 8.

Kastan et al (1991) demostraron que la pérdida de la actividad supresora tumoral de la p53 se asocia con una incapacidad para detener la transición desde G1 a S en el ciclo celular en las células que han acumulado daño del ADN (85).

Cuando hay daño del ADN la célula da tiempo para inducir una respuesta de reparación de la lesión, pero cuando la expresión de una p53 está mutada no presentan este fenómeno, estas células no dejan de dividirse después del daño del ADN (86,87).

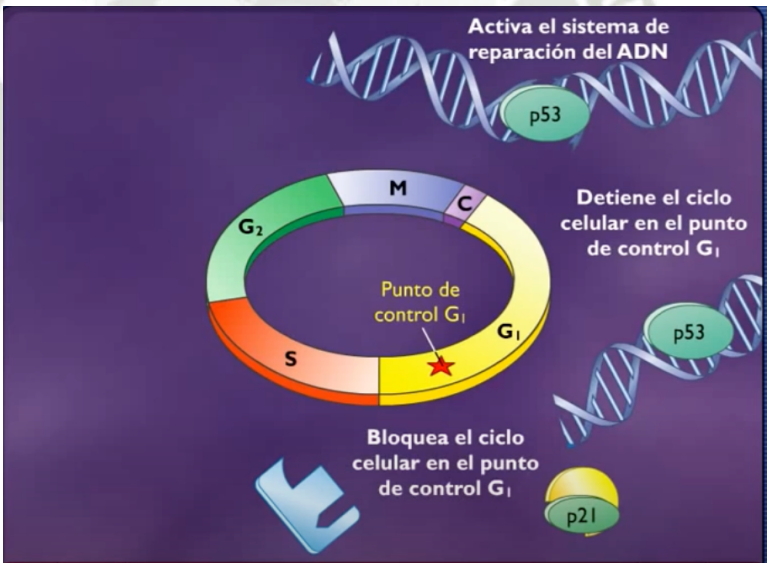


Figura 8. P53 en el ciclo celular (88).

la p53 natural y la p53 mutada, se descubrió un gen que es específicamente inducido por la p53 natural: el gen WAF 1, el cual codifica la proteína p21. La sobreexpresión de la proteína p21 en varios tipos celulares induce detención del crecimiento en la fase G1 que es dependiente de la p53 natural. Esta proteína p21 también ha sido identificada por diferentes grupos como siendo capaz de asociarse específicamente con la cinasa cíclin-dependiente (cdk2) e inhibir la actividad cinasa de los complejos cdk2-ciclina. La inducción de lesiones del ADN en células

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

con p53 natural causa sobreexpresión de WAF1 > ARN > proteína; pero esto no se observa en presencia de p53 mutada (89).

1.6.3. Evaluación de la Expresión De P53

1.6.3.1.RT-PCR

Esta técnica aisla el RNA total de las células del cultivo celular, luego es convertido en cDNA usando la tecnica de la transcriptasa reversa (90). El cDNA se utiliza como moldes para amplificar el transcripto de p53 usando primers específicos. El producto de la PCR y su tamaño del amplicon es evaluado en electroforesis mediante geles de agarosa (91).

Este método ayuda hacer muchas copias de una secuencia genética específica con el fin de analizarla (91). Se usa una enzima llamada retrotranscriptasa que convierte un trozo específico de ARN en un trozo de ADN compatible (92). Luego otra llamada ADN-polimerasa amplia ese trozo de ADN. Las copias ayudan a identificar si hay un gen que produce la molécula específica de ARNm. Ayuda a diagnosticar ciertas enfermedades como el cáncer (93).

1.6.3.2.Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia son un conjunto de técnicas donde usamos anticuerpos para detectar y localizar, antígenos específicos en células y/o tejidos. El procedimiento tiene los siguientes pasos:

- **Fijación:** Preserva la localización, su composición y estructura del material biológico, conservando su fidelidad en lo posible a la situación que existe en vivo. Para fijar una muestra podemos utilizar las diferentes materiales biológicos como:
    - **Glutaraldehído:** Donde su modo de acción es entre grupos aminos de las proteínas, mayormente es utilizado en microscopía electrónica y provee la mayor preservación de estructura fina.
    - **Paraformaldehído:** su modo de acción es por puentes entre grupos aminos de las proteínas. Es empleado para estudios de fluorescencia e inmunocitoquímicos y penetra más rápidamente en la célula.
    - **Metanol o Acetona,** su modo de acción es precipitación de proteínas y carbohidratos aplicable en variedad de estudios, si bien es cierto su

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

fijación es más rápida, pero puede provocar contracción en la muestra (94).

- **Permeabilización:** Existen diversos métodos de permeabilización, algunos suaves y otros fuertes. Producen poros en las membranas celulares, permitiendo así el ingreso de los anticuerpos a la célula si queremos detectar estructuras internas dentro de la célula.
- **Bloqueo:** Impide interacciones inespecíficas de los anticuerpos con el material biológico reduciendo así la marcación inespecífica. El anticuerpo primario debe competir con la proteína bloqueante para unirse a su epitope para detectar la estructura de nuestro interes.
- **Inmunodetección:** Se encargan de reconocer y unirse con alta afinidad a otras moléculas que son los antígenos. Cada antígeno tiene al menos un epitope o región reconocida por un anticuerpo (95).

1.6.3.2.1. Tipos de inmunofluorescencia

1.6.3.2.1.1. Inmunofluorescencia directa:

También conocida como primaria, se utiliza para diagnosticar enfermedades de tipo autoinmunitario, excelentes para y de gran uso para enfermedades de piel y mucosas. Aquí el fluorocromo se une directamente con el anticuerpo primario. Esta se realiza en un paso básico de reacción (96,97).

1.6.3.2.1.2. Inmunofluorescencia Indirecta:

Conocida también como secundaria. Es una técnica de doble capa, es más compleja que la anterior, requiere más pasos y es propensa a que sufra interferencias. Los anticuerpos específicos no marcados se unen al antígeno, y en la segunda etapa se agrega el anticuerpo marcado como fluorocromo (94). A diferencia de la directa, el fluorocromo se une con un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario, teniendo así una mayor sensibilidad a la inmunofluorescencia directa.

Primera etapa: Se fijan sobre un portaobjeto los antígenos que constituyen el sustrato conocido específico, sobre el que se coloca el suero, del cual se sospecha la presencia de anticuerpos específicos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Segunda etapa:** Se agrega la antiinmunoglobulina humana marcada, que reaccionará con el anticuerpo del complejo producido en la primera etapa (98).

1.6.3.3. Evaluación de mutaciones de p53

Actualmente el estudio de las mutaciones se hace a traves de la secuenciación por el método de sanger y comparado con la secuencia de una base de datos, usando el software Blast (99).

Otro método es comparar la secuencia de un determinado gen con el genoma mediante el software IGV.

1.7. Métodos para la determinación de la viabilidad celular.

1.7.1. Evaluación de la integridad de la membrana celular

1.7.1.1. Métodos de sustancias colorantes o fluorescentes:

El azul de Tripan es un colorante vital derivado de la toluidina que deja las células no viables con un color azul, al ser observadas bajo microscopio o una camara Neubauer. Mientras que las células aparecen sin teñir, blancas o un halo azul. Por otro lado, las células viables, sus membranas son intactas, no permiten el acceso de tinciones en la célula, no absorbiendo el azul de Tripan (100).

Se realiza una mezcla con suspensión de células que sea equivalente 1:1 a la solución de azul de Tripan 0.4 % se deja reposar de 2-5 minutos, se toma 10-15 microlitos (µl) de la solución y se lleva al hemocitómetro previa limpieza de este instrumento con etanol al 70%, luego se deja reposar de 1-2 minutos para llevarlo al microscopio invertido. El hemocitómetro, también denominado cámara Neubbauer está delineado por líneas de cuadrícula que identifican las zonas de la cámara, con cuatro zonas que están divididas por 16 cuadrados pequeños. Se realiza el recuento del número de células viables y no viables, en cada uno de los 4 cuadrantes.

Es el ensayo más utilizado, para determinar la viabilidad celular, por ser un ensayo sencillo, económico y efectivo. Este distingue entre células apoptóticas y células necróticas, un requerimiento indispensable para saber si el porcentaje de viabilidad encontrado es óptimo o real para ser usado en futuras construcciones de tejidos y órganos. Solo distingue células no viables cuando la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

membrana celular es irreparable, pero no determina el estado vital de las células viables, por ende, no garantiza una buena taza de supervivencia (101).

1.7.1.2.Métodos basados en la liberación de sustancias al medio extracelular:

El Lactato deshidrogenasa es una enzima citoplasmática que se encuentra en la mayoría de los organismos vivos que cataliza las intercomversiones concomitantes de piruvato a ácido láctico durante la glicólisis, y las reacciones inversas durante el ciclo de Krebs (102). En respuesta al daño celular, inducida por mecanismos celulares endógenos o como resultado de mecanismos de forma exógena (40,103). Esta enzima se libera desde el citoplasma al medio extracelular. Su actividad se determina mediante la utilización de una reacción enzimática acoplada donde la enzima oxida a lactato piruvato, que reacciona con cloruro de yodonitrotetrazolio para formar formazan. La suposición subyacente para este ensayo es que cualquier aumento en la cantidad de formazan producidos en el sobrenadante del cultivo se correlaciona directamente con la viabilidad celular (102).

La cuantificación de la enzima es un ensayo que proporciona una visión rápida, y reproducible de toxicidad en los fármacos, en los compuestos experimentales. Su estabilidad en medios de cultivo celular determina la presencia de daño y la toxicidad en tejidos y células de manera segura (101).

1.7.2. Ensayos funcionales

1.7.2.1.Cuantificación de los niveles de adenosintrifosfato:

Este ensayo es muy utilizado en citotoxicidad y recuento de la proliferación celular por ser rápido, fácil de efectuar y de resultados consistentes (104). Sin embargo, los nuevos estudios han demostrado poco fiable este ensayo por tener muchas interferencias que afecten los resultados (105).

El ensayo está basado en tetrazolio, siendo la conversión enzimática del colorante a cristales (106). De formazán insolubles en agua, principalmente por deshidrogenasas succinicas mitocondriales que se produce en numerosos organelos incluyendo la mitocondria y el retículo endoplasmático de las células (107). También pueden estar implicadas enzimas citosólicas como la nicotimida adenina dinucleótido reductasa y flavina oxidasa. La tasa de la conversión de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

formazán se ha demostrado estar en relación directa con el número de células vivas.

Para la elaboración, las células se colocan en placas de 96 pocillos estériles en un medio estándar. Para la reproductibilidad, la incubación se realiza a 37º C con 5% de CO_2 después de 24 h o 48 h; se agrega 20 microlitros de una solución MTT, 5 mg/mL a cada pocillo y la placa se incuba a 4 horas adicionales, el medio aspira o elimina y los pocillos se lavan con PBS, el colorante convertido se solubiliza con etanol al 100%. La absorbancia del colorante convertido se mide a una longitud de onda de 570 nanómetros con sustracción de fondo a 630-690nm (108).

1.7.2.2.Síntesis del nuevo ADN:

Se utiliza la timidina en el medio de cultivo para que se introduzca en el ADN durante la replicación de este (109). Siendo cuantificada por la obtención de radioactividad.

Su procedimiento se adiciona metil timidina marcado con ^{3}H en PBS 18h antes de la cosecha de las células, se cuenta la incorporación de la timidina ^{3}H después de la adición del líquido de centelleo a cada muestra. Los especímenes se examinan en un contador de centelleo. Es confiable, pero se necesitan varios procedimientos, llevando al investigador más horas de trabajo, por ende, este método ha sido sustituido por el ensayo MTT (110).

1.7.2.3.Detección de proteínas:

La actividad de la proteasa se encuentra predominnantemente en células viables intactas y se miden usando marcadores de un sustrato péptido permeable de células fluorogénicas. El sustrato impregna las células intactas donde se divide para generar una señal fluorescente proporcional al número de células vivas. Tras la muerte celular, la proteasa que cercena el sustrato GF-AFC se vuelve intacta. La segunda proteasa activada se libera en el medio de las células muertas que han perdido integridad de membrana, esta se mide usando un sustrato peptido fluorogénico no permeable. Debido a que el sustrato no puede entrar en las células viables (101).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1.8.Secuenciamiento del transcriptoma - Illumina.

La tecnología de secuenciación de Illumina es una tecnología de secuenciación más usada, fue desarrollado originalmente por Shankar Balasubramanian y David Klenerman en la Universidad de Cambrige. Luego se fundó la compañía de Solexa en 1998 para luego ser comprada por Illumina (111,112).

1.8.1. Transcriptoma.

Es la colección completa de secuencias de ARN en una célula, cada ARN es el reflejo de la secuencia del ADN de la que fue transcrito. Es posible contar con el número de transcriptos para determinar la cantidad de actividad génica en un tipo específico de células o tejidos (113).

1.8.2. Secuenciación de Illumina

1.8.2.1.Preparación de la biblioteca.

- Se inicia preparando la biblioteca de secuenciación, etiqueta del ADN en segmentos de 200 a 600 de bases. Luego, la ligadura del adaptador en los extremos 3´y 5´ de los segmentos cortos de ADN.
- El sitio de unión del cebador de secuenciación, el índice y una región, se agregan al adaptador en ambos lados mediante amplificación de ciclo reducido. Véase en la Fig. 9.

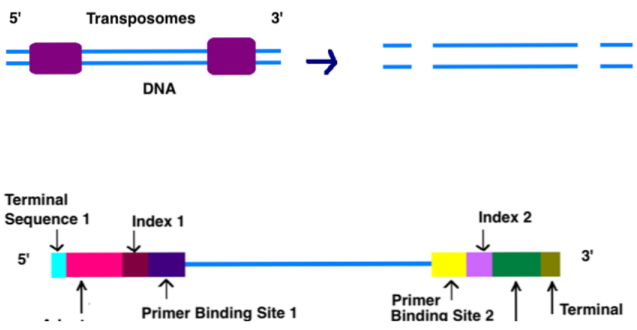


Figura 9. Etiquetado y adición de motivos (111).

1.8.2.2.Generación de cluster.

- La biblioteca de secuenciación preparada se desnaturaliza y se carga en una celda de flujo, para generar el cluster.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Cada fragmento en la biblioteca de secuenciación se amplía isométricamente (114).
- La celda de flujo está conformada por carriles de vidrio.
- Cada carril se encuentra recubierto por dos tipos de oligonucleótidos.
- Un tipo es complementario de la región 5´mientras que el otro es complementario de la región 3´de la biblioteca.
- Estos oligonucleótidos se unen a las regiones correspondientes de ADN de la biblioteca de secuenciación (111).
- El oligo que se une a la región 5´de la biblioteca de secuenciación se encuentra de color rosa, mientras que el oligo que se une a la región 3´es de color verde. Véase en la Fig. 10.

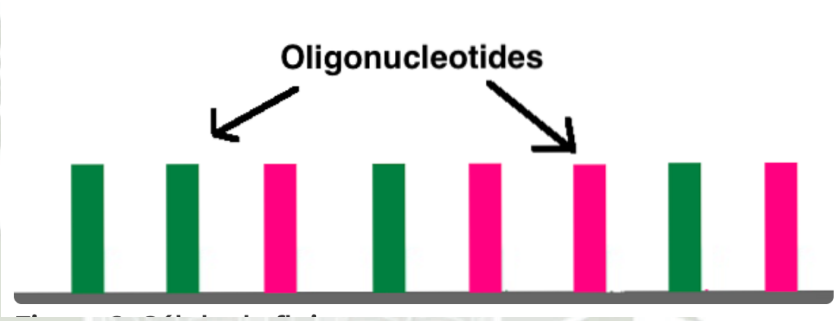


Figura 10 Célda de flujo (111).

- Cuando la biblioteca de secuenciación se une con el oligo, la cadena complementaria se genera. Luego, el ADN de doble cadena se desnaturaliza y cadena original se elimina (115).
- La amplificación clonal del fragmento se logra a través de ampliación de puente. La hebra se pliega sobre el segundo tipo de oligo en la celda de flujo. La desnaturalización del puente da como resultado dos cadenas de ADN.
- La amplificación del puente se repite una y otra vez para obtener millones de agrupaciones, todos los tipos de fragmentos en la biblioteca (116). Véase en la Fig. 11.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

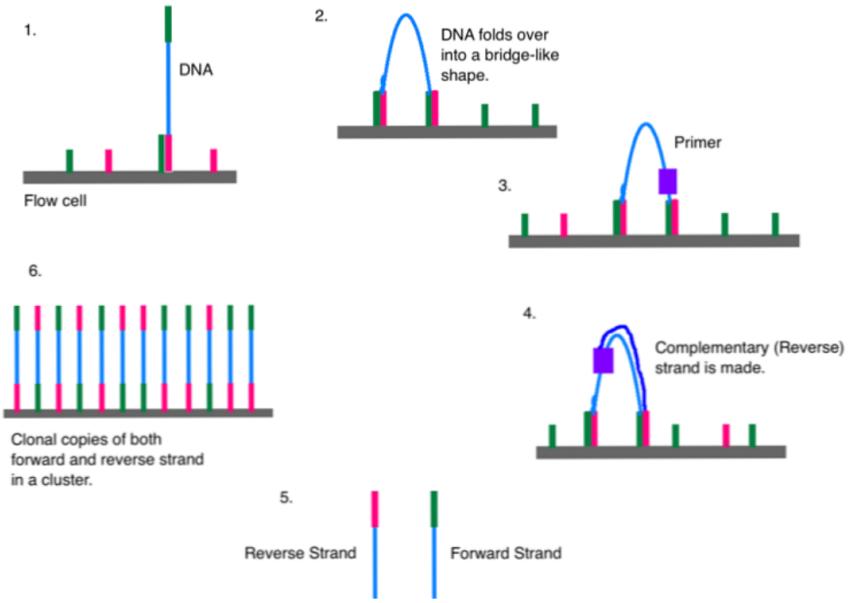


Figura 11. Amplificación clonal (111).

- Debe lavarse las hebras inversas y quedarse solo con las hebras delanteras en la celda de flujo. El extremo 3´está libre y está bloqueado para evitar un cebado no deseado (111).

1.8.2.3. Secuenciación

1.8.2.3.1. Primera Lectura

- Se da la extensión del primer cebador de secuenciación.
- Este método utiliza dNTP modificados en la posición 3´ (117).
- Después de la adición de cada nucleótido, se observan los grupos en la celda de flujo para la emición de fluorescencia.
- Índice 1: El cebador del indice 1 se hibrida a grupos para generar una segunda lectura por secuenciación por sintesis.
- Índice 2: El extremo 3´del grupo se desprotege, lo que permite la hibridación del extremo 3´, con el segundo tipo de oligo en la celda de flujo (118).

1.8.2.3.2. Segunda Lectura.

- Se obtiene por secuenciación por síntesis mediante la hibridación y extensión del segundo cebador de secuenciación (111).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.8.2.3.Análisis de datos.

- Las lecturas se agrupan en función de sus secuencias de índice.
- Las secuencias con lecturas similares se agrupan
- Las lecturas hacia adelante y hacia atrás se emparejan para formar secuencias contiguas.
- Las alineaciones ambiguas se pueden resolver por secuencias pareadas.
- Las secuencias contiguas se alinean con el genoma de referencia para la identificación de la variante (119).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2. Metodología.

2.1. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación

2.1.1. Ubicación Espacial.

El presente estudio se realizó en el laboratorio de investigación de la Escuela de Postgrado de la Universidad Católica de Santa María, pabellón F-403.

2.1.2. Ubicación Temporal

Enero 2021 – Agosto 2022

2.1.3. Unidades de Estudio

La recolección de muestras de cultivos primarios de células del quiste radicular inflamatorio en medio DMEM completo, al 10 % de SBF agregado el antibiótico meropenem.

2.1.4. Materiales, equipos y reactivos:

2.1.4.1. Materiales

- ✓ Pipetas desechables de 5 y 10 mL
- ✓ Frascos de cultivo celular de 15 y 75 mL
- ✓ Placa de cultivo de 6 pozos
- ✓ Tubos Falcon de 15 y 50 mL
- ✓ Tubos Eppendorf
- ✓ Pipeta automática de 0.5 µL a 10 µL, 20 µL a 200 µL, 100 µL a 1000 µL
- ✓ Placas de 96 pozos para qPCR
- ✓ Tips estériles para micropipetas de 1000, 200 y 20 µL
- ✓ Placa petri
- ✓ Vaso precipitado
- ✓ Tijera quirúrgica.
- ✓ Cámara Neubauer
- ✓ Mango de bisturí
- ✓ Hoja 11 para bisturí

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.1.4.2. Equipos

- ✓ Incubadora de CO_2
- ✓ Cabina de Seguridad para PCR
- ✓ Cámara de Bioseguridad
- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Centrífuga para tubos Falcon de 15mL
- ✓ Centrífuga refrigerada
- ✓ Termociclador para PCR en tiempo real
- ✓ Equipo para Electroforesis
- ✓ Vortex marca IKA
- ✓ Microscopio Invertido
- ✓ Congelador - 20 ºC, - 80 ºC
- ✓ Software IGV

2.1.4.3. Reactivos

- ✓ SBF - Gibco™ suero fetal de bovino
- ✓ Medio DMEM - Gibco™
- ✓ PBS (buffer fosfato salino) - Merck
- ✓ Meropenen 10µL
- ✓ Etanol 96° y 70°
- ✓ Agarosa - Tracklt™
- ✓ Buffer tris-acetato-EDTA 50x (TAE)
- ✓ Buffer Loading
- ✓ Tripsina - Gibco™
- ✓ Anfotericina B - Merck
- ✓ Péptido beta-amiloide
- ✓ Trizol – TRI Reagent – Merck - 100mL
- ✓ F12 suplemento
- ✓ Penicilina
- ✓ Estreptomicina
- ✓ Anticuerpos contra p53 (anti p53 rabbit)
- ✓ Anticuerpos unidos a fluoresceína.
- ✓ Tinción de Hoechst

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- ✓ Cloroformo
- ✓ Colagenasa tipo I - SIGMA
- ✓ Azul de tripán

2.2. Muestra y selección de la muestra.

Para realizar el experimento se seleccionaron 8 muestras de pacientes con diagnóstico radiológico e histopatológico de quiste radicular inflamatorio. Las extraccines de la piezas dentarias se llevarón a cabo en la Clínica de la Universidad Católica de Santa María y en la consulta privada. Previamente, se informó al paciente sobre el procedimiento y la aceptación del consentimiento informado tanto de la cirugía como de la investigación a realizar, aprobado por el comité de Bioética de la UCSM.

2.3. Cultivo celular

El aislamiento de las células del quiste radicular inflamatorio estaba dividido en 2. La primera, se colocó en la placa de cultivo y el segundo en un Eppendorf. En la placa se agregó 15mL de medio nutritivo compuesto por medio DMEM de Gibco™ completado con suero fetal al 10% mas Meropenem 10µl, Luego se introdujo a la incubadora a 37°C en atmósfera húmeda a un 95% de aire y un 5% de CO2.

En el cuarto día se cambió el medio de cultivo y se eliminó los restos de celulares no adherentes lavándose 3 veces con solución buffer de fosfato PBS frio 10mL. Las células se mantuvieron hasta alcanzar la proliferación celular y conformación de colonias a partir del sexto día, con cambios periódicos del medio en días variados (19).

2.4. Aislamiento enzimático de células.

Se colocó el tejido en una mezcla de solución enzimática de 2mg/mL de colagenasa tipo I (SIGMA) por 60 minutos a 37ºC. La suspensión obtenida se filtró a traves de un filtro de células de 70µm. Posteriormente, la suspensión celular resultante se centrifugó durante 6 minutos a 500g, el taco celular obtenido, se resuspendió en el medio nutritivo para células mesenquimales, compuesto por: medio DMEM y F12 suplemento con 15% de SFB (GIBCO) 100 mL ácido ascórbico 2-fosfato (Merck), 2 mM L-glutamina (Glutamax; GIBCO) 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina y 2 µg/mL de anfotericina B (GIBCO) Sembrar en las placas de plástico (120).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.5. Aislamiento mecánico de células.

Previamente, con la ayuda de la campana de flujo laminar se lavó tres veces cada muestra con solución buffer de fosfato PBS 10% congelado. Luego se llevó la muestra a una placa petri para realizar los cortes y la limpieza del tejido. Se eliminó las caras circundantes y se buscó el centro interno de la muestra con ayuda del bisturí de hoja once. Luego, se lavó tres veces la muestra con PBS al 10% para colocarlo en un tubo de Eppendorf de 18mL. Por último se trozó la muestra dentro del tubo, hasta conseguir las partículas más pequeñas del tejido.

2.6. Viabilidad celular

2.6.1. Cámara Neubauer

Para la viabilidad celular, se realizó mediante la cámara de Neubauer se puede observar en la Fig. 12:

- Se colocó el cubreobjetos sobre la cámara de conteo. Para ello se humedeció con agua los puentes para luego situar suavemente el cubreobjetos.
- Se cargó 20ul de la suspensión celular con azul de Tripan en la pipeta.
- Para llenar la cámara se depositó unos 20ul en la ranura y se deja que la suspensión celular se distribuya por capilaridad en forma homogénea.

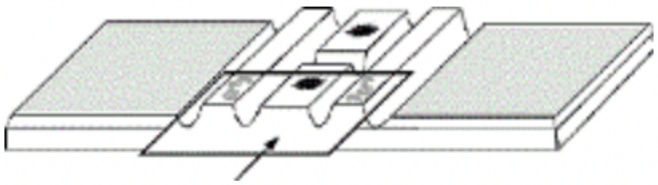


Figura 12. Cámara de Neubauer – llenado (121)

Con la ayuda del microscopio, se enfocan las líneas de la cuadrícula de la cámara de Neubauer con el objetivo 10X. Se realizó el conteo únicamente de las células que se encontraban dentro del recuadro o a la derecha de la última línea límite. Moviendo la cámara de Neubauer se cuenta al siguiente conjunto de 16 cuadrados hasta que los 4 conjuntos de cada esquina sean contados véase en el gráfico de la Fig.13.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

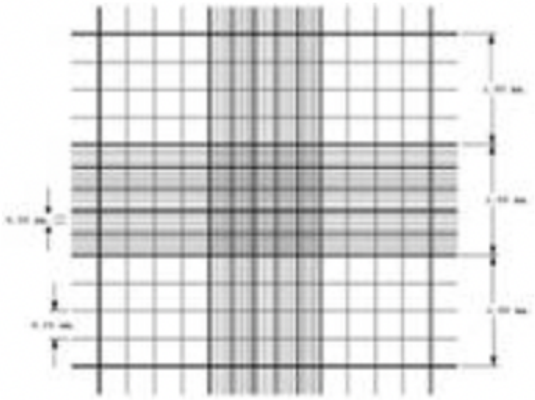


Figura 13. Retícula de recuento (121).

2.6.2. Cámara Neubauer para el recuento celular:

Se realizó un recuento celular total de células viables y no viables, un ejemplo podemos observarlo en la Fig. 14, teniendo las siguientes reglas para su recuento:

- De las tres líneas que se observa en los cuadrados periféricos, la central es la que delimita su superficie
- Se contaron todas las células dentro de una zona de medición definida

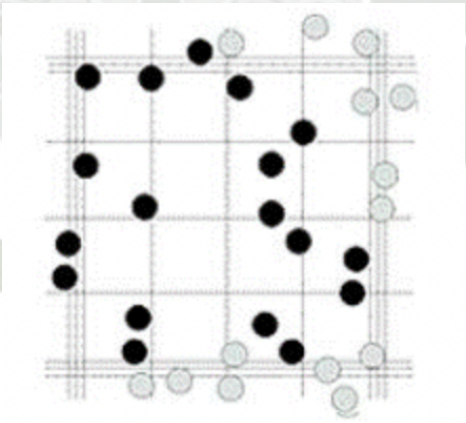


Figura 14. Cámara Neubauer para el recuento celular (121).

Luego, se realizó el cálculo de células viables por mL. se tomó el promedio de células contadas de cada uno de los conjuntos de 16 cuadrados y se multiplica por 160000 para determinar el número de células vivas y muertas por mL y sacar sus porcentajes. Luego, para hallar la viabilidad celular por los 4 cuadrantes de los extremos se sumaron todos los porcentajes obtenidos, se dividió entre 4 para ser multiplicado por 160000. Por último, se multiplicó por 5 para corregir la adición del azul de Tripán.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.7. Caracterización de las células.

La caracterización morfológica y el comportamiento in vitro de las células mesénquimas del quiste radicular inflamatorio, se realizó con observaciones al microscopio invertido de contraste y se tomaron los registros fotográficos correspondientes.

2.8. Estudio de la expresión de la proteína p53 por inmunofluorescencia.

Se utilizó el anticuerpo de p53 hecho en conejo, para formar el complejo antígeno anticuerpo, (p53-anti p53) y como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo contra la fracción constante Fc de anticuerpos de conejo conjugado con fluoresceína (color verde) y la fluorescencia será observada en microscopio de fluorescencia marca ZOE (biorad), se sigue el siguiente protocolo (122).

- En una cámara húmeda se coloca la laminilla que contiene las células adheridas y fijadas con paraformaldehído al 4% por 5 minutos y reemplazamos el fijador con PBS.
- A continuación, retiramos la laminilla con PBS de los cultivos. Colocamos 3 gotas de cloruro de amonio mientras preparamos la solución de bloqueo (630 PBS-70BSA-3.5 tritón 20%). Sacamos el cloruro de amonio y realizamos un lavado continuo con PBS. Colocamos la solución de bloqueo hasta que cubra la lámina por 30 min la cantidad de 70µl. Colocar un rectángulo de parafilm en la cámara húmeda, sacamos las láminas cubraobjetos y lo colocamos encima del parafil. Seguidamente, colocamos la solución de bloqueo (123).
- Antes de iniciar el procedimiento, realizamos la preparación del primer anticuerpo con 400 µl bloqueo y 3µl de anti p53 rabbit. Colocarlo encima de la lámina cubreobjetos y esperamos una hora. Succionamos y lavamos con PBS cubriendo las laminillas por 3 minutos, se repite 3 veces.
- Realizamos la preparación con el segundo anticuerpo anti rabbit green (1µl y 100µl de solución de bloqueo sin tritón más 1µl de Hoeschst) se coloca sobre la laminilla 100µl de esta preparación y se deja incubar por 30min. Lavamos las laminillas por 3 veces. Por último colocamos 5 µl del medio de montaje para cubrir la muestra, sobre ella la lámina cubre objetos y sellamos con ayuda de acetona para luego visualizarlo en el microscopio.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.9. Secuenciación masiva de última generación (Rna – Seq)



Figura 15. Software IGV, secuenciación masiva de última generación (124).

Evaluación de Mutaciones: Para evaluar las mutaciones de las secuencias de p53, se aisló el RNA total de la biopsia y se envió para su secuenciación por RNA-seq (125). Una vez obtenida la base de datos del secuenciamiento y pasadas las pruebas de control de calidad respectivas, se guardaron los datos obtenidos en formato BAM (formato binario para el almacenamiento de datos de secuenciación). La extensión de archivo (BAM) contiene información sobre lecturas de secuencias después de haber sido estas alineadas contra un genoma de referencia. Para proceder a la visualización de las alineaciones encontradas se utilizó el software IGV (integrative genomics viewer) véase en la Fig. 15, comparando contra la base genómica GRCh38.p13 (versión 13 del consorcio 38 del genoma de referencia humano), para poder detectar mutaciones en el gen p53 (126).

2.10. Métodos de determinación de la expresión génica

2.10.1. Rna – seq. usando la plataforma de Illumina.

El Panel de expresión genética humana de transcriptona es un ensayo de resecuenciación selectiva para la cuantificación de la expresión genética (127). Los resultados son sensibles y precisos para los estudios de expresión genética, como en el caso de los tejidos fijados en formol y embebidos en parafina. Forma parte de un completo flujo de trabajo que incluye la preparación de bibliotecas basada en PCR, así como la tecnología de secuenciación de próxima generación y los análisis automatizados. Este flujo de trabajo optimizado, los investigadores

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

pueden centrar sus estudios en regiones codificantes de ARN, lo que disminuye la cantidad de entrada necesaria y permite resultados precisos y extremadamente sensibles (111,128).

2.10.1.1. Cobertura genética.

La cobertura integral de las secuencias codificantes del ARN. El panel de grupo y tubo únicos incluye más de 20 000 amplicones diseñados con respecto al genoma de referencia NCBI37/hg19, traduce en una cobertura superior al 95 % de los genes de Ref-Seq. Los investigadores ahorran tiempo y esfuerzo en la identificación de objetivos, el diseño de amplicones y la optimización del rendimiento (129).

2.10.1.2. Flujo de trabajo

Permite la creación simultánea de perfiles de expresiones genéticas de más de 20 000 genes humanos distintos en un solo grupo. Forma parte de una solución completa que ofrece un contenido optimizado, una preparación sencilla de bibliotecas, sistemas de secuenciación solo con pulsar un botón y análisis simplificado de los datos (113).

La preparación de bibliotecas comienza con la conversión de ARN total en ADNc, seguida de un sencillo protocolo basado en PCR que puede completarse en tan solo seis horas, con un tiempo de participación activa inferior a una hora y media. Las bibliotecas resultantes pueden normalizarse, agruparse y, posteriormente, cargarse en una celda de flujo para su secuenciación. Esta última se efectúa mediante los procesos químicos probados de SBS en un sistema de secuenciación de Illumina

Los datos resultantes pueden analizarse de forma local con Local Run Manager o transmitirse con facilidad a BaseSpace™ Sequence Hub. Local Run Manager y BaseSpace Sequence Hub pueden acceder al flujo de trabajo de análisis de amplicones de ARN para la creación de perfiles de expresiones genéticas(130).

2.10.1.3. Procedimiento.

- **Preparación de la muestra:** Para la construcción de la librería, el ARN es extraído de la muestra. Después de aplicar el control de calidad (quality

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

control, QC), las muestras que califican, proceden para la construcción de la librería.

- **Construcción de la librería:** La librería es construida a partir de la fragmentación aleatoria de la muestra del ADN complementario, seguida de la ligación 5' y 3'. Alternativamente, la "tagmentación" fusiona las reacciones de fragmentación y ligación en un solo paso, que incrementa enormemente la eficiencia del proceso de preparación de la librería. Posteriormente, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR y se **purifican en gel**. La electroforesis en gel, es el procedimiento de laboratorio estándar para separar el ADN por tamaño (p. ej., longitud en pares de bases) para su visualización y purificación. La electroforesis utiliza un campo eléctrico para mover el ADN con carga negativa a través de una matriz de gel de agarosa hacia un electrodo positivo. Los fragmentos de ADN más cortos migran a través del gel más rápidamente que los más largos. Por lo tanto, puede determinar la longitud aproximada de un fragmento de ADN ejecutándolo en un gel de agarosa junto con una escalera de ADN (una colección de fragmentos de ADN de longitudes conocidas), lo que permite la recuperación de ADN del gel que es directamente adecuado para PCR y el secuenciamiento.
- **Secuenciamiento:** Para la obtención de agrupamientos, la biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un campo de oligos unidos a la superficie y que son complementarios a los adaptadores de la librería. A continuación, cada fragmento se amplifica por grupos. Cuando se completa la generación del clúster, las plantillas están listas y preparadas para la secuenciación propiamente dicha en el equipo. El número de lecturas fue de 40 a 60 millones por muestra durante el secuenciamiento (126).
- **Datos sin procesar (*raw data*):** La data resultado del secuenciamiento previamente construida, es procesada por el software y se genera un archivo de tipo FastQ.

2.11. Secuenciación de nucleótidos.

Es una herramienta eficiente para identificar variantes en el código genético. Para ello se desarrollaron nuevas plataformas de secuenciación denominadas de alto

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

rendimiento o generación "Next-Generation Secuencing" – NGS este programa es capas de generar millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación (115,119,131).

2.11.1. Técnicas de secuenciación.

2.11.1.1. Frangmentación de ADN:

Se generan pequeños fragmentos de diversos tamaños se unen a los extremos llamados adaptadores formando las librerías (132).

2.11.1.2. Métodos de amplificación mediante PCR:

Se produce un anclaje del fragmento del ADN con sus adaptadores a una superficie sólida. Existen plataformas de segunda y tercera generación que no requieren la amplificación de los fragmentos de ADN, así permiten reducir el tiempo de trabajo y abaratando el proceso de secuenciación (133).

2.11.1.3. Secuenciación del material genético:

La secuenciación y bases ocurre simultáneamente en todas las moléculas de ADN (secuenciación masiva y paralela) (113,126).

2.11.1.4. Creación de archivos:

Guardan la información de la secuenciación y alineamiento de todas las lecturas del genoma. Luego, estas lecturas son guardadas en archivos fastq. Se necesita de dos potentes herramientas informáticas para proceder al alineamiento y posteriormente a una base de datos (113,119).

2.12. Criterios para el manejo de resultados

2.10.1. Plan de procesamiento de Datos.

Los datos recopilados serán almacenados en tablas de Excel y para el procesamiento se utilizará el software IGV (Integrative Genomics Viewer) para la identificación de mutaciones, en forma de tablas y figuras.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Resultados y discusión

3.1. Protocolo de aislamiento de células a partir quiste radicular inflamatorio

Como se ha mencionado en materiales y métodos se ha realizado diferentes pruebas a partir del quiste radicular inflamatorio debiendo mencionar que el mejor resultado fue el siguiente:

3.1.1. Aislamiento mecánico

En la técnica de aislamiento mecánico se realizó varios lavados, tres veces cada muestra, con PBS 10% congelado. Luego se llevó la muestra a una placa petri para realizar los cortes y la limpieza del tejido con una tijera quirúrgica. Se eliminó las caras circundantes y se buscó el centro interno de la muestra con ayuda del bisturí de hoja once. Luego, se lavó tres veces más la muestra con PBS al 10% para colocarlo en un tubo de Eppendorf de 18mL. Por último se trozó la muestra dentro del tubo, hasta conseguir las partículas más pequeñas del tejido Véase la comparación de tipos de aislamiento en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de los tipos de aislamiento.

	Aislamiento enzimático	Aislamiento enzimático II	Aislamiento mecánico
Enzima	Colagenasa tipo I (2mg/mL)	Colagenasa tipo I (0.5mg/mL)	
Tiempo de reacción	60 minutos	60min	
Incubación	37ºC	37ºC	
Instrumento			Tijera quirúrgica
Centrifugado	6 min	6min	

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.2.Cultivo celular

3.2.1. Medio de cultivo modificado

Las muestras aisladas se colocaron en la placa de cultivo, se agregó 15mL de medio nutritivo compuesto por medio DMEM completado con suero fetal al 10% mas Meropenem 10µl, Luego se introdujo a la incubadora a 37°C en atmósfera húmeda a un 95% de aire y un 5% de CO2 (134).

En el cuarto día se cambió el medio de cultivo y se eliminó los restos celulares no adherentes lavándose 3 veces con PBS frio 10mL. Las células se mantuvieron hasta alcanzar la proliferación celular y conformación de colonias a partir del sexto día, con cambios periódicos del medio en días variados véase la comparación de resultados de medios de cultivo en la tabla 3.

Tabla 3. Comparación de medios de cultivo.

CARACTERÍSTICAS	MEDIO DE CULTIVO ESTÁNDAR	MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO
Incubación	37ºC	37ºC
atmósfera	95% aire	95% aire
CO2	5% CO2	5% CO2
Medio de cultivo	DMEN(GIBCO™) 15mL	DMEN (GIBCO™) 15mL
Antibiótico	Anfotericina 2µL	Meropenem 10µL
Número de intentos	7 intentos	4 intentos.
Placas contaminadas	7 placas	Ninguna

3.3.Evaluación y caracterización de las células madre aisladas de quiste radicular inflamatorio.

3.3.1. Caracterización morfológica.

Estas células fueron evaluadas con el microscopio invertido en un aumento de 10X, observando que el día 1 en la Fig. 13a la presencia de células circulares redondeadas aisladas, con bordes irregulares de pequeño tamaño. Luego, en el día 4 en la Fig. 13b, se encontraron células alargadas y planas mononucleadas,

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

fibroblásticas y otras en división celular, así como algunas células mitóticas alrededor del tejido fusiforme y algunas células en apoptosis. Luego, el día 10 en la Fig. 13c, se cambió el medio de cultivo eliminando las células no adheridas con el lavado de PBS 10% observándose una placa limpia de células fibroblásticas adheridas. Para el día 17 en la Fig. 13d se observó el aumento de células alargadas y aplanadas por varios sectores de la placa de cultivo acompañados de otros restos celulares. Del día 20 al 25 en la Fig. 13e y 13f se observó la proliferación celular, inclusive capas celulares sobrepuestas, cubriendo casi un 90% de toda la placa de cultivo (135).

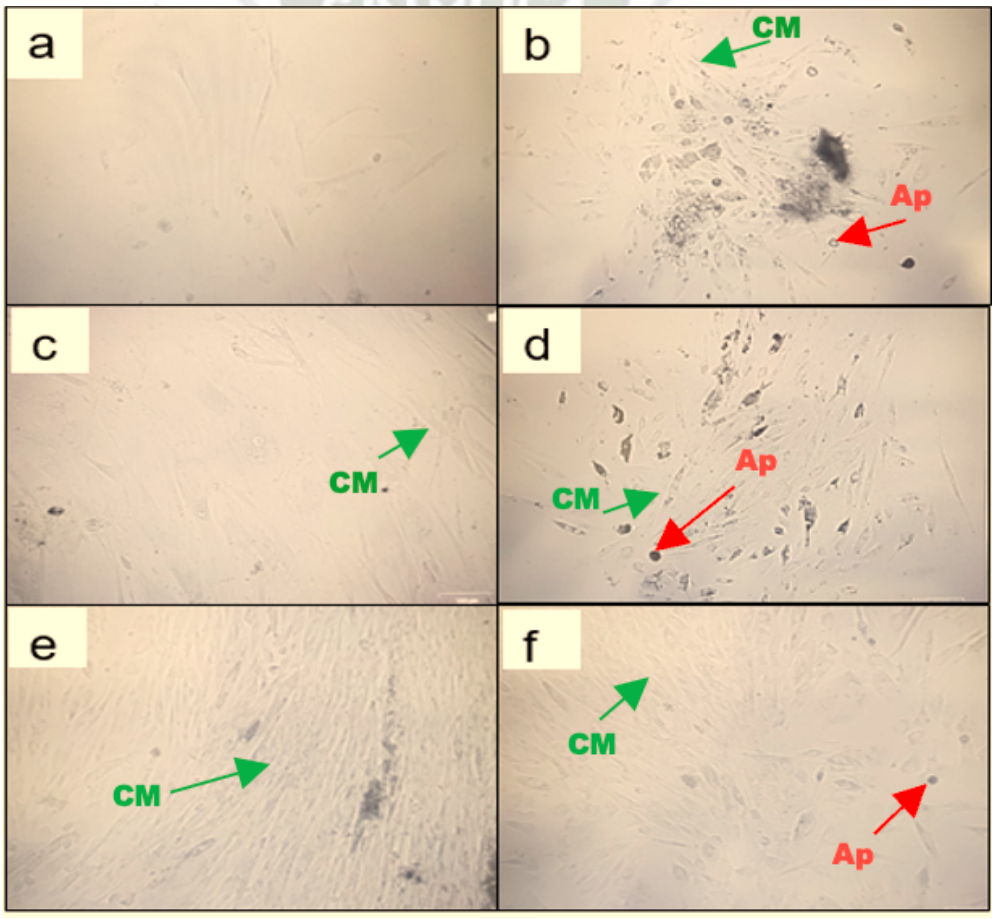


Figura 16. Cultivo y proliferación celular en placas de cultivo.

En la Fig 16. (a) Se observa la aparición de células alargadas y aplanadas en el día 4 (b) y (c) Crecimiento y proliferación celular 10mo y 14vo día (d) células alargadas y aplanadas por varios sectores de la placa de cultivo acompañados de otros restos celulares (e) y (f) crecimiento de células con cambios periódicos CM: Células madre fibroblásticas de quiste radicular inflamatorio. Ap: Célula apoptótica con forma redonda contraida.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

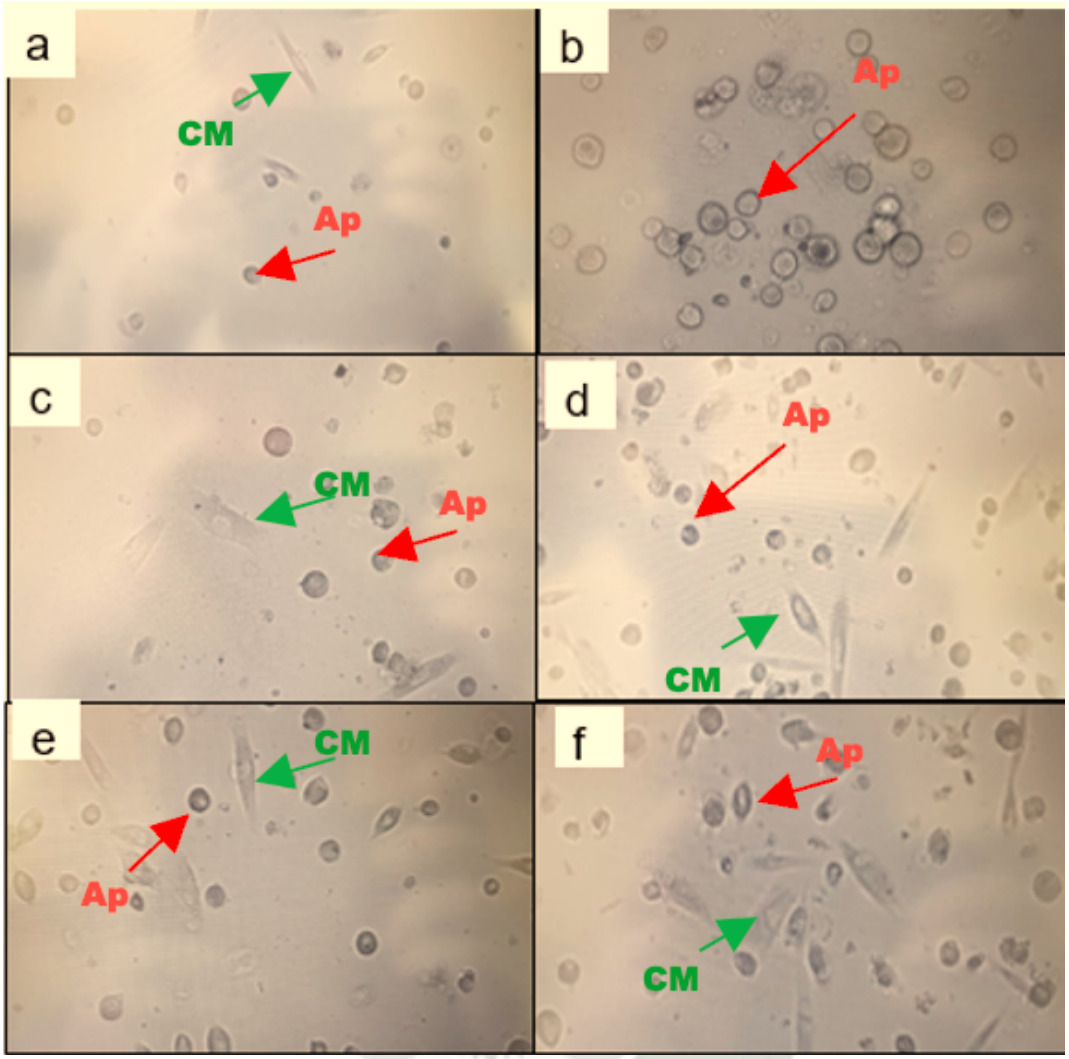


Figura 17. Cultivo y proliferación celular en los pozos de cultivo.

En la Fig. 17, se dividió en 6 segmentos cada uno conformado por cada pozo y medio DMEM se observa el crecimiento y proliferación de células alargadas y otras en apoptosis. Fig. 17(a) Pozo uno de cultivo celular, con gran número de células en apoptosis y presencia de cuatro células madre fibroblásticas. Fig. 17(b) Pozo dos, solo se encontró la presencia de células apoptóticas con membrana redonda. Fig. 17(c) Pozo tres, presencia de tres células fibroblasticas alargadas con varias células apoptóticas de tonalidad oscura. Fig 17(d) Pozo cuatro, presencia de varias células alargadas y aplanadas y células apoptóticas. Fig. 17(e) Pozo cinco, presencia de cinco células alargadas y aplanadas con células apoptóticas. Fig. 14(f) Pozo seis, presencia de doce células aplanadas y alargadas con células apoptóticas. CM: Células madre fibroblásticas Ap: Célula apoptótica forma

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

circular mas resaltada. Este crecimiento y prolideración fue diferente en los 6 pozos teniendo el poso de la Fig. 17(d),(e),(f) con el mayor número de células vivas.

3.3.2. Viabilidad celular

Con el fin de evaluar la viabilidad celular, 20µl de suspención celular fueron mezclados con un volumen igual de solución de azul de tripán como indica en la sección de metodología, las células fueron colocadas en la cámara Neubauer y con la ayuda del microscópio se hace recuento celular. Para ello se determinó el número de células vivas y muertas mediante la siguiente operación.

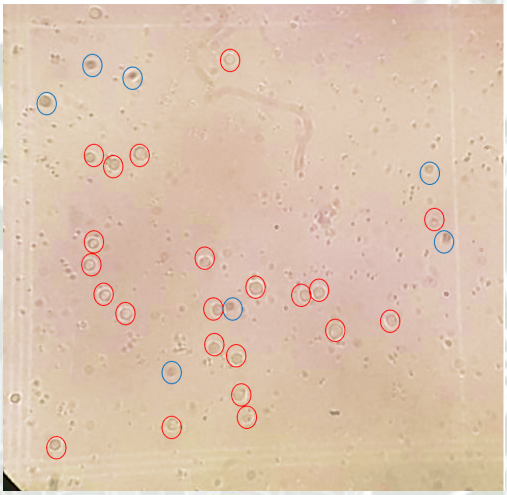


Figura 18. Viabilidad celular – recuento de células viables y no viables.

Recuento de células totales.

29/16 = 1.8

1.8X160000 = 290000/mL

Recuento de células muertas.

7/16 = 0.43

0.43X160000 = 70000/mL

Porcentaje de células muertas es de 24%

Porcentaje de células vivas es de 76%

Tenemos que el valor es de 80%

En la Fig. 18 en un recuento total de células se observa un total de 29 células, de las cuales 22 células se encuentran vivas y 7 células se encuentran muertas, teniendo un porcentaje de viabilidad de 80% en el cuadrante superior izquierdo, posteriormente se siguió el mismo procedimiento con los otros cuadrantes restantes.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

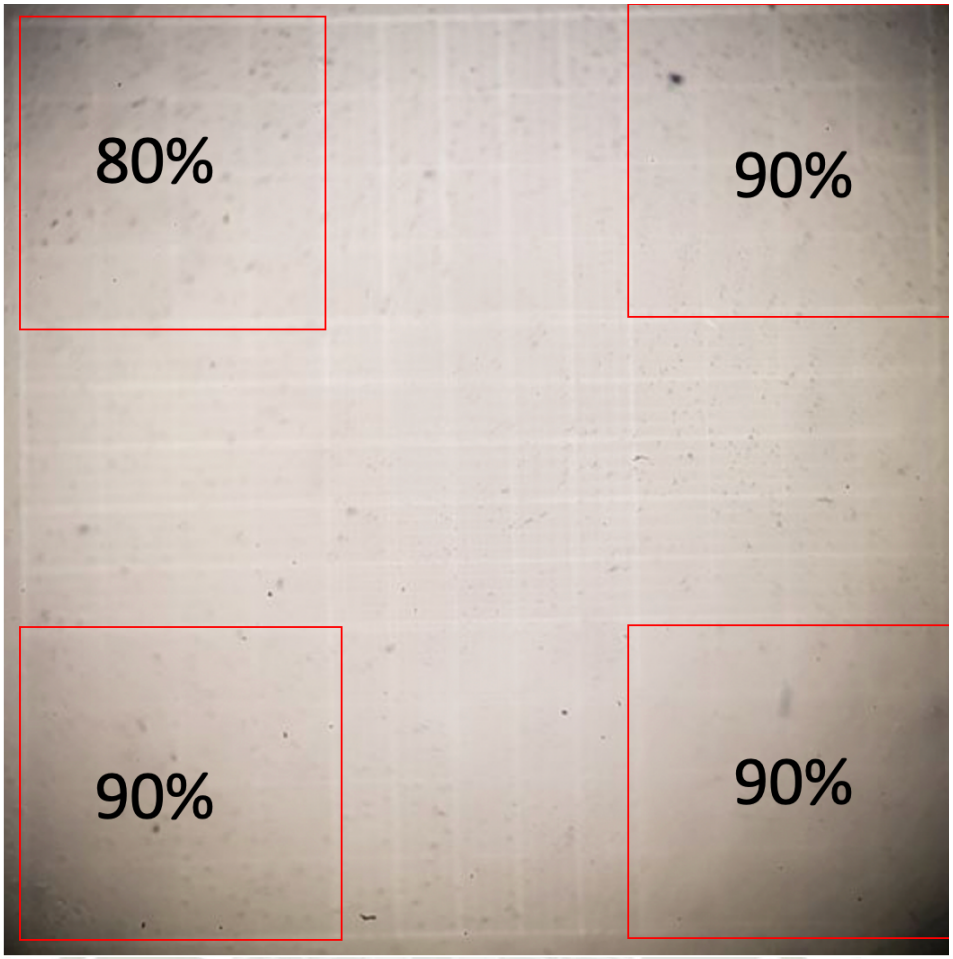


Figura 19. Viabilidad celular por cuadrantes.

En la Fig. 19, se observa la viabilidad celular por cada uno de los 16 cuadrantes fue de 80, 90, 90 y 90 en el cultivo, al ser evaluadas las muestras con la tinción de azul de tripán y su cuantificación posterior de la siguiente forma:

(80+90+90+90) / 4 = 87

(87 X 160,000) = 14000000

14000000 X 5 = 70000000 /mL células vivas

Se multiplicó por 5 para corregir la dilución de 1:5 realizada con la adición de azul de tripán.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

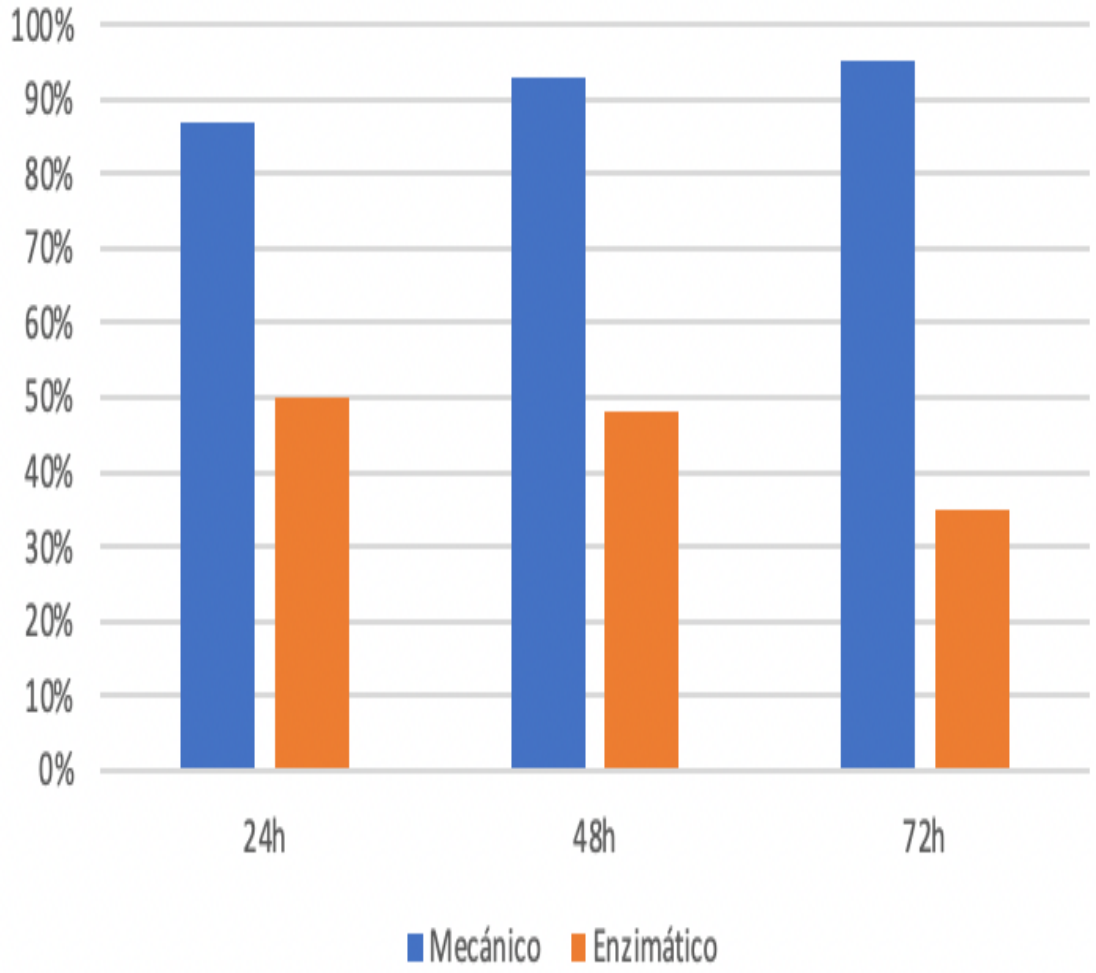


Figura 20. Comparación de las técnicas de aislamiento por medio de viabilidad celular con azul de tripán.

En la Fig. 20, se muestra los resultados de la comparación de dos diferentes técnicas de aislamiento de células. La técnica mecánica y la técnica enzimática, de los cuales se obtuvo los siguientes datos analizados en determinadas horas. A las 24 horas se obtuvo un 80% de efectividad en el aislamiento celular con el método mecánico, mientras que el enzimático solo nos brindó un 50% de efectividad en el aislamiento celular. A las 48 horas se encuentra al 93% su nivel de efectividad en el aislamiento celular con la técnica mecánica y en un 48% de efectividad en el aislamiento celular en el caso de la técnica enzimática. Por último, a las 72 horas encontramos una efectividad en el aislamiento celular a un 95% con la técnica mecánica, mientras que la técnica enzimática alcanzó un 35% de efectividad en el aislamiento celular.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

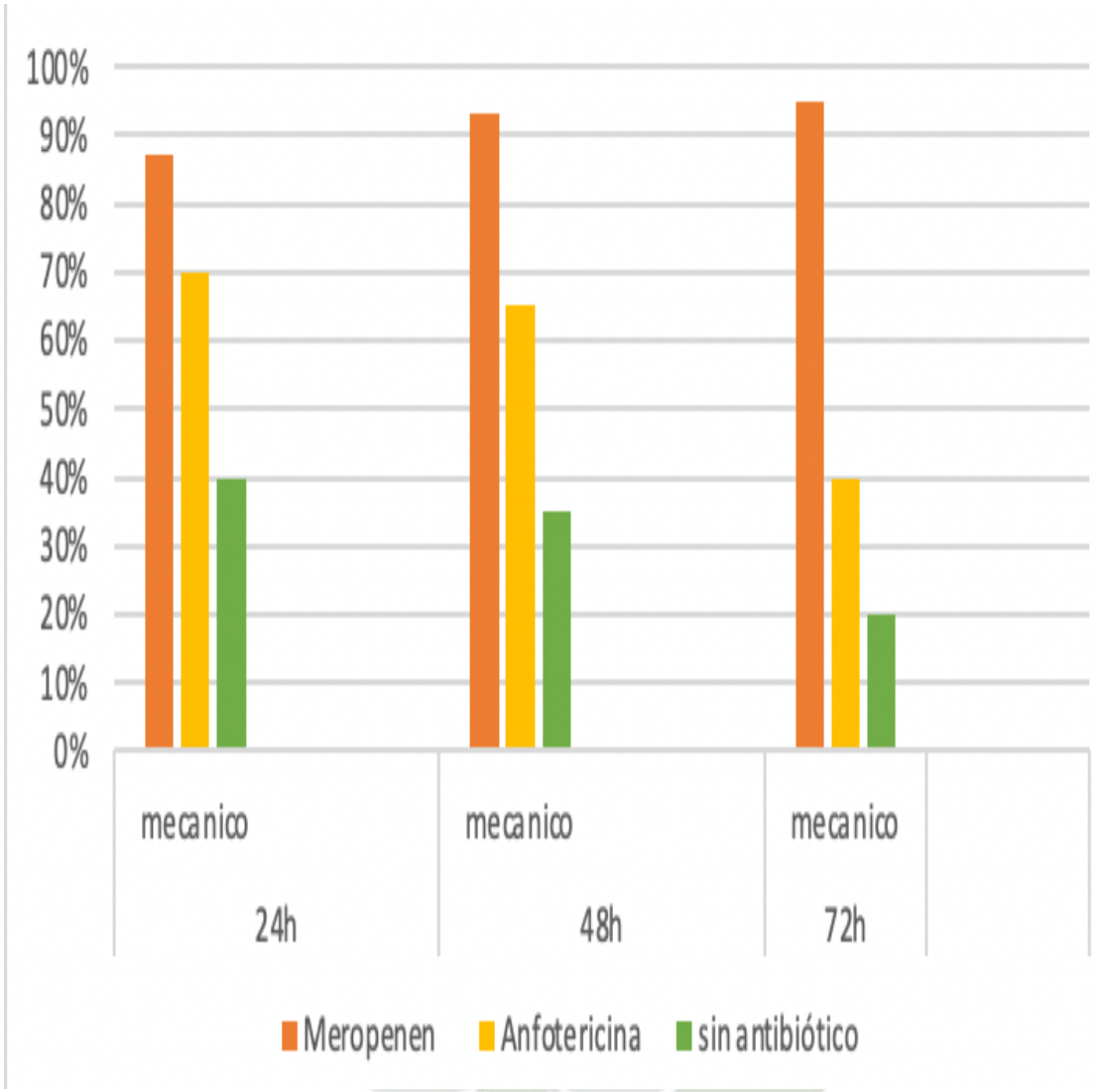


Figura 21. Aislamiento mecánico con diferentes casos de medicación.

En la Fig. 21, se muestra que a las 24 horas aplicando la medicación de meropenen la cantidad de células se encuentra en un 86% de efectividad Por otro lado, con la técnica mecánica más agregación de la medicación de anfotericina, en un 70% de efectividad y por último, con un proceso mecánico sin agregar ningún medicamento se obtiene un resultado del 40% de efectividad. A las 48 horas la técnica mecánica agregando la medicación de meropenen se obtiene un 93% de efectividad, mientras que agregando el medicamento anfotericina se obtiene un 65% de efectividad y para terminar, sin el uso de algún medicamento, encontramos un 35% de efectividad. A las 72 horas la técnica mecánica agregando una medicación con meropenen lo encontramos en un 95% de efectividad, pero si agregamos anfotericina obtenemos un 40% de efectividad y sin ningún medicamento se encuentra en un 20% de efectividad.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

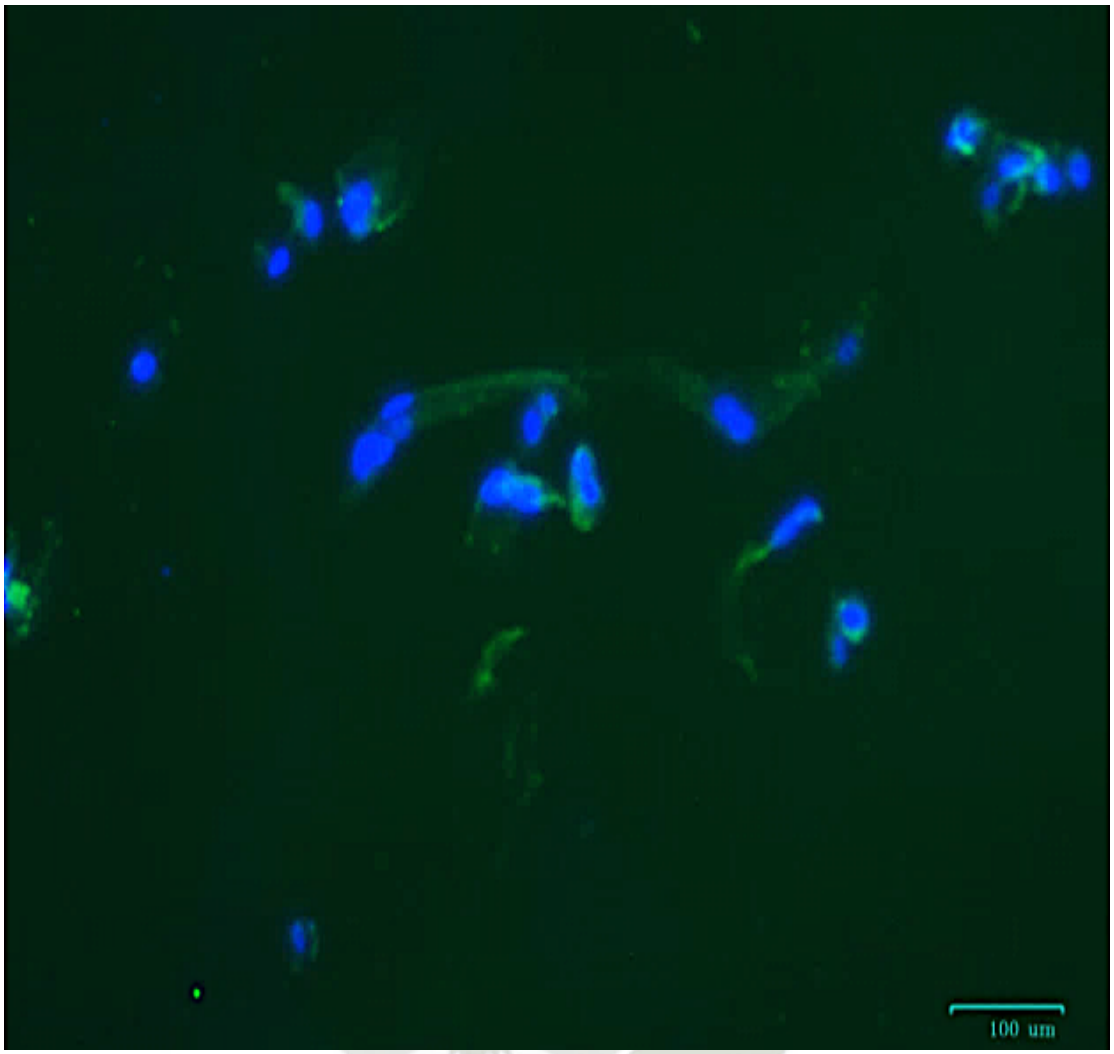


Figura 22. Inmunofluorescencia indirecta.

En la Fig. 22, en el día 35 se realizó el procesado y fijación de células con los marcadores p53 en los portaobjetos, observados en un ambiente oscuro, para luego ser llevados al microscopio invertido. observándose la tinción de los receptores de p53 a nivel del citoplasma y con mayor intensidad a nivel del núcleo a una magnitud de 10X con luz fluorescente. La característica celular de acuerdo a su morfología, muestran áreas azules fusiformes ovoideas a los 100 µm de los núcleos de las células fibroblásticas alargadas y pigmentos de color verde correspondiente a la evidencia de p53 que invaden tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.3.3. Evaluación de Mutaciones para p53.

Para el análisis de mutaciones, se usa como referencia el genoma humano (GRCh38) y las secuencias de RNa-seq de las muestras alineadas y normalizadas en un formato BAM se comparan con el genoma mediante el software IGV (Integrative Genomics Viewer). Si un nucleótido difiere de la secuencia de referencia en más del 20 % de las lecturas ponderadas de calidad, IGV colorea la barra en proporción al recuento de lecturas de cada base (A, C, G, T). La mutación de nucleótido único (SNP) para p53 es mostrada en las siguientes Fig. 23.

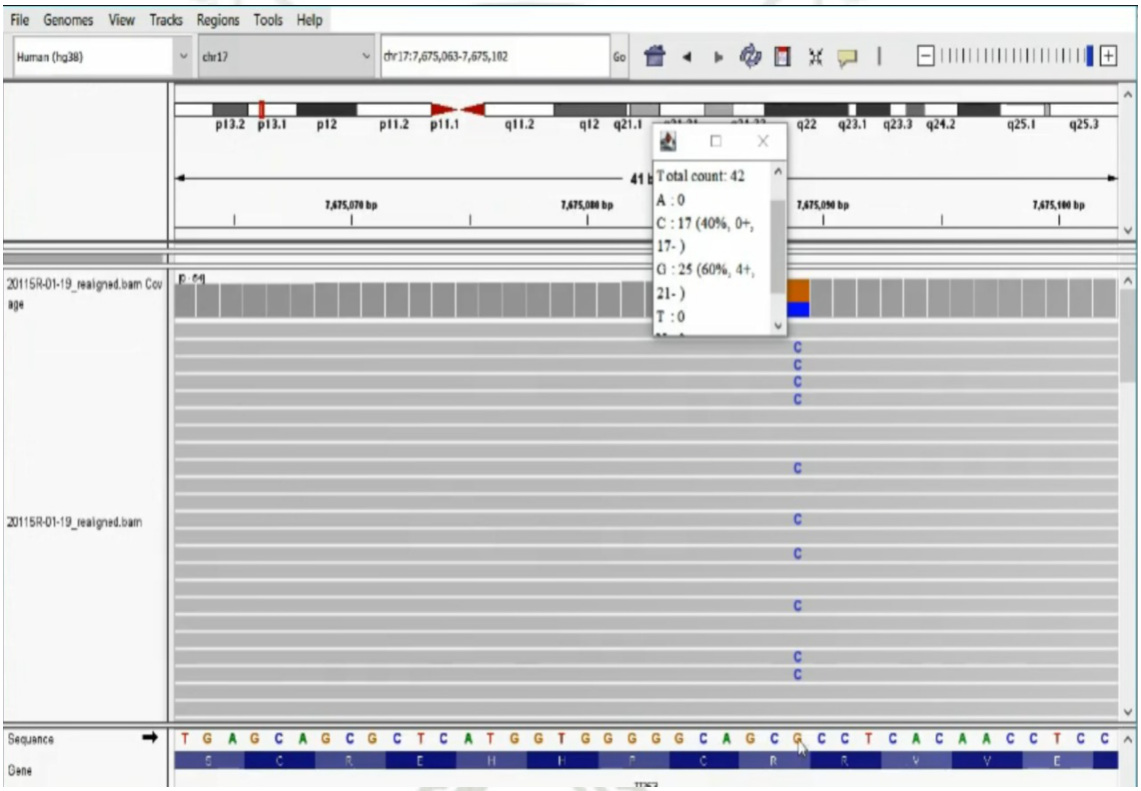


Figura 23. Mutaciones en p53 exon 1, cromosoma 17: 7675089, G>C en quiste radicular inflamatorio.

En la Fig. 23, se muestra la pista de cobertura predeterminada para un archivo de alineación BAM utilizando el software IGV (Integrative Genomics Viewer) Si un nucleótido difiere de la secuencia de referencia en más del 20 % de las lecturas ponderadas de calidad, IGV colorea la barra en proporción al recuento de lecturas de cada base (A, C, G, T). Se encontraron los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para p53: exon 1, chr 17: 7675089, SNV (variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido) G > C, donde C equivale el 40% de mutación missense.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4. Mutaciones puntuales de p53 Exon 1 (136).

tp53 - Exon 1

Mutación	Referencias biliográficas
Tipo de variante: SNV Alelos: G > C Cromosoma 17: 7675089 (GRCh38) Exón: 1 Functional Consequence: missence	National Center for Biotechnology information

En la tabla 4 se muestra las mutaciones de tp53 tomando como referencia a la "National Center for Biotechnology information" (GRCh38). De 1 mutación encontrada en el exon 1, la mutacion de tp53 Cromosoma 17: 7675089 es una variante missense, esto demuestra que estas mutaciones ya se encontraban descritas en la literatura según las referencias de la National Center for Biotechnology information.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

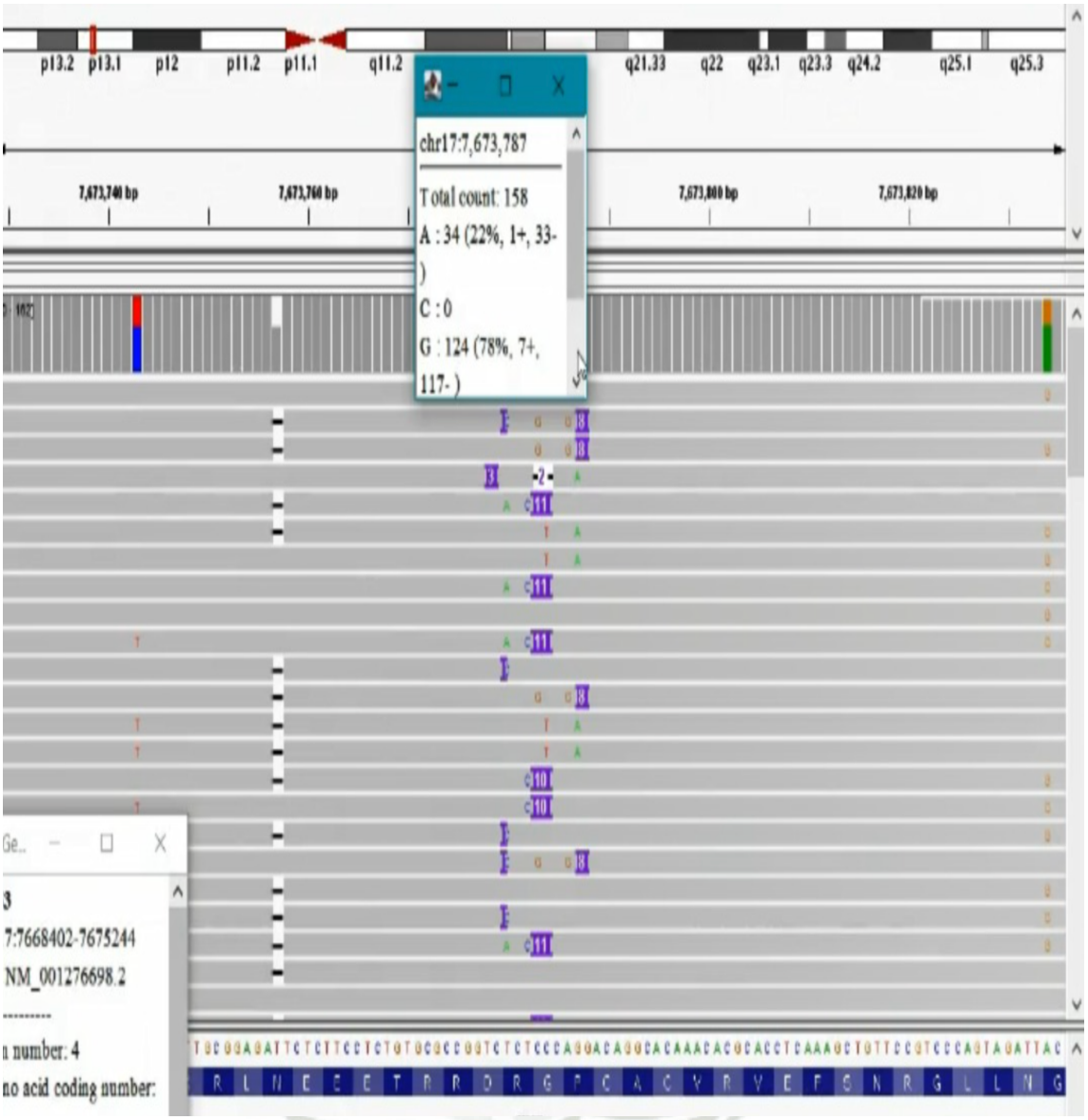


Figura 24. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673787, G>A en quiste radicular inflamatorio.

En la Fig. 24, se muestra la pista de cobertura predeterminada para un archivo de alineación BAM utilizando el software IGV (Integrative Genomics Viewer) Si un nucleótido difiere de la secuencia de referencia en más del 20 % de las lecturas ponderadas de calidad, IGV colorea la barra en proporción al recuento de lecturas de cada base (A, C, G, T). Se encontraron los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para p53: exon 4, chr17: 7673787, SNV (variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido) G > A, donde A equivale el 22% de mutación missense.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

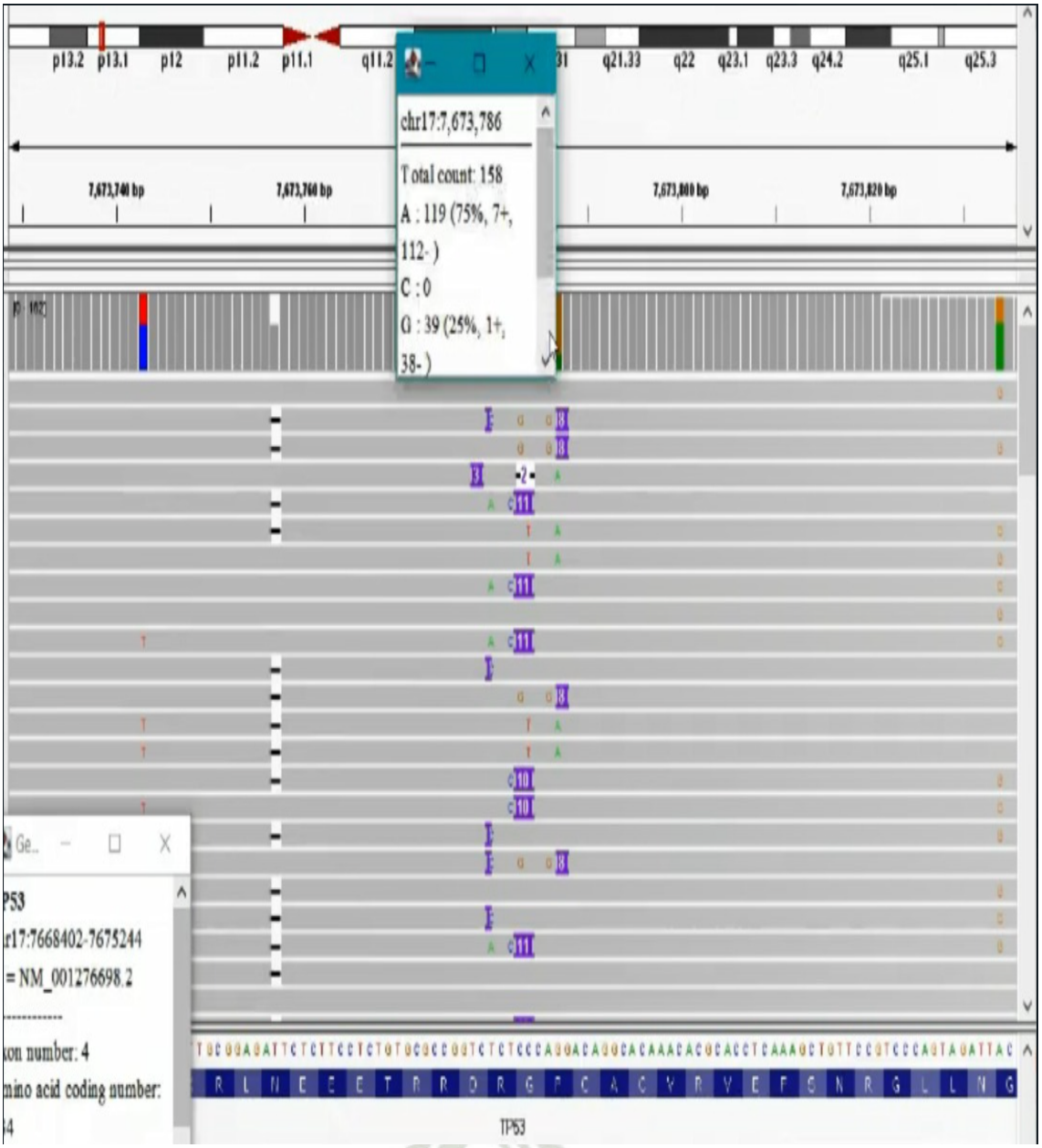


Figura 25. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673786, G>A en quiste radicular inflamatorio.

En la Fig. 25, se muestra la pista de cobertura predeterminada para un archivo de alineación BAM utilizando el software IGV (Integrative Genomics Viewer) Si un nucleótido difiere de la secuencia de referencia en más del 20 % de las lecturas ponderadas de calidad, IGV colorea la barra en proporción al recuento de lecturas de cada base (A, C, G, T). Se encontraron los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para p53: exon 4, chr17: 7673786, SNV (variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido) G > A, donde A equivale el 75% de mutación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

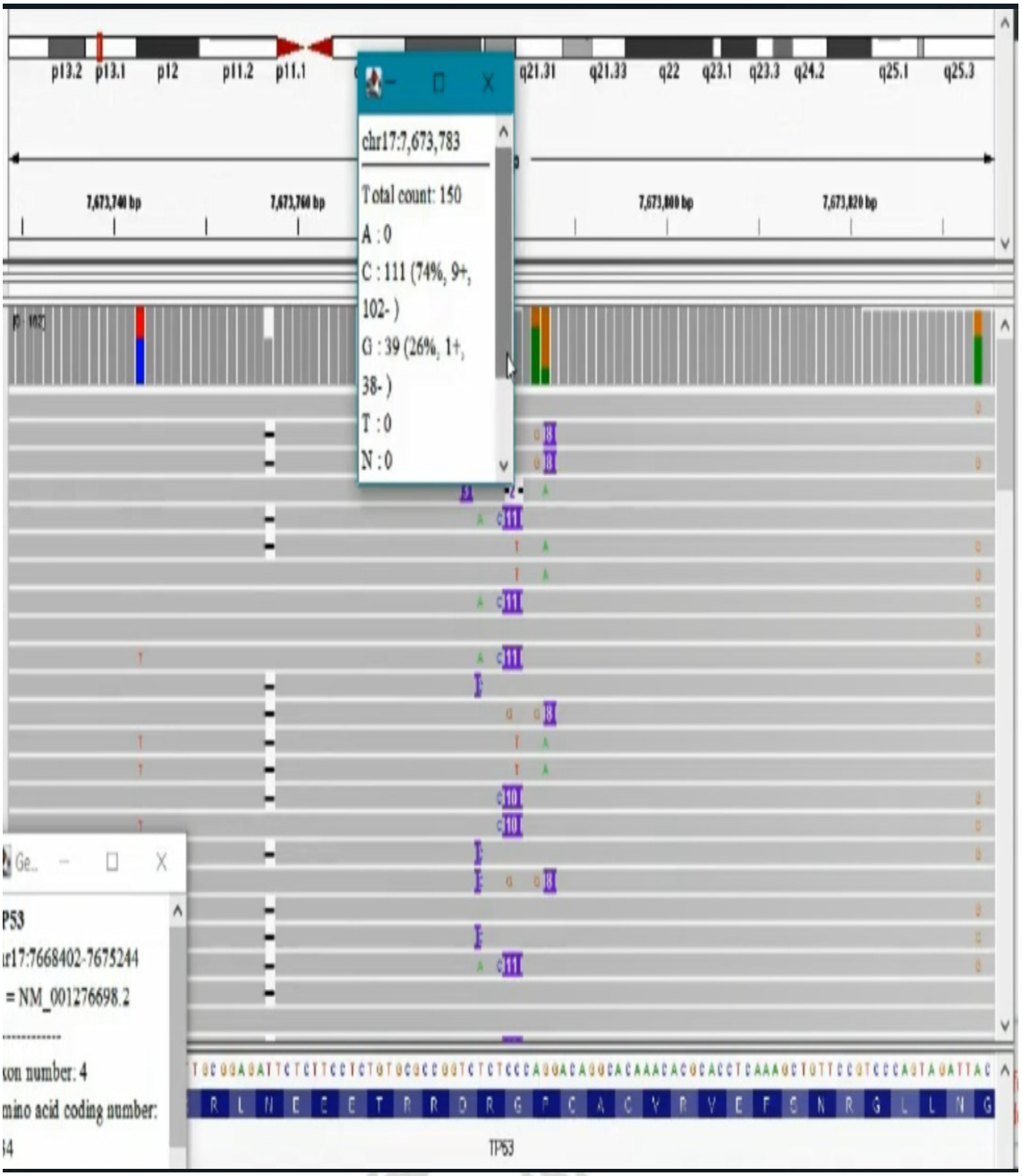


Figura 26. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673783, C>G en quiste radicular inflamatorio.

En la Fig. 26, se muestra la pista de cobertura predeterminada para un archivo de alineación BAM utilizando el software IGV (Integrative Genomics Viewer) Si un nucleótido difiere de la secuencia de referencia en más del 20 % de las lecturas ponderadas de calidad, IGV colorea la barra en proporción al recuento de lecturas de cada base (A, C, G, T). Se encontraron los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para p53: exon 4, chr17: 7673783, SNV (variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido) C > G, donde G equivale el 26% de mutación missense.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

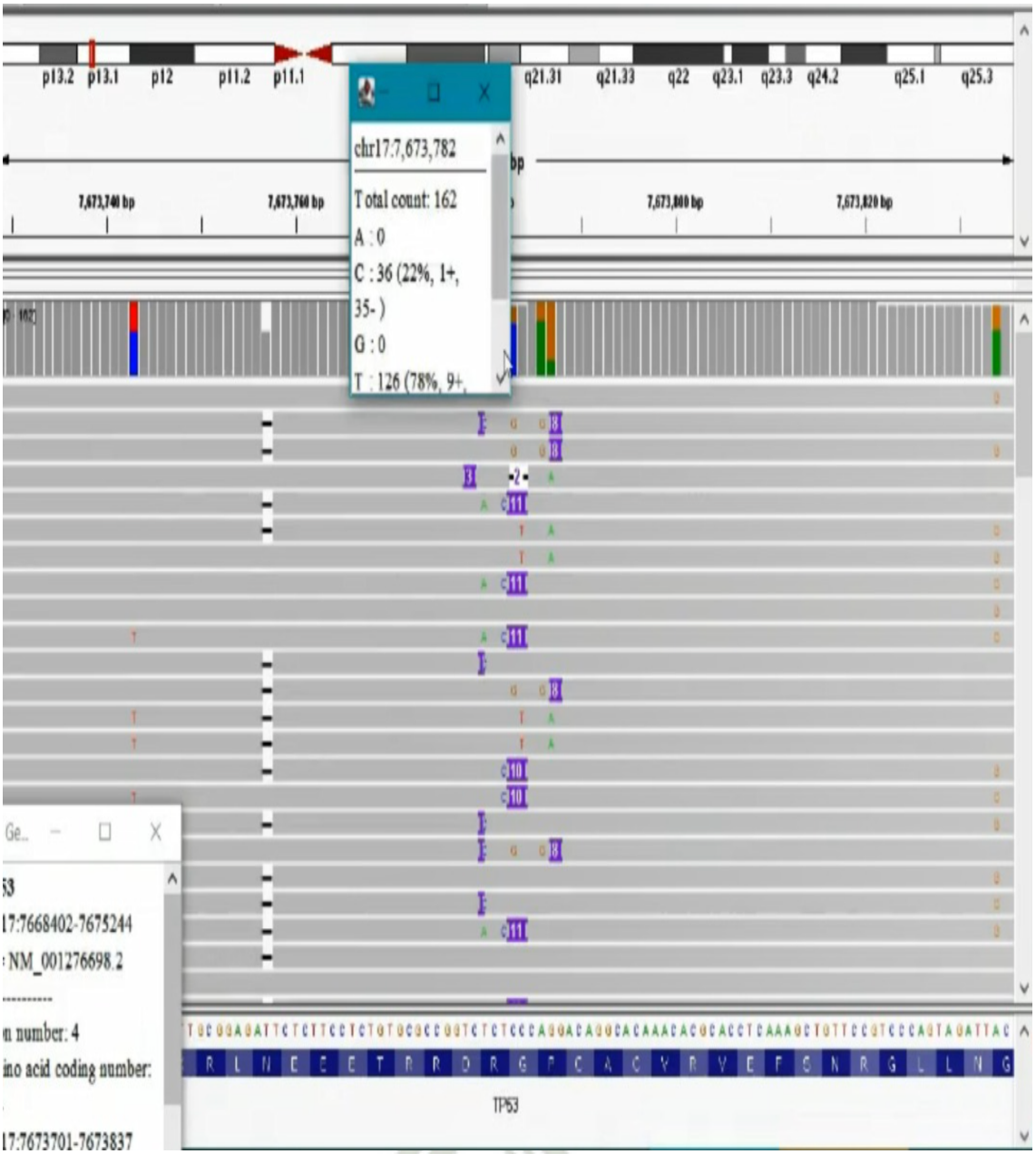


Figura 27. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673782, T > C en quiste radicular inflamatorio.

En la Fig. 27, se muestra la pista de cobertura predeterminada para un archivo de alineación BAM utilizando el software IGV (Integrative Genomics Viewer) Si un nucleótido difiere de la secuencia de referencia en más del 20 % de las lecturas ponderadas de calidad, IGV colorea la barra en proporción al recuento de lecturas de cada base (A, C, G, T). Se encontraron los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para p53: exon 4, chr17: 7673782, SNV (variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido) T > C, donde C equivale el 22% de mutación missense.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

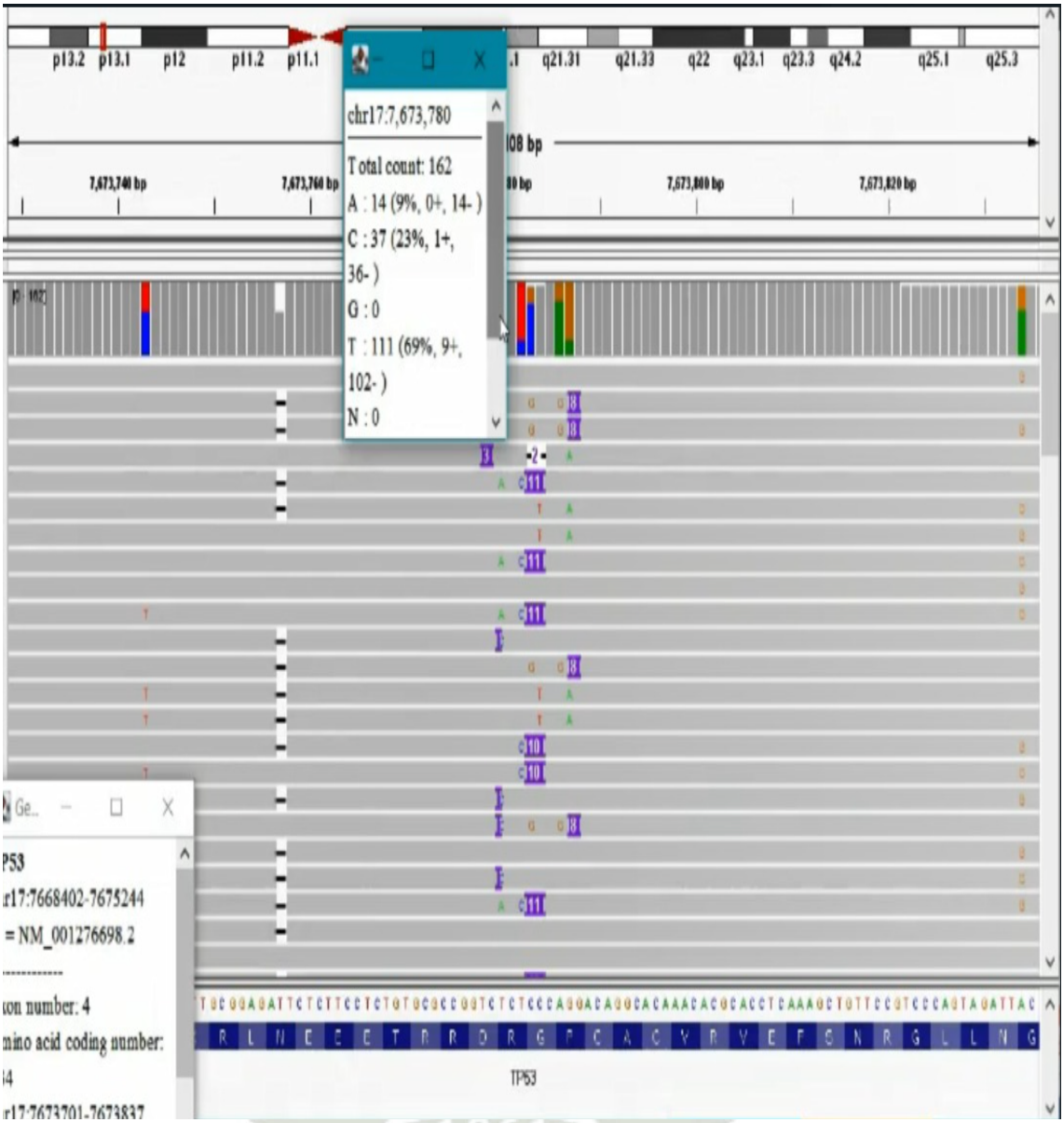


Figura 28. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673780, T > A, T > C, en quiste radicular inflamatorio.

En la Fig, 28, se muestra la pista de cobertura predeterminada para un archivo de alineación BAM utilizando el software IGV (Integrative Genomics Viewer) Si un nucleótido difiere de la secuencia de referencia en más del 20 % de las lecturas ponderadas de calidad, IGV colorea la barra en proporción al recuento de lecturas de cada base (A, C, G, T). Se encontraron los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para p53: exon 4, chr17: 7673780, SNV (variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido) T > A, donde A equivale el 9% y T > C, donde C equivale el 23% de mutación missense.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

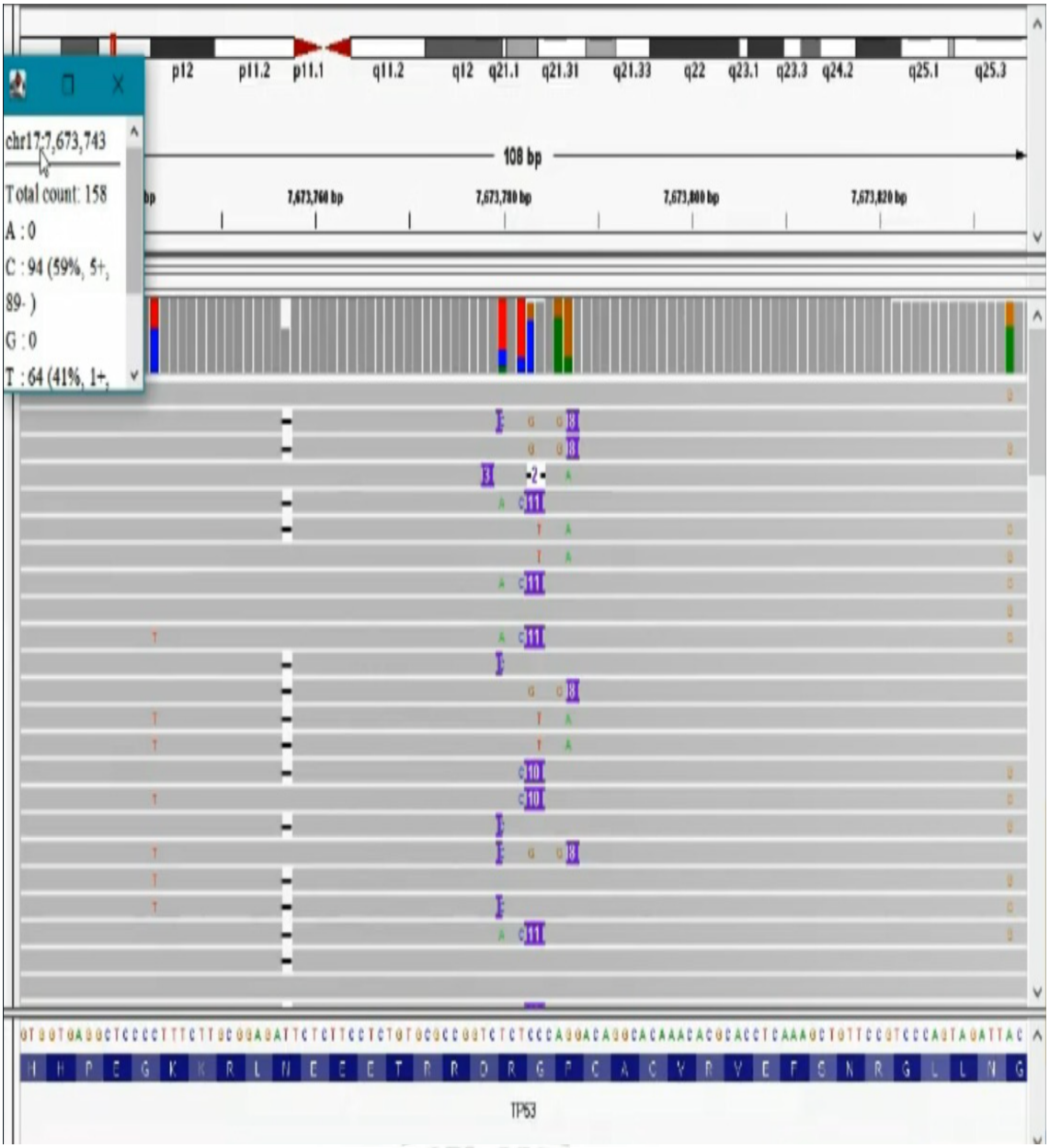


Figura 29. Mutaciones en p53 exon 4, cromosoma 17: 7673743, C > T, en quiste radicular inflamatorio.

En la Fig. 29, se muestra la pista de cobertura predeterminada para un archivo de alineación BAM utilizando el software IGV (Integrative Genomics Viewer) Si un nucleótido difiere de la secuencia de referencia en más del 20 % de las lecturas ponderadas de calidad, IGV colorea la barra en proporción al recuento de lecturas de cada base (A, C, G, T). Se encontraron los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para p53: exon 4, chr17: 7673743, SNV (variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un solo nucleótido) C > T, donde T equivale el 41% de mutación missence.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 5. Mutaciones puntuales de p53 Exon 4 (136).

Tp53 Exon 4	
Mutación	**Referencias bibliográficas**
Tipo de variante: SNV Alelos: G > A Cromosoma 17: 7673787 (GRCh38) Exón: 4 Functional Consequence: missense	National Center for Biotechnology information
Tipo de variante: SNV Alelos: **C > T** Cromosoma 17: 7673783 (GRCh38) Exón: 4 Functional Consequence: Sinónima	National Center for Biotechnology information
Tipo de variante: SNV Alelos: T > C Cromosoma 17: 7673782 (GRCh38) Exón: 4 Functional Consequence: missense	National Center for Biotechnology information
Tipo de variante: SNV Alelos: T > A Cromosoma 17: 7673780 (GRCh38) Exón: 4 Functional Consequence: missense	National Center for Biotechnology information
Tipo de variante: SNV Alelos: C > T Cromosoma 17: 7673743 (GRCh38) Exón: 4 Functional Consequence: missense	National Center for Biotechnology information

En la tabla 5, se muestra las mutaciones de tp53 tomando como referencia a la “National Center for Biotechnology information” (GRCh38). De 6 mutaciones encontradas en el exon 4, la mutacion de tp53 chr 17: 7673787 variante missense, chr 17: 7673783 variante sinónima, chr 17: 7673782 variante missense, chr 17: 7673780 variante missense, y chr 17: 7673780 variante missense ya se encontraban descritas en la literatura.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

DISCUSIÓN

Durante el proceso de aislamiento y cultivo de las células madre del quiste radicular inflamatorio, se presentó la limitación en el manejo de las muestras al tratar de aislarlas y cultivarlas como también evitar su contaminación. Se probaron diferentes protocolos como el de Camejo y Marelli(137,138) que usaron como enzima la colagenasa tipo I, pero con ese protocolo, no se logró el efecto deseado del crecimiento celular en todos los intentos. Luego, se buscó disminuir la concentración de la colagenasa tipo I, pero, aun así, las células comenzaban a morir con la programación de apoptosis celular, describiéndo una célula contraída de forma redondeada. También, Olavéz(139) utiliza en su estudio la Tripsina/EDTA, pero tampoco se obtuvo resultados favorables con el protocolo, se descartó el uso del método enzimático para el aislamiento celular.(139)

Se obtuvieron células del quiste radicular inflamatorio después del día cuatro. Sin embargo, para Trejo(140) la proliferación celular fue a partir del día tres con presencia de células fibroblásticas, si bien, no pretendemos decir que es la mejor técnica para aislar y cultivar células, teniendo en cuenta que la mayoría de los investigadores(141–143) emplean el método de disgregación enzimática descrito por Gronthos y col (144), este estudio demostró lo eficaz que también puede ser el método mecánico agregando un antibiótico apropiado como el meropenen. El crear un nuevo protocolo modificado del aislamiento y cultivo de células, a partir del quiste radicular inflamatorio, permite cubrir las condiciones propicias para el crecimiento celular, al igual que conocer el manejo del cultivo hace relevante y de gran importancia el poder realizar el estudio.

En la morfología coincidimos con el autor Olavéz en mencionar que las células presentan una forma fusiforme, alargada y planas mononucleadas, fibroblásticas, con proliferación de colonias celulares sobrepuestas(139) como se observa en la Fig. 16. Se evidenció la formación de colonias de células del quiste radicular inflamatorio, del cual se observó que de 100 células por placa se formaron numerosas colonias. Dando a conocer una cercana evidencia entre el número de células y el número de colonias fibroblásticas, coincidiendo con las observaciones de D'Aquino (145). El crecimiento y proliferación celular se logró a partir de las 24 horas con la presencia de células circulares. En el 4to día estas células adoptaron la forma alargada y aplanada, como se muestra en la Fig. 17a, a lo que coincidimos con Angulo(146) por la aparición de sus líneas celulares. También otro punto a considerar fue el tiempo que se demoran las células en formar su colonización

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

entre el 10mo y 14vo día en comparación a los resultados encontrados en la investigación de Amortegui(50).

Se estimó la viabilidad de los cultivos con el fin de determinar la reproducibilidad del protocolo modificado de aislamiento, teniendo como total de $70X10^6$ /mL células vivas a comparación de la investigación de Angulo(146) que evidencia una menor cantidad de células vivas con el método enzimático. Tal vez podríamos decir que en esta investigación, aparte del método, pudo influir mucho el meropen para la conservación celular.

Por otro lado, en la Fig. 22, los resultados de la inmunofluorescencia muestran que las células presentes en nuestros cultivos del quiste radicular inflamatorio son positivas a los marcadores de p53 no encontrando una literatura específica y comparable, pero si con otros ensayos previos de aislamiento y caracterización de Ameloblastomas o queratoquiste, reaccionando las colonias celulares a los marcadores de p53 por Maturana o como en los estudios de expresión de marcadores ki-67, p53, p16 y bcl-2 en ameloblastomas encontrados por Fleischmacher y Mende siendo estas de comportamiento neoplásico.

Chuaire hace mención sobre el papel de la p53 y su proceso como el guardián del genoma, dando a conocer los procesos que inhiben a la mutación y división celular de oncogenes. Sin embargo, en la Fig. 23, se encontró mutación en el gen p53 en el exon 1 chr 17: 7675089 (GrCh38) de variante missense en los alelos de G > C que a la vez ya se encontraban descritas en la literatura por la National Center for Biotechnology information como se muestra en la tabla 4 (136).

En las Fig. 23 -29, se evidencia la ubicación cromosómica de las mutaciones puntuales de p53 encontrando 7 mutaciones SNV (variante de un solo nucleótido) en el exon 4 del chr 17: 7673787 con alelo G > A, el chr 17: 7673782 con alelo T > C, chr 17: 7673780 con alelo T > A y chr 17: 7673743 con alelo C > T, encontrando que ya fueron descritas en la literatura por la National Center for Biotechnology information en la tabla 5, lo que indica que corroboramos su mutación ya encontrada en p53 que es missense. Sin embargo, en el chr 17: 7673783 con alelo C > G y el chr 17: 7673780 con el alelo T > C y chr 17: 7673786 con alelo G > A, no se encuentran mencionadas, lo que indica que por primera vez reportamos este tipo de mutación para p53(136). Todas estas mutaciones conllevarían a un mal funcionamiento de p53 lo que se observa en la sobre expresión de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

las células madre del quiste radicular inflamatorio, como se ve en la inmunofluorescencia de la Fig. 22.

Por último, el conocer el conjunto de genes de la p53 con las mutaciones en sus diferentes exones, nos abre un nuevo campo a la investigación y vías para el desarrollo de pronósticos y terapias direccionadas al quiste radicular inflamatorio.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CONCLUSIONES

PRIMERA

Este estudio demostró que el tejido del quiste radicular inflamatorio, utilizando el método mecánico, acompañado de un antibiótico como el meropenen, podemos obtener células o colonias celulares ya morfológicamente bien definidas en un periodo comprendido entre 4 a 25 días.

SEGUNDA

La morfología de las células madre del quiste radicular inflamatorio son de forma alargada y planas, mononucleadas fibroblásticas, con división celular y con la presencia de algunas células apoptóticas.

TERCERA

Con el método de aislamiento y cultivo mecánico acompañado del antibiótico Meropenen se obtuvo la cantidad de $70X10^6$ células vivas /mL con un promedio de 87% en la viabilidad celular.

CUARTA

Por medio de la inmunofluorescencia se encontró el gen p53 tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células del quiste radicular inflamatorio.

QUINTA

El método de secuenciación ayudó a entender el procesamiento de las bases de datos de la lectura de las bibliotecas celulares de p53.

SEXTA

Se encontraron mutaciones en el genoma del quiste radicular inflamatorio para el gen p53 en el exón 1 chr 17: 7675089 (GrCh38) de variante missense en los alelos de G > C. así como también mutaciones en el exon 4 chr 17: 7673787 con alelo G > A, el chr 17: 7673782 con alelo T > C, chr 17: 7673780 con alelo T > A y chr 17: 7673743 con alelo C > T

SETIMA

Se encontraron nuevos tipos de mutación para p53 en el chr 17: 7673783 con alelo C > G y el chr 17: 7673780 con el alelo T > C y chr 17: 7673786 con alelo G > A, ya que hasta el momento son reportadas por primera vez.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

RECOMENDACIONES

PRIMERA

Realizar en el menor tiempo posible la extracción de la muestra, ya que provienen de la cavidad oral y es propensa a contaminarse por la gran cantidad de biofilm que se encuentra en esa zona.

SEGUNDA

Continuar con la optimización del protocolo de técnica mecánica añadido el meropenen para el aislamiento de cultivos celulares.

TERCERA

Seguir realizando más estudios del quiste radicular aplicando como lograr obtener un banco genómico para profundizar más su estudio.

CUARTA

Seguir los estudios con el marcador Ki–67 que son utilizados para ameloblastoma o queratoquistes.

QUINTA

Se recomienda siempre examinar los cultivos durante el proceso de crecimiento celular para observar si la muestra no está contaminada y requerir a los antibióticos, como también el estar pendiente de sus cambios periódicos a otros subcultivos.

SEXTA

Para obtener línea celular, se sugiere realizar fotografías a diferentes densidades celulares específicas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

REFERENCIA.

1. Karina CVVH Vázquez Del Mercado Mabel Sánchez, Jasson Galván Dayana, López Rodríguez. Quiste radicular [Internet]. [citado 5 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=106505

2. Mascitti M, Togni L, Balercia A, Balercia P, Rubini C, Santarelli A. p53-Family Proteins in Odontogenic Cysts: An Immunohistochemical Study. Appl Immunohistochem Mol Morphol. junio de 2020;28(5):369-75.

3. Pereira DDV. Quiste odontogénico | Diagnóstico y Tipos de quistes dentales [Internet]. Clínicas Propdental. 2013 [citado 5 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.propdental.es/blog/odontologia/quiste-odontogenico/

4. Infantes M, Alva E, Quiroz L. Quiste Periapical: Reporte de caso clínico. Odontología Sanmarquina. 14 de mayo de 2014;8:46.

5. Clasificación de los tumores odontogénicos [Internet]. [citado 6 de agosto de 2022]. Disponible en: https://1library.co/article/clasificaci%C3%B3n-de-los-tumores-odontog%C3%A9nicos.zle8dwrq

6. Cunha EM, Fernandes AV, Versiani MA, Loyola AM. Unicystic ameloblastoma: a possible pitfall in periapical diagnosis. International Endodontic Journal. 2005;38(5):334-40.

7. Rosenberg PA, Frisbie J, Lee J, Lee K, Frommer H, Kottal S, et al. Evaluation of pathologists (histopathology) and radiologists (cone beam computed tomography) differentiating radicular cysts from granulomas. J Endod. marzo de 2010;36(3):423-8.

8. Scalas D, Roana J, Boffano P, Mandras N, Gallesio C, Amasio M, et al. Bacteriological findings in radicular cyst and keratocystic odontogenic tumour fluids from asymptomatic patients. Arch Oral Biol. noviembre de 2013;58(11):1578-83.

9. Vázquez D, Balsamo MF, Gandini P, Valdez A, Carbajal E. Diagnóstico radiográfico, solución de un caso y revisión de la literatura. 2009;(1):4.

10. Concha G. Radiología de quistes de los maxilares. Rev Hosp Clin Univ Chile. 2002;23-32.

11. Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. mayo de 1999;87(5):617-27.

12. Brad Neville Douglas D. Damm Carl Allen Jerry Bouquot. Oral and Maxillofacial Pathology - 3rd Edition [Internet]. 2008 [citado 6 de junio de 2020]. Disponible en: https://www.elsevier.com/books/oral-and-maxillofacial-pathology/neville/978-1-4160-3435-3

13. Rajendran B. Infected Radicular Cyst. Review of Basic Concepts and A Clinical Case Report. Odovtos International Journal of Dental Sciences. 6 de noviembre de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2015;1:21-9.

14. Moderno D. Lesiones endo-periodontales: diagnóstico, clasificación, tratamiento y pronóstico [Internet]. DM | El Dentista Moderno - Ortodoncia, dentistas, odontólogos... [citado 22 de julio de 2022]. Disponible en: https://www.eldentistamoderno.com/texto-diario/mostrar/3524410/lesiones-endo-periodontales-diagnostico-clasificacion-tratamiento-pronostico

15. Londoño LS, Barrera JL, Gómez PQ, Molina NSR. Comparación de técnicas de disgregación mecánica, enzimática y mecano-enzimática en la extracción de poblaciones linfocitarias y macrófagos en tejidos con periodontitis crónica avanzada. Universitas Odontológica. 2007;26(58):26-33.

16. Beltran Vargas NE, Gonzales de la Rosa CH. Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. México; 2016.

17. El qué, el porqué y el cómo del cultivo de explantes | Grain of sound [Internet]. [citado 6 de agosto de 2022]. Disponible en: https://grainofsound.org/es/el-qu%c3%a9-el-porqu%c3%a9-y-el-c%c3%b3mo-del-cultivo-de-explantes/

18. Guzmán González C. Efecto del tipo de explante aéreo en la regeneración in vitro de Alstroemeria spp. 2015 [citado 23 de julio de 2022]; Disponible en: https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/148016

19. Cultivo Celular - EcuRed [Internet]. [citado 6 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.ecured.cu/Cultivo_Celular.

20. Método: Digestión por enzimas de restricción [Internet]. Conogasi. 2017 [citado 6 de agosto de 2022]. Disponible en: https://conogasi.org/articulos/metodo-digestion-por-enzimas-de-restriccion/

21. Paz Campos M. Técnicas DE Aislamiento Y Purificación Celular [Internet]. StuDocu. [citado 5 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.studocu.com/es/document/universidad-de-sevilla/tecnicas-moleculares-y-celulares/tema-2-tecnicas-de-aislamiento-y-purificacion-celular/14621736

22. Muestras líquidas. - Estudio de las técnicas de envolventes para la evaluación de la concentrac [Internet]. [citado 6 de agosto de 2022]. Disponible en: https://1library.co/article/muestras-l%C3%ADquidas-estudio-t%C3%A9cnicas-envolventes-evaluaci%C3%B3n-concentrac.y9g3g5dq

23. Cultivo celular - EMEI [Internet]. 2012 [citado 29 de enero de 2022]. Disponible en: https://epidemiologiamolecular.com/cultivo-celular/

24. Gil-Loyzaga PE. Cultivo de células animales y humanas: Aplicaciones en medicina regenerativa. Vision Libros; 2013. 400 p.

25. Lloyd MG, Liu D, Lyu J, Fan J, Overhulse JM, Kashemirov BA, et al. An acyclic phosphonate prodrug of HPMPC is effective against VZV in skin organ culture and mice. Antiviral Research. 1 de marzo de 2022;199:105275.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

26. Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. Chapter 9 - Metanephric organ culture. En: Weimbs T, editor. Methods in Cell Biology [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 6 de agosto de 2022]. p. 169-83. (Methods in Kidney Cell Biology - Part A; vol. 153). Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X1930069X

27. Lee SA, Park BR, Moon SM, Hong JH, Kim DK, Kim CS. Chondroprotective Effect of Cynaroside in IL-1β-Induced Primary Rat Chondrocytes and Organ Explants via NF-κB and MAPK Signaling Inhibition. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 25 de enero de 2020;2020:e9358080.

28. García J. Introducción al cultivo de tejidos. :32.

29. Gordon J, Amini S. General Overview of Neuronal Cell Culture. En: Amini S, White MK, editores. Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021 [citado 6 de agosto de 2022]. p. 1-8. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1437-2_1

30. Beltran N, Gonzalez-De la Rosa C. Técnicas de cultivos celulares e ingienería de tejidos. 2021.

31. Diferencia entre la línea celular, la distensión celular y el tipo de célula. / Biología Celular [Internet]. La diferencia entre objetos y términos similares. [citado 6 de agosto de 2022]. Disponible en: https://es.sawakinome.com/articles/cell-biology/difference-between-cell-line-cell-strain-and-cell-type.html

32. Tipos de líneas celulares [Internet]. Ciencia de Hoy. 2019 [citado 6 de agosto de 2022]. Disponible en: https://cienciadehoy.com/tipos-de-lineas-celulares/

33. Cultivos en Monocapa | PDF | Virus | Rna [Internet]. Scribd. [citado 9 de agosto de 2022]. Disponible en: https://es.scribd.com/document/357299245/Cultivos-en-Monocapa.

34. López Marure R, Hernández Montes J, Sánchez Sánchez L, Weiss Steider B. Los factores de crecimiento hematopoyéticos estimulan la proliferación de células tumorales no hematopoyéticas. Revista de investigación clínica. 1998;50(5):413-8.

35. Munévar JCR, Combita AL, Rodríguez JA. Restablecimiento de la expresión de HLA-A*02:01 y HLA-B*44:01 en líneas celulares tumorales mediante transferencia génica usando adenovirus recombinantes. Revista Colombiana de Cancerología. 1 de enero de 2017;21(1):64.

36. Rueda N. Las células madre podrían ser más fáciles de obtener • ENTER.CO [Internet]. ENTER.CO. 2014 [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.enter.co/cultura-digital/ciencia/nuevos-experimentos-revolucionan-el-desarrollo-de-celulas-madre/

37. Cultek. Células Natural Killer humanas (NK selección positiva) criopreservadas, > 5 millones de cels. [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.cultek.com/c-lulas-natural-killer-humanas-nk-selecci-n-positiva-criopreservadas-5-millones-de-cels.html

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

38. Ciclo celular y crecimiento [Internet]. [citado 9 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm

39. Apoptosis | NHGRI [Internet]. [citado 9 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Apoptosis

40. von Bernhardi M R. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? Revista chilena de neuro-psiquiatría. octubre de 2004;42(4):281-92.

41. Los valores normales del pH [Internet]. CCM Salud. [citado 15 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://salud.ccm.net/faq/32746-los-valores-normales-del-ph

42. Arredondo-Vega B, Voltolina D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En 2007.

43. Manual de Patolgía General [Internet]. [citado 15 de septiembre de 2022]. Disponible en: http://publicacionesmedicina.uc.cl/PatologiaGeneral/Patol_012.html

44. Altervista. Calcular la densidad de siembra celular [Internet]. Cultivo de células. 2018 [citado 16 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://cellculture.altervista.org/how-to-calculate-the-seeding-density-of-cells/

45. Altervista. Subcultivo de células adherentes. [Internet]. Cultivo de células. 2022 [citado 16 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://cellculture.altervista.org/subculture-of-adherent-monolayered-cells/

46. ¿Qué es un subcultivo en microbiología? [Internet]. Ciencia de Hoy. 2019 [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://cienciadehoy.com/que-es-un-subcultivo-en-microbiologia/

47. Gallego-Pinazo R, Pinazo-Durán MD, Serrano M. El ciclo celular y el gen p53. Aproximación a la oftalmología molecular. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. 1 de julio de 2010;85(7):229-31.

48. Cubo T, Padilla D, Villarejo P, López A. Utilidad de la determinación sérica de factor de crecimiento del endotelio vascular en el postoperatorio del cáncer colorrectal. Medicina Clínica. 1 de junio de 2007;129(1):38-9.

49. Gasión JPB, Moreno JLP, Donoso CDV, Cruz JFJ, Moragues MO. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. Actas Urol Esp. :14.

50. Amórtegui ÁX, Ramírez SR. Cultivo primario de queratinocitos humanos sembrados en submucosa intestinal porcina. Revista Ciencias de la Salud [Internet]. 2008 [citado 13 de mayo de 2022];6(3). Disponible en: https://revistas.urosario.edu.co/index.php/revsalud/index

51. Resolución de problemas observados en los cultivos celulares [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-troubleshooting

52. González EAH, Aguilar EJ. Evolución del medio de cultivo en el estudio de las células madre neuronales. 2009;8.

53. Viresa. Determinación de pH en medios de cultivo como prueba de control de calidad. [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://viresa.com.mx/blog_ph_medios_de_cultivo_control_calidad

54. Altervista. Temperatura en cultivo celular [Internet]. Cultivo de células. 2021 [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://cellculture.altervista.org/temperature-how-it-can-affect-the-reproducibility-of-the-results/

55. Brajovic F. Cuidados y uso básico de la Incubadora de laboratorio [Internet]. Cromtek. 2020 [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.cromtek.cl/2020/07/31/cuidados-y-uso-basico-de-la-incubadora-de-laboratorio/

56. CORDIS. Una investigación sobre la viscosidad celular amplía los conocimientos sobre las células cancerosas | News | CORDIS | European Commission [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://cordis.europa.eu/article/id/33403-cell-viscosity-research-improves-our-knowledge-of-cancer-cells/es

57. Cultek. Solución balanceada, Earle's Balanced Salts 10X w_ Calcium w_ Magnesium w_o Sodium Bicarbonate - 100ml [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.cultek.com/solucion-balanceada-earle-s-balanced-salts-10x-w-calcium-w-magnesium-w-o-sodium-bicarbonate-100ml.html

58. Jordao BQ. Ciclo celular en Meristemos [Internet] [http://purl.org/dc/dcmitype/Text]. Universidad Complutense de Madrid; 1987 [citado 9 de agosto de 2022]. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=197317

59. Tineo Figueroa MV. Suplementación de aminoácidos esenciales (Lisina, Metionina Y Treonina) en el crecimiento y acabado de cuyes machos (Cavia porcellus) genotipo Perú – Ayacucho, 2750 m.s.n.m. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga [Internet]. 2017 [citado 9 de agosto de 2022]; Disponible en: http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2645

60. G367: Tema 4. Regulación de la osmolaridad y del volumen de los líquidos corporales [Internet]. [citado 9 de agosto de 2022]. Disponible en: https://ocw.unican.es/mod/page/view.php?id=561

61. Gómez AM, Carrillo DCH, Tapoada L, Toro MR del. Relevancia del monitoreo continuo de glucosa en la práctica clínica: revisión de la evidencia. Revista Colombiana de Endocrinología, Diabetes & Metabolismo. 17 de agosto de 2018;5(3):33-42.

62. Antibióticos en cultivo celular ¿Amigos o enemigos? [Internet]. [citado 17 de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.labclinics.com/2018/08/07/antibioticos-cultivo-celular/

63. Uam/Sinc, Razón L. Los antibióticos matan al medio ambiente [Internet]. La Razón. 2013 [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.larazon.es/sociedad/medio-ambiente/los-antibioticos-matan-al-medio-ambiente-DX2550041/

64. Gutiérrez P, Javier F. Caracterización de suero fetal bovino obtenido de la industria cárnica para cultivo celular. 23 de mayo de 2022 [citado 9 de agosto de 2022]; Disponible en: http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/2295

65. 15Tecnicas_de_Cultivos_Celulares_e_Ingenieria_de_Tejidos.pdf [Internet]. [citado 11 de mayo de 2022]. Disponible en: http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Tecnicas_de_Cultivos_Celulares_e_Ingenieria_de_Tejidos.pdf

66. Pardo VMR. Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación. Universitas Scientiarum. 10 de enero de 2005;10(1):5-14.

67. Pazhanisamy S. Stem Cell Markers. Materials and Methods [Internet]. 29 de enero de 2022 [citado 6 de abril de 2022]; Disponible en: https://www.labome.com/method/Stem-Cell-Markers.html

68. Panel de marcadores de células madre embrionarias (humano: Oct4, Nanog, Tra-1-60 (R), SOX2, SSEA4) (ab109884) [Internet]. [citado 6 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.abcam.com/embryonic-stem-cell-marker-panel-human-oct4-nanog-tra-1-60-r-sox2-ssea4-ab109884.html

69. Mata-Miranda M, Vázquez-Zapién GJ, Sánchez-Monroy V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. Perinatología y reproducción humana. enero de 2013;27(3):194-9.

70. Gallego-Pinazo R, Pinazo-Durán MD, Serrano M. El ciclo celular y el gen p53: Aproximación a la oftalmología molecular. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. julio de 2010;85(7):229-31.

71. Huret JL, Dessen P, Bernheim A. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, year 2003. Nucleic Acids Res. 1 de enero de 2003;31(1):272-4.

72. Quintela Senra D, López Sáez JJB, Senra Varela A. La proteína p53 y el cáncer de mama. Revisión crítica. Rev Senol Patol Mamar. 1 de abril de 2001;14(2):71-7.

73. Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ. Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. Cell. febrero de 1982;28(2):387-94.

74. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science. 6 de abril de 1990;248(4951):76-9.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

75. Genes del Cáncer [Internet]. CancerQuest. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/genes-de-cancer

76. Quimica.es. P53 [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.quimica.es/enciclopedia/P53.html

77. El gen p53 actúa como sensor molecular de estrés metabólico y puede conducir al envejecimiento celular [Internet]. El médico interactivo. 2013 [citado 29 de enero de 2022]. Disponible en: https://elmedicointeractivo.com/gen-p53-actua-sensor-molecular-estres-metabolico-y-puede-conducir-envejecimiento-celular-20130123155525096091/

78. Chuaire-Noack L. p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. Revisión. Investigación Clínica. 2008;34.

79. Cooper GM. Oncogenes. Edición: 2. Boston: Jones & Bartlett Learning; 1995. 384 p.

80. Uribe LPG. Estrés oxidativo, daño al ADN y cáncer. Universidad de Cartagena; 2015.

81. Sionov RV, Hayon IL, Haupt Y. The Regulation of p53 Growth Suppression [Internet]. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [citado 5 de junio de 2020]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6412/

82. El factor de transcripción p53 | Biología molecular del cáncer | Genética Molecular [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponible en: http://genetica.rua.unam.mx/data/ZVDS8TS9.HTM

83. Harvey Lodish / Arnold Berk / Chris A. Kaiser / Monty Krieger / Anthony Bretscher / Hidde Ploegh / Angelika Amon / Matthew P. Scott. Biología Celular y Molecular [Internet]. 2016 [citado 6 de junio de 2020]. Disponible en: https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/5505/Biologia-Celular-y-Molecular.html

84. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. EMBO J. mayo de 1990;9(5):1595-602.

85. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res. 1 de diciembre de 1991;51(23 Pt 1):6304-11.

86. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. Ann N Y Acad Sci. junio de 2000;910:121-37; discussion 137-139.

87. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature. 2 de julio de 1992;358(6381):15-6.

88. Cómo bloquean la división celular los genes supresores de tumores [Internet]. 2017 [citado 13 de mayo de 2022]. Disponible en:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

https://www.youtube.com/watch?v=lTVxTdrqkxA

89. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell. 19 de noviembre de 1993;75(4):817-25.

90. Reverse Transcription - PE [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/pcr/reverse-transcription.html

91. Tamaño de aplicon - Niveles transcripcionales y proteicos de fibromodulina en líneas celulares [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponible en: https://1library.co/article/tama%C3%B1o-amplicon-niveles-transcripcionales-proteicos-fibromodulina-l%C3%ADneas-celulares.zwvnk6gq

92. Tratamiento del sarcoma de tejido blando infantil (PDQ®)–Versión para pacientes - NCI [Internet]. 2007 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.cancer.gov/espanol/tipos/sarcoma-de-tejido-blando/paciente/tratamiento-tejido-blando-infantil-pdq

93. Instituto Nacional del Cáncer. Definición de RT-PCR - Diccionario de cáncer del NCI [Internet]. 2011 [citado 7 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/rt-pcr

94. Oliva-Menacho JE, Arroyo-Acevedo JL, Oliva-Candela JA, García-Hjarles MA. Patrones de tinción de anticuerposantinucleares identificados por Inmunofluorescencia indirecta en pacientes con enfermedad del tejido conectivo. Revista Medica Herediana. enero de 2019;30(1):33-9.

95. Pierre. Inmunofluorescencia - Técnica que se utiliza para la detección de estructuras [Internet]. StuDocu. [citado 31 de enero de 2022]. Disponible en: https://www.studocu.com/pe/document/universidad-privada-antenor-orrego/inmunologia-general/pierre-inmuno/4388373

96. Diferencia entre la inmunofluorescencia directa e indirecta / Inmunología [Internet]. La diferencia entre objetos y términos similares. [citado 31 de enero de 2022]. Disponible en: https://es.sawakinome.com/articles/immunology/difference-between-direct-and-indirect-immunofluorescence.html

97. Inmunofluorescencia directa - Parc de Salut Mar [Internet]. [citado 30 de enero de 2022]. Disponible en: https://www.parcdesalutmar.cat/es/dermatologia/tecniques-diagnostiques/immunofluorescencia/

98. Inmunofluorescencia indirecta - Hoogstra - Centros Medicos [Internet]. Hoogstra - Medical Centers. [citado 31 de enero de 2022]. Disponible en: https://doctorhoogstra.com/en/wiki/inmunofluorescencia-indirecta/

99. Castillo P, Cecilia N. Evaluación del estatus de p53 y su relación con la expresión de TLR3 en células prostáticas malignamente transformadas in vitro con arsenito de sodio. 1 de agosto de 2020 [citado 9 de agosto de 2022]; Disponible en:

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/7105

100. Azul de Tripan | PDF | Tinción | Microscopía [Internet]. Scribd. [citado 23 de julio de 2022]. Disponible en: https://es.scribd.com/document/505668074/azul-de-tripan

101. Alvarez EML. Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación en odontología. :27.

102. curioso E. Lactato deshidrogenasa: Función y estructura [Internet]. El Gen Curioso. [citado 23 de julio de 2022]. Disponible en: https://www.elgencurioso.com/diccionario/lactato-deshidrogenasa/

103. Mecanismos celulares de prevención y respuesta a daño [Internet]. [citado 23 de julio de 2022]. Disponible en: https://1library.co/article/mecanismos-celulares-de-prevenci%C3%B3n-y-respuesta-a-da%C3%B1o.y64md0nq

104. Pruebas de citotoxicidad - EUROLAB [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.eurolab.com.tr/es/testler/medikal-tibbi-cihaz-performans-testleri/sitotoksisite-testleri

105. Ensayo de citotóxicidad - MATERIALES Y MÉTODOS [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://1library.co/article/ensayo-de-citot%C3%B3xicidad-materiales-y-m%C3%A9todos.zlnv3krq

106. Tetrazolio - Informe de Libros - meky22 [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.clubensayos.com/Ciencia/Tetrazolio/1120598.html

107. espowiki. Formazan [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://espowiki.com/formazan

108. ¿Qué es una placa de 96 pocillos? - BALLYA [Internet]. https://ballyabio.com/es/. [citado 18 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://ballyabio.com/es/%C2%BFQu%C3%A9-es-una-placa-de-96-pocillos%3F/

109. Devlin TM. Bioquímica con aplicaciones clínicas. Volumen 1: Libro de texto con aplicaciones clínicas. Reverte; 2021. 556 p.

110. Casal JF, Herrero C, Cabezas B, Abalde J, Liaño R. Incorporación de los isótopos radiactivos timidina-3H, uridina-3H, glucosa-14C y leucina-3H a través del ciclo celular de la microalga marina «Tetraselmis suecica». Acta científica compostelana: revista de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Santiago de Compostela. 1986;(1-2):69-78.

111. ¿Cómo funciona la secuenciación de Illumina? / Ciencia [Internet]. La diferencia entre objetos y términos similares. [citado 5 de agosto de 2022]. Disponible en: https://es.sawakinome.com/articles/science/how-does-illumina-sequencing-work.html

112. Secuenciación del ADN [Internet]. Genome.gov. [citado 8 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN

113. López De Heredia Larrea U. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

de la diversidad biológica. Munibe Ciencias Naturales. 2016;64:7-31.

114. Construcción y secuenciación de bibliotecas de ADNC. [Internet]. [citado 8 de agosto de 2022]. Disponible en: https://1library.co/article/construcci%C3%B3n-y-secuenciaci%C3%B3n-de-bibliotecas-de-adnc.q5w9kxgq

115. Secuenciación del ADN [Internet]. Genome.gov. [citado 8 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN

116. Genotipia. La aplicación de la secuenciación masiva de exoma completo para el estudio de la evolución clonal en leucemia [Internet]. Genotipia. [citado 18 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://genotipia.com/genetica_medica_news/evolucion-clonal-leucemia/

117. Diferencia entre dNTP y DdNTP | Compare la diferencia entre términos similares [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://locandadellangelo.net/difference-between-dntp-and-ddntp/

118. Christina Swords. Secuenciación de ADN: tecnologías para leer el código de la vida [Internet]. Nebula Genomics Blog. 2021 [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://nebula.org/blog/es/secuencia-adn/

119. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. Univ Med [Internet]. 2 de abril de 2020 [citado 8 de agosto de 2022];61(2). Disponible en: https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/27461

120. Iriarte CGT, Ramírez OR, García AM, Terán SLV, Clavel JFG. Aislamiento de células mesenquimales del ligamento periodontal de premolares extraídos. Método simplificado. Rev Odont Mex. 20 de enero de 2017;21(1):13-21.

121. Louis KS, Siegel AC. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. En: Stoddart MJ, editor. Mammalian Cell Viability [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [citado 9 de mayo de 2022]. p. 7-12. (Methods in Molecular Biology; vol. 740). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-108-6_2

122. Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. J Cell Sci. 15 de septiembre de 2007;120(Pt 18):3163-72.

123. Gil M. Buffer de fosfatos (PBS): fundamento, preparación y usos [Internet]. Lifeder. 2019 [citado 8 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.lifeder.com/buffer-fosfatos/

124. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Briefings in Bioinformatics. 1 de marzo de 2013;14(2):178-92.

125. Extracción de ARN total de biopsias de piel [Internet]. [citado 8 de agosto de

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2022]. Disponible en: https://1library.co/article/extracci%C3%B3n-de-arn-total-de-biopsias-de-piel.6qm7wp9q

126. González MS, Rosales JML. Técnicas de secuenciación masiva (NGS). 2018.

127. Transcriptoma [Internet]. Genome.gov. [citado 5 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Transcriptoma

128. mRNA Sequencing | A comprehensive view of the coding transcriptome [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/mrna-seq.html

129. Secuenciación de ARN-principio, pasos, métodos y aplicaciones | Mark's Trackside [Internet]. [citado 8 de agosto de 2022]. Disponible en: https://markstrackside.com/es/secuenciación-de-arn-principio-pasos-métodos-y-aplicaciones/

130. Illumina. Panel de expresión genética humana de transcriptoma AmpliSeq™ for Illumina [Internet]. Disponible en: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/ampliseq-transcriptome-panel-data-sheet-770-2017-031-translations/ampliseq-transcriptome-panel-data-sheet-770-2017-031-esp.pdf

131. Valdelamar LMM, Díaz AS. Secuenciación de fragmentos de ADN. :20.

132. Saucedo-de la Llata E, López-Reyes JJ, Moraga-Sánchez MR, Romeu-Sarrió A, Carmona-Ruiz IO, Saucedo-de la Llata E, et al. Fragmentación del ADN espermático: situación actual. Ginecología y obstetricia de México. 2017;85(3):164-89.

133. PCR cuantitativa en tiempo real para la amplificación de ADN de Burkholderia mallei: comparación con el método molecular recomendado por la OIE [Internet]. [citado 9 de agosto de 2022]. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712017000200085

134. Artedinamico. Incubadora de CO2 [Internet]. Equipos y laboratorio de Colombia. equiposylaboratorio.com; [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/incubadora-de-co2

135. Portela R. Cultivos celulares y su utilidad clínica [Internet]. Ciencia y Biología. 2021 [citado 17 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://cienciaybiologia.com/cultivos-celulares-y-su-utilidad-clinica/

136. SNP - NCBI [Internet]. [citado 2 de junio de 2022]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=tp53+chr+17%3A+7675089

137. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Cells Isolated from Human Periapical Cysts Express Mesenchymal Stem Cell-like Properties. Int J Biol Sci. 2013;9(10):1070-8.

138. Camejo Suarez MaV. Aislamiento y caracterización de las Células Madre Mesenquimales de la pulpa dentaria humana. [citado 13 de mayo de 2022]; Disponible

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

en: https://www.actaodontologica.com/ediciones/2013/3/art-4/

139. Olávez D, Salmen S, Padrón K, Lobo C, Díaz N, Berrueta L, et al. Isolation and Culture of Postnatal Stem Cells from Deciduous Teeth. Univ Odontol [Internet]. 8 de septiembre de 2014 [citado 13 de mayo de 2022];33(70). Disponible en: http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/5870

140. Trejo Iriarte CG, Ramírez Ramírez O, Muñoz García A, Verdín Terán SL, Gómez Clavel JF, Trejo Iriarte CG, et al. Aislamiento de células mesenquimales del ligamento periodontal de premolares extraídos. Método simplificado. Revista odontológica mexicana. marzo de 2017;21(1):13-21.

141. Zhang W, Walboomers X f., Wolke J g. c., Bian Z, Fan M w., Jansen J a. Differentiation Ability of Rat Postnatal Dental Pulp Cells in Vitro. Tissue Engineering. marzo de 2005;11(3-4):357-68.

142. Huang AHC, Chen YK, Chan AWS, Shieh TY, Lin LM. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. J Endod. mayo de 2009;35(5):673-81.

143. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. J Endod. junio de 2007;33(6):703-8.

144. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences. 5 de diciembre de 2000;97(25):13625-30.

145. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death Differ. junio de 2007;14(6):1162-71.

146. Angulo Bustos WA. Estandarización de un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de células primarias de queratinocitos in vitro. :60.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CONCENTIMIENTO INFORMADO

FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Tìtulo del Estudio	**:**	**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN P53 Y KI 67 EN CÉLULAS MADRE AISLADAS Y CULTIVADAS A PARTIR DE QUISTE RADICULAR INFLAMATORIO.**
Nº de Protocolo	**:**	**01**
Investigador Responsable	**:**	**Mg: Francis Wendell Jácobo Valdivia.** **Dr. Julio Cesar Bernabé Ortiz** **Dra. Muñoz del carpio Toia Agueda Rossangella** **Dr. Ivo palomino Valverde** **Dr. Javier Valero Quispe**
Lugar en que se realizará el estudio (Dpto, Sede, Facultad, etc)	**:**	**Pais: Perú** **Departamento de Arequipa** **Universidad: Universidad católica de Santa María.** **Facultad: Odontología**
Unidad Académica	**:**	**Investigación**
Nº de teléfonos asociados al estudio	**:**	**941274503**

Este formulario de consentimiento puede tener palabras que Usted no entienda, por favor debe solicitar al investigador o persona responsable del estudio que le clarifique cualquier palabra o duda que se le presente. Usted tiene derecho a una copia de este formulario de consentimiento para pensar sobre su participación en este estudio o para discutirlo con familiares, amigos antes de tomar una decisión.

El propósito de este documento es ayudarle a tomar una decisión informada para decidir participar y brindar la muestra al estudio denominado "EXPRESIÓN DE P53 EN CULTIVO DE CÉLULAS MADRE AISLADAS A PARTIR DE QUISTE RADICULAR INFLAMATORIO".

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CONCENTIMIENTO INFORMADO

I.- INTRODUCCIÓN:

Antes que Usted decida participar en el estudio lea cuidadosamente este formulario y haga todas las preguntas que tenga, para asegurar que entienda los procedimientos del estudio, riesgos y beneficios; de tal forma que Usted pueda decidir voluntariamente si desea participar o no. Si luego de leer este documento tiene alguna duda, pida al investigador responsable o personal del estudio que le explique, sienta absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayuda a aclarar sus dudas. Ellos/as le deberán proporcionar toda la información que necesite para entender el estudio.

Una vez que haya comprendido el estudio y si Usted desea participar, entonces se le solicitará que firme esta forma de consentimiento, del cual recibirá una copia firmada y fechada.

II.- PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Explicar brevemente y de manera simple las razones para realizar este estudio. Describir los criterios para participar en el estudio.

El estudio brindara información sobre la técnica de aislamiento y cultivo de células madre.

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. (*Dar razones de carácter médico y social*).

IV. OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos

El objetivo de esta investigación será realizar el cultivo de células madre y procedimientos biomoleculares en el laboratorio de la UCSM

(*La información deberá estar acotada en un lenguaje que sea claro para una persona sin conocimientos médicos, deberá detallar los objetivos y los resultados esperados*).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CONCENTIMIENTO INFORMADO

V.- PARTICIPANTES DEL ESTUDIO:

5.1.- Indicar quién forma parte de este estudio, describir criterios de inclusión y exclusión de participantes.

Criterios de Inclusión
Pacientes de 12 a 80 años
Pacientes con presencia de quiste radicular
Tratamiento quirúrgicos de extirpación del quiste.

Criterios de Exclusión

Paciente en tratamientos endodónticos
Pacientes menores de 12 años

VI.- PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO:

6.1.- ¿Qué me harán en este estudio? Especificar la condición en la cual se participa, indicar responsabilidades del sujeto.

1. **Se someterá a un procedimiento quirúrgico para la extracción del quiste radicular**
2. **La muestra será llevada al laboratorio de investigación de la escuela de post grado de la universidad católica de santa maría.**
3. **La muestra será sometida para obtener la replicación y cultivo de células madre para su estudio**
4. **La muestra de células se teñirá con el marcador para p53**

6.2. ¿Cuáles serán los procedimientos de investigación en que participaré si decido entrar en el estudio?

Solamente durante la intervención y extracción de la muestra del quiste radicular.

6.3.- Especificar todas las actividades en que involucra la participación, especificar aquellas que pueden causar molestias, o aquellas que pudiesen causar algún grado de molestias.

Obtención de la muestra.

6.4.- Especificar la duración del proyecto

2años

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

VII. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

***Explicar brevemente los beneficios esperados. Si existen estudios anteriores o alternativos, hacer referencia a ellos en este capítulo con la intención de ampliar la información*. En caso de no existir beneficios individuales para el participante, informar como contribuye el mismo con su participación en el estudio.**

Este estudio tiene el beneficio de producir conocimiento científico para la parte académica como universidades, docentes, estudiantes y pacientes

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha observado que no hay mucha bibliografía respecto a la investigación que se pretende realizar.

VIII. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

A juicio de los investigadores el estudio no implica ningún tipo de riesgo físico o psicológico para Usted. Sus respuestas no le ocasionarán ningún riesgo ni tendrán consecuencias de ninguna naturaleza ya que solamente se trabajará con la muestra obtenida.

Este estudio consta de las siguientes fases:

1. **Muestra y selección de la muestra**
2. **Evidencias radiográficas**
3. **Obtención de la muestra**
4. **Aislamiento y cultivo**
5. **Inmunofluorescencia p53**

Posterior a la extracción del quiste radicular se puede presentar *dolor* en el tratamiento post operatorio por ser una lesión infecciosa

La segunda parte del estudio se aplicará a la muestra para su estudio.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CONCENTIMIENTO INFORMADO

IX.- BENEFICIOS

Es probable que Usted no reciba ningún beneficio personal por participar en este estudio.

Su enfermedad, condición, síntomas, fenómeno social, podrían mejorar como resultado de su participación en este estudio.

Este estudio tiene el beneficio de producir conocimiento científico para para la sociedad y la academia

Los hallazgos que arroje la investigación podrían aportar a la ciencia para un mejor tratamiento para el futuro de esta condición.

X.- INCENTIVOS PARA EL PARTICIPANTE

No contempla por el hecho del trabajo es sobre la misma muestra.

XI.- CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO INFORMACIÓN

Los resultados de la investigación serán manejados de modo abierto para el público en general del campo científico sin mencionar los nombres y apellidos permitiendo su confidencialidad

Solamente, el investigador Francis Wendell Jácobo Valdivia, tendrán acceso a los datos en que puedan identificar al participante (directa o indirectamente), los miembros del equipo de investigación. No divulgaremos ninguna información de Usted o proporcionada durante la investigación. Cuando los resultados de la investigación sean publicados o se discutan en conferencias científicas, no se incluirá información que pueda revelar su identidad. Toda divulgación de la información obtenida se realizará con fines científicos y/o pedagógicos

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CONCENTIMIENTO INFORMADO

XII.- VOLUNTARIEDAD

Su participación es en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede decidir participar o no en este proyecto, su decisión de participar o no en este proyecto no afectará la atención que puede seguir recibiendo. (o su relación actual o futura con la Universidad Católica de Santa María).

Usted podrá retirarse de la investigación en cualquier momento, sin sanción o pérdida de beneficios a los que tendría derecho, retirarse no tiene ninguna consecuencia para Usted.

Usted podrá solicitar información relacionada con el proyecto de investigación en el momento que lo estime al Investigador Responsable, Sr Francis W. Jácobo Valdivia Teléfono 941274503 correo electrónico frawe_18@hotmail.com

XIII.- PREGUNTAS/INFORMACIÓN:

Usted tiene derecho a clarificar todas las dudas que se le presenten, podrá solicitar información más detallada sobre la investigación o algún tema relacionado con el estudio, en el momento que desee, debe comunicarse con el investigador principal Sr Francis W. Jácobo Valdivia Teléfono 941274503

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

Cuando ocurran cambios en las condiciones o en los procedimientos de un estudio y también en estudios de largo plazo, el investigador responsable deberá Renovar el Consentimiento.

XVI. DERECHOS DE LOS PARTICIPANTES

He leído, comprendido y discutido la información anterior con el investigador responsable del estudio y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.

Mi participación en este estudio es voluntaria, podré renunciar a participar en cualquier momento, sin causa y sin responsabilidad alguna.

Si durante el transcurso de la investigación, surge información relevante para continuar participando en el estudio, el investigador deberá entregar está información.

He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos y/o educativos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Si durante el transcurso de la investigación me surgen dudas respecto a la investigación o sobre mi participación en el estudio, puedo contactarme cone el investigador responsable, Sr Francis W. Jácobo Valdivia teléfono 941274503 correo electrónico frawe_18@hotmail.com

Acepto participar en este estudio de investigación titulado "EXPRESIÓN DE P53 EN CULTIVO DE CÉLULAS MADRE AISLADAS A PARTIR DE QUISTE RADICULAR INFLAMATORIO"



Firma del participante o del padre o tutor Fecha

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis