

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE (STEM CELLS) DE LA  
PULPA DENTAL DE PREMOLARES HUMANOS, CLÍNICA  
ODONTOLÓGICA, UCSM, AREQUIPA 2012**

Tesis presentada por el Bachiller:

**CHRISTIAN VÍCTOR CALDERÓN MOYA**

Para optar por el Título Profesional de:

**CIRUJANO DENTISTA**

**AREQUIPA-PERU**

**2012**

## ***Dedicatoria***

### ***A Dios:***

*Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte durante la realización de mi trabajo de investigación.*

### ***A mi mamá Zaida:***

*Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien y me ha formado como un profesional que siempre busca nuevos conocimientos para el servicio de sus pacientes, pero más que nada, por su amor.*

### ***A mi papá Victor Hugo:***

*Por sus virtudes de perseverancia, de entrega al trabajo, de constancia, de bondad que lo caracterizan; que me han iluminado siempre, por el ejemplo mostrado para vencer los obstáculos y salir adelante.*

## ÍNDICE

Dedicatoria .....	01
Índice .....	02
Resumen .....	05
Abstract .....	06
Introducción .....	07
Capítulo I: Planteamiento Teórico .....	09
I. Planteamiento Teórico .....	09
1. Problema de Investigación .....	09
1.1 Enunciado .....	09
1.2 Descripción del Problema .....	09
a. Área del Conocimiento .....	10
b. Operacionalización de Variables .....	10
c. Interrogantes Básicas .....	11
d. Taxonomía de la Investigación .....	11
1.3 Justificación .....	11
2. Objetivos .....	12
3. Marco Teórico .....	13
3.1 Marco Conceptual .....	13
<b>Pulpa Dentaria</b> .....	13
Citología Pulpar .....	14
Elementos Estructurales .....	15
Elementos Extracelulares .....	20
Funciones .....	21
<b>Células Madre</b> .....	23
Definición .....	23
Clasificación .....	24
Propiedades .....	31
Aplicaciones Clínicas en Odontología .....	31
Análisis y Síntesis de la Células Madre .....	38
3.2 Antecedentes Investigativos .....	39

4. Hipótesis .....	42
Capítulo II: Planteamiento Operacional .....	43
II Planteamiento Operacional .....	43
1. Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación .....	43
1.1 Técnica .....	43
1.2 Instrumentos .....	43
a. Documental .....	43
b. Instrumental .....	43
c. Materiales .....	43
2.3 Procedimiento Laboratorial .....	44
2.4 Diagramación Operativa .....	48
2. Campo de Verificación .....	49
2.1 Ubicación Espacial .....	49
2.2 Ubicación Temporal .....	49
2.3 Unidades de Estudio .....	49
3. Estrategias de Recolección .....	50
3.1 Organización .....	50
3.2 Recursos .....	50
a. Humanos .....	50
b. Físicos .....	50
c. Económicos .....	50
d. Institucional .....	51
3.3 Validación del Instrumento .....	51
4. Estrategias para Manejar los Resultados .....	51
4.1 Plan de Procesamiento .....	51
4.2 Plan de Análisis .....	52
5. Cronograma de Trabajo .....	53
Capítulo III: Resultados .....	54
III Resultados .....	54
Procesamiento de los Datos y Análisis .....	54
Tablas y Gráficos .....	64

Discusión .....	65
Conclusiones .....	67
Recomendaciones .....	68
Bibliografía .....	69
Hemerografía .....	69
Informatografía .....	73
Anexos .....	73
Modelo de Instrumento .....	74
Consentimiento Informado .....	75
Matriz de Sistematización .....	76
Solicitud de Permiso para la Recolección de Muestras .....	77
Secuencia Fotográfica .....	78

## RESUMEN

El presente estudio cuasi experimental de diseño laboratorial tiene como propósito obtener células madre del tejido pulpar de premolares humanos.

La muestra estuvo conformada por 20 unidades de análisis del tejido pulpar de 20 premolares que fueron recolectados en pacientes de ambos géneros con edades comprendidas entre los 10 y 18 años, que asisten a la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Católica de Santa María.

El procedimiento laboratorial implica una técnica rigurosa y aséptica que se inició de inmediato a la exodoncia dentaria, luego se obtuvo el tejido pulpar, a partir del cual con el uso de la enzima tripsina y con el proceso de centrifugación se logró la separación de células de nuestro interés y luego se procedió al cultivo celular en los medios adecuados, siendo necesario después de la segunda semana realizar la tripsinización o separación de las células madre de su adherencia a la superficie plástica, para luego seguir con su cultivo durante la tercera y cuarta semana en forma selectiva.

El análisis de las células madre con el microscopio óptico invertido a las 24 horas del procedimiento laboratorial, permitió observarlas de forma ovoide. Después de los 7 días de cultivo ocurrió una estabilización celular y se observaron de forma fibroblastoide, características morfológicas propias de las células madre.

Durante el procedimiento de cultivo celular, a las 24 horas se logró un 20% de presencia celular, en la primera semana de cultivo se obtuvieron 40% de crecimiento celular y en la segunda semana se logró un 80 % de confluencia celular.

Constituyendo el tejido pulpar una de las principales fuentes de células madre o células troncales, los resultados demuestran que si es posible obtener estas células de premolares humanos.

**Palabras Clave:** cultivo de células madre, pulpa dental de premolares.

## ABSTRACT

The presentquasi-experimental study of laboratory design aims to obtain stem cells from pulp tissue of human premolars.

The simple consisted of 20 analysis units of pulptissue of 20 premolars that were collected on patients of both genders aged between 10 and 18 years, that was attendingthe Dental Clinic of the Faculty of Dentistry at the Catholic University of Saint Mary.

The laboratory procedure involves a rigorous and aseptic technique that was initiated immediately after the extraction, then the pulp tissue was obtained, from which with the use of the enzyme trypsin and the centrifugation process was achieved the cell separation of our interest and then proceeded to the cell culture in appropriate ways, being necessary after the second week performing the trypsinization or separation of stem cells from their adherence to the plastic surface, and then continue with his cropduring the third and fourth weekin a selectively way.

The analysis of stem cells with the inverted optical microscopeafter 24 hours of laboratory procedure allowed to observed in an ovoid form. After 7 days of cell cultivation occurred a celular stabilization and wasobserved in anfibroblastoid shape, morphology own characteristic of stem cells.

During the process of cell cultura of 100% of the obtained stem cells, at 24 hours was achieved a 20% cell presence, in the first week of culture was obtained 40% of cell growth and in the second week was achieved a 80% of cell confluence.

Pulp tissue constituting one of the main sources of stem cells, the results show that it is possible to obtain these cells from human premolars.

**Keywords:** stem cells culture, dental pulp premolars.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años las células madre o troncales han pasado de ser un concepto de interés científico principalmente en el campo de la biología e ingeniería de tejidos, a ocupar artículos científicos resultado de investigaciones relevantes.

Los conocimientos sobre células madre en el campo de la odontología que se experimentan de forma casi diaria, han dado origen a nuevas expectativas para la ciencia dirigidas al tratamiento de múltiples enfermedades humanas hasta hoy de imposible o difícil resolución.

En la actualidad existen estudios que han comprobado la posibilidad de reconstruir un diente y sus partes, no perfectamente en su apariencia pero si en su estructura interna, lo que significa que en un futuro no lejano los pacientes pueden tener dientes en las partes edéntulas de su boca sin necesidad del uso de aparatos protésicos, así mismo si es necesario el tratamiento de una lesión cariosa amplia y profunda, se podrá recuperar los tejidos perdidos sin necesidad del uso de restauraciones dentales y si se compromete el tejido pulpar, no sería necesario realizar un tratamiento de endodoncia, la elaboración de un espigo y/o corona.

La historia de las células madre se inicia en la década de los 80 cuando un grupo de investigadores lograron obtener su cultivo procedente de embriones de ratones. En 1988 científicos de la universidad de Wisconsin (USA), obtuvieron células madre embrionarias humanas. Desde el año 1989 se usan células madre del cordón umbilical, médula ósea, tejido adiposo, sangre y otros tejidos humanos para el tratamiento de más de 75 enfermedades malignas y no malignas. Las células madre adultas se encuentran en los diferentes órganos del cuerpo y su misión es reparar los daños que sufren las células o los tejidos.

En odontología son múltiples también las aplicaciones de las células madre obtenidas hasta hoy de la pulpa dental, ligamento periodontal, papila apical y germen dental. Por su capacidad extraordinaria de autoregeneración pueden dar

origen a diferentes tipos celulares, con la posibilidad de regenerar tejido óseo del complejo cráneo facial para reparar defectos producidos por enfermedades degenerativas, pueden ser una alternativa para el tratamiento de deficiencias mandibulares en pacientes con maloclusión por micrognatismo mandibular, pueden tener el potencial de diferenciarse en odontoblastos, generar estructuras similares a la dentina con fibras colágenas y superficie mineralizada, pueden tener capacidad de regenerar pulpa dental y hacer frente a la agresión que experimenta este tejido por estímulos nocivos.

El propósito de la presente investigación es lograr el aislamiento de las células madre de la pulpa dental de premolares humanos extraídos por indicación ortodóntica y proceder a su cultivo para su proliferación; con la posibilidad a futuro de realizar otras investigaciones donde se puedan regenerar tejidos dentales como dentina y pulpa.

La investigación ha sido organizada en tres capítulos: el capítulo I es el planteamiento teórico, el capítulo II es el planteamiento operacional y el capítulo III evidencia los resultados, los cuales responden de manera inherente a cada uno de los objetivos. Luego presentamos la discusión, en la que se resalta algunas particularidades de la técnica laboratorial y algunas características propias de las células madre durante su cultivo, que se relacionan con los resultados obtenidos en otras investigaciones similares para contrastarlos con nuestros hallazgos, luego se formulan las conclusiones en relación directa a los objetivos e hipótesis. Se presentan las recomendaciones que se originan de los resultados orientadas al aporte desde la perspectiva de la ciencia para la profesión, los estudiantes y la institución universitaria. Finalmente se presenta la bibliografía, hemerografía, informatografía y los anexos.

## I PLANTEAMIENTO TEÓRICO

### 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1 Enunciado

“AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE (STEM CELLS) DE LA PULPA DENTAL DE PREMOLARES HUMANOS, CLÍNICA ODONTOLÓGICA, UCSM, AREQUIPA 2012”

#### 1.2 Descripción del Problema

Las células madre se definen como células clonogénicas con capacidad de autorrenovación y diferenciación, son células no especializadas que se renuevan durante largos periodos de tiempo por división celular y son capaces de una diferenciación celular específica; lo cual hace posible su diferenciación por un estímulo adecuado en células con funciones especiales como miocitos, osteoblastos, odontoblastos, etc.

Los antecedentes investigativos sobre el área dental reportan el aislamiento de las células madre a partir de órganos dentales recientemente extraídos (premolares), las células madre obtenidas de esta manera pueden formar estructuras que parecen complejos pulpa-dentina y ligamento periodontal-cemento radicular. Son capaces también de estimular la formación de tejido óseo por lo que pueden aplicarse en la regeneración ósea - craneo-facial.

El estudio de las células madre permite iniciar líneas de investigación en el área biomédica y dental por su facilidad de obtención y factibilidad de expandir el cultivo in vitro para su posterior utilización terapéutica, que convierten a las células madre en candidatos ideales para investigar el área de regeneración tisular, ingeniería de tejidos y terapia celular.

El propósito de la presente investigación es la obtención de células madre derivadas de la pulpa dental de premolares de pacientes jóvenes con indicación

de exodoncia por tratamiento ortodóntico para su posterior cultivo y supervivencialaboratorial, que puede ser utilizado a futuro en necesidades médico y/o dentales del paciente donante.

**a) Área del Conocimiento:**

Área general: Ciencias de la Salud

Área específica: Odontología

Especialidad: Histología y Embriología Dental

Línea o Tópico: Biología Molecular

**b) Operacionalización de las Variables**

VARIABLE ÚNICA	INDICADOR	SUBINDICADOR
Células Madre de la Pulpa Dental de Premolares	Lavado Celular	Suero Fetal Bovino al 10%
		Tiempo: 3 minutos
	Digestión Celular	Solución de 3mg/mL de Tripsina al 0,25 %
		Temperatura 37° C
		4.5 g/L Glucosa L-Glutamina Piruvato de Sodio
		Tiempo: 10 minutos
	Proliferación de Células Madre	Multiplacas de cultivo con DMEM Suero Fetal Bovino (SFB) Solución de antibióticos:
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Penicilina 100 UI/mL</li> <li>• Estreptomicina 100µm/mL</li> <li>• Fungisona 0.3 µm/mL</li> </ul> Aminoácido no Esencial: Glutamina100 UI/mL
	Tripsinización de Células Madre	Tripsina al 0,25 %
		Tiempo: 2 a 5 minutos
Cultivo de Células Madre	Estufa de cultivo celular a 37°C y 5 % de CO <sub>2</sub>	
	Multiplacas de cultivo con DMEM Suero Fetal Bovino (SFB) Solución de antibióticos:	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Penicilina 100 UI/mL</li> <li>• Estreptomicina 100µm/mL</li> <li>• Fungisona 0.3 µm/mL</li> </ul> Aminoácido no Esencial: Glutamina100 UI/mL	
	Tiempo:4 semanas	

**c) Interrogantes Básicas**

1. Cómo es el procedimiento de lavado y digestión celular para seleccionar células madre en la pulpa dental de premolares humanos?
2. Cuál es el procedimiento para la proliferación de células madre en la pulpa dental de premolares humanos?
3. Cómo es el procedimiento de tripsinización celular para seleccionar células madre en la pulpa dental de premolares humanos?
4. Cómo se realizará el cultivo de células madre de la pulpa dental de premolares humanos?

**d) Taxonomía de la Investigación**

ABORDAJE	TIPOS DE ESTUDIO					DISEÑO	NIVEL
	Por la técnica de recolección	Por el tipo de dato	Por el número de mediciones de la variable	Por el número de muestras	Por el ámbito de recolección		
Cuantitativo	Cuasi Experimental	Prospectivo	Longitudinal	Descriptivo	De campo	Laboratorial	Cuasi Experimental

**1.3 Justificación**

La investigación justifica por las siguientes razones:

**a) Originalidad**

La investigación posee una originalidad específica, porque si bien reconoce antecedentes investigativos internacionales, en nuestro medio proponemos la obtención laboratorial de células madre obtenidas de la pulpa dental de premolares humanos, que servirán para continuar futuras investigaciones al respecto.

**b) Relevancia**

Desde la antigüedad el hombre busca solucionar los problemas dentales, adaptando y creando materiales que cada vez superan las exigencias de biocompatibilidad; sin embargo existe la posibilidad de restaurar los dientes

con la misma estructura dental. En un futuro cercano se podría reconstruir el diente y sus partes sin necesidad de restauraciones, el uso de prótesis removibles, prótesis fijas o implantes quedaría relegado. Es por esta razón que el presente estudio presenta relevancia científica por el cúmulo de nuevos conocimientos relacionados al problema. La relevancia práctica se refiere a soluciones futuras de alteraciones patológicas que puedan presentarse en boca recurriendo al empleo de células madre para la regeneración de los tejidos afectados por enfermedades en la cavidad bucal.

**c) Factibilidad**

La investigación es manejable porque se ha previsto de la disponibilidad de las muestras de análisis, la accesibilidad a las mismas, recursos laboratoriales, tiempo, literatura especializada, conocimiento éticometodológico y presupuesto económico.

**d) Otras Razones**

Motivación personal para investigar sobre el tema de interés, que a su vez se halla en concordancia con las políticas investigativas de la Facultad de Odontología de la UCSM.

## **2. Objetivos**

### **General**

Obtención de células madre de premolares humanos.

### **Específicos**

1. Realizar el procedimiento de lavado y digestión celular para seleccionar células madre en la pulpa dental de premolares humanos.
2. Inducir la proliferación de células madre en la pulpa dental de premolares humanos.
3. Realizar el procedimiento de tripsinización celular para seleccionar células madre de la pulpa dental de premolares humanos.
4. Cultivar las células madre obtenidas durante su proliferación de pulpas dentales de premolares humanos.

### 3. Marco Teórico

#### 3.1. Marco Conceptual

##### PULPA DENTARIA

###### a. Generalidades

La pulpa dentaria forma parte del complejo dentinopulpar, usualmente la dentina y la pulpa son desarrolladas por separado, principalmente porque la dentina es un tejido conectivo duro y la pulpa un tejido conectivo blando, pero ambas son embriológica, histológica y funcionalmente el mismo tejido y tienen su origen embrionario en el ectomesénquina.

La pulpa a nivel coronario, se aloja en una cámara pulpar rodeada por dentina que contiene extensiones o prolongaciones periféricas de las células que le dieron origen, a nivel radicular la pulpa está contenida dentro de los conductos radiculares e igualmente rodeada por dentina, por lo tanto cada órgano pulpar está compuesto por una pulpa coronaria localizada centralmente en las coronas y por una pulpa radicular localizada centralmente en las raíces de los dientes.

En dientes unirradiculares, los órganos pulpares son únicos y en dientes multirradiculares siguen la forma anatómica respectiva, no siempre rectos, su tamaño, forma y número es variable. Las porciones radiculares de los órganos pulpares se continúan con el tejido conectivo periapical a través del foramen o foramina apical, cuya localización y forma pueden experimentar cambios como consecuencia de influencias funcionales sobre los dientes.

La pulpa en un individuo joven posee un 25% de sustancia orgánica constituida por células, matriz extracelular representada por fibras y sustancia fundamental, lo restante está constituido en un 75% por agua, estas proporciones varían con la edad disminuyendo el porcentaje de agua y aumentando la cantidad de fibras.

Por lo expuesto se ha denominado a este conjunto con el nombre de complejopulpodentinario, debido a la íntima relación existente entre dentina y

pulpa.<sup>1</sup>

La pulpa dentaria es un tejido conectivo de tipo gelatinoso, ricamente vascularizado. Es uno de los tejidos conectivos blandos más primitivos del cuerpo ocupando la parte central del diente.<sup>2</sup>

## **b. Citología Pulpar**

Las células de la pulpa dentaria conservan la estructura común a todas ellas, están conformadas por un núcleo rodeado de citoplasma que contiene organelas e inclusiones y delimitadas por una membrana.

### **1. Núcleo**

Ubicado generalmente en el centro de la célula, muestra cromatina organizada en forma laxa compuesta por el ácido desoxirribonucleico (DNA), este material controla el comportamiento genético y metabólico de la célula. El núcleo está compuesto en su mayor parte por ácido ribonucleico (RNA), que es más abundante en células jóvenes, contiene además uno o varios elementos redondeados llamados nucléolos, que participan en la producción de proteínas y en el metabolismo del ácido nucleico. La cromatina y el núcleo están suspendidos en la sustancia fundamental llamada cariolinfa y limitadas por una membrana elástica que es la membrana nuclear.<sup>2</sup>

### **2. Citoplasma**

Rodea al núcleo y está limitado por la membrana plasmática o plasmalema, que es semipermeable y controla osmóticamente los cambios entre la célula y el medio circundante. En condiciones normales la membrana forma un límite ininterrumpido para la célula. En circunstancias adversas puede existir rupturas locales de la membrana por lesiones, éstas se reparan para evitar la pérdida excesiva del

---

<sup>1</sup>Moya de Calderón Zaida, *Plasma Rico en Plaquetas en Odontología*, pág. 17.

<sup>2</sup> Provenza Vincent D, *Histología y Embriología Odontológicas*, pág.56.

citoplasma.<sup>3</sup>

La mayoría de procesos metabólicos tienen lugar en el citoplasma, pero siempre están dirigidos por el núcleo.<sup>4</sup>

### **c. Elementos Estructurales de la Pulpa Dental**

La pulpa dental está conformada por cuatro zonas: odontoblástica, acelular o de Weil, celular y central.

#### **1. Zona Odontoblástica**

El estrato externo constituido por células en pulpa sana es la capa de odontoblastos, se encuentra localizada inmediatamente por debajo de la dentina.

Debido a que las prolongaciones o extensiones de los odontoblastos se ubican en el interior de los túbulos dentinarios de la dentina, la capa de odontoblastos está compuesta predominantemente por los cuerpos o somas de los odontoblastos, dispuestos en forma de empalizada y conectados entre sí por diferentes complejos de unión, que mantienen la integridad de la capa.<sup>5</sup>

Los odontoblastos son células específicas o típicas del tejido pulpar, alcanzan la cifra aproximada de 45,000 por mm<sup>3</sup> y disminuyen sensiblemente en la zona radicular. Su tamaño es mayor en la corona, semejando a células de un epitelio cilíndrico pseudoestratificado y menor en la raíz, semejando a células de un epitelio cilíndrico simple.

Los odontoblastos son células cilíndricas altas (40  $\mu$ ), con núcleos grandes de localización basal durante su máxima actividad secretora.<sup>6</sup>

---

<sup>3</sup>Borysenko Myrin et al, *Histología Funcional*, pág.26.

<sup>4</sup>Finn Genesser, *Histología Sobre Bases Moleculares*, pág.33.

<sup>5</sup>Arauzo Fernández P, *Estudio Histológico de los Componentes de la Pulpa Dental en Relación a la Edad, en Dientes Sanos Permanentes de Pacientes de 8-20, 30-50 y 60-80 Años del Distrito de Arequipa*, pág 28.

<sup>6</sup>Gómez de Ferraris M. y Campos Muñoz A, *Histología y Embriología Bucodental*, pág. 7.

El citoplasma es intensamente basófilo por su alto contenido en ácido ribonucleico (RNA), empleando microscopia electrónica analítica se han detectado importantes niveles de calcio, fósforo y azufre durante su fase secretora.

Estudios recientes detectaron la presencia de la proteína S-100 en el odontoblasto humano, vinculado con la actividad funcional y biológica intracelular del calcio.

Los odontoblastos ultraestructuralmente poseen un retículo endoplásmico rugoso y extenso, que ocupa gran parte del citoplasma. Tienen un complejo de golgi de localización supranuclear muy desarrollado, con gránulos de contenido filamentoso ordenados a manera de cuentas, el citoplasma posee también abundantes mitocondrias. En un odontoblasto joven (activo), la prolongación odontoblástica posee gránulos maduros y escasas organelas.

El odontoblasto y su prolongación con pequeñas ramificaciones laterales son los responsables de transportar y liberar a través de un mecanismo de exocitosis los gránulos maduros hacia el espacio extracelular, que contienen glucosaminoglucanos, glucoproteínas y precursores del colágeno, que son componentes básicos de la matriz orgánica de la dentina.

La prolongación citoplasmática del odontoblasto en el interior del túbulo dentinario varía de 0.3 mm a 0.7 mm, pero en ocasiones puede llegar a la unión amelodentinaria, situación asociada con el estado de maduración del diente.<sup>7,8</sup>

El odontoblasto maduro es una célula que contiene todos los elementos ultraestructurales, es altamente diferenciada, pero ha perdido la capacidad de dividirse. Los nuevos odontoblastos que se forman en los procesos reparativos de la dentina como respuesta a un estímulo o como respuesta al proceso de inflamación tienen su origen en células ectomesenquimales que provienen del tejido pulpar o de la sangre, los nuevos odontoblastos podrían también derivar de los fibroblastos pulpares. En este proceso juega un papel muy importante la fibronectina, como medidor en la diferenciación de las células ectomesenquimales.

<sup>7</sup>Walton Richard, *Endodoncia: Principios y Práctica Clínica*, pág. 34.

<sup>8</sup>Canalda Carlos y Brau Esteban, *Endodoncia: Técnicas Clínicas y Bases Científicas*, pág. 23.

La fibronectina es una matriz de glucoproteína implicada en una variedad de actividades biológicas, como la mediación de adhesión de las células a la matriz extracelular, la migración celular, diferenciación y morfogénesis, particularmente gobernadas por interacciones ectomesenquimales, durante la formación de los dientes.<sup>9</sup>

## 2. Zona Acelular, Zona de Weil o Capa Basal de Weil

Ubicada inmediatamente por debajo de la capa de odontoblastos, se observa en la pulpa coronaria una zona estrecha de aproximadamente 40 micrómetros de espesor que está relativamente libre de células.

La zona de Weil es atravesada por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y los delgados procesos citoplasmáticos de los fibroblastos. La presencia o ausencia de la zona acelular depende del estado funcional de la pulpa, esta zona no es muy evidente en pulpas jóvenes que poseen la ventaja de formar dentina rápidamente.<sup>10,11</sup>

## 3. Zona Celular

Está conformada por células ectomesenquimales y por fibroblastos que originan las fibras de Von Korff. La zona celular es más notable en la pulpa coronaria que en la pulpa radicular, presentando mayor densidad celular las pulpas jóvenes en relación a las pulpas envejecidas.

La zona celular está formada por fibroblastos, células ectomesenquimales, macrófagos, linfocitos, mastocitos y células de reserva.

- **Fibroblastos:** son activos, poseen un contorno fusiforme y un citoplasma basófilo, con gran desarrollo de organelas que intervienen en la síntesis de proteína, el núcleo es elíptico con uno o dos nucléolos evidentes.

<sup>9</sup>Lukinmaa P. and Vaheri A, Ed - A Región - Containing Isoform of Cellular Fibronectin is Present in Dentin Matrix in Dentinogenesis Imperfecta Associate With Osteogenesis Imperfecta, Journal Dental Research, pág. 1187-1196.

<sup>10</sup>Gómez de Ferraris M. y Campos Muñoz A, Ob. Cit, pág. 18.

<sup>11</sup><http://odontologia-online.com/estudiantes/trabajo/MuAYO1>

Los fibroblastos son las células principales y más abundantes del tejido conectivo pulpar, especialmente en la corona, secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas, así como la sustancia fundamental de la pulpa.

En pulpas jóvenes los fibroblastos poseen largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas, conectadas a través de complejos de unión a otros fibroblastos, conformando un sincicio morfológico, pero no funcional. En la pulpa adulta se transforman en fibrocitos, adquiriendo forma ovalada, con núcleo que tiene cromatina más densa y citoplasma escaso con organoides también escasos.

Durante procesos de respuesta a estímulos, reparación o respuesta inflamatoria del tejido conectivo, los fibroblastos pueden variar en forma y en número, desarrollando organelas. Así, los fibrocitos pueden diferenciarse nuevamente en fibroblastos frente a dichas reacciones; pero existe mayor sustento científico que demuestra que los fibroblastos adultos derivan de otras células.<sup>12</sup>

Los fibroblastos por lo general se ubican entre las fibras colágenas, tienen por función formar, mantener y regular el recambio de la matriz extracelular fibrilar y amorfa. Son células multifuncionales que tienen también capacidad para degradar colágeno, en respuesta a estímulos fisiológicos del medio interno.<sup>13</sup>

- **Células Ectomesenquimales:** derivan del ectodermo de la cresta neural, conforman la reserva pulpar por su capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos, según el estímulo que actúe.

Su número disminuye con la edad, que está directamente relacionado con la reducción en la capacidad de autodefensa de la pulpa.

Las células ectomesenquimales se ubican en la región subodontoblástica o en la proximidad de los capilares sanguíneos, por lo que se denomina células perivascularésópericitos. Son difíciles de diferenciar de los fibroblastos, se

---

<sup>12</sup>Gómez de Ferraris M. y Campos Muñoz A, Ob.Cit, pág. 20.

<sup>13</sup>Walton Richard, Ob.Cit, pág.19.

Canalda Carlos y Brau Esteban, Ob. Cit, pág 9.

describen como células de menor tamaño y de aspecto estrellado.

- **Macrófagos:** cambian de forma según donde se encuentren, pueden estar fijos en el tejido conectivo llamados histocitos, con aspecto irregular porque tienen prolongaciones citoplasmáticas; pueden estar libres en el mismo tejido, los cuales tienen forma redondeada con pequeños repliegues citoplasmáticos en su superficie, esta variedad de forma se relaciona con su función de fagocitosis. Los macrófagos tienen un núcleo escotado y ligeramente excéntrico, citoplasma poco visible, pero con el complejo de Golgi y el retículo endoplásmico bien desarrollados, tiene también mitocondrias, abundantes vacuolas y lisosomas.

Los macrófagos participan en el mecanismo de defensa y pertenecen al sistema fagocítico mononuclear, tienen su origen en los monocitos de la sangre.

Durante procesos inflamatorios los histocitos se transforman en macrófagos libres, tienen como función digerir microorganismos, remover bacterias y eliminar células muertas, presentan las partículas extrañas a los linfocitos, interviniendo en la respuesta inmunológica de la pulpa, porque tienen antígenos clase II en la superficie celular.

- **Linfocitos:** la pulpa sana solamente posee linfocitos tipo T, los linfocitos B normalmente están ausentes. Los linfocitos T participan en la respuesta inmunológica inicial ante la presencia de antígenos por ejemplo provenientes de una caries, liberando linfoquinas que provocan dilatación pulpar, este mecanismo permite la migración de linfocitos B desde la circulación sanguínea hasta el tejido pulpar, diferenciándose en células plasmáticas, que elaboran anticuerpos específicos para los antígenos que desencadenaron la respuesta inflamatoria.

- **Mastocitos:** son de tamaño, número variable y de distribución perivascular, son células redondeadas con abundante gránulos citoplasmáticos, que poseen histamina, heparina y anticoagulante. En los mastocitos el retículo endoplásmico está poco desarrollado, tienen un aparato de Golgi extenso y las mitocondrias son escasas.

Suelen encontrarse en tejidos con inflamación crónica, pero también se observan en pulpas normales.

**-Células de Reserva:** se encuentran a lo largo de los capilares y en la zona celular, son células primitivas indiferenciadas que conforman un reservorio de células pluripotenciales, que pueden diferenciarse en células específicas según las necesidades.

Pueden convertirse en fibroblastos o en células productoras de dentina (dentinoblastos), en la inflamación pueden diferenciarse en macrófagos o en células de reabsorción (dentinoclastos), su número disminuye con la edad, lo que origina una reducción en la capacidad de autodefensa de la pulpa.

#### **4. Zona Central**

Es la masa central de la pulpa propiamente dicha, esta masa o estroma pulpar contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas y componentes celulares como fibroblastos, células ectomesenquimales, macrófagos de localización perivascular; ya descritos.

La zona central proporcionalmente tiene menor cantidad de células por unidad de superficie, en comparación con la zona rica en células.

#### **d. Elementos Extracelulares de la Pulpa Dental**

Básicamente constituidos por fibras colágenas, reticulares, elásticas y oxitalánicas.

##### **1. Fibras Colágenas**

Su distribución y proporción difiere según la región, son escasas y dispuestas en forma irregular en la pulpa coronaria, en la zona radicular adquieren disposición paralela y se encuentran en mayor concentración. La densidad y diámetro de las fibras aumenta con la edad. La matriz extracelular pulpar contiene colágeno y

fibronectina.<sup>14</sup>

## 2. Fibras Reticulares

Formadas por delgadas fibrillas de colágeno y fibronectina, se disponen al azar en la pulpa, excepto en la zona odontoblástica, donde se entrelazan con las células y forman el plexo de Von Korff, formadas por fibras más gruesas y espiraladas, igualmente aumentan con la edad.

## 3. Fibras Elásticas

Son escasas y ubicadas exclusivamente en las paredes de los vasos sanguíneos aferentes, su principal componente es la elastina.

## 4. Fibras Oxitalánicas

Son fibrillas onduladas, consideradas como fibras elásticas inmaduras, de función aún desconocida.

### e. Funciones de la Pulpa Dental

La pulpa dental es responsable de la vitalidad dentaria y cumple funciones muy importantes que perduran durante toda la vida si el diente no experimenta agresión.

#### 1. Función Inductiva

El complejo dentinopulpar posee un mecanismo inductor durante la amelogénesis, porque es necesario el depósito de dentina para que se produzca la síntesis y el depósito de esmalte.

#### 2. Función Formativa

La pulpa dental tiene como función esencial formar dentina mientras conserve su vitalidad. La dentinogénesis se produce principalmente por los odontoblastos y

---

<sup>14</sup>Gómez de FerrarisM. y Campos Muñoz A,Ob.Cit.pág. 22.

según el momento en que se forma la dentina surgen sus distintos tipos: primaria, secundaria, terciaria, reparativa.

La dentina reparativa se forma en respuesta a distintos estímulos naturales ó irritantes que pueden ser biológicos (bacterias), físicos (calor, presión) o químicos (sustancias provenientes de algunos materiales dentales).

### **3. Función Nutritiva**

La pulpa dental nutre a la dentina por las prolongaciones odontoblásticas y los metabolitos que provienen del sistema vascular.

### **4. Función Sensitiva**

La pulpa dental a través de los nervios sensitivos, responde a diferentes estímulos o agresiones con dolor dentinario o pulpar.

El dolor dentinal es agudo, el dolor pulpar es sordo y pulsátil, persistiendo durante un tiempo.

### **5. Función Defensiva y Reparadora**

La pulpa dental posee una probable capacidad reparativa formando dentina ante los estímulos o agresiones. Presenta dos líneas de defensa: la formación de dentina tubular con estrechamiento de los túbulos dentinarios para impedir la penetración de noxas o bacterias a la pulpa, produciendo una esclerosis dentinaria, que constituye la primera línea de defensa pulpar; y la formación de dentina reparativa, llamada también de reacción o irritación que constituye la segunda línea de defensa pulpar.

La dentina así formada es elaborada por nuevos odontoblastos, que tienen su origen en fibroblastos jóvenes ó en células ectomesenquimales, denominadas también células madre.<sup>15</sup>

---

<sup>15</sup>Moya de Calderón Z, Ob.Cit, págs. 25-27.

## CÉLULAS MADRE

### a) Definición

Las células madre o StemCell o células troncales se definen como una célula progenitora autorrenovable, capaz de generar uno o más tipo celulares diferenciados en distintas estirpes celulares.<sup>16</sup>

Son células que se caracterizan principalmente por ser indiferenciadas. Al dividirse, originan más células que pueden permanecer como células madre y reproducirse durante un tiempo ilimitado o seguir el camino de la diferenciación celular, dando origen a una clase específica de células con una función definida.

Las células madre están consideradas como uno de los futuros más prometedores en las Ciencias de la Salud. Actualmente se están desarrollando investigaciones para determinar las posibles aplicaciones de las células madre de origen dentario, sus características, diferencias entre tipos, conocer las diferentes aplicaciones clínicas y descubrir cuál puede ser su potencial a futuro en el campo odontológico.

Las células madre tienen capacidad para autorenovarse, ser clonogénicas y diferenciarse en distintas estirpes celulares, teniendo la capacidad osteo/odontogénica, adipogénica y neurogénica.

Existen 5 tipos de células madre de origen dental: de la pulpa, del ligamento periodontal, de dientes primarios exfoliados, de la papila dental y del folículo dental (capa externa del germen dental).

Las aplicaciones de las células madre en el campo odontológico se encuentran en una fase de estudio prometedora. Actualmente, se podría concretar en dos grandes campos: la cirugía, destacando la implantología y la endodoncia en tratamientos de apicoformación.

### b) Clasificación

---

<sup>16</sup>Moraleda J, Ruiz F, Blánquez M, Arriba F, *¿Qué son las Células Madre?*, Revista de Hematología y Medicina Molecular, pág. 2-5.

Existen diversas formas de clasificación, en función a diversos criterios:

### 1. Según su Origen

- **Origen Embrionario:** poseen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula (totipotentes), adquiriendo un enorme potencial para la regeneración tisular.
- **Origen Adulto:** también son denominadas células madre postnatales. Son multipotentes y sobre ellas cabe destacar que su potencial de diferenciación queda restringido a la capa embrionaria de la que procedan. Las Mesenchymal Stem Cells (MSC), fueron aisladas por primera vez en aspiraciones de médula ósea. Actualmente sus marcadores químicos continúan siendo la clave respecto al aislamiento de células madre. Las células mesenquimales y hematopoyéticas comparten marcadores similares, su identificación específica es importante para su aislamiento, siendo el STRO-1, el antígeno más importante para su identificación.

### 2. Según el Tejido de Soporte

Es muy importante comprender el concepto de nicho celular, que son los elementos que rodean a la célula troncal cuando se encuentra en su estado nativo, incluyendo las células no troncales que puedan estar en contacto directo con ella, así como la matriz extracelular y las moléculas solubles que se encuentran localmente. Si se identifican los nichos celulares específicos en tejido vital, es más sencillo la obtención de células madre.<sup>17</sup>

Existen nichos celulares en las siguientes localizaciones: médula ósea, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, folículo piloso, intestino, sistema nervioso y diente.<sup>18</sup>

### 3. Según su Potencial de Diferenciación

---

<sup>17</sup>Kolf C, Cho E, Tuan R, *Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells: Regulation of Niche, Self-Renewal and Differentiation*, Journal Arthritis Research, pág. 204.

<sup>18</sup>Shi S, Gronthos S, *Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp*, Journal Bone Mineral Research, págs. 696-704.

- Totipotentes:** son aquellas capaces de originar un embrión y un individuo completo, diferenciándose hacia cualquier estirpe celular.
- Pluripotentes:** tienen la capacidad de poder desarrollar los 200 tejidos de un ser humano pero no el tejido extraembrionario, por sí solas no pueden producir un individuo.
- Multipotentes:** pueden originar un subconjunto de tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, pueden formar tipos celulares diferentes pero no todos.
- **Oligopotentes:** al igual que las anteriores, pueden desarrollar un subconjunto de tipos de células, pero mucho más reducido.
- **Unipotentes:** con capacidad para diferenciarse en un único tipo celular.

Debemos tener en cuenta que las características *in vitro* varían en mayor o menor medida, dependiendo del tipo de célula. Los odontoblastos generados de las Células Madre de la Pulpa (DPSC) serían precursores de la dentina reparativa, mientras que los odontoblastos de las Células Madre de la Papila Dental (SCAP) parece ser que son precursores de la dentina radicular.

Actualmente se buscan alternativas para la obtención de células madre adultas, ya que su obtención de la médula ósea está quedando relegada debido al bajo porcentaje de células obtenido, el dolor y la gran morbilidad que lleva el procesolaboratorial.

## CÉLULAS MADRE DE ORIGEN DENTAL

### a) Definición

Las células madre de origen dental poseen potencial de multidiferenciación y por tanto pertenecen al grupo de células madre adultas, tienen la capacidad de formar células con carácter osteo/odontogénico, adipogénico y neurogénico. Sin embargo, se puede afirmar que, en comparación con las células madre de la médula ósea, las de origen dental tienen predilección por el desarrollo odontogénico.<sup>19</sup>

### b) Clasificación

Existen diversos tipos de células madre de origen dental:

#### 1. Células Madre de la Pulpa (Dental Pulp Stem Cells (DPSC))

Fueron las primeras células madre dentarias que se aislaron. Por analogía con las células madre de la médula ósea, se consideró que existía una comunidad de células multipotenciales en el tejido pulpar de dientes maduros. En estudios posteriores, se las empezó a relacionar con características endoteliales y vasculares, pero sus características se han determinado sólo después de aislarse.<sup>20</sup>

El origen y localización exacta de estas células en la pulpa dental es aún incierto, la producción de DPSC es muy pequeña (1 por 100 de todas las células) y según aumenta la edad del individuo la disponibilidad de estas células se ve reducida. Se han estudiado sobretodo las células que provienen de terceros molares y dientes supernumerarios. Cabe destacar que, si son aisladas durante la formación de la corona, las DPSC son más proliferativas que cuando se aíslan más adelante.

<sup>19</sup>Huang G, Gronthos S, Shi S, *Mesenchymal Stem Cells Derived From Dental Tissues Vs. Those From Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine*, Journal Dental Research, págs.792-806.

<sup>20</sup>Gronthos S, et al, *Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in Vivo*, Proc. Natl. Academy Science USA, págs.13625-13630.

Las células madre de la pulpa dental (DPSC), han demostrado que pueden resolver las dificultades de su obtención y preservación: el lugar donde se encuentran es de fácil acceso y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular.<sup>21</sup>

La capacidad de diferenciación de las DPSC quedó demostrada en estudios experimentales en ratas, donde se pudo observar su potencial terapéutico para la reparación de un infarto de miocardio inducido tras ligadura de las arterias coronarias. Siete días después, estas células fueron inyectadas intramiocárdicamente en los animales y a las 4 semanas, las ratas sometidas a este tratamiento celular mostraron una mejora en su función cardíaca.<sup>22</sup>

Con las mismas capacidades prácticamente que las DPSC, se puede hablar de un subtipo: las DPSC procedentes de dientes neonatales, las hNDPSC (human Natal Dental PulpStemCells), que ofrecen una mayor capacidad de proliferación en comparación con las células de la médula ósea, aunque sin grandes diferencias al compararlas con las DPSC.<sup>23</sup>

Las SBP-DPSCs son otro subtipo de DPSC capaces de diferenciarse hacia osteoblastos, D'Aquino y colaboradores, lograron sintetizar chips de tejido óseo tridimensionales in vitro que se pueden diferenciar en osteoblastos y en endotelios. Su asombrosa capacidad de diferenciación les permite dar lugar in vivo a hueso adulto con canales de Havers y la apropiada vascularización.<sup>24</sup>

---

<sup>21</sup>D'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A, *Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool For Bone Regeneration*, Journal StemCell, pág. 25

<sup>22</sup>Gandía C. et al, *Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction*, pág. 639.

<sup>23</sup>Karaöz E. et al, *Isolation and in Vitro Characterisation of Dental Pulp Stem Cells From Natal Teeth*, Journal Histochem Cell Biology, pág. 95-112.

<sup>24</sup>D'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A, Ob. Cit, pág. 26.

## 2. Células Madre del Ligamento Periodontal (Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSC))

Nagamoto y colaboradores, en sus investigaciones realizadas afirman que el ligamento periodontal tiene poblaciones de células con capacidad de diferenciarse en cementoblastos como en osteoblastos.<sup>25</sup>

La presencia de múltiples tipos de células en el periodonto sugiere que este tejido contiene células madre llamadas PDLSC (Periodontal Ligament Stem Cells), que mantienen la homeostasis y la regeneración del tejido periodontal. Los análisis in vivo con PDLSC realizados en ratones inmunocomprometidos, sugirieron la participación de estas células en la regeneración de hueso alveolar al propiciar la formación de una fina capa de tejido muy similar al cemento que, además de contar entre sus componentes con fibras colágenas, se asociaron íntimamente al hueso alveolar próximo al periodonto regenerado.

Las fibras colágenas generadas in vivo en humanos, fueron capaces de unirse con la nueva estructura formada de cemento, imitando así la unión fisiológica de las fibras de Sharpey. De estos estudios y análisis se podría decir que las PDLSC podrían contener un subtipo de células capaces de diferenciarse hacia cementoblastos/cementocitos así como hacia células formadoras de colágeno.<sup>26</sup>

Una de las más prometedoras investigaciones con PDLSC se asocia a la hipoplasia congénita radicular, una enfermedad caracterizada por ser un desorden evolutivo fisiológico de la raíz que cursa con displasia ectodérmica, movilidad dentaria, atonía masticatoria y exfoliación prematura. En su etiología se conoce que el gen ADAM28 se expresa en el germen dentario, las células de la papila dental y las células del folículo dental, se supone que estaría involucrado en el proceso morfogénico tanto de la corona como de la raíz. Se estudió la influencia del gen ADAM28 en la proliferación, apoptosis y diferenciación de las PDLSC en terceros molares impactados. Los resultados obtenidos parecen

---

<sup>25</sup>Nagamoto K. et al, *Stem Cell Properties of Human Periodontal Ligament Cells*, Journal Periodontology Research, pág. 303.

<sup>26</sup>Huang G, Gronthos S, Shi S, Ob. Cit, pág. 802.

mostrar que este gen, tiene una regulación efectiva en la proliferación de PDLSC, así como su apoptosis durante la morfogénesis dentaria, lo que podría ser el principio de un tratamiento efectivo, hasta ahora inexistente, de la hipoplasia congénita radicular.<sup>27</sup>

### 3. Células Madre de Dientes Deciduos Exfoliados (Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED))

Se han aislado células de la pulpa remanente de los dientes deciduos exfoliados, denominadas SHED. Los resultados revelan que contienen una población de células madre multipotenciales diferentes a las aisladas anteriormente de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSC).

Adecuadamente conservadas, las SHED se consideran una importante fuente de células madre de fácil obtención. Los dientes deciduos y los permanentes tienen importantes diferencias en cuanto a su función, proceso de desarrollo y estructura tisular y al comparar las SHED con las DPSC, se encontró una mayor velocidad de proliferación y una mayor capacidad de especialización. Un revelador ejemplo es la existencia, hasta ahora ignorada, de células epiteliales en la pulpa de estos dientes. Fueron aisladas de manera exitosa por Nam y Lee, quienes demostraron que dichas células tienen la posibilidad de cumplir un rol importante en la composición epitelial para la reparación o regeneración del diente, ya que sus características morfológicas corresponden al fenotipo de células madre epiteliales, pudiendo llegar a expresar marcadores epiteliales.<sup>28</sup>

También se ha probado el potencial de las SHED para diferenciarse en células angiogénicas, cuya capacidad de inducción se considera fundamental para cualquier tipo de regeneración con tejido conjuntivo. Es necesario el factor de

---

<sup>27</sup>Zhao Z, Wang Y, Wang D, Liu H, *The Regulatory Role of A Disintegrin and Metalloproteinase 28 on the Biologic Property of Human Periodontal Ligament Stem Cells*, Journal Periodontology, págs. 934-944.

<sup>28</sup>Nam H, Lee G, *Identification of Novel Epithelial Stem Cell-like Cells in Human Deciduous Dental Pulp*, Journal BiochemBiophys Research Común, págs. 135-139.

crecimiento vascular endotelial (VEGF) para que las SHED se diferencien hacia células endoteliales.<sup>29</sup>

En cuanto a la capacidad osteoinductora, se ha comprobado en ratones, que las SHED pueden reparar defectos de formación ósea. Así, los dientes deciduos no sólo favorecen la guía eruptiva de los dientes permanentes, también pueden estar involucrados en la inducción ósea durante la erupción del permanente.<sup>30</sup>

Gotlieb y colaboradores, realizaron una investigación ultraestructural con microscopio electrónico del tejido y la estructura pulpar implantado dentro de dientes tratados endodónticamente, concluyó que es posible implantar dichas estructuras pulpares creadas gracias a la ingeniería tisular dentro de los dientes tras su limpieza y conformación.<sup>31</sup>

#### 4. Células Madre de la Papila Dental (StemCellsfromthe Apical Papilla (SCAP))

La papila apical hace referencia al tejido blando situado en los ápices del diente permanente que se está formando, existe una zona muy rica en células entre la papila apical y la pulpa. Es interesante destacar que sin estimulación neurológica, las SCAP se muestran positivas para varios marcadores neurológicos, pero cuando se someten a estimulación neurológica, el número de marcadores aumenta notablemente.

Parece que las SCAP son las precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular, mientras que las células madre de la pulpa (DPSC), son probablemente, las precursoras de los odontoblastos que forman la dentina reparativa, además, éstas últimas, contienen un mayor componente vascular y celular que las SCAP.<sup>32</sup>

---

<sup>29</sup>Zhao Z, Wang Y, Wang D, Liu H, Ob. Cit, pág. 940.

<sup>30</sup>Miura M. et al, *SHED: Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth*, Proc. Natl. Academy Science USA, pág.89.

<sup>31</sup>Gotlieb E. et al, *An Ultrastructural Investigation Of Tissue-Engineered Pulp Constructs Implanted Within Endodontically Treated Teeth*, Journal American Dental Association, págs. 457-465.

<sup>32</sup>Huang G, Gronthos S, Shi S, Ob. Cit, pág.797.

Sonoyama y colaboradores, emplearon las SCAP para conseguir raíces mediante ingeniería tisular empleando cerdos como modelo animal experimental, con el propósito de probar que son una fuente prometedora para las futuras aplicaciones clínicas.<sup>33</sup>

## 5. Células Madre del Folículo Dental (Dental Follicle Precursor Cells (DFPC))

El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación. Este tejido contiene células madre que son las responsables de la formación del periodonto, constituido por cemento, ligamento, hueso alveolar y encía. Las DFPC se han aislado de los folículos dentales de los terceros molares impactados, son semejantes al resto de células madre de origen dental, pero constituyen colonias clonogénicas en menor número que los demás tipos.

In vitro, estas células muestran una morfología típica de fibroblastos, después de su inducción, se ha demostrado su diferenciación osteogénica; in vivo se ha identificado el antígeno STRO-1 en los folículos dentales. El trasplante de estas células genera una estructura constituida de tejido fibroso rígido, no se ha observado formación de dentina, cemento o formación ósea en el trasplante in vivo. Huang y colaboradores sustentan la posibilidad que se deba al reducido recuento celular en los cultivos.<sup>34</sup>

### c) Propiedades de las StemCell

Las propiedades dependen de su presencia in situ ó en experimentos, es decir in vitro y son básicamente:

- **Autorenovación (SelfRenewal):** es la capacidad de regenerar al menos una célula hija con características similares a la célula de origen.
- **Potencial de Diferenciación:** capacidad de una célula para diferenciarse en múltiples linajes, es decir es el potencial para modificar el fenotipo de la célula

<sup>33</sup>Sonoyama W, et al, *Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study*, *Journal Endodontic*, págs.166-171.

<sup>34</sup>Huang G, Gronthos S, Shi S, Ob. Cit, pág.804.

de origen en distintos tipos celulares al tejido de origen y al menos en un tipo celular diferente al tejido de origen.

- **Reconstitución Funcional:** es la diferenciación funcional in vivo de un tejido en particular, lo que significa la diferenciación funcional in vivo en células del tejido de origen embrionario y al menos en un tipo celular de un tejido diferente al tejido de origen embrionario inicial.

#### d) Aplicaciones Clínicas de la StemCell en Odontología

La ingeniería tisular basada en las células madre de origen dental tiene un futuro prometedor dentro de las ciencias de la salud. Se ha determinado, por ejemplo, que para regenerar un diente entero, la fuente de las células tiene que corresponder a un germen dentario, donde se encuentran todo tipo de células madre dentarias; sin embargo, para reparar parte de algún tejido dentario (dentina, pulpa, ligamento periodontal) aislado, podrían ser necesarios uno o dos tipos de células madre.<sup>35</sup>

Gotlieb y colaboradores han reportado como evidencia, que las células madre de tejido no neural pueden ser capaces de diferenciarse en células neurales. Las células madre de la pulpa dental son capaces de producir factores neurotróficos e incluso rescatar motoneuronas después de una lesión de la médula espinal. Por tanto, podrían ser un recurso importante para regenerar lesiones de tejidos dentarios, inducir regeneración ósea y posiblemente tratar lesiones del tejido nervioso o incluso enfermedades degenerativas. Se requieren más estudios en cuanto a su importancia biológica y su posible aplicación en terapias celulares.<sup>36</sup>

Para poder hablar de la terapéutica basada en el empleo de células madre es necesario comprender el concepto de **transdiferenciación**, que es la capacidad de las células madre para ser transplantadas bajo unas determinadas condiciones en determinados tejidos y dar origen a linajes celulares diferentes al suyo original.

---

<sup>35</sup>Huang G, Gronthos S, Shi S, Ibid pág.806.

<sup>36</sup>Gotlieb E. et al, Ob. Cit, pág. 460.

Lo más destacable es que las células madre de origen dental, no tienen porque ser obtenidas a partir de embriones humanos, por lo tanto no presentan los habituales problemas éticos a los que se enfrentan este tipo de investigaciones, así como también superan los problemas típicos de los aloinjertos: histocompatibilidad y medicación inmunosupresora.

A nivel odontológico la terapéutica con células madre se ha encaminado hacia la regeneración tisular, donde se destaca sus aplicaciones en la cirugía y la endodoncia, que detallamos a continuación.

### **1. Cirugía (Regeneración e Implantología)**

Los implantes se han convertido en una de las terapéuticas más frecuentes en la presente década. El mayor problema de la técnica implantológica reside en su falta de contorno natural y la relación con el hueso alveolar porque carece de ligamento periodontal. Éste hecho respalda la necesidad de buscar otro tipo de alternativas terapéuticas, dentro de ellas la regeneración dental experimental ha sido probada con la formación ectópica de tejidos parecidos a los tejidos dentarios en estructuras in vivo.

Estudios en animales de experimentación (perros), demuestran que tras la obtención de células madre del germen dentario en estadio de campana, aisladas e implantadas en otro alveolo, regeneran la estructura dentinaria, pero no el esmalte ni la raíz. En otros animales de experimentación (cerdos), las células madre implantadas nuevamente en su alveolo original dieron como resultado la formación de la raíz y el periodonto. Hoy en día, aún existen una gran cantidad de obstáculos que a futuro serán superados: no se obtiene el tamaño normal de un diente, se observa inconsistencia en la formación del tejido radicular y falta la evidencia de una completa erupción dentaria hasta conseguir la oclusión funcional.

En un estudio realizado en animales de experimentación (cerdos), se ha observado que las células madre de la papila apical (SCAP) y las del ligamento (PDLSC), en lugar de regenerar un diente completo, han regenerado una raíz

biológica, junto con el tejido periodontal adyacente. Luego de 3 meses, se observó que se había formado la raíz en la mandíbula y posteriormente se le sometió a la inserción de una corona de porcelana. El tejido periodontal rodeó a la raíz por completo en aparenterelación natural y biológica con el hueso circundante. Sin embargo, la fuerza mecánica que poseía ésta raíz, era un tercio menor que las raíces naturales debido a la presencia de hidroxiapatita residual, ya que no se logró regenerar el mismo tipo de dentina de un diente natural. Faltan estudios de larga evolución que superen dichas deficiencias.<sup>37</sup>

Del mismo modo se ha demostrado la capacidad de las DPSC para realizar una regeneración tisular en pacientes que presentan reabsorción bilateral de la cresta alveolar distal en relación al segundo molar mandibular (defecto de al menos 1.5cm), secundaria a la impactación del tercer molar en la lámina cortical del alveolo.

A partir de DPSC procedentes de los terceros molares superiores extraídos previamente y de un andamiaje en base a colágeno, se ha creado un biocomplejo que puede restaurar los defectos mandibulares. La óptima regeneración ósea fue evidente tras un año del injerto.<sup>38</sup>

Resultados similares se obtuvieron con las SHED llegando a reparar el defecto óseo mandibular de manera completa a los 6 meses de la reconstrucción postquirúrgica.<sup>39</sup>

## 2. Endodoncia (Apicogénesis y Apicoformación)

La ingeniería del tejido pulpar es un campo que está en continua expansión y que tiene como propósito el reemplazo de una pulpa inflamada, necrótica e irreversible por una pulpa sana y un tejido funcionalmente competente, capaz de formar nueva dentina; dicho tratamiento es atractivo para dientes inmaduros necróticos,

<sup>37</sup>Huang G, Gronthos S, Shi S, Ob. Cit, pág.805.

<sup>38</sup>D' Aquino R. et al, *Human Mandible Bone Defect Repair by the Grafting of Dental Pulp Stem/Progenitor Cells and Collagen Sponge Biocomplexes*, Journal European Cell Mater, págs. 75-83.

<sup>39</sup>Zheng Y. et al, *Stem Cells From Deciduous Tooth Repair Mandibular Defect in Swine*, Journal Dental Research, págs. 249-254.

en los que es necesario completar el desarrollo radicular. La capacidad de las células madre de origen dental para generar complejos dentinopulpares y complejos cemento-ligamento periodontal, sugiere el posible potencial de éstas en procesos de apicogénesis y tratamientos de apicoformación.

El cierre del ápice dentario ocurre en promedio 3 años a 3 ½ años después de la erupción del diente (apicogénesis). Habitualmente el hidróxido de calcio y el MTA (mineral trióxidoagregado), son los materiales de elección para los tratamientos de apicoformación, sin embargo, ninguno de ellos puede calificarse como material ideal porque no tienen la capacidad de estimular la regeneración del tejido pulpar y el continuo desarrollo de la raíz.<sup>40</sup>

La repoblación del ápice abierto, propio de los dientes inmaduros, se produce con células madre capaces de ser dirigidas hacia una estirpe tisular concreto y para regenerar el tejido natural, por lo tanto esto supone una nueva alternativa de tratamiento para los pacientes que han sufrido un daño en algún diente inmaduro (traumatismo dental). Una combinación de las células madre de origen dental y los factores de crecimiento obtenidos del plasma rico en plaquetas puede usarse en la regeneración tisular, in vitro o in vivo.

Se ha estudiado que la revascularización in vitro y la aplicación de factores de crecimiento angiogénicos aumentan las condiciones favorables del entorno para una reparación adecuada. Histológicamente, se ha mostrado que existe tejido vivo en el espacio de la pulpa radicular tras los procedimientos de revascularización, pero el origen de este tejido sigue siendo desconocido.<sup>41</sup>

Pérez y colaboradores, demostraron que las células madre pueden proliferar y migrar desde el ligamento periodontal sano adyacente, hasta el área dañada. Esto sugiere que las PDLSC puedan ser estimuladas a distancia, para que migren

---

<sup>40</sup>Weissman I, *Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities*, Journal Science, pág1,442.

<sup>41</sup>Moya de Calderón Z, Ob.Cit, págs. 141-160.

Friedlander L, Cullinan M, Love R, *Dental Stem Cells and Their Potential Role in Apexogenesis and Apexification*, Journal International Endodontic, pág. 62.

hasta el ápice inmaduro de la raíz. Es interesante recalcar que se ha observado mayor número de células madre dentro del ligamento periodontal afectado, donde el proceso inflamatorio posee activamente un sistema de reclutamiento de células inmaduras.<sup>42</sup>

Los problemas que se pueden encontrar son los siguientes:

1. ¿Qué señales del entorno son necesarias para que se dé este proceso? y ¿cuál es el nivel crítico inflamatorio necesario para estimular la migración de las células madre hacia el ápice abierto, con el potencial de depositar dentina, cemento y/o hueso alveolar pero sin dañar irreversiblemente las células?
2. La regeneración in vitro: las células tienen que crecer y expandirse antes de ser implantadas en el canal radicular. Las células implantadas deben adherirse a las paredes desinfectadas del canal, lo cual puede significar un cambio en el actual abordaje de la endodoncia.<sup>43</sup>

Por último, el tejido implantado carece de soporte vascular y además es una técnica muy difícil de realizar sin daño celular. Pérez y colaboradores en el año 2009, desarrollaron nuevas técnicas de regeneración periodontal in vitro (mediante técnica celular multiplanar), cuyo resultado fue la formación de tejido inmaduro parecido al cemento y un ligamento periodontal perpendicular a las superficies dentinales.<sup>44</sup>

Además, del mismo modo que se intenta regenerar el ligamento periodontal para los casos de aplicaciones quirúrgicas, los intentos para regenerar la pulpa están siendo estudiados. Anteriormente se proponía la inducción de una hemorragia para la formación del coágulo que sirvieran de guía en la reparación tisular, pero apenas se obtenía la formación de 1 mm de tejido diferente al tejido pulpar. La década pasada se buscó dichos resultados usando biomateriales y, más

---

<sup>42</sup>Pérez A, Domínguez L, Ilisástegui, *De la Terapia Celular a la Regeneración Periodontal*, Revista Habanera de Ciencias Médicas, págs. 1-6.

<sup>43</sup>Friedlander L, Cullinan M, Love R, Ob. Cit, pág. 65.

<sup>44</sup>Pérez et al, *Historia de la Aplicación de la Terapia Celular en Periodoncia*, págs. 4-8.

recientemente, desde el aislamiento de las células madre de origen dentario, se está experimentado con ellas.

Aún no se ha conseguido la regeneración pulpar completa. Esto puede deberse, a que la implantación de células madre en los canales radiculares tiene su única fuente de vascularización comprometida. Por tanto para demostrar la posible regeneración pulpar, sería necesario una prueba clínica, puesto que in vitro se compromete la vascularización de las células.<sup>45</sup>

#### **d) Investigación Actual y Obtención de Células Madre de Origen Dental**

Thams en el año 2001, propone un programa marco de investigación en células madre, que recibe 50,000 millones de euros para investigaciones en el periodo comprendido entre 2007-2013. Dicho programa tiene como propósito la investigación sobre células madre embrionarias, pero no su obtención.<sup>46</sup>

En EE.UU. el actual presidente Barack Obama, ha eliminado las restricciones de financiación para la investigación sobre linajes de células madre embrionarias.<sup>47</sup>

Al finalizar el presente sustento teórico, se ha demostrado que se han realizado diversas investigaciones destinadas a conseguir el aislamiento, caracterización y diferenciación celular de las células madre de origen dental procedentes de dientes deciduos exfoliados, supernumerarios, terceros molares o dientes extraídos por razones ortodóncicas (premolares) que demuestran que las DPSC:

1. Pueden ser obtenidas al seccionar el órgano dentario para la extirpación pulpar y su conservación en frío, pudiendo aislar células madre o colonias individuales mediante un proceso de digestión enzimática.
2. Se pueden aislar mediante métodos de cultivo celular para obtener colonias clonogénicas, obteniendo una morfología característica de las células madre

<sup>45</sup>Huang G, Gronthos S, Shi S, Ob. Cit, pág.798.

<sup>46</sup>Thams C, *Actualidad de la Investigación con Células Madre*, Gaceta Dental, pág. 134.

<sup>47</sup>Glick M, *Stem Cell Research and Oral Health*, Journal American Dental Association, pág.112.

- post-natales (semejantes a fibroblastos, alargados y aplanados, ubicados en estas colonias). Requiere entre 2 y 5 semanas.
3. Poseen marcadores de membrana específicos de células progenitoras mesenquimales: STRO-1 y CD-44. Estos marcadores se han encontrado también en las células madre obtenidas a partir de dientes deciduos, células madre procedentes del ligamento periodontal e incluso, células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea.
  4. La diferenciación celular de las DPSC se ha evaluado mediante los niveles de expresión del gen que codifica dos de las proteínas más importantes involucradas en el proceso de biomineralización.<sup>48,49</sup>

### Consideraciones Éticas

Es ineludible hablar de los problemas éticos en los que se relaciona la investigación con células madre, tanto en Perú como prácticamente en todo el mundo.

Es importante conocer tanto los beneficios como los riesgos que aporta la investigación sobre células madre. Su empleo puede convertirse en una práctica diaria en un futuro próximo. Por esto surgen algunos pronunciamientos contrarios a estas investigaciones.

En cuanto a las consideraciones éticas, los principales problemas que encuentra la investigación de células madre son:

1. El estatus del embrión (exclusivamente en el caso de las células madre embrionarias).
2. Posibilidad de manipular y crear óvulos humanos a partir de dichas células (tanto las embrionarias como las adultas).

---

<sup>48</sup>Magallanes F. y Colaboradores, *Aislamiento y Caracterización Parcial de Células Madre de la Pulpa Dental*, Revista Odontológica Mexicana, pág. 64.

<sup>49</sup>Nagamoto K. et al, *Stem Cell Properties of Human Periodontal Ligament Cells*, Journal Periodontology Research, pág. 303.

Frente a estas situaciones, existen implicancias de carácter ético, moral y religioso que se oponen a la investigación con células madre, si bien los sectores más radicales parecen escandalizarse con las de origen embrionario, lo son en menor medida con aquellas de tipo adulto. Sin embargo, los beneficios médicos derivados de este estudio no pueden ser pasados por alto.<sup>50</sup>

### **Análisis y Síntesis sobre Células Madre**

1. El almacenaje de dientes deciduos exfoliados, dientes supernumerarios, terceros molares o dientes extraídos por razones ortodóncicas (premolares), permite la utilización posterior de células madre de origen dental.
2. Existen marcadores celulares comunes (STRO-1), tanto para las células madre dentarias como para las procedentes de la médula ósea, esto podría implicar un origen y camino molecular común para regular la formación de la dentina, el cemento y el hueso alveolar. El conocimiento del entorno y el comportamiento de las células madre en él, están aún por estudiar.
3. El uso de la terapia genética para regenerar tejido dentario puede ser una posibilidad en el futuro. La investigación se encuentra en una etapa primaria con una restricción ética sobre el uso de la terapia genética y la aplicación clínica para la regeneración tisular dentaria.
4. Se ha demostrado que las células madre aportan los siguientes resultados: mejora de la dentina terciaria, la regeneración del ligamento periodontal y del hueso alveolar, permiten la implantación de tejido pulpar vital, reparación de deficiencias esqueléticas craneofaciales. También es conveniente mencionar su capacidad para interactuar con multitud de materiales biológicos (biomateriales).<sup>51</sup>

---

<sup>50</sup>Hernández Ramirez P, *Aspectos Éticos en el Empleo de las Células Madre*, Revista Cubana De Hematología, Inmunología y Hemoterapia, pág. 1-7.

<sup>51</sup>González L, Font A, De Nova J, *Investigación con Células Madre de Origen Dentario*, Revista Gaceta Dental, pág. 118-128.

### 3.2. Antecedentes Investigativos

**Autor:** Magallanes Fabian M, Carmona Rodriguez B, ÁlvaresPerez M.<sup>52</sup>

**Título:** Aislamiento y Caracterización Parcial de Células Madre de Pulpa Dental.

**Resumen:**

El propósito de la investigación fue aislar, caracterizar e inducir la diferenciación de células madre derivadas de pulpa dental de premolares. Las células madre aisladas en los cultivos celulares formaron colonias clonogénicas después de 5 semanas de cultivo, que fueron positivas a los anticuerpos CD-44 y STRO-1 que reconocen epítopesmembranales específicos de células madre aisladas de tejidos adultos; que fueron capaces de diferenciarse hacia un fenotipo mineralizante como sialoproteínaósea, osteopontina analizadas por la técnica RT-PCR e inmunocitoquímica. Los resultados muestran que a partir de pulpas dentales es posible aislar células madre adultas con características clonogénicas, capaces de inducir su diferenciación celular formando tejido similar al depositado por las células que dan origen a la dentina o tejidos mineralizados como hueso o cemento radicular.

**Autor:** Gronthos S, et al.<sup>53</sup>

**Título:** Propiedades de las Células Madre de Pulpas Dentales Humanas.

**Resumen:**

Eneste estudio, secaracterizala capacidad deauto-renovación ymulti-linaje, de la capacidad de diferenciacióny la eficienciACLONOGÉNICAde las células

---

<sup>52</sup>Magallanes Fabian M, Carmona Rodriguez B, ÁlvaresPerez M, Aislamiento y Caracterización Parcial de Células Madre de Pulpa Dental, Revista Odontológica Mexicana, pág. 32.

<sup>53</sup>Gronthos S, et all, *Stem Cells Properties of Human Dental Pulp Stem Cells*, Journal Dental Research, pág. 98.

madre de la pulpa dental humana (DPSC). Las DPSC son capaces de formar dentina ectópica asociada al tejido pulpar in vivo, además semejantes a las células del estroma se restablecieron en un cultivo de trasplantes primarios DPSC y fueron re-transplantados en ratones inmunodeficientes para generar como un tejido pulpo-dental, demostrando su capacidad de auto-renovación. DPSC se encontró también que son capaces de diferenciarse en adipocitos y células neuronales similares. Fue determinado el potencial odontogénico de 12 colonias individuales derivadas de DPSC de una sola cepa. Dos tercios de las colonias derivadas de DPSC de una sola cepa generó abundante dentina ectópica in vivo, mientras que sólo una cantidad limitada de la dentina se detectó en el tercio restante. Estos resultados indican que una sola colonia derivada de las cepas DPSC difieren entre sí con respecto a su tasa de odontogénesis. En conjunto, estos resultados demuestran que DPSC poseen células madre similares en cualidades, incluyendo la capacidad de auto-renovación y diferenciación en múltiples linajes.

**Autor:** Liu H, Gronthos S, SHIS.<sup>54</sup>

**Título:** Células Madre de la Pulpa Dental. Métodos en Enzimología

**Resumen:**

Stem Cells postnatales han aislado a partir de una variedad de tejidos. Estas Stem Cells se cree que poseen un gran potencial terapéutico para la reparación de tejidos dañados y/o defectuosos. Clínicamente, Stem Cell hematopoyético se han utilizado con éxito durante décadas en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos. Sin embargo, el potencial terapéutico de trasplantes postnatales Stem Cell todavía no se ha realizado, debido a la falta de comprensión detallada de sus características Stem Cell en los niveles celular y molecular. Por otra parte, existe un conocimiento limitado de su valor

---

<sup>54</sup>Liu H, Gronthos S, SHIS, *Dental Pulp Stem Cells Methods in Enzimology*, Journal Adults Stem Cells Methods in Enzimology, pág. 78.

terapéutico en el ámbito preclínico. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias óptimas y enfoques para superar los importantes retos que actualmente enfrentan los investigadores que examinan la eficacia clínica de las diferentes poblaciones de células madre postnatales. En esta revisión investigativa, se presentan metodologías para aislar células madre postnatales de la pulpa dental humana y discutir su papel potencial en la regeneración de tejidos.

**Autor:** Vipon Arora, Pooja Arora, Aka Munshi.<sup>55</sup>

**Título:** Banco de Células Madre de Dientes Humanos Deciduos Exfoliados: Guardados para el futuro

**Resumen:**

Las células derivadas de los dientes deciduos son de fácil acceso y proporcionan una manera fácil y mínimamente invasiva para obtener y almacenar las células madre para su uso futuro. Los derivados del propio banco de dientes de células madre es una alternativa razonable y simple con respecto a la cosecha de células madre de otros tejidos.

La obtención de células madre de dientes deciduos humanos exfoliados es simple y conveniente, con mínimo o ningún trauma. Cada niño pierde los dientes primarios, lo cual crea la oportunidad perfecta para recuperar y almacenar esta fuente útil de células madre, en caso de que sean necesarios para tratar las lesiones o dolencias futuras y presenta una mejor alternativa para simplemente descartar los dientes o guardarlos como un recuerdo del pasado.

Además, el uso de células madre en pocos casos, produce riesgos para el desarrollo de reacciones inmunes o rechazo tras transplantes y también elimina la posibilidad de contraer enfermedades a partir de células donantes. Las células madre también pueden ser recuperadas en el desarrollo de las terceras molares y los dientes permanentes. Las personas tienen diferentes

---

<sup>55</sup>Vipon Arora, Pooja Arora, AKA Munshi, *Baking Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED)*, Journal Clinical Pediatric Dentistry, pág. 65.

oportunidades en diferentes etapas de su vida para depositar estas valiosas células. Lo mejor es la recuperación de las células madre cuando un niño es joven y saludable y las células son fuertes y proliferativas.

El propósito de esta revisión investigativa fue analizar el escenario actual, así como los detalles técnicos del banco de dientes en relación con la eliminación de las células madre.

### 3.3. Hipótesis

**Dado que** el tejido pulpar de premolares jóvenes contiene diferentes elementos celulares que constituyen una reserva celular.

**Es probable que** se pueda aislar células madre con poder autoregenerativo y de diferenciación celular, para identificarlas con una posible aplicación odontológica a futuro.

## II. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

### 1. Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación

#### 1.1. Técnica

Se empleó una sola técnica que es la observación durante la experimentación laboratorial, conforme se esquematiza a continuación:

VARIABLE UNICA	TÉCNICA	INSTRUMENTO
Células Madre de la Pulpa Dental de Premolares	Observación Laboratorial	Documental (ficha laboratorial)

#### 1.1.1. Instrumentos Mecánicos

- Cámara de flujo laminar
- Micro pipetas
- Tubos de ensayo
- Frasco Roux (de plástico con tapa rosca)
- Multiplacas de 6 pozos (de plástico)
- Gradillas

- Centrifugadora
- Vibrador
- Mechero bunsen
- Pinzas
- Tijeras
- Estufa de cultivo celular con 5 % de CO<sub>2</sub>
- Microscopio óptico invertido
- Cámara fotográfica

### 1.1.2. Soluciones

- DMEN (DulbeccosModified Eagle Medium)
- SFB (Suero Fetal Bovino)
- Solución de tripsina (Triple Express)
- Solución de antibióticos y aminoácido
- Suero fisiológico.

## 1.2. Procedimiento Laboratorial

El procedimiento para efectivizar la técnica laboratorial comprende la siguiente secuencia:

### a) Selección de Pacientes

Para realizar la presente investigación, fueron seleccionados 20 pacientes voluntarios aparentemente sanos de ambos géneros, niños y adolescentes, con una edad comprendida entre los 10 a 18 años de edad, que asistieron a la Clínica Odontología de la UCSM. Su tratamiento de base consistió en la extracción de primeros o segundos premolares superiores o inferiores por necesidades de espacio (ortodoncia), ellos fueron informados del estudio para su consentimiento.

### b) Extracción Dental

Las exodoncias de los premolares de los 20 pacientes se realizaron en la especialidad de Odontopediatría y Ortodoncia de la Facultad de Odontología de la UCSM. La exodoncia se realizó con lidocaína al 2 % como anestésico local, luxando el órgano dentario con un elevador recto mediano y realizando la extracción propiamente dicha con un forcepara premolares o con un forceprecto, evitando excesiva manipulación durante las maniobras quirúrgicas.

#### **c) Obtención de la Muestra Pulpar**

Mediata a la exodoncia de los premolares se procedió a obtener el tejido pulpar. El premolar extraído fue seccionado en sentido longitudinal en dirección vestibulo-lingual, mediante el uso de la alta velocidad con refrigeración y el empleo de una piedra de fisura N° 701, que fue renovada cada tercer uso para evitar el sobrecalentamiento y el daño del tejido pulpar. La muestra pulpar se retiró de la cavidad pulpar con una pinza estéril y se colocó en el medio de conservación Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) estéril, a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para garantizar el estado celular del tejido pulpar hasta su uso.

#### **d) Aislamiento de Células Madre (Stem Cells)**

Todo el procedimiento laboratorial se realizó dentro de una cámara de flujo laminar, que garantiza la esterilización de las maniobras y medios de cultivo porque otorga un ambiente de anaerobiosis.

1. Después de recolectar las muestras de la pulpa dental que se mantienen en el medio de conservación DMEM y a  $-20^{\circ}\text{C}$ , con una pinza estéril se colocan en un tubo de ensayo, luego el medio es retirado (absorbido) con una micro pipeta y reemplazado con una solución de suero fetal bovino (SFB), (en toda maniobra las puntas de la micro pipeta son eliminadas para evitar contaminación y asegurar la esterilización); el **propósito** de esta acción es lavar las muestras con SFB.

2. Se retira el SFB con una micro pipeta, las muestras pulpar es son cortadas en trozos más pequeños para aumentar la superficie del tejido con una tijera estéril cuyas puntas se humedecen con SFB y son flameadas con un mechero bunsen para asegurar su esterilización, luego se vierte una solución de enzima tripsina al tubo de ensayo hasta cubrir las muestras del tejido pulpar, agitando unos segundos. Se eleva la temperatura del líquido a 37°C, llevando el tubo de ensayo a la estufa durante 10 minutos, porque la tripsina no actúa hasta llegar a dicha temperatura. Luego de retirar el tubo de ensayo de la estufa, se lleva a un vibrador (bortex) para despegar las células madre que se adhieren a la superficie (propiedad única) y lograr mantenerlas suspendidas en el medio de cultivo. Se extrae el sobrenadante (que contiene las células sueltas) con una micro pipeta y se deposita en otro tubo de ensayo, en el cual se vierte nuevamente una solución de la enzima tripsina y una solución de DMEN, **el propósito** de esta maniobra es asegurar la digestión de las células que no son de interés al estudio.
3. El tubo de ensayo con el sobrenadante que contiene las células sueltas y la mezcla de las soluciones anteriormente indicadas se lleva a la centrifugadora para su centrifugación a 1,500 rpm durante treinta segundos, se obtiene un precipitado de alta densidad celular denominado pellet ó botón celular.
4. El sobrenadante con la solución de tripsina se elimina y el sedimento de células es resuspendido al agregar el medio de cultivo DMEN en el tubo de ensayo, el cual es enriquecido con una solución de SFB al 10% y se le adiciona la solución de antibióticos más un aminoácido. Los antibióticos son: penicilina 100 UI/mL, estreptomycin 100 UI/mL, fungisona 0,3 um/mL y el aminoácido es glutamina 100 UI/mL; todas las soluciones se mezclan con el contenido celular para que no exista grumos y se homogenice la muestra.
5. La muestra en solución se coloca en un frasco Roux (de plástico), se introduce a la estufa de cultivo celular a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, se lava a

las 24 horas con SFB para eliminar las células no adheridas al plástico(propiedad única de las células madre). Luego el frasco se mantiene en la estufa renovando el medio de cultivo preparado cada 3 días durante 2 semanas. Se denomina medio de cultivo preparado a la mezcla de DMEN, SFB, antibióticos y aminoácido que se conserva en un frasco refrigerado a 4 °C de temperatura.

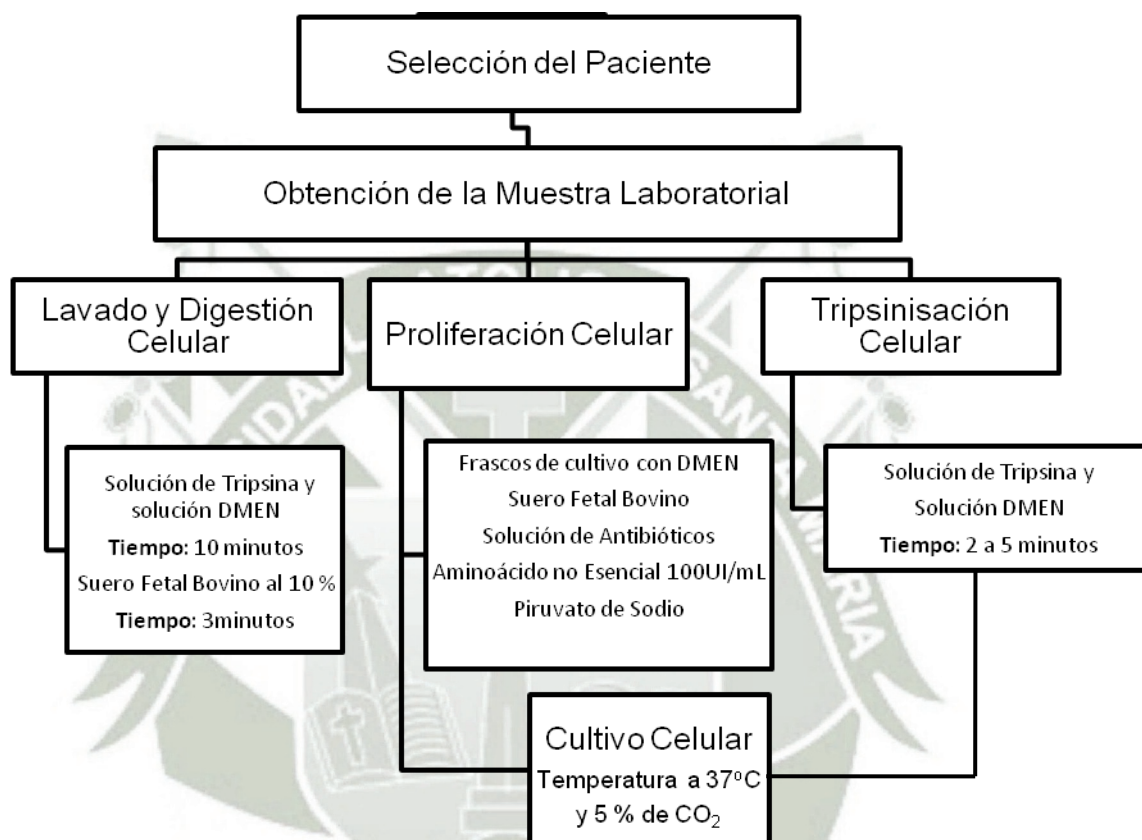
6. Después de lograr una confluencia de células madre en el cultivo se realiza la liberación de las células de su adherencia a la superficie plástica para la continuidad de su proliferación, que se denomina tripsinización. Para esto se cambia el medio 2 veces con solución salina estéril, después se adiciona solución de tripsina al 0,25% durante 2 a 5 minutos, para que las adherencias de las células a la matriz extracelular se rompan y permitan el desprendimiento de las células madre a la botella de plástico de cultivo (frasco Roux).
7. La enzima es inactivada por la adición del medio de cultivo que se tiene preparado y en un tubo de ensayo es llevado a centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se elimina y el sedimento de células se separa para agregar nuevamente el medio de cultivo DMEN preparado.

#### **e) Crecimiento de Células Madre (StemCells)**

El contenido celular obtenido después de las 2 semanas de proliferación celular, se somete nuevamente al proceso de proliferación celular en las mutiplacas de plástico que tienen 6 pozos de cultivo, donde se coloca 10 microlitos de la muestra en presencia del DMEM suplementado con SFB, mas la solución de antibióticos y el aminoácido no esencial ya descritos, con el **propósito** de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo y obtener colonias clonogénicas de células madre. El medio de cultivo que favorece el crecimiento de dichas células fue renovado cada tres días durante 2 semanas y las cajas con sus pozos se depositan en una estufa a 37°C, con una tensión controlada de CO<sub>2</sub> al 5% para mantener el equilibrio carbonato-bicarbonato, la estufa para el cultivo celular contiene un

termostato de seguridad, un dispositivo de control de humedad ambiente, para evitar la vaporización del agua del medio de cultivo y un dispositivo de recirculación de aire en su interior para homogenizar la temperatura; condiciones que garantizan el crecimiento celular.

### 1.3. Diagramación Operativa de la Investigación



### 1.4. Viabilización de la Proliferación Celular

Proliferación Celular	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Renovación del medio DMEM						
	3 días	3 días	3 días	3 días	3 días	3 días...

## 2. Campo de Verificación

### 2.1. Ubicación Espacial

La investigación se realizó en dos ámbitos específicos:

#### a. Ámbito Clínico

Clínica Odontológica de la UCSM.

#### b. Ámbito Laboratorial

Laboratorio BIOMOL (Instituto Peruano de Biología Molecular), para el análisis y procesamiento de las muestras.

### 2.2. Ubicación Temporal

#### a. Cronología

La investigación se realizó en el año 2012.

### 2.3. Unidades de Estudio

#### a. Unidades de Estudio

Fueron seleccionado 20 pacientes niños y adolescentes, de ambos géneros, con edades comprendidas entre los 10 a 18 años, con indicación de exodoncia de premolares por tratamiento ortodóntico.

#### b. Unidades de Análisis

Muestras de pulpa dental.

#### c. Manejo Metodológico de las Unidades de Análisis

##### c.1. Criterios de Inclusión

- Pacientes con aparente buen estado de salud general
- Pacientes de ambos géneros
- Pacientes con edades entre 10 a 18 años
- Primeros y/o segundos premolares sanos
- Premolares recientemente extraídos.

### **c.2. Criterios de Exclusión**

- Pacientes con alguna enfermedad sistémica
- Pacientes menores de 10 años y mayores de 18 años
- Premolares con lesiones cariosas y/o compromiso pulpar
- Premolares con tratamiento de ortodoncia/endodoncia
- Premolares extraídos no recientemente.

### **c.3. Consideraciones Éticas**

Los pacientes donadores de dientes premolares participaron voluntariamente en la investigación, firmando el consentimiento informado que se adjunta en anexos.

### **d. Tamaño de la Muestra**

Por considerar el diseño del presente estudio, el proceso laboratorial de las unidades de estudio y el costo del financiamiento, se asignó 20 unidades de análisis.

## **3. Estrategias de Recolección**

### **3.1. Organización**

Antes de aplicar el proceso laboratorial en la presente investigación, se realizó las siguientes actividades:

- Autorización del director de la Clínica Odontológica de la UCSM.
- Coordinación con el laboratorio BIOMOL.
- Prueba piloto.

### **3.2. Recursos**

#### **a. Recursos Humanos**

Investigador: Christian Víctor Calderón Moya.

Asesor: Dr. Gustavo Obando Pereda.

Colaborador: PhD. Dr. Julio César Bernabé Ortiz

**b. Recursos Físicos**

Representados por la disponibilidad ambiental y de infraestructura de la Clínica Odontológica de la UCSM y del laboratorio BIOMOL.

**c. Recursos Económicos**

El presupuesto para la presente investigación ha sido cubierto por el investigador.

**d. Recursos Institucionales**

- Clínica Odontológica de la UCSM.
- Laboratorio BIOMOL.

**3.3. Validación del Instrumento**

Antes de aplicar la ficha laboratorial, esta fue validada en una unidad de análisis piloto, a efecto de juzgar la funcionabilidad de la misma, hacer reajustes, probar la factibilidad y controlar todo el proceso laboratorial.

**4. Estrategia para Manejar los Resultados**

**4.1. Plan de Procesamiento o Sistematización**

Se empleó un procesamiento manual y computarizado conforme a las siguientes operaciones:

**a. Clasificación**

La información obtenida a través de la ficha laboratorial fue ordenada en una matriz de registro y control, denominada matriz de sistematización, que figura en los anexos de la investigación.

**b. Recuento**

La observación e identificación de las unidades de análisis fue laboratorial con su debido registro y documentación fotográfica. Los datos fueron reunidos recurriendo a la matriz de sistematización.

**c. Tabulación**

Se elaboraron cuadros numéricos con datos de frecuencia de la proliferación celular, para satisfacer el requerimiento de los resultados obtenidos en la investigación.

**d. Graficación**

Se confeccionaron gráficas en forma de histogramas y polígonos de frecuencia, para evidenciar la proliferación celular a través del tiempo y según la naturaleza de los datos expuestos en las tablas.

**4.2. Plan de Análisis**

**a. Tratamiento Estadístico**

Se utilizó un análisis cuantitativo de la información obtenida, cuya diagramación se presenta a continuación:

VARIABLE ÚNICA	CARÁCTER ESTADÍSTICO	MEDICIÓN
Células Madre de la Pulpa Dental de Premolares	Cuantitativo	1. Recuento celular con intervalos de frecuencia. 2. Tasa de proliferación celular en porcentaje

**b. Metodología Interpretativa**

Los cuadros fueron interpretados jerarquizando los datos y con una apreciación crítica.

**c. Modalidad Interpretativa**

Se utilizó una interpretación subsecuente a cada cuadro y gráfico, seguida de una discusión o comentario final.

**d. Nivel Interpretativo**

Se utilizó niveles exclusivamente laboratoriales.

### e. Operaciones Interpretativas

Se recurrió al análisis, síntesis, deducción e inducción de los resultados obtenidos.

### 5. Conclusiones

Se arribaron a las conclusiones dando respuesta a los objetivos planteados en la presente investigación.

### 6. Recomendaciones

Fueron redactadas en base a las necesidades de las políticas de investigación de la Facultad de Odontología de la UCSM, también como contribución científica para la profesión, a los estudiantes de odontología y a la institución universitaria, según la relevancia local, nacional e internacional.

### 7. Cronograma de Trabajo

TIEMPO DE ACTIVIDADES	AÑO 2012															
	Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Recolección de la información y ejecución del marco teórico	X	X	X													
Viabilidad laboratorial				X	X											
Recolección de la muestra						X	X									
Procesamiento Laboratorial								X	X	X	X					
Análisis e interpretación de los resultados												X	X			
Elaboración del informe final														X		



## **CAPITULO III**

# **RESULTADOS**

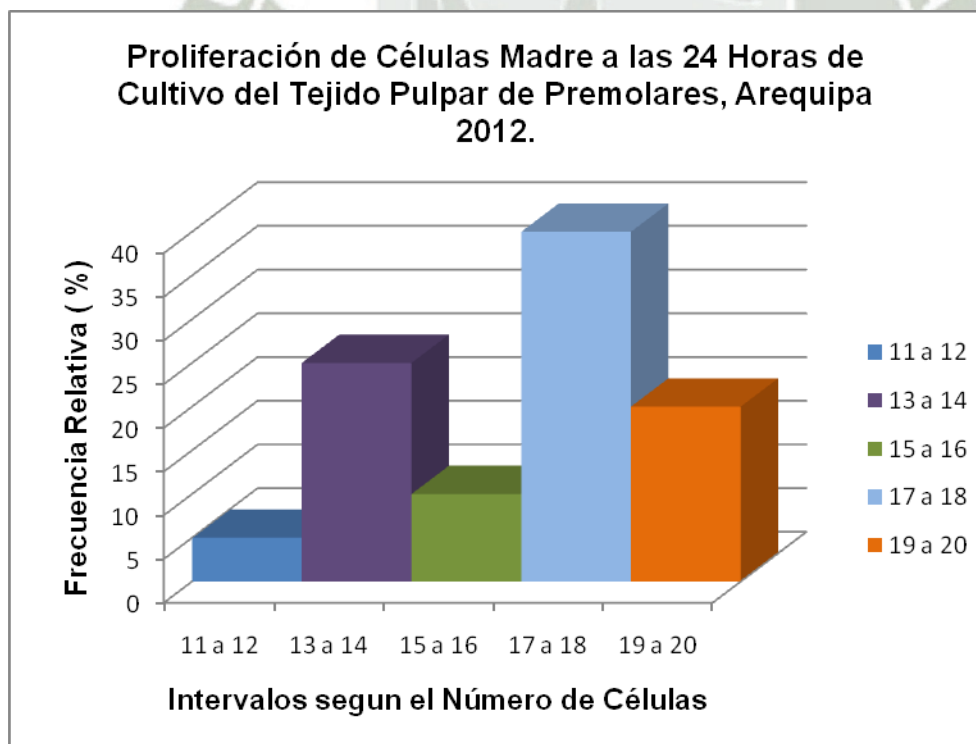
**CUADRO No. 1**

**Proliferación de Células Madre a las 24 Horas de Cultivo del Tejido  
Pulpar de Premolares, Arequipa 2012.**

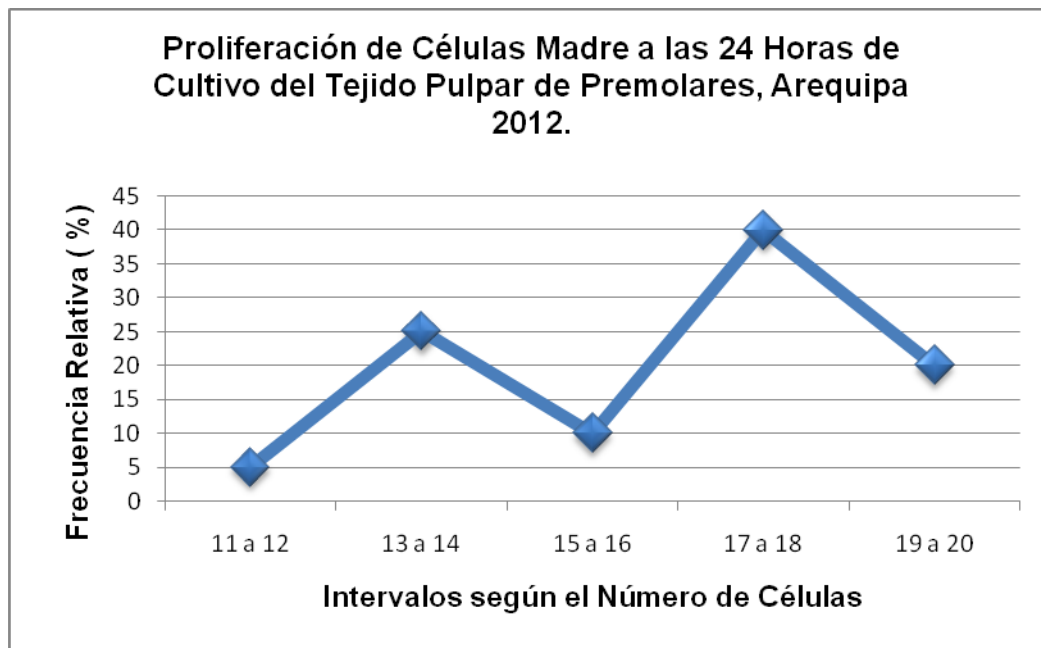
Nº de Células	ni	Ni	fi	fi(%)	Fi
11 a 12	1	1	0,05	5	5
13 a 14	5	6	0,25	25	30
15 a 16	2	8	0,1	10	40
17 a 18	8	16	0,4	40	80
19 a 20	4	20	0,2	20	100

Fuente: Matriz de Sistematización

**GRÁFICO No. 1 a**



**GRÁFICO No. 1 b**



El cuadro No. 1 y los gráficos No. 1 a-b, evidencian que a las 24 horas de cultivo se observa con el microscopio óptico invertido 17 a 18 células madre por campo, con la característica de presentar una forma ovoide, que conforman el 40 % de las unidades de análisis.

Lo que se debe a la capacidad de multiplicación que poseen las células madre, manteniendo su estado indiferenciado.

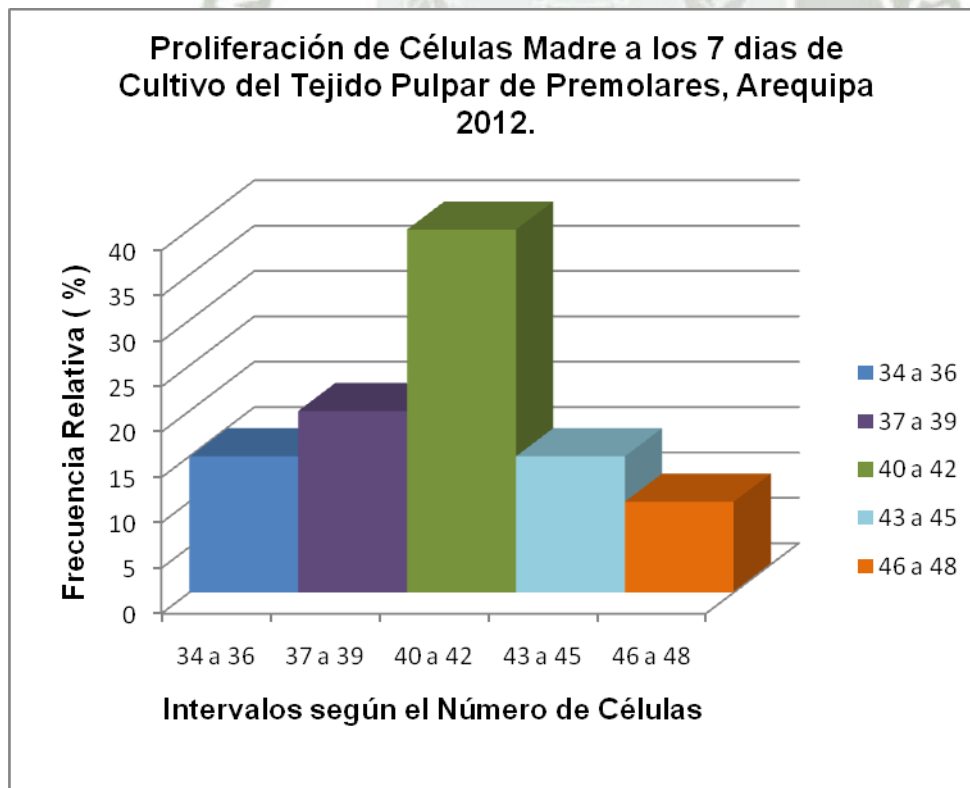
**CUADRO No. 2**

**Proliferación de Células Madre a los 7 días de Cultivo del Tejido Pulpar de Premolares, Arequipa 2012.**

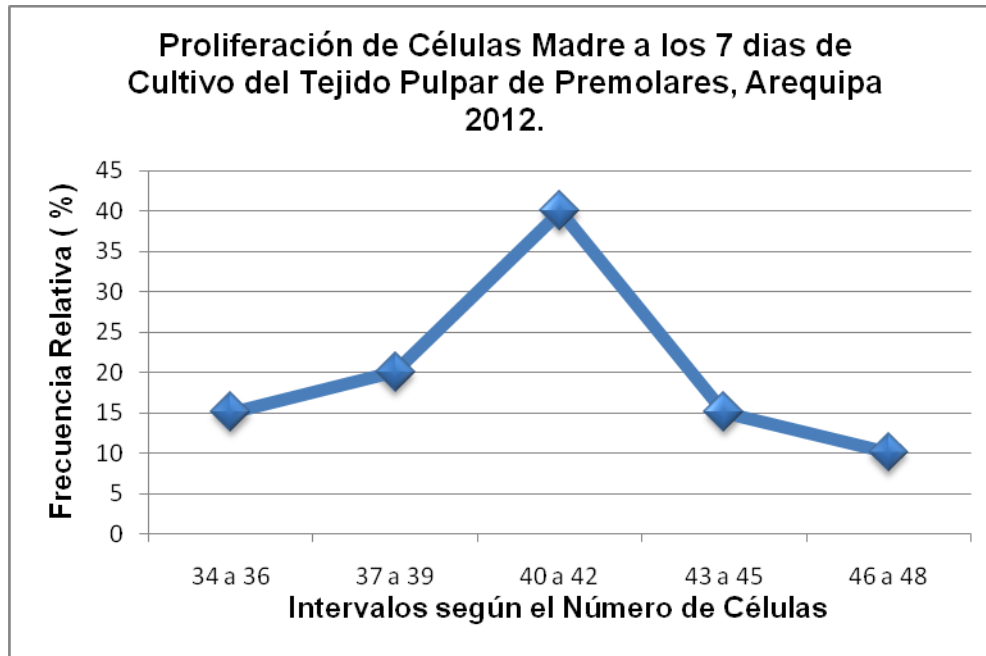
Nº de Células	ni	Ni	fi	fi(%)	Fi
34 a 36	3	3	0,15	15	15
37 a 39	4	7	0,2	20	35
40 a 42	8	15	0,4	40	75
43 a 45	3	18	0,15	15	90
46 a 48	2	20	0,1	10	100

Fuente: Matriz de Sistematización

**GRÁFICO No. 2 a**



**GRÁFICO No. 2 b**



El cuadro No. 2 y los gráficos No. 2 a-b, demuestran que a los 7 días de cultivo se observa con el microscopio óptico invertido 40 a 42 células madre por campo, con la característica de presentar una forma fibroblastoide, que conforman el 40 % de las unidades de análisis.

Las células madre poseen potencial de multiplicación, pero exigen ciertas condiciones de microambiente que les permite la reposición activa de su población de manera constante.

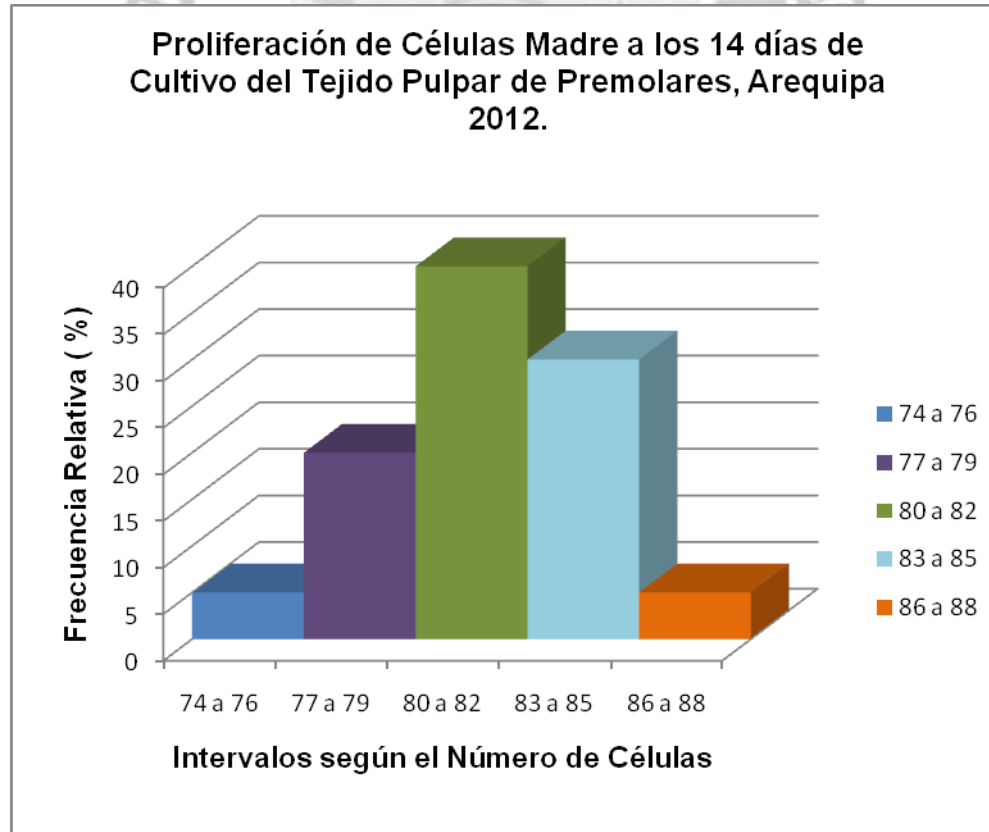
**CUADRO No. 3**

**Proliferación de Células Madre a los 14 días de Cultivo del Tejido Pulpar de Premolares, Arequipa 2012.**

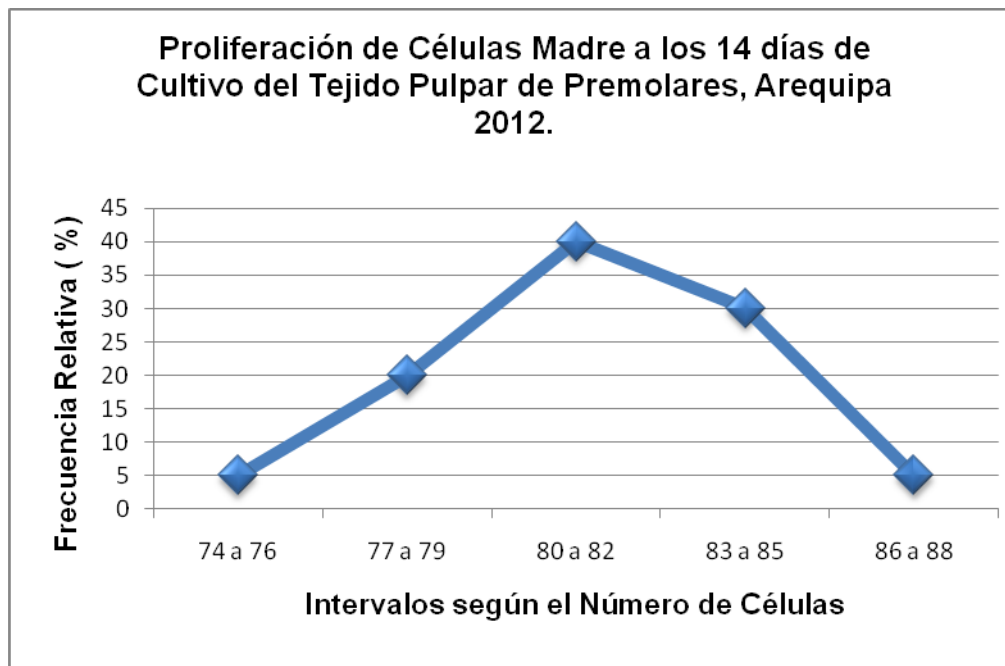
Nº de Células	ni	Ni	fi	fi(%)	Fi
74 a 76	1	1	0,05	5	5
77 a 79	4	5	0,2	20	25
80 a 82	8	13	0,4	40	65
83 a 85	6	19	0,3	30	95
86 a 88	1	20	0,05	5	100

Fuente: Matriz de Sistematización

**GRÁFICO No. 3 a**



**GRÁFICO No. 3 b**



El cuadro No. 3 y los gráficos No. 3 a-b, demuestran que a los 14 días de cultivo se observa con el microscopio óptico invertido 80 a 82 células madre por campo, con la misma característica de presentar forma fibroblastoide, que constituyen el 40 % de las unidades de análisis.

Su potencial de multiplicación proporciona reposición activa de su población de manera constante, a pesar de no ser inmortales tienen la capacidad de expandirse numerosas veces durante su cultivo, manteniendo su capacidad de crecimiento y su pluripotencialidad.

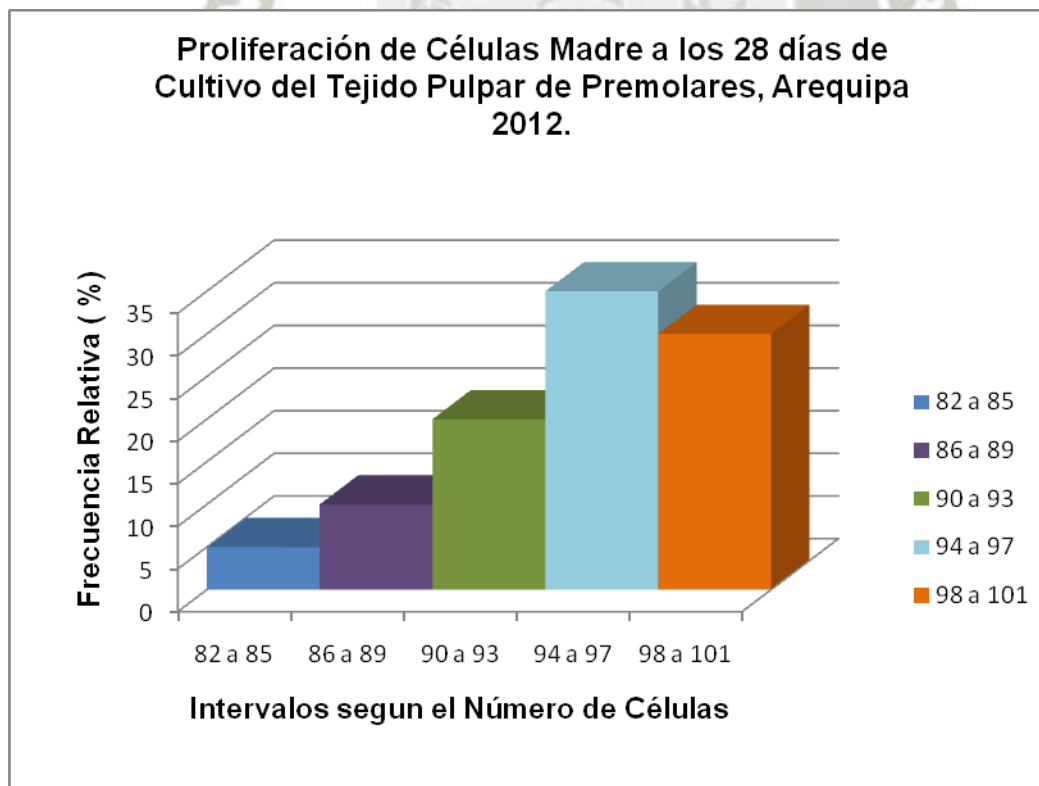
**CUADRO No. 4**

**Proliferación de Células Madre a los 28 días de Cultivo del Tejido Pulpar de Premolares, Arequipa 2012.**

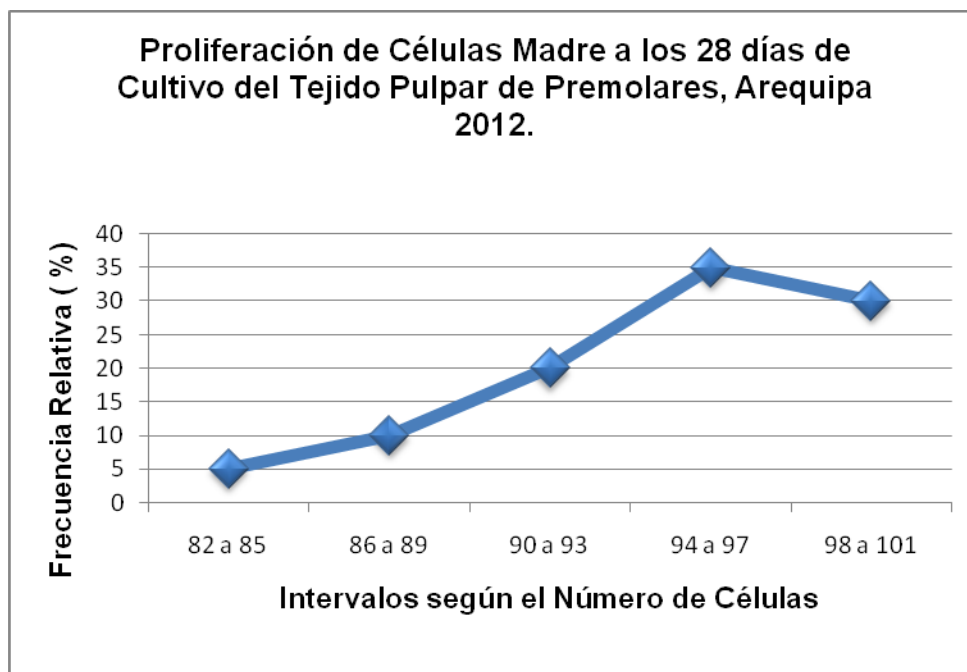
Nº de Células	ni	Ni	fi	fi(%)	Fi
82 a 85	1	1	0,05	5	5
86 a 89	2	3	0,1	10	15
90 a 93	4	7	0,2	20	35
94 a 97	7	14	0,35	35	70
98 a 101	6	20	0,3	30	100

Fuente: Matriz de Sistematización

**GRÁFICO No. 4 a**



**GRÁFICO No. 4 b**



El cuadro No. 4 y los gráficos No. 4 a-b, nos permiten apreciar que a los 28 días de cultivo se observa con el microscopio óptico invertido 94 a 97 células madre por campo, conservando la característica de presentar forma fibroblastoide, que corresponden al 35 % de las unidades de análisis. Valores próximos a los anteriores corresponden de 98 a 101 células madre por campo que constituyen el 30 % de las unidades de análisis. Si sumamos ambos resultados podemos decir que en el 65 % de las muestras la proliferación de células madre fue sostenida, con valores entre 94 y 101 células.

Los resultados obtenidos pueden deberse a las condiciones de cultivo celular, al cuidado por evitar la contaminación de las muestras y sobre todo a la edad de los paciente donantes que como se dijo anteriormente son niños y jóvenes de 10 a 18 años. El tejido pulpar de sus premolares tuvo contenido celular considerable que incluye definitivamente a las células madre.

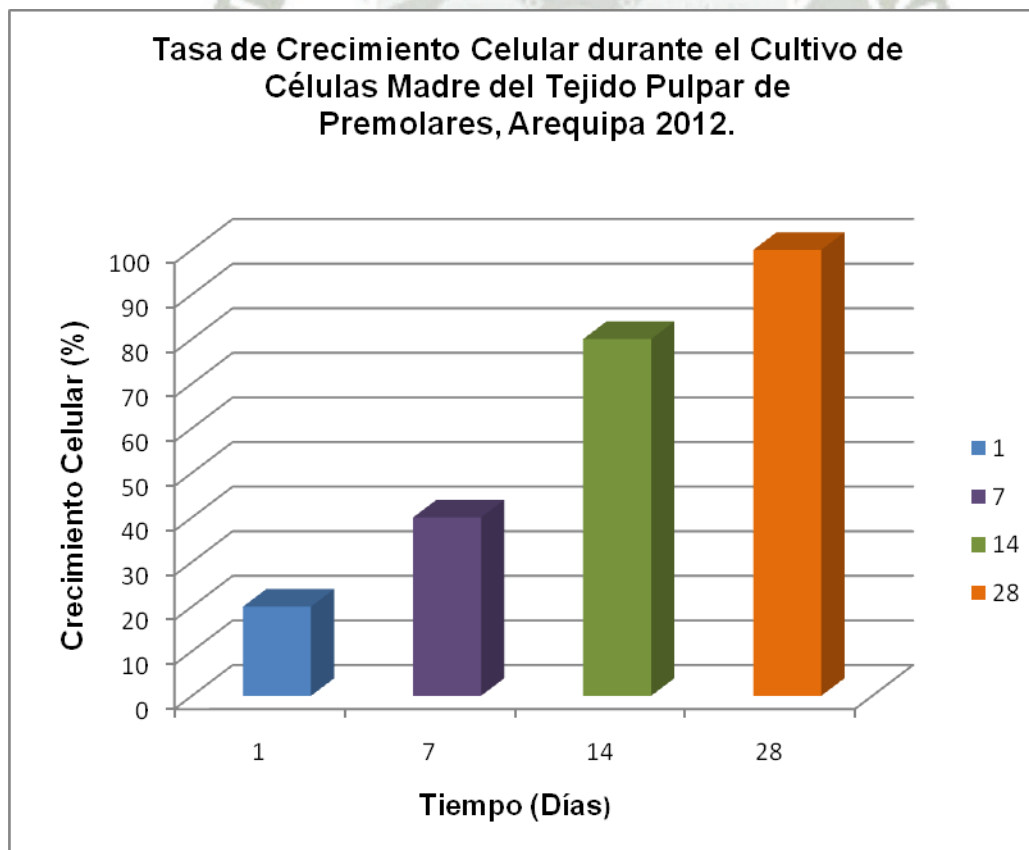
**CUADRO No. 5**

**Tasa de Crecimiento Celular durante el Cultivo de Células Madre del Tejido Pulpar de Premolares, Arequipa 2012.**

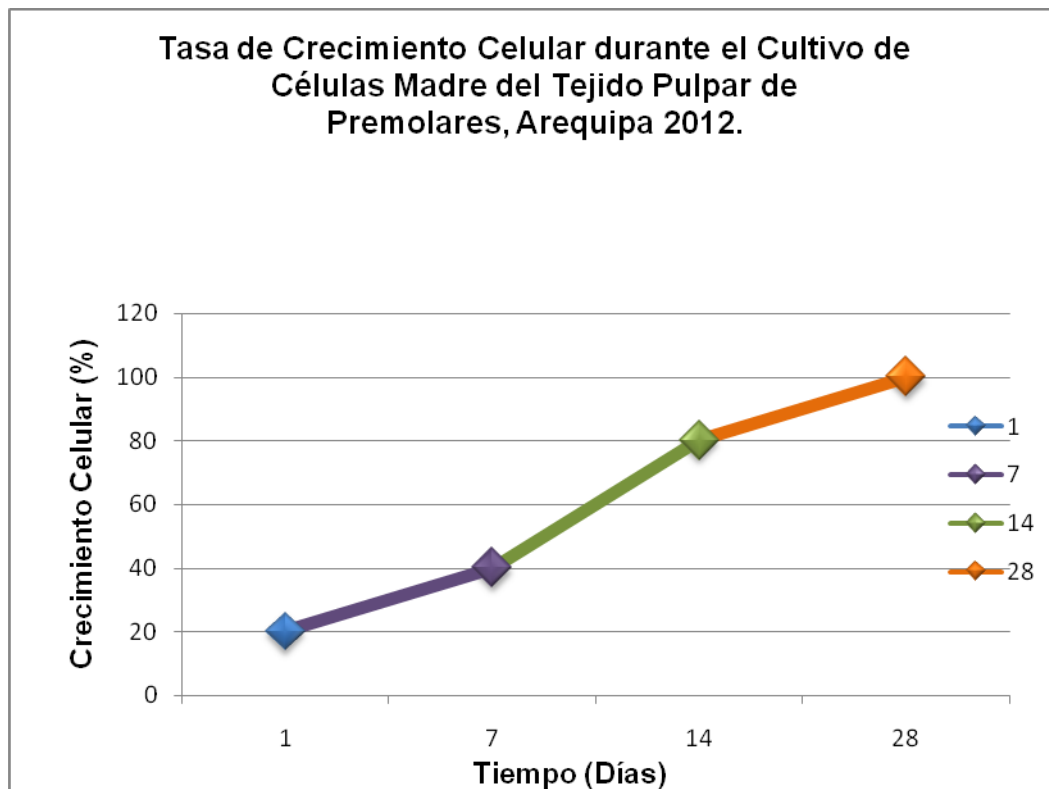
TASA DE CRECIMIENTO CELULAR	
Crecimiento Celular (%)	Tiempo (días)
20	1
40	7
80	14
100	28

Fuente: Matriz de Sistematización

**GRÁFICO No. 5 a**



**GRÁFICO No. 5 b**



El cuadro No. 5 y los gráficos No. 5 a-b, evidencian la tasa de crecimiento celular que se obtuvo durante el procedimiento laboratorial al cultivar las células madre de los premolares humanos.

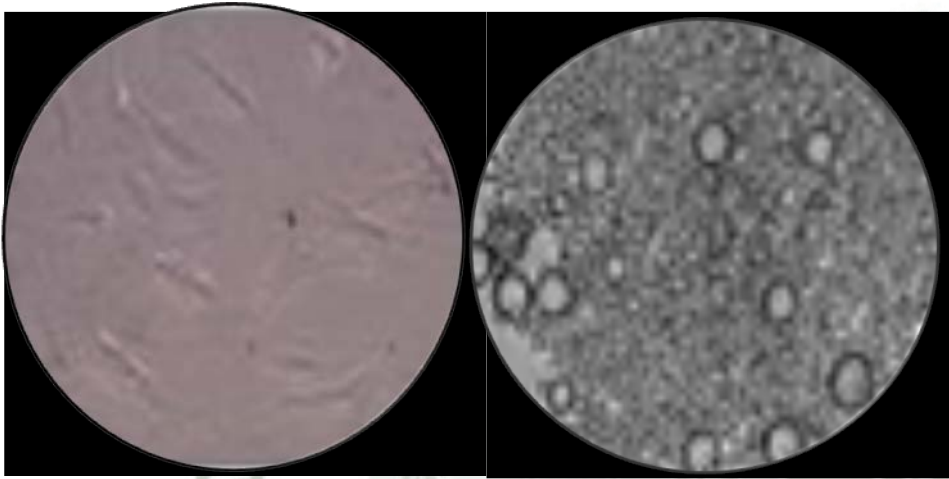
Durante las primeras 24 horas la tasa de crecimiento celular fue del 20 %, a los 7 días del 40 %, a los 14 días del 80 % y a los 28 días del 100 %, (la tasa de crecimiento celular es el tiempo necesario para que una población celular se multiplique).

En la presente investigación la tasa de crecimiento celular fue consistente y permaneció constante durante el tiempo de cultivo.

## GRÁFICO No. 6

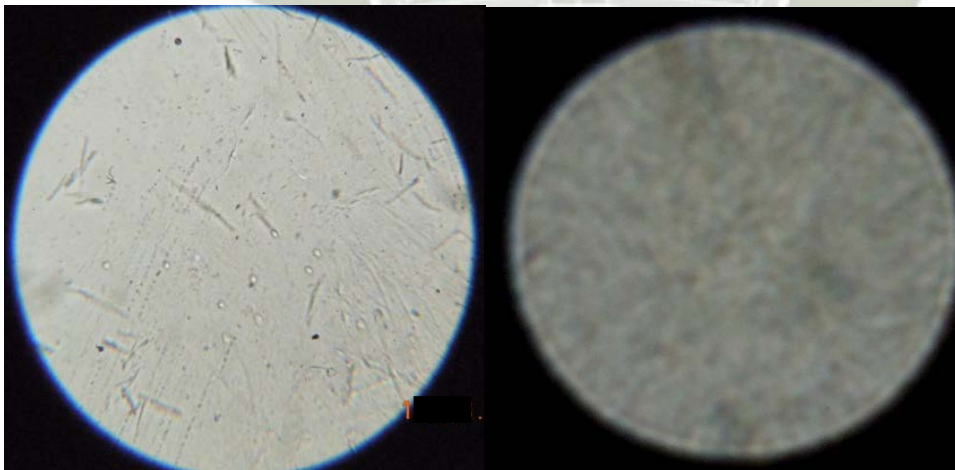
### Cultivo Celular de Células Madre del Tejido Pulpar de Premolares, Arequipa 2012

#### OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA



24 horas

24 horas, forma ovoide



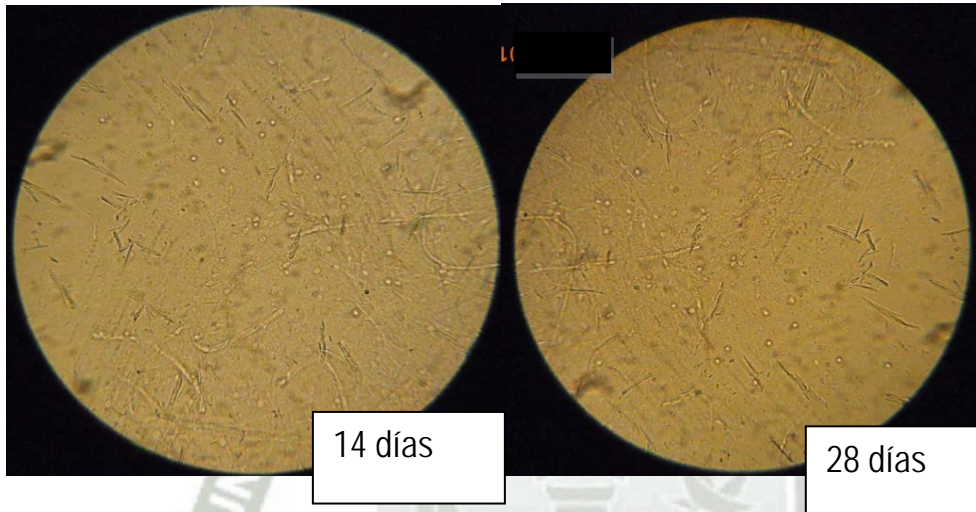
24 horas

7días

## GRÁFICO No. 7

### Cultivo Celular de Células Madre del Tejido Pulpar de Premolares, Arequipa 2012

#### OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA



28 días, forma  
fibroblastoide

## DISCUSIÓN

En odontología los estudios con células madre sirven como fundamento científico para aplicar la terapia celular en la regeneración de tejidos bucales.

Por el carácter inédito de la presente investigación, los resultados obtenidos no pueden ser comparados o contrastados en su totalidad con otras investigaciones científicas similares; sin embargo se ha resaltado algunas particularidades importantes de la técnica laboratorial y algunas características propias de las células madre durante su cultivo celular.

**Bydlowsky et al (2009)**, menciona como características biológicas de las células madre su capacidad de autorenovación, de multiplicación, manteniendo su estado indiferenciado, proporcionan reposición activa de su población, tiene capacidad de diferenciarse en diversos tejidos celulares; características que acreditan que las células madre tienen papel regenerativo cuando sufren lesión o injuria.<sup>56</sup>

Una de las principales particularidades de las células madre durante su proliferación y cultivo es su adherencia a las superficies de plástico, por esta razón se emplean frascos y multiplacas de poliestireno con buena calidad óptica.

**Flores, Montesinosy Mayani (2006)**, coinciden con nuestra apreciación, al indicar que la identificación de las células madre consiste en obtener de manera consistente células adherentes a la superficie de plástico.<sup>57</sup>

En la presente investigación, durante la observación de las muestras de células madre al microscopio óptico invertido en diferentes cortes de tiempo, podemos indicar que hasta las 24 horas tienen forma ovoide, luego van tomando un aspecto muy semejante a los fibroblastos. **Araujo et al (2011)**, menciona que después de la adhesión de las células madre a la superficie plástica, presentan una forma inicial ovoide, para luego tomar forma fibroblastoide; características de

---

<sup>56</sup> Araujo de Jesús A. et al, Coleta y Cultura de Celulas Tronco Obtidas da Polpa de Dentes Deciduos: Técnica e Relato de Caso Clínico, Dental PressJournalOrthodontic, págs. 111-114.

<sup>57</sup> Bydlowsky P. Sergio et al, Características Biológicas das Celulas Tronco Mesenquimaes, Revista Brasileira de Hematología e Hemoterapia, págs. 25-35.

forma que coinciden con las expresadas por nosotros durante la observación microscópica.<sup>58</sup>

**Meruane y Rojas (2011)**, consideran como aspecto muy importante durante el procedimiento laboratorial de obtención y cultivo celular de células madre, el cumplimiento de las estrictas medidas de esterilización, porque es posible la contaminación de la muestras con todo tipo de gérmenes. La presente investigación se realizó en los laboratorios BIOMOL, aplicando las medidas de esterilización durante todo el procedimiento.<sup>59</sup>

Sin embargo, **Bydlowsky et al (2009)**, menciona como otros factores que influyen en su crecimiento: el método de aislamiento, la superficie de cultivo, el medio de cultivo, la densidad de sembrado, el tratamiento con diferentes factores de crecimiento, el empleo de sustancias químicas, así como la edad del donante.<sup>60</sup>

Finalmente estamos conscientes que los resultados de este trabajo serán el inicio de otros a futuro, porque estamos seguros que la terapia celular tiene mucho potencial de aplicación clínica en odontología.

---

<sup>58</sup>Flores Figueroa Eugenia, Montesinos Juan y Mayani Héctor, Células Troncales Mesenquimales: Historia, Biología y Aplicación Clínica, Revista de Investigación Clínica, págs. 498-511.

<sup>59</sup>Meruane N. Manuel y Rojas R. Mariana, Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo: Técnica de Obtención y Utilidad en Cirugía, Revista Chilena de Cirugía, págs. 223-228.

<sup>60</sup>Bydlosky P. Sergio et al, Ibid, págs. 25-35.

## CONCLUSIONES

- PRIMERA:** El procedimiento laboratorial para la obtención de células madre de premolares humanos consistió en el lavado y digestión celular, cultivo celular, tripsinización celular y de forma más selectiva la proliferación celular.
- SEGUNDA:** La estructura morfológica de las células madre observada con el microscopio óptico invertido fue ovoide a las 24 horas y fibroblastoide a partir de los 7 días.
- TERCERA:** El recuento celular del 40 % de las unidades de análisis fue de 18 células a las 24 horas, 42 células a los 7 días, 82 células a los 14 días y el recuento celular del 35 % fue 100 células a los 28 días.
- CUARTA:** Del 100 % de crecimiento celular obtenido a los 28 días; la tasa de crecimiento celular a las 24 horas fue 20 %, a los 7 días 40 % y a los 14 días 80 %.
- QUINTA:** Si es posible obtener células madre del tejido pulpar de premolares humanos.

## RECOMENDACIONES

- PRIMERA:** Se recomienda continuar otras investigaciones con células madre de origen dental, que complementen la que se ha realizado y permitan ofrecer alternativas de terapia celular en el campo de la odontología.
- SEGUNDA:** Se sugiere la motivación de los docentes en los estudiantes de pregrado y de especialidad, para realizar estudios de investigación laboratoriales y experimentales con células madre de origen pulpar, periodontal, de la papila apical y del folículo dental.
- TERCERA:** Es necesario solicitar a las autoridades de la facultad y de la institución universitaria la implementación de laboratorios con fines de investigación, que eviten la búsqueda de otros ambientes externos.
- CUARTA:** Las células madre de origen dental por sus características y propiedades constituyen una esperanza prometedora del futuro para las enfermedades que se relacionan con el campo de la odontología.

## BIBLIOGRAFÍA

BorysenkoMyrin et al, *Histología Funcional*, Editorial Limusa, Año 1985.

Canalda Carlos y Brau Esteban, *Endodoncia Técnicas Clínicas y Bases Científicas*, Editorial Masson, Año 2001.

FinnGenesser, *Histología Sobre Bases Moleculares*, Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, Año 2003.

Gómez de Ferraris María y Campos Muñoz Antonio, *Histología y Embriología Bucodental*, Editorial Médica Panamericana, Segunda Edición, Año 2003.

Linares Rosado L, *Proyecto de Investigación para Odontología*, Editorial Universidad Católica de Santa María, Primera Edición, Año 2008.

Moya de Calderón Zaida, *Plasma Rico en Plaquetas en Odontología*, Editorial Universidad Católica de Santa María, Primera Edición, Año 2015.

Provenza Vincent D, *Histología y Embriología Odontológicas*, Editorial Interamericana, Año 1972.

## HEMEROGRAFÍA:

Araujo de Jesús A. et al, *Coleta y Cultura de Celulas Tronco Obtidas da Polpa de Dentes Deciduos: Técnica e Relato de Caso Clínico*, Dental Press Journal Orthodontic, Vol. 16, No. 6, Año 2011.

Bydlosky P. Sergio et al, *Características Biológicas das Celulas Tronco Mesenquimaes*, Revista Brasileira de Hematología e Hemoterapia, Vol. 31, (Suplemento 1), Año 2009 .

D'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A, *Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool For Bone Regeneration*, Journal StemCell, Vol 4:21-26, Año 2008.

D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A. et al, *Human Mandible Bone Defect Repair by the Grafting of Dental Pulp Stem/Progenitor Cells and Collagen Sponge Biocomplexes*, Journal European Cell Mater, Vol.18:75-83, Año 2009.

Flores Figueroa Eugenia, Montesinos Juan y MayaniHéctor, *CélulasTroncalesMesenquimales: Historia, Biología y AplicaciónClínica*, Revista de InvestigaciónClínica, Vol. 58, No. 5, Año 2006.

Friedlander L.T, Cullinan M.P, Love R.M, *Dental Stem Cells and Their Potential - Role in Apexogenesis and Apexification*, Journal International Endodontic, Vol. 42:955-62, Año 2009.

Gandía C, Armiñán A, García-Verdugo J, Lledó E, Ruiz A, Miñana M, et al, *Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction*, Falta ..... Vol. 26:638-645, Año 2008.

Glick M, *Stem Cell Research and Oral Health*, Journal American Dental Association, Vol. 140:112-4, Año 2009.

González L, Font A, De Nova J, *Investigación con Células Madre de Origen Dentario. Actualización*, Revista Gaceta Dental, N. 223, Año 2011.

Gotlieb E.L, Murray P.E, Namerow K.N, Kuttler S, García-Godoy F, *An Ultrastructural Investigation Of Tissue-Engineered Pulp Constructs Implanted Within Endodontically Treated Teeth*, Journal American Dental Association, Vol. 139:457-465, Año 2008.

Gronthos S, et all, *Stem Cells Properties of Human Dental Pulp Stem Cells*, Journal Dental Research, Año 2002.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, GehronRobey P, Shi S, *Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in Vivo*, Proc. Natl. Academy Science USA, Vol. 97:13625-13630, Año 2000.

Hernández Ramirez P, *Aspectos Éticos en el Empleo de las Células Madre*, Revista Cubana De Hematología, Inmunología y Hemoterapia, Vol. 23 N. 2:1-7, Año 2007.

Huang G.T.J, Gronthos S, Shi S, *Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those From Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine*, Journal Dental Research, Vol. 88(9):792-806, Año 2009.

Jiménez I. et al, *Avances en Regeneración Celular en Odontología*, Revista Dentum, Vol. 7(3), Año 2007.

Karaöz E, NurDofan B, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S et al, *Isolation and in Vitro Characterisation of Dental Pulp Stem Cells From Natal Teeth*, Journal Histochem Cell Biology, Vol. 133:95-112, Año 2010.

Kolf C, Cho E, Tuan R, *Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells: Regulation of Niche, Self-Renewal and Differentiation*, Journal Arthritis Research, Vol. 9(1):204, Año 2007.

Liu H, Gronthos S, SHIS, *Dental Pulp Stem Cells Methods in Enzimology*, Journal Adults Stem Cells Methods in Enzimology, Vol. 419, Año 2006.

Lukinmaa P. and Vaheri A, *Ed-A Region - Containing Isoform of Cellular Fibronectin Presents in Dentin Matrix in Dentinogenesis Imperfecta Associate with Osteogenesis Imperfecta*, Journal Dental Research 73(6) 1187-1196, Año 1998.

Magallanes Fabian M, Carmona Rodriguez B, Álvares Perez M, *Aislamiento y Caracterización Parcial de Células Madre de Pulpa Dental*, Revista Odontológica Mexicana, Vol. 14 N. 1, Año 2010.

Meruane N. Manuel y Rojas R. Mariana, *Células Troncales Derivadas del Tejido Adiposo: Técnica de Obtención y Utilidad en Cirugía*, Revista Chilena de Cirugía, Vol. 63, No. 2, Año 2011.

Miura M, Gronthos S, Zhao Mingrui, Lu B, Fisher LW, GheronRobey P. et al, *SHED: Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth*, Proc. Natl. Academy Science USA, Vol.100:5807-5812, Año 2003.

Moraleda J, Ruiz F, Blánquez M, Arriba F, *¿Qué son las Células Madre?*, Revista de Hematología y Medicina Molecular, Vol. 3:2-5, Año 2004.

Munévar Niño J, Becerra Calixto A. y Bermudez Olaya C, *Aspectos Celulares y Moleculares de las Células Madre Involucradas en la Regeneración de los Tejidos con Aplicaciones en la Práctica Clínica Odontológica*, Revista Acta Odontológica Venezolana, Vol. 46 N.3, Año 2008.

Nagamoto K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S. et al, *Stem Cell Properties of Human Periodontal Ligament Cells*, Journal Periodontology Research, Vol. 41:303-10, Año 2006.

Nam H, Lee G, *Identification of Novel Epithelial Stem Cell-like Cells in Human Deciduous Dental Pulp*, Journal BiochemBiophys Research Comun, Vol. 386:135-139, Año 2009.

Pérez A, Domínguez L, Ilisástegui Z, *De la Terapia Celular a la Regeneración Periodontal*, Revista Habanera de Ciencias Médicas, Vol. 8 N. 2, Año 2009.

Pérez A, Ilisástegui Z, Hernández P, Domínguez L. et al, *Historia de la Aplicación de la Terapia Celular en Periodoncia*, Revista Habanera de Ciencias Médicas, Vol. 8 N. 5, Año 2009.

Ohazama A. et al, *Stem Cell-Based Tissue Engineering of Murine Teeth*, Journal Dental Research, Vol. N. 83 (7), Año 2004.

Shi S, Gronthos S, *Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp*, Journal Bone Mineral Research, Vol. 18(4):696-704, Año 2003.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S. et al, *Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study*, Journal Endodontic Vol. 34(2):166-171, Año 2008.

Thams C, *Actualidad de la Investigación con Células Madre*, Revista Gaceta Dental, Vol.184:134-7, Año 2007.

Vipon Arora, Pooja Arora, AKA Munshi, *Banking Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED)*, Journal Clinical Pediatric Dentistry, Vol. N°33 (4), Año 2009.

Weissman I, *Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities*, Journal Science, Vol. 287(57):1442-6, Año 2000.

Yang X, Van Der Kraan P.M, Bian Z, Fan M, Walboomers X.F, Jansen J.A, *Mineralized Tissue Formation By BMP 2- Transfected Pulp Stem Cells*, Journal Dental Research, Vol. 88(11):1020-5, Año 2009.

Zhao Z, Wang Y, Wang D, Liu H, *The Regulatory Role of A Disintegrin and Metalloproteinase 28 on the Biologic Property of Human Periodontal Ligament Stem Cells*, Journal Periodontology, Vol. 81:934-944, Año 2010.

Zheng Y, Liu Y, Zhang-CM, Zhang H.Y, Li WH, Shi S. et al, *Stem Cells From Deciduous Tooth Repair Mandibular Defect in Swine*, Journal Dental Research, Vol. 88(3):249-254, Año 2009.

### **TESIS:**

Arauzo Fernández Pablo, *Estudio Histológico de los Componentes de la Pulpa Dental en Relación a la Edad, Realizado en Piezas Sanas Permanentes en Pacientes de 8-20, 30-50 y 60-80 Años del Distrito de Arequipa*, Tesis de la Facultad de Odontología, UCSM, Año 1999.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,..... padre y/o madre del menor  
....., he sido informado del  
propósito de la investigación, por lo tanto otorgo mi consentimiento para que el  
diente extraído de mi hijo pueda servir para tal fin.

\_\_\_\_\_

DNI No.



### MATRIZ DE SISTEMATIZACION

Tiempo	24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	28 DIAS
Muestra/Nº de celulas				
1	15	36	81	98
2	17	38	78	95
3	14	41	75	86
4	18	40	80	94
5	16	35	80	97
6	13	44	79	87
7	18	48	84	92
8	17	47	80	93
9	17	34	79	90
10	20	38	80	94
11	14	40	81	98
12	12	41	83	100
13	17	39	85	100
14	20	39	80	97
15	19	40	79	83
16	18	41	84	99
17	14	43	86	95
18	20	44	83	92
19	13	41	80	97
20	18	40	85	99

**SOLICITO:      AUTORIZACIÓN      PARA      LA  
RECOLECCIÓN DE DATOS Y APLICAR  
INSTRUMENTO DE EVALUACIÓN**

**SEÑOR DIRECTOR DE LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE  
SANTA MARÍA  
DR. MARIO FLORES GONZALES**

Yo, **CHRISTIAN CALDERÓN MOYA**, alumno del Programa Profesional de Odontología, con código 2008200581, ante usted con el debido respeto me presento y expongo:


Que, deseando realizar el trabajo de investigación titulado: **“AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE (STEM CELLS) DE LA PULPA DENTAL DE PREMOLARES-MOLARES HUMANOS, CLÍNICA ODONTOLÓGICA, UCSM, AREQUIPA 2012”**, por dicha razón acudo a su Despacho para solicitar a usted se brinde la **AUTORIZACIÓN** y facilidades respectivas para el uso la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología, hacer la respectiva recolección de datos y aplicar el instrumento del trabajo de investigación.

**POR LO EXPUESTO:**

Pido a usted acceder a mi solicitud.

Arequipa, 22 de noviembre de 2012.

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARÍA  
  
CD. Mario Flores Gonzalez  
DIRECTOR-CLINICA ODON

  
CHRISTIAN CALDERÓN MOYA  
Código 2008200581

## Secuencia Fotográfica No. 1

### Obtención de la Muestra Laboratorial



## Secuencia Fotográfica No. 2

### Equipos de Laboratorio



Cámara de Flujo Laminar



Estufa de Cultivo



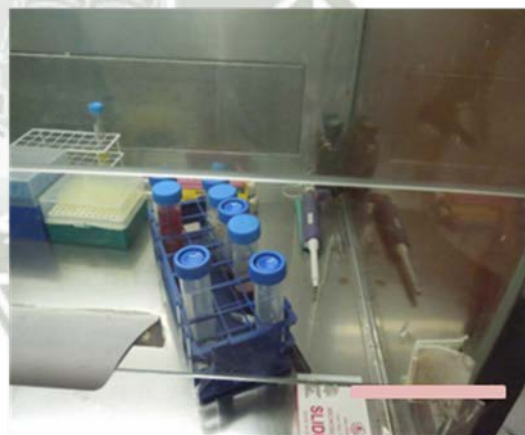
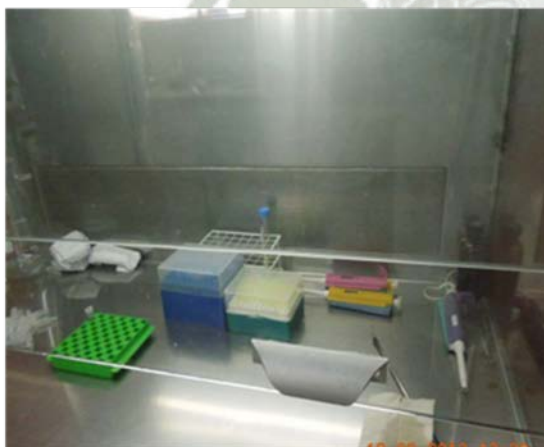
Centrifugadora



Vibrador

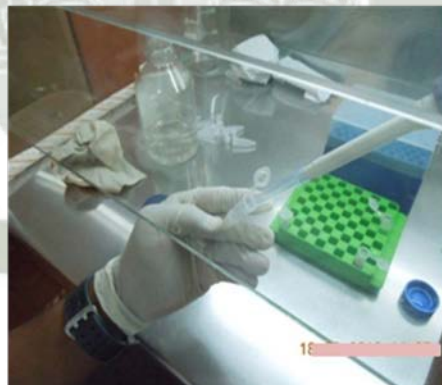
## Secuencia Fotográfica No. 3

### Preparación del Laboratorio



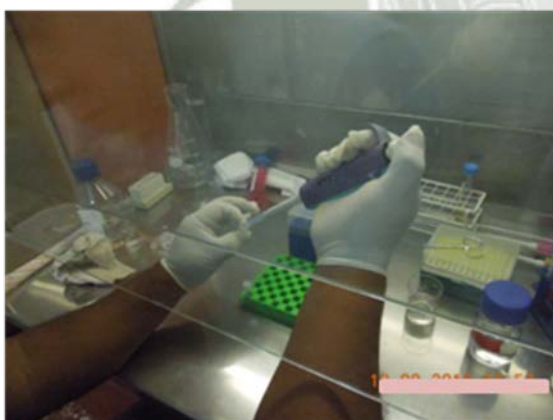
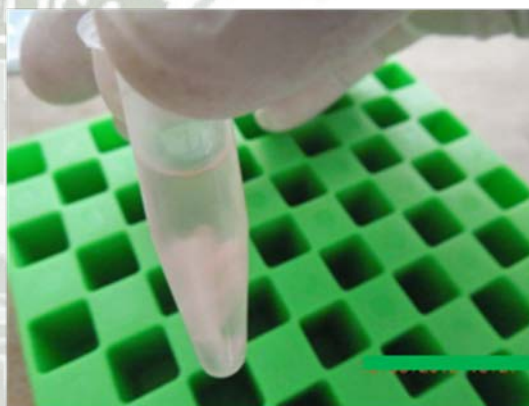
## Secuencia Fotográfica No. 4

### Digestión y Lavado Celular



## Secuencia Fotográfica No. 5

### Selección Celular



## Secuencia Fotográfica No. 6

### Proliferación Celular



## Secuencia Fotográfica No. 7

### Tripsinización Celular



## Secuencia Fotográfica No. 8

### Cultivo Celular

