

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA**

**AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS
DE PULPA DENTAL DE DIENTES DECIDUOS**

Autora: Bach. Gleny Corali Castro Hidalgo

Asesora: Dra. Carla María Ordinola Ramírez

Co -Asesores: PhD. Juan Rigoberto Tejedo Huamán

PhD. Alonso Rafael Tapia Limonchi

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

DATOS DEL ASESOR

Dra. Carla María Ordinola Ramírez

DNI N°: 18131989

Registro ORCID: 0000-0001-9146-0894

<http://orcid.org/0000-0001-9146-0894>

Campo de la Investigación y el Desarrollo OCDE según la organización para la
Cooperación y el Desarrollo Económico.

3.00.00---Ciencias Médicas, Ciencias de la Salud

3.02.00 Medicina clínica

DEDICATORIA

A mi madre por darme fortaleza, ánimos de seguir luchando para lograr este objetivo trazado y por sentirse orgullosa de mí.

A mi esposo, mi compañero, mi amigo, mi brazo derecho, promotor de toda esta lucha diaria para lograr esta meta que en un principio parecía muy difícil; pero con su apoyo incondicional tanto económico como moral se pudo lograr.

A mis hijos que junto a su padre sintieron mi ausencia cuando tenía que ir a estudiar y por sentirse orgullosos de su madre luchadora y darme ese beso de despedida diaria y esas palabras de aliento “Tú puedes mami, suerte”.

A mis hermanos a todos y cada uno de ellos que me demostraron su felicidad al verme que día a día avanzaba en este camino largo pero reconfortante, por su apoyo moral y económico.

AGRADECIMIENTO

A mi alma mater Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNRTM) por ser mi guía y formadora profesional, por forjarme un camino en las Ciencias de la Salud, a mis docentes que me guiaron con su experiencia y profesionalismo y a mis compañeros por el apoyo en este trayecto complicado.

A mis asesores Dra. Carla María Ordinola, PhD Juan Tejedo Huamán, PhD Rafel Tapia Limonchi; por ser mis guías en el desarrollo de esta Tesis.

A la Bióloga Genetista Cecilia Pajuelo Reyes por guiarme en el desarrollo de esta Tesis y por compartir sus conocimientos en cultivo celular. A la Dra. Stela Chenet Carrasco por estar también pendiente del desarrollo de esta Tesis; a todos ellos mi eterno agradecimiento y estima.

Al Instituto de Enfermedades Tropicales (IET) por brindarme su laboratorio de investigación y permitirme desarrollar esta Tesis paso a paso.

Al FONDECYT por la subvención de esta Tesis en todo el tiempo que duró este proceso. Que mediante el contrato N° 09-2019-FONDECYT- BM-INC-INV “Implementación de una Plataforma de Referencia para el Control y Vigilancia de Enfermedades Parasitarias de Alto Impacto en Perú y Desarrollo de un Dispositivo Multidiagnóstico en Puntos de Atención al Paciente” financiado por el FONDECYT que, gracias a su financiamiento en parte, fue posible la realización de esta tesis.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS.**

DR. POLICARPIO CHAUCA VALQUI.

Rector

DR. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

Vicerrector Académico

DRA. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN.

Vicerrector de Investigación

DR. YSHONER ANTONIO SILVA DÍAZ

Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud

VISTO BUENO DEL ASESOR



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE PULPA DENTAL DE DIENTES DEBIDUOS" del egresado Glory Corali Castro Hidalgo de la Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Estomatología de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 25 de abril del 2021

Firma y nombre completo del Asesor

Dra. Carla María Ordinala Ramírez

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS

Resolución de Decanatura (N°0121-2021-UNTRM-VRAC/FACISA)

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Mg. Oscar Joel Oe Carrasco

Presidente



Mg. Carlos Alberto Farje Gallardo

Secretario



Mg. Yamira Itaisa Herrera Garcia

Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

 **UNTRM**
REGLAMENTO DE PROCEDIMIENTO PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-0

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:
Aislamiento, Cultivo y Caracterización de Células Madre Mesenquimales derivado de pulpa dental de Jiróna Drieduco
presentada por el estudiante (Vegresado (X)) Doc: Gleny Corral Castro Hidalgo
de la Escuela Profesional de Estomatología
con correo electrónico institucional 1662382651@untrm.edu.pe
después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

a) La citada Tesis tiene 19 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor () / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.

b) La citada Tesis tiene % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.

Chapoyas, 03 de AGOSTO del 2022




SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:
.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 23 de AGOSTO del año 2022, siendo las 10 horas, el aspirante: Bach: Gleny Corub Costa Hidalgo, defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: ANÁLISIS, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN AL KOWIAS HABEC MEXENQUALLA DERIVADO DE PULPA DENTAL DE DIENTES RESIDUOS, teniendo como asesor a Dra. CARLA MARÍA ORDÓÑEZ RAMÍREZ, para obtener el Título Profesional de CIDUSALUD DENTARIA, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Mg. Oskar de Carabico

Secretario: Mg. Carlos Alberto Farié Cayón

Vocal: Mg. Yanna Iraila Herrera Gadaña



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado ()

Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 12:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL

| | |
|--|------|
| DATOS DEL ASESOR | ii |
| DEDICATORIA..... | iii |
| AGRADECIMIENTO | iv |
| AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS. | v |
| VISTO BUENO DEL ASESOR | vi |
| JURADO EVALUADOR DE LA TESIS | vii |
| CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS | viii |
| ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS..... | ix |
| ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL | x |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xii |
| RESUMEN | xv |
| ABSTRACT..... | xvi |
| I: INTRODUCCIÓN..... | 17 |
| II: MATERIAL Y MÉTODOS | 23 |
| III: RESULTADOS..... | 32 |
| IV: DISCUSIÓN..... | 41 |
| V: CONCLUSIONES..... | 43 |
| VI: RECOMENDACIONES | 44 |
| VII: BIBLIOGRAFÍA | 45 |
| VIII: ANEXOS | 50 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 01: Población en % de expresión de genes positivos y negativos de las CMMh o SHED. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com) | 21 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 01: | Tipos de células madre de acuerdo a su origen y potencialidad. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com) | 1 |
| Figura 02: | Caracterización de Células Madre Mesenquimales Humanas de acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). 1) Adhesión al plástico 2) Manifestación de marcadores de linaje 3) Diferenciación a osteocito, condrocito, adipocito. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com). | 2 |
| Figura 03: | Fuentes de Obtención de Células Madre Mesenquimales y algunas Aplicaciones Terapéuticas. 1) Médula ósea 2) Tejido adiposo 3) Músculo 4) Tejido neonatal 5) Pulpa dental 6) Piel. 7) Algunas aplicaciones. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender. com). | 3 |
| Figura 04: | Tipos de Células madre mesenquimales orales (MSC) según los diferentes sitios de aislamiento. Figura adaptada a partir de (Shi et al., 2020) Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com). | 4 |
| Figura 05: | Resumen gráfico del diseño experimental del proyecto. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender. com). | 9 |
| Figura 06: | Resumen gráfico del aislamiento y cultivo de CMMh derivado de pulpa de diente deciduo. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com) | 10 |
| Figura 07: | Resumen Gráfico del diseño experimental de Tridiferenciación de las CMMh derivadas de pulpa de diente deciduo. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender. com). | 14 |
| Figura 08: | Aislamiento de Pulpa de diente deciduo. Se observa que si se puede aislar pulpa dental de diente deciduo. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com) | 16 |
| Figura 09: | Observación en el microscopio invertido de CMMh derivado de pulpa dental de diente deciduo. Se observan forma fibroblástica y adheridas al plástico. Las figuras son propias de los cultivos | 18 |

- primarios. Ampliación de 4x y 10x: Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).
- Figura 10:** Forma a través de los 8 pasajes de las CMMh cultivadas en medio DMEM + 10% SFB. Se observa que las CMMh son fibroblásticas y están adheridas al plástico. Las imágenes son propias de los 8 pasajes. Ampliación en objetivos 4x, 10x y 20x: Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com). 19
- Figura 11:** Evaluación de la cinética de crecimiento de las CMMh cultivadas en medio DMEM + 10% de SFB. A: Tiempo de duplicación (Td) a través de los 8 pases. B. Duplicación acumulativa de la población (CPD) a través de los 8 pases, Los datos de A y B son la media más la desviación de los 8 pases o subcultivos: Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com). 20
- Figura 12:** Características fenotípicas de las CMMh cultivadas en medio DMEM +10% de SFB. Citometría de flujo en los pases 7 y 9 de los marcadores positivos de membrana CD 73, CD 105, CD 90 y marcadores de membrana negativos a CD 45, CD 34, HLA-DR. El eje Y simboliza el porcentaje de células marcadas. Los resultados equivalen a la media más la desviación de al menos dos experimentos individuales: Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com). 22
- Figura 13:** Competencia de diferenciación a osteocito de las CMMh sembradas en medio de diferenciación y medio control (DMEM +10% de SFB). Se observa de rojo la acumulación de calcio gracias a la tinción Alizarin Red S a 1%. Las imágenes están en aumento 10x y 20x y son representativas de 1 experimento individual: Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com). 23
- Figura 14:** Competencia de diferenciación a adipocito de las CMMh sembradas en medio de diferenciación y medio control (DMEM + 10% de SFB). Se observa vesículas de grasa de color rojo gracias a la tinción Oil Red al 1%. Las imágenes mostradas 24

tienen aumento de 10x y 20: Imagen elaborada en la aplicación
BioRender (biorender.com)

RESUMEN

Las CMMh de pulpa dental decidua son utilizadas en terapias regenerativas por su capacidad de autorrenovación, regeneración, diferenciación, inmunomodulación, promoción del angiogénesis y regeneración de tejidos dañados. Este estudio de enfoque cuantitativo, experimental- aplicativo, prospectivo, longitudinal y analítico, con objetivo de aislar, cultivar y caracterizar CMMh de pulpa dental decidua. Los parámetros evaluados fueron: cinética de crecimiento durante 8 pases: forma y adhesión al plástico valorada mediante microscopía, presencia de marcadores específico positivos CD90, CD73, CD105 y negativos, CD34, CD45, HLA-DR mediante citometría de flujo. Capacidad diferenciadora realizada a través de ensayos de diferenciación hacia adipocito y osteocito. Los resultados obtenidos mostraron que ha sido posible aislar y cultivar CMMh de pulpa dental durante 8 pases, presentando forma fibroblástica característica de CMMh. Encontrando que los cultivos presentan, senescencia replicativa, a partir del pase 6 acrecentándose en los pases; 7 y 8. La cinética de crecimiento, recuento de células viables mostró que las CMMh cultivadas presentaron tiempos de duplicación (entre 51 a 64 h adecuados para este tipo de cultivos) en los pases 2,3,4,5. En los pases 6, 7 y 8 estos tiempos de duplicación se alargan (hasta 131 y 154 h). El crecimiento de línea celular muestra un doblaje poblacional acumulativo, medido en 8 pases, presentando capacidad de diferenciación y expresión de genes. Concluyendo que las SHED se pueden aislar, cultivar y caracterizar in vitro, las SHED demostraron un patrón de proliferación, características inmunofenotípica y capacidad de diferenciación.

Palabras clave: Células madre mesenquimales, aislar, cultivar, caracterizar, pulpa dental decidua.

ABSTRACT

Deciduous dental pulp hMSC are used in regenerative therapies for their capacity for self-renewal, regeneration, differentiation, immunomodulation, promotion of angiogenesis, and regeneration of damaged tissues. This study has a quantitative, experimental-applicational, prospective, longitudinal and analytical approach, with the objective of isolating, cultivating and characterizing hMSC from deciduous dental pulp. The parameters evaluated were: growth kinetics during 8 passages: shape and adhesion to the plastic was assessed by microscopy, presence of positive specific markers CD90, CD73, CD105 and negative, CD34, CD45, HLA-D by flow cytometry. Differentiating capacity carried out through differentiation tests towards adipocytes and osteocytes. The results obtained showed that it has been possible to isolate and culture hMSC from dental pulp for 8 passages, presenting a characteristic fibroblastic form of hMSC. Finding that the cultures present, replicative senescence, from pass 6 increasing in the passes; 7 and 8. The growth kinetics, viable cell count showed that cultured hMSC presented doubling times, (between 51 and 64 hours, suitable for this type of culture), in passages 2,3,4,5. In passages 6, 7 and 8 these doubling times are lengthened (up to 131 to 154 h). The growth of the cell line shows a cumulative population doubling, measured in 8 passages, showing differentiation capacity and gene expression. Concluding that SHEDs can be isolated, cultured and characterized in vitro, SHEDs demonstrated a proliferation pattern, immunophenotypic characteristics and differentiation capacity.

Keywords: Mesenchymal stem cells, isolate, cultivate, characterize, deciduous dental pulp.

I: INTRODUCCIÓN

Las células madre son células no diferenciadas con capacidad de formar otras células que forman tejidos con funciones especializadas, es decir, poseen alto potencial de diferenciación y capacidad de autorrenovación (Hosseini et al., 2018); dentro de los tipos según su origen (figura 1) tenemos las embrionarias que provienen de embriones en etapas tempranas especialmente en la etapa de blastocisto. Son células pluripotentes debido a que tienen potestad de fraccionarse en más células madre o transformarse en cualesquiera otras células del cuerpo; gracias a esta capacidad estas células son utilizadas para renovar o restaurar tejidos u órganos dañados, lesionados o disfuncionales. (NIH, 2016).

Existen además las adultas que son encontradas en tegumentos maduros en bajas cantidades y lo encontramos en la médula ósea, tejido adiposo, cavidad oral, cordón umbilical, placenta, etc. Poseen baja capacidad para generar células del cuerpo, dentro de ellas tenemos: Células madre de cadena germinal y células madre somáticas como hematopoyéticas, mesenquimales, epiteliales. (NIH, 2016). De acuerdo a su potencial de diferenciación: Se clasifican en: Células totipotentes, pluripotentes, multipotentes, unipotentes (Anitua et al., 2018) y (Ji et al., 2020)

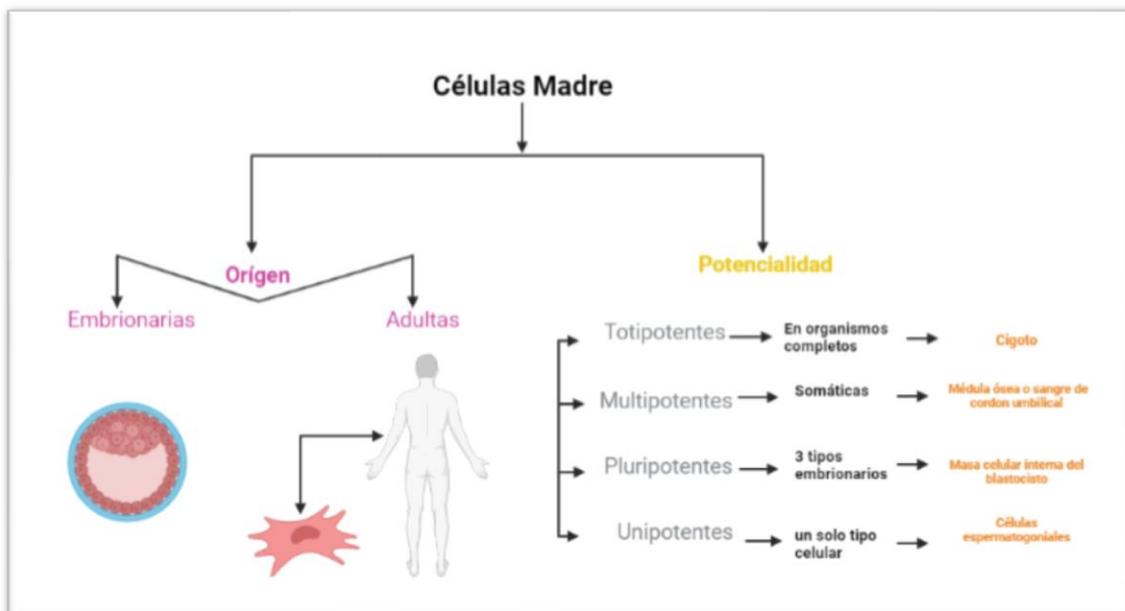


Fig. 1. Tipos de células madre de acuerdo a su origen y potencialidad. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Las células madre mesenquimales humanas (CMMh), son células adultas multipotentes del estroma no hematopoyéticas que tienen capacidad de dividirse y generar dos células hijas idénticas cuando son cultivadas en condiciones óptimas y tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares cuando son cultivadas en condiciones que promuevan dicha diferenciación. Estas células pueden aislarse a partir de diferentes tejidos, sangre periférica, médula ósea, tejido adiposo, tejido neonatal, pulpa dental, piel, fluidos humanos, etc. (Hosseini et al., 2018) utilizando protocolos de derivación específicos. (Figura 2).

Tienen además la competencia de “Homing” o anidamiento es decir emigran y se hacen en zonas del cuerpo con lesiones en la cual hay mayor aglutinación de quimioquinas debido a que tienen receptores para esto. (Hosseini et al., 2018)

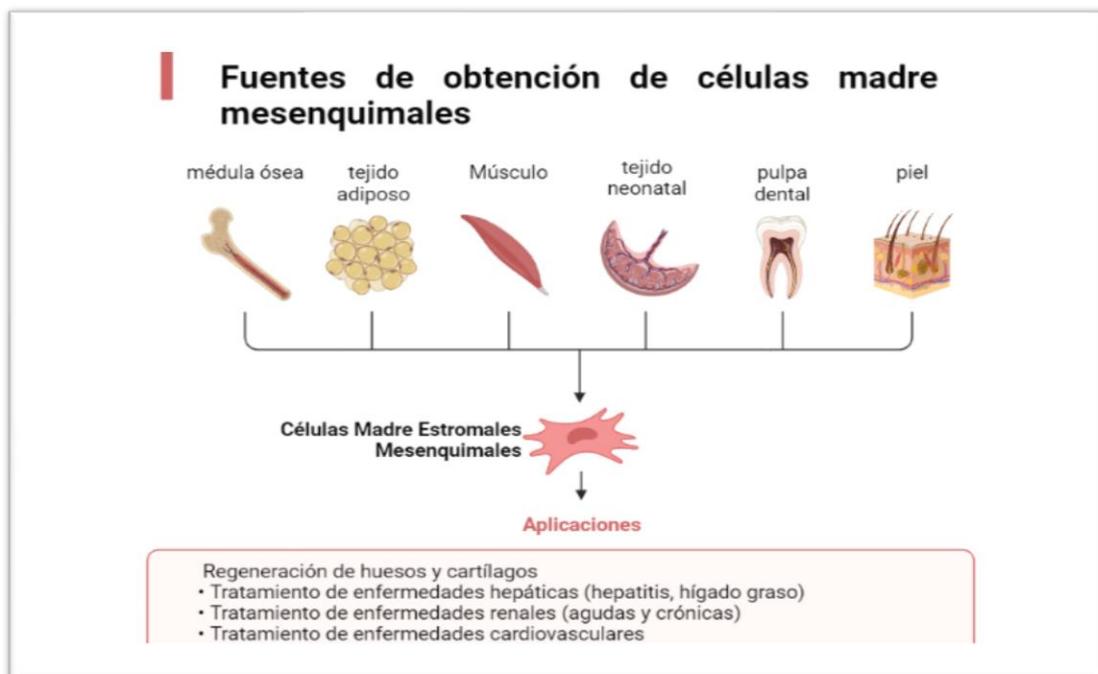


Fig. 2. Fuentes de Obtención de Células Madre Mesenquimales y algunas Aplicaciones Terapéuticas. 1) Médula ósea 2) Tejido adiposo 3) Músculo 4) Tejido Neonatal 5) Pulpa dental 6) Piel 7) Algunas aplicaciones. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Específicamente a partir de tejidos dentales se pueden aislar varios tipos de células madre adultas (figura 3), dos de las cuales son las células madre de pulpa dental (DPSC) y las células madre de diente deciduo exfoliado humano (SHED) (Shi et al., y, Sui et al., 2020).

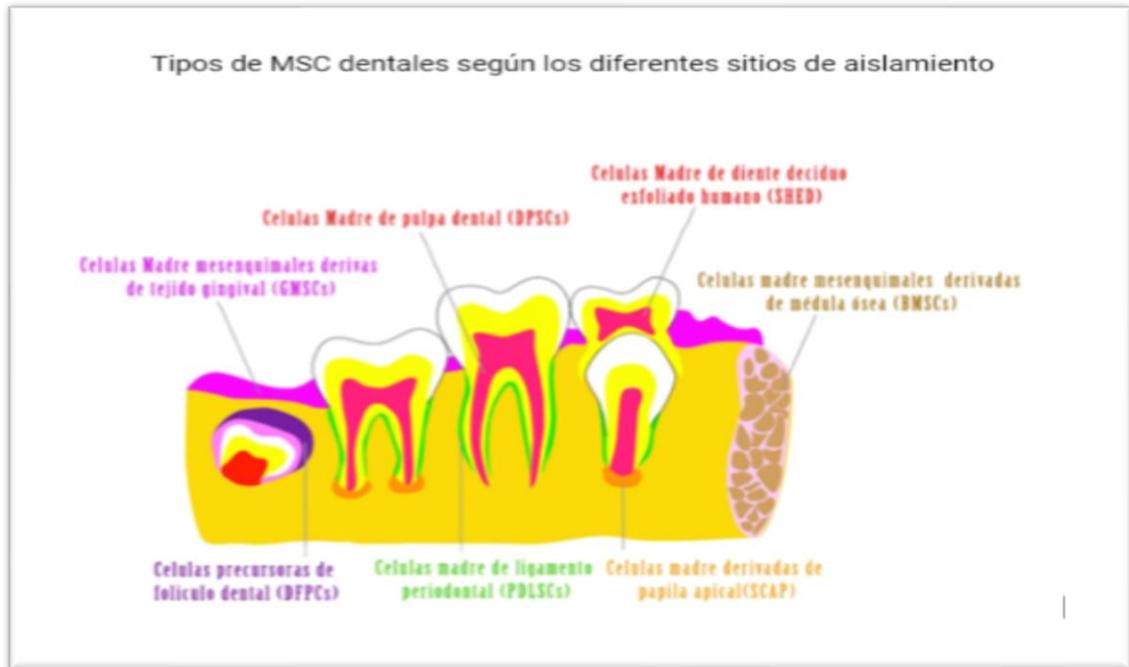


Fig. 3: Tipos de Células madre mesenquimales orales (MSC) según los diferentes sitios de aislamiento. Figura adaptada a partir de (Shi et al., 2020) Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Desde el punto de vista de sus características biológicas las DPSC y las SHED presentan los tres criterios mínimos para ser consideradas MSC propuestos por la Sociedad Internacional para terapia celular (Doiminici M, et al 2006), es decir estas células son capaces de adherirse al plástico de las placas de cultivo; expresan CD73, CD90, CD105, mientras que no expresa CD34, CD45, y HLA-DR. o no expresa marcadores de membrana (figura 4) además presentan la capacidad de diferenciarse hacia osteocito, adipocito y condrocito (Malekfar et al., 2016). Recientemente se han descrito que tanto las DPSC, como las SHED, además de diferenciarse a los tipos celulares de origen mesodermal (dentina, hueso, ligamento periodontal, osteoblastos, condrocitos adipocitos), también pueden diferenciarse a tipos celulares de origen ectodérmico (melanocitos, células gliales) y hacia tipos celulares de origen endodérmico como hepatocitos, células beta pancreáticas (Shi et. al. 2020, Potdar et al., 2015).

Adicionalmente, además de esta amplia multipotencia, las DPSC y SHED tienen capacidad de autorrenovarse después de una división simétrica (Kawase et al., 2020). Otra característica biológica relevante de las células DPSC y SHED, es su capacidad inmunomoduladora, de promoción del angiogénesis, de regeneración de tejidos dañados, etc. (Zeiltin & Shi et al., 2020; Karakaya & Ulusoy. 2018). Todas estas características

indican de su enorme potencial en la ingeniería tisular en odontología, principalmente en la regeneración, renovación y restauración de tejidos perdidos (Karakaya & Ulusoy, 2021; Anitua et al., 2018; Lambrichts et al., 2016).

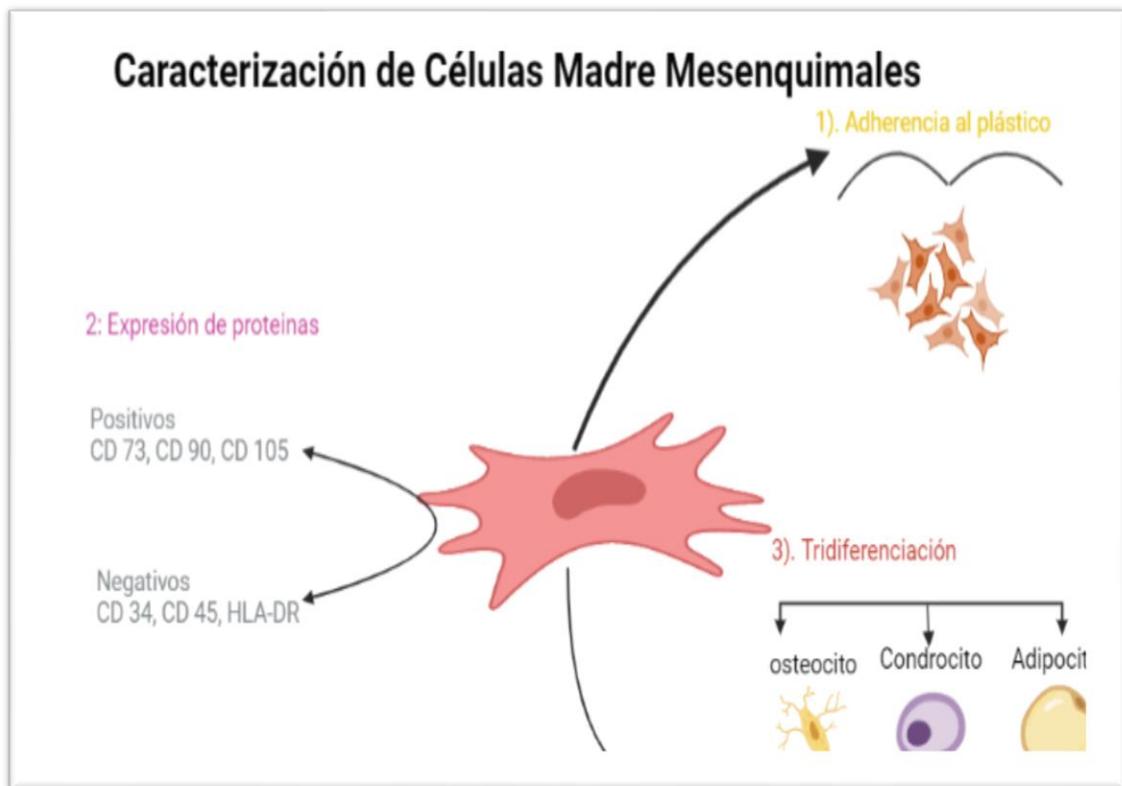


Fig. 4: Caracterización de Células Madre Mesenquimales Humanas de acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT). 1) Adhesión al plástico 2) Manifestación de marcadores de linaje 3) Diferenciación a osteocito, condrocito, adipocito. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Anitua et al., (2018) afirma que existen factores que alteran la multiplicidad característica de la CMMh tales como: densidad de la siembra, entorno físico - químico, área del sustrato; además también el uso de medio suplementados con SFB que por su naturaleza de origen animal y su posible transmisión de patógenos y endotoxinas zoonóticas (Guiotto et al., 2020) puede también ser un factor condicionante a reacciones inmunológicas y contaminación biológica (Fuoco et al., 2020).

Con respecto a la competencia de diferenciación según Anitua et al., (2018) determina que la dexametasona, suplemento con ácido L-ascórbico y fosfato de β -glicerol son los inductores de la osteogénesis y es la tinción Alizarin Red S la que confirma dicha acumulación de calcio después de la inducción y en cuanto a la diferenciación a adipocito afirma que la insulina, la dexametasona, 3 -isobutil – metilxantina (IBMX) e

indometacina son los inductores de la diferenciación después de iniciada la inducción; lo cual se confirma con la tinción de color rojo gracias al tinte Oil Red .

Un aspecto relevante para esta tesis, son los protocolos de aislamiento y cultivo de las DPSC y SHED. En principio, está bien establecido que los explantes de origen son de tejidos sanos, con los cuales según estudios anteriores se obtuvo una eficiencia del 100% a partir de dientes permanentes y del 75 % a partir de dientes deciduales, con la diferencia que en la aparición de células los cultivos de dientes permanentes demoran más que las células de dientes deciduos (Naz et al., 2019).

Las células obtenidas tienen las características descritas arriba. Cuando se utilizaron dientes con caries dental moderada, y severa, o tejido de pacientes que presentan pulpitis las células obtenidas expresan marcadores proinflamatorios tales como IL-6, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP) receptor tipo toll 1 (TLR1) y TLR8; TLR2, TLR3 y TLR6 (Tsai, et al. 2017).

Existen diversos estudios científicos que demuestran que actualmente las células madre mesenquimales derivadas de pulpa dental de dientes deciduos son utilizadas con éxito en tratamientos regenerativos, terapéuticos de diversas enfermedades tales como: El cáncer, autismo, degeneración neural, reemplazo de órganos e incluso a la adicción y otras enfermedades que pueden ser sistémicas, dentales etc. Debido a su inmensurable potencial en regeneración de tejidos ya que provee de una elevada capacidad de diferenciación tanto en condrocitos, adipocitos, osteocitos (Zeiltin, 2020), (Malekfar et al., 2016).

El primer medicamento a base de células madre mesenquimales (MSC) el Alofisel (Darvadstrocel) para el tratamiento de la enfermedad de Crohn fue aprobada su comercialización en marzo del 2018 por la comisión europea, lo cual genera el inicio de las terapias celulares y la ingeniería tisular siendo una alternativa con gran capacidad esperanzadora para la renovación de tejidos perdidos (Anitua et al. 2018), por tanto, diversos estudios se han realizado a base de este método autólogo biológico que son de fácil recolección (Kawase et al. 2020).

El presente estudio fue de enfoque cuantitativo, de nivel experimental-aplicativo, prospectivo, longitudinal y analítico, que se realizó con el objetivo de aislar, cultivar y caracterizar células madre mesenquimales de pulpa dental de dientes deciduos (SHED); que para lograr el objetivo se definió la población con niños entre 6 a 13 años de edad

como donantes y el tipo de diente a utilizar, en este caso fueron dientes deciduos sanos previo consentimiento informado de su tutor y/o padres, determinando como muestreo el carácter no probabilístico ya que este fue deliberado o por juicio, ya que la selección de la muestra fue mediante un diagnóstico clínico exhaustivo; luego, para determinar la existencia de CMMh derivadas de pulpa dental de dientes deciduos se llevó a cabo el cultivo de sus células en medio DMEM suplementado con 10% de SFB a partir de un explante. (Tsai et al., 2017) y (Ferreira et al., 2018) por ser un método más sencillo y fácil de realizar. En ese sentido, para este estudio se utilizaron dientes deciduos provenientes de niños que no presentan ninguna enfermedad odontológica, se optimizó un protocolo de obtención de explante, extracción, cultivo, caracterización y almacenamiento de células SHED. Por tal razón se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Se podrán aislar, cultivar y caracterizar las células madre mesenquimales derivadas de pulpa dental de dientes deciduos?

II: MATERIAL Y MÉTODOS

1. Materiales

- Micropipetas
- Frascos de cultivo
- Cuchareta de dentina estéril
- Frascos de muestras estériles
- Lima endodóntica N°40
- Tubos de plástico 1.5ml, 15ml, 50ml
- Tubos de centrífuga
- Lidocaína con epinefrina al 2%
- Agujas cortas N31_{G/XS}
- Clorhexidina al 0.12%
- Yodopovidona
- Guantes, gasas estériles, bata
- Puntas desechables
- Placas de plástico para explántes
- Pinzas
- Mango de bisturí N° 3
- Hoja de bisturí N° 15
- Tubos de vidrio
- Eppendorf
- Papel toalla
- Tips de micropipeta
- Hipoclorito de Na
- Etanol al 70%
- Suero fisiológico

2. Material biológico:

Pulpa dental humana de diente deciduo sin inflamación

Materiales de laboratorio:

Reactivos:

Medio DMEM + GlutamaxTM

SFB: Suero Fetal Bovino

DPBS: Solución Salina fosfatada o solución Buffer

Tripsina (10X)

DMSO: Factor de crecimiento Dimetil Sulfóxido

Anticuerpos antihumanos monoclonales: anti CD-73/PE, anti CD90/FICT, anti CD105/PE, anti CD34/PE, anti CD45/FITC, anti HLA-DR/FITC

Azul de Tripán

Isocianato de fluoroceína (FITC)

Ficoeritrina (PE)

Solución salina (suero fisiológico o cloruro de sodio)

Estreptomicina, Penicilina, Terbinafina
Óxido Nítrico (NO)
Medios de diferenciación
Tinciones (Oild Red, Alizarin Red S, Alciam Blue)

3. Equipos

- Microscopio invertido
- Cabina de flujo laminar
- Citómetro de flujo
- Tanque de nitrógeno
- Computador
- Cámara de Neubauer
- Incubadora de CO₂
- Refrigerador de -20°C y, -80°C
- Centrífuga
- Congelador -80°C
- Contómetro
- Recipientes de congelación Mr. Frosty

Métodos

Una vez seleccionado los 12 donantes de los dientes deciduos sanos de niños entre 6 a 13 años de edad, en la clínica dental de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Estomatología, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), previo consentimiento informado (CI) y aprobación del proyecto de Tesis y consentimiento informado por el Comité de Ética de dicha institución; se extrajeron en condiciones de asepsia y antisepsia, los cuales fueron colocados en suero fisiológico en un envase estéril herméticamente cerrado y luego transportados al laboratorio del Instituto de Enfermedades Tropicales (IET) de dicha institución donde luego se colocaron en fosfato de Dulbecco, siendo una solución salina tamponada (DPBS; Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) que posee 400 μ l de penicilina y 400 μ l de estreptomicina (Gibco) + antifúngico + suero fisiológico y se mantuvo en frío a menos 4°C (todo con máxima esterilidad en cabina de flujo laminar) mientras se prepara el medio de cultivo y el DPBS (solución de lavado) para su extracción de la pulpa dental decidua y su posterior aislamiento y cultivo celular. Todos los procedimientos se realizaron en dicho laboratorio de Bioseguridad 2.

Línea de células madre mesenquimales humanas (CMMh) utilizada:

Pulpa dental de dientes deciduos de donantes niños sanos de 6 a 13 años de edad siguiendo los lineamientos para el trabajo de CMMh de España (Anexo 1.2). La línea de CMMh de pulpa dental decidua dMSC fue separada y estabilizada en medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbeco (DMEM) suplementado con 10% de SFB más antibióticos, más terbinafina hasta el pase 4 (32 días) Todo procedimiento se realizó en el Instituto de Enfermedades Tropicales que es un Laboratorio de Bioseguridad 2 controladas con profesionales competentes. Desde el pase 7 la línea fijada se utilizó para procesar los experimentos especificados en esta tesis siguiendo el siguiente diseño experimental del proyecto; (figura. 5)

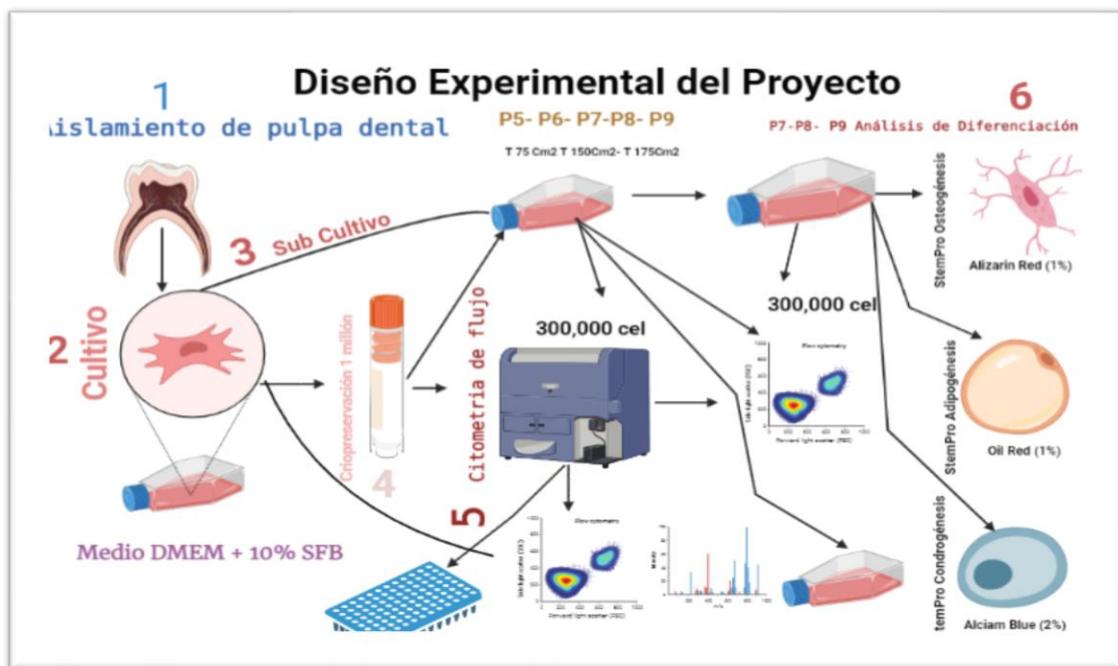


Fig. 5: Resumen gráfico del diseño experimental del proyecto. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Aislamiento de células madre mesenquimales de pulpa dental de diente deciduo

Se higienizaron los dientes en solución de lavado estéril (DPBS a 1x + antibióticos y antifúngico) por 3 veces; luego, se extrajo la pulpa dental con cucharita de dentina o lima endodóntica N°40 estéril, posteriormente, se realizaron 3 lavados a la pulpa dental con DPBS, seguidamente se seccionó la pulpa dental con hoja de bisturí N° 15 y mango N° 3, más tarde, se colocó en placa Petri de plástico, se esperó por 30min. Luego se procedió al cultivo celular (figura. 6)

Cultivo de Células Madres Mesenquimales (CMM) con medio DMEM+SFB

Se colocó 3ml de medio de cultivo que contiene medio de base DMEN + Glutamax™ (sigma) suplementado con 10% de SFB (sigma), 400 μ l de penicilina y estreptomina 400 μ l (Gibco) + 7.3 μ l de Terbinafina en una placa de plástico para explante de 25cm² (Corning) Consecutivamente se colocó en la incubadora de CO₂ al 5.0% a temperatura de 37°C después se cambió de medio de cultivo cada 3 días evaluando diariamente por el microscopio invertido “amscope” microscopio digital con cámara “MU 2003 – BI” para verificar la formación de colonias y adherencia al plástico. Con lo cual se observó la progresión o formación de colonias celulares logrando alcanzar una confluencia de 80% y procediendo luego a realizar el primer pasaje o sub cultivo celular; logrando realizar hasta 4 pasajes; luego se procedió a crio preservar las células; obteniendo 25 crioviales con un millón de células por criovial para el banco de células y manteniendo en congelación a una temperatura de menos 80°C.

Posteriormente se continuó con el procedimiento de descongelamiento de células y sub cultivo celular de un criovial logrando duplicar las células hasta el pasaje 8.



Fig. 6. Resumen gráfico del aislamiento y cultivo de CMMh derivado de pulpa de diente deciduo. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com)

Subcultivo de Células Madres Mesenquimales

Posteriormente se realizó el primer pasaje o sub cultivo en frascos de cultivo T25 (25cm²) (Corning) hasta que alcancen la confluencia de 80 a 100% total. Se eliminó el medio de cultivo por aspiración luego se lavaron 2 veces con PBS sin calcio ni magnesio (DPBS, Thermo) y luego tratado con 0.25 % de tripsina (25200; Gibco) a 37°C con 2.5ml de

TrypLE(10X) a 1X o Tripsina al 0,05%, precalentado a 37°C luego se incubó 5 minutos en incubadora de CO² a 37°C.

Con la ayuda del microscopio digital invertido “amscope” con cámara “MU 2003 – BI” se observaron que las células estén levantadas o sueltas posteriormente se agregó 2.5ml de medio de cultivo DMEM + GlutamaxTM suplementado con 10% de SFB y esta suspensión celular fue transferida a un tubo de ensayo de poliestireno de fondo redondo (352054; falcón, BD Labware, Franklin Lakes, NJ9). La suspensión fue centrifugada a 1000 rpm durante 5min. El sobrenadante fue descartado. El sedimento celular se resuspendió en 1ml del medio de cultivo que se está utilizando (DMEM + GlutamaxTM + SFB al 10% + antibióticos + antifúngico).

Evaluación de la viabilidad y concentración celular de CMMh

La morfología celular se evaluó por observación a través del microscopio invertido “amscope” microscopio digital con cámara “MU 2003 – BI” considerando la forma fibroblástica fusiforme, que estén adheridas al plástico cuyas evidencias fueron fotografiadas en objetivos de 10x, 20x y 40x antes de realizar los subcultivos.

Las células aisladas se separaron una alícuota de 20 µl de la suspensión celular obtenida, se colocó en un tubo de 1.5ml 180µl de Azul de Tripán al 0,4% posteriormente se homogenizó con el vórtex luego se cargó la cámara de Neubauer con 10µl de la mezcla y se realizó el conteo del número de células viables y no viables considerando como célula viable a la célula sin teñir, mientras que las teñidas de azul como no viables o muertas. Después se calculó el porcentaje de viabilidad y según el método de conteo en la cámara de Neubauer la concentración celular usando la siguiente fórmula.

$$[]_{\text{celular}} \left(\frac{\text{celulas}}{\mu\text{l}} \right) = \frac{\text{células vivas contadas}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{)} \cdot \text{profundidad cámara (mm)} \cdot \text{dilución}}$$

Evaluación de cinética de crecimiento, evaluación de forma, cálculo del tiempo de duplicación (Td) y doblaje acumulativo poblacional (CPD)

Luego del conteo celular con la ayuda de un hemocitómetro se procedió a realizar el cálculo del tiempo de duplicación (Td) y la duplicación acumulativa de la población (CPD) en cada pase mediante las siguientes fórmulas:

$$Td = \frac{\text{tiempo} \cdot \log(2)}{\text{Log}([\] \text{ final}) - \text{Log}([\] \text{ inicial})}$$

$$CPD = \frac{\text{Log}([\] \text{ final}) - \text{Log}([\] \text{ inicial})}{\log(2)}$$

La media más la desviación estándar de los valores obtenidos en los 8 pases fueron utilizadas para construir gráficas de cinética: Número de pase vs Td o CPD.

Caracterización e inmunofenotipo de CMM mediante citometría de flujo

Para la caracterización de la SHED o CMM se ha considerado los tres criterios mínimos propuestos por la Sociedad Internacional para terapia celular (Doiminici et al., 2006)

Adhesión al plástico de las placas de cultivo; genes más expresados, CD73, CD90, CD105 y menos expresados, CD34, CD45 and HLA-DR. y capacidad de diferenciarse hacia osteocito, adipocito y condrocito (Malekfar et al., 2016).

Para el análisis de expresión de genes positivos y negativos se utilizó la citometría de flujo usando los anticuerpos adquiridos de BD los cuales están asociados a isocianato de fluorocéina (FITC) y ficoeritrina (PE): anti- CD 73/PE, anti - CD90/FITC, anti - CD105/PE, anti - CD34/PE, anti- CD45 / FITC y anti-HLA-DR/FITC, como controles de isotipo que son reactivos fluorescentes, anticuerpos conjugados, colorantes fluorescentes y proteínas de expresión. (McKinnon. 2018 y 2019), mientras que para el análisis de resultados se utilizó el software de libre acceso FLOW-JO.

La citometría de flujo es una tecnología de análisis para identificar de forma cuantitativa y cualitativa diferentes grupos de células humanas y animales de forma simultánea, del mismo modo permite identificar las proteínas que estas expresan mientras son transportadas en un fluido e incidadas por un haz de luz; además mide la granularidad y el tamaño de la célula así como su fluorescencia; estas características se determinan gracias al sistema óptico unido a un sistema electrónico el cual graba la forma en que la célula dispersa el haz de luz y emite fluorescencia.. Los láseres de la fuente de luz producen luces dispersas y fluorescentes que emite señales; las cuales son captadas por los detectores (fotodiodos o tubos multiplicadores) las cuales se convierten en señales electrónicas y son analizadas por una computadora y grabadas en un formato o archivo estándar (fcs). Las luces dispersas van en 2 direcciones: una hacia adelante o FSC que

está a 90° e indica el tamaño relativo de la celda y la otra SSC que mide la complejidad o granularidad de la celda. (McKinnon. 2018 y 2019)

Los marcadores de membrana, CD73, CD90, CD105, CD34, CD 45, HLA-DR para CMMh fueron evaluados en el pase 7 y 9 los cuales se resuspendieron en 100 ul de buffer filtrado en medio DMEM + GlutamaxTM suplementado con un 10% de SFB en donde corresponden como mínimo a 10 000 conteos.

Las células con 80 % de confluencia recuperadas en cada pasaje se resuspendieron en 1ml de medio DMEM + GlutamaxTM suplementado con un 10% de SFB; luego de la evaluación de viabilidad y concentración celular se separaron 2 alícuotas, cada una con 10 000 células (A1, A2) en tubos de 1.5ml. Se centrifugó a 1000 rpm x 10min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendio, en 100 ul de buffer filtrado, se agregó 10ul de MSC Phenotyping Cocktail en la alícuota 1 y 10ul de Isotipo Control Cocktail en la alícuota 2; se mezcló bien e incubó por 10min en oscuridad en la refrigeradora a -4°C, luego se lavó las células agregando 1 a 2ml de buffer, se centrifugó a 1000 rpm x 10min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendio el pellet en 50ul de buffer en tubos de 1.5 ml, se mantuvo en frío hasta su procesamiento realizado por citometría de flujo.

Los datos de caracterización inmunofenotípica fueron procesados en la universidad de Pablo de Olvide de Sevilla adquiridos por el citómetro de flujo de marca “ImageStream Mark-III” mediante el programa BD CellQuestTM con apoyo de una plantilla donde los datos de selección de población por SSC y SFC estaban ya predeterminados. La población y el umbral en el histograma fueron definidos por los controles de isotipo, dejando un 0.2 de células positivas. Luego, se precipitaron las muestras marcadas con anticuerpos en donde el programa calculó automáticamente el número de células positivas. Para el análisis, ordenamiento y exposición de datos finales se utilizó el programa Flowing Sofwarw versión 2.5 (Turbo Bioscience) FLOW-JO de libre acceso. Los resultados en todos los casos se representaron como la media más la desviación estándar de 2 experimentos individuales (p - valúe < 0,005).

Tridiferenciación de CMMh

Este proceso se realizó descongelando un criovial del pasaje 4 con un conteo de viabilidad celular de 1 millón de células de las cuales se realizó un subcultivo (P⁵) y se sembró en placas T25, las cuales se realizó cambio de medio de cultivo (DMEM +SFB al 10% + Penicilina + estreptomycin + terbinafina) agregando también 19ul de ON para potenciar la viabilidad y duplicación celular; luego de lograr un 100 % de confluencia se realizó conteo de viabilidad y concentración celular obteniendo una concentración de células de 1200 células/ μl y luego se realizó un sub cultivo (P⁶) en frasco T75, realizando cambio de medio de cultivo cada 3 días y agregando diariamente 19ul de ON para potencializar la viabilidad y duplicación celular Tapia, L. (2013) luego de 8 a 10 días se realizó el conteo de concentración y la viabilidad celular logrando una concentración de 738,000 células/cm²; los cuales fueron sembradas en 2 placas diferentes de 6 pocillos; sembrando a una densidad de 5 000 células por μl logrando sembrar 48 000 células por pocillo de 9.6cm² de superficie cada una para lograr la inducción de diferenciación a osteocito, adipocito, ya que se contaba con los medios para este proceso y no realizando la diferenciación de condrocito por no contar con el medio de diferenciación para este proceso. La siembra se realizó en 2 placas; para el cual se tuvo que realizar cambio de medio de cultivo de inducción cada 4 días por 2 veces y en el día 8 se agregó medio específicos indicadores de la diferenciación a cada cultivo celular según el linaje celular registrando en fotos obtenidas por el microscopio invertido para la evidencia del proceso. (figura. 7)

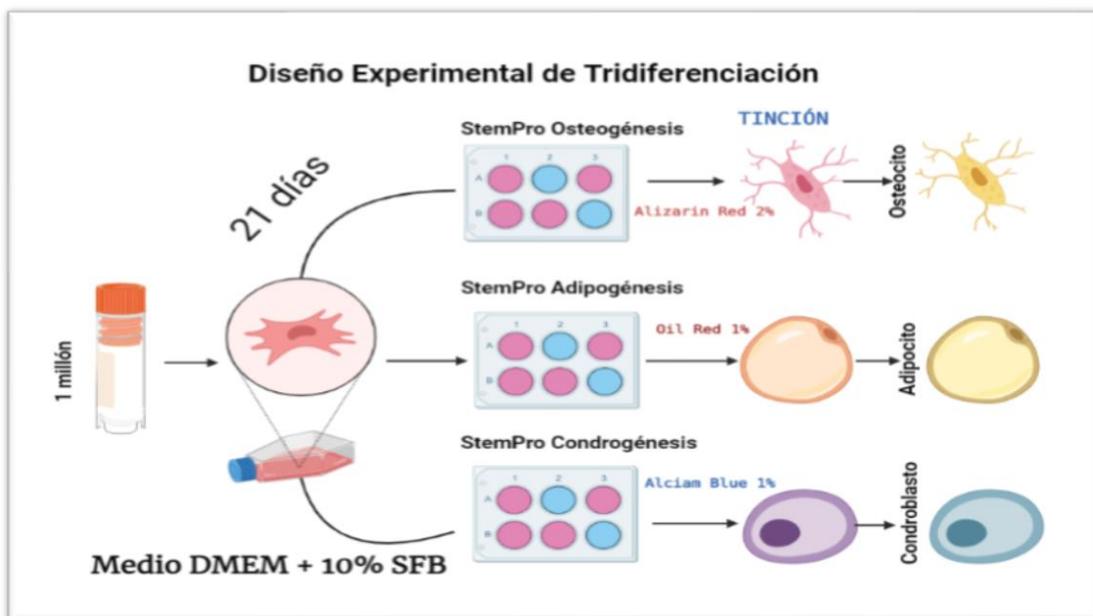


Fig. 7. Resumen Gráfico del diseño experimental de Tridiferenciación de las CMMh derivadas de pulpa de diente decíduo. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Análisis estadístico

Se utilizó el software IBM SPSS para Windows, versión 28 (SPSS Inc., Chicago, III., USA). Por los resultados obtenidos de conteo de viabilidad y concentración celular, caracterización e inmunofenotipado de CMMh mediante hemocitómetro y citometría de flujo. p -valúe $< 0,05$ y T- student de una cola.

III: RESULTADOS

Aislamiento de CMMh de Pulp dental decidua

Una vez obtenidos los 12 dientes deciduos se logró aislar la pulpa dental decidua. (Figura. 8)



Fig. 8. Aislamiento de Pulp dental de diente deciduo: Se observa que si se puede aislar pulpa dental de diente deciduo. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Cultivo celular y Subcultivo

Una vez iniciado los cultivos de los explántes se estuvo observando a través del microscopio invertido “amscope” con cámara digital “MU 2003 – BI” para evaluar adherencia al plástico, morfología fobroblastoide en donde a los 3 días se observa presencia de polimorfonucleares en poca cantidad (células migrantes no fibroblásticas) y se realiza cambio de medio de cultivo a cada placa; se observa algunas células de forma fibroblásticas, adheridas al plástico (un foco) características de las CMMh. Encontrando que los cultivos presentan, senescencia replicativa, a partir del pasaje 6 acrecentándose en los pasajes 7 y 8.

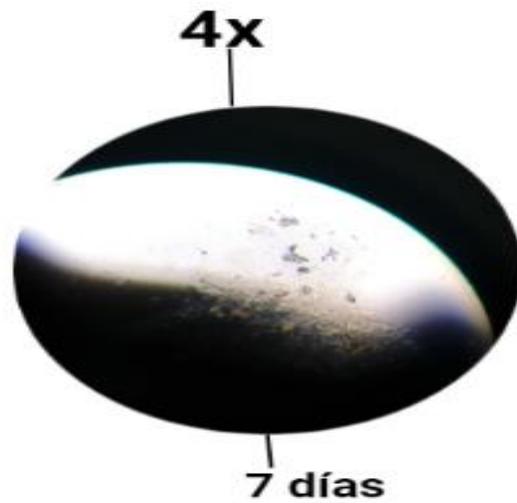
Evaluación de la forma y cinética de crecimiento de las CMMh

Las células cultivadas en medio DMEM suplementadas con 10% de SFB durante los 8 pases seguidos (64 días, cada 8 días), presentaron una forma fibroblástica característica de las CMMh, En torno a la cinética de crecimiento, el recuento de células viables mostró que las CMMh cultivadas presentaron tiempos de duplicación (entre 51 a 64 horas tiempos adecuados para este tipo de cultivos) , en los pases 2,3,4,5. En los pases 6, 7 y 8 estos tiempos de duplicación se alargan (hasta 131 a 154 horas) (figura. A). Lo cual determina que a lo largo de los pases aumenta progresivamente el tiempo de duplicación.

Además, la expansión de la línea celular en medio DMEM +10% de SFB muestra un doblaje poblacional acumulativo (CPD), medido entre los 8 pases (p-value <0,05). T-student, $p < 0,005$ estadísticamente significativa. (figura. B)

Observación de células SHED en el cultivo primario

Primer foco de células madre mesenquimales



Células madre mesenquimales

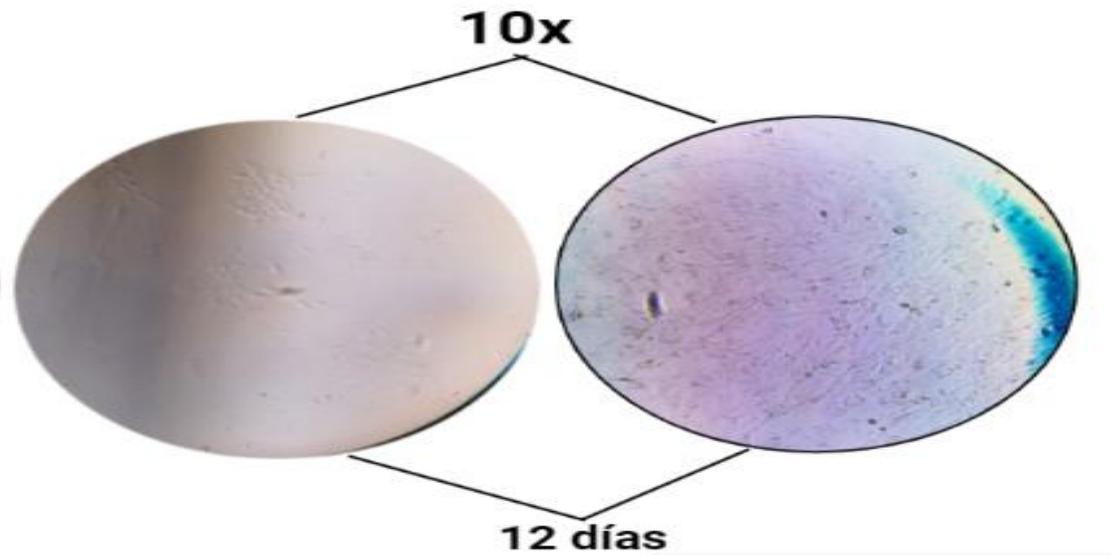


Fig. 9. Observación en el microscopio invertido de CMMh derivado de pulpa dental de diente decíduo. Se observan forma fibroblástica y adheridas al plástico. Las figuras son propias de los cultivos primarios. Ampliación de 4x y 10x. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com)

Observación de la Morfología de las SHED en cada Sub Cultivo

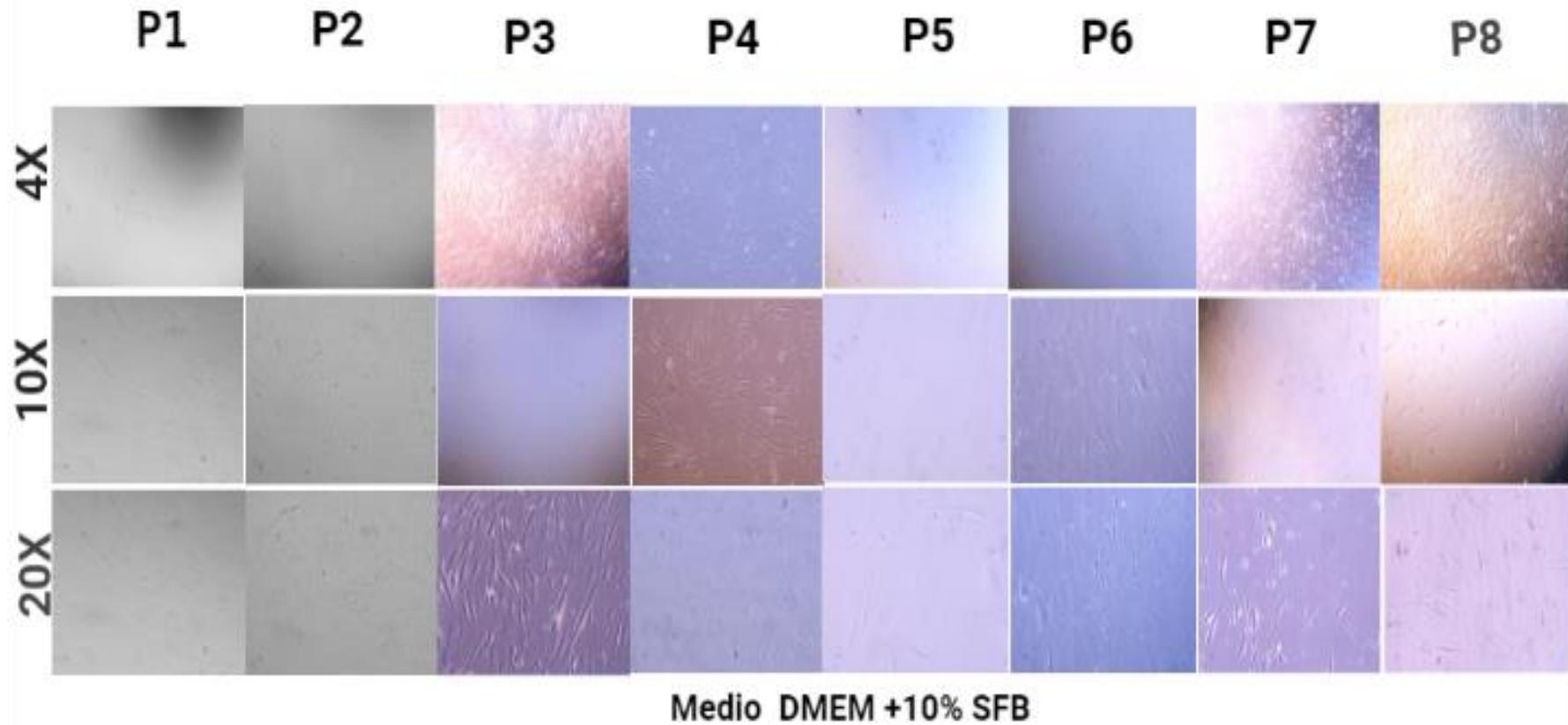


Fig. 10. Forma a través de los 8 pasajes de CMMh cultivadas con medio DMEM +10% de SFB. Se observan forma fibroblástica y adheridas al plástico. Las imágenes son propias de los 8 pasajes. Ampliación de 4x, 10x,20x. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com)

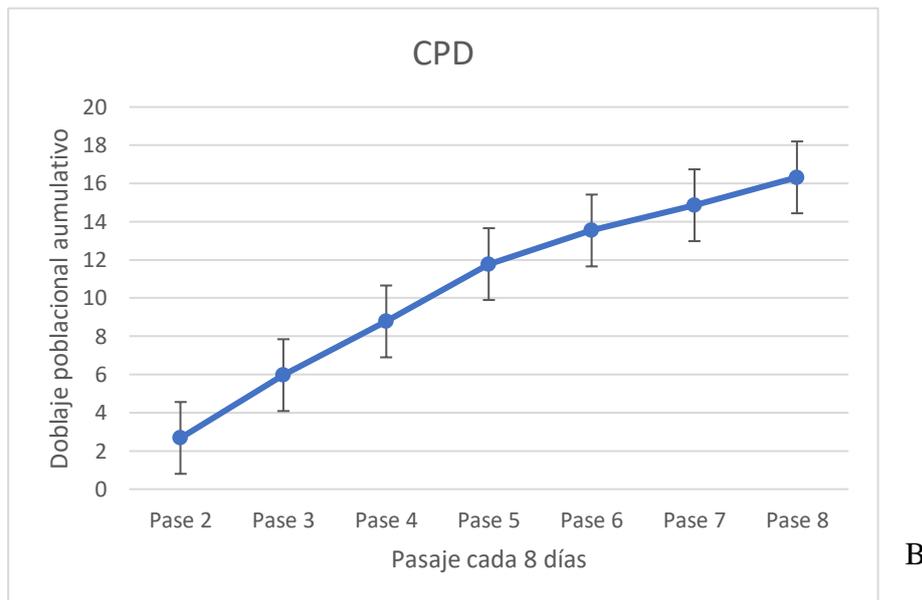
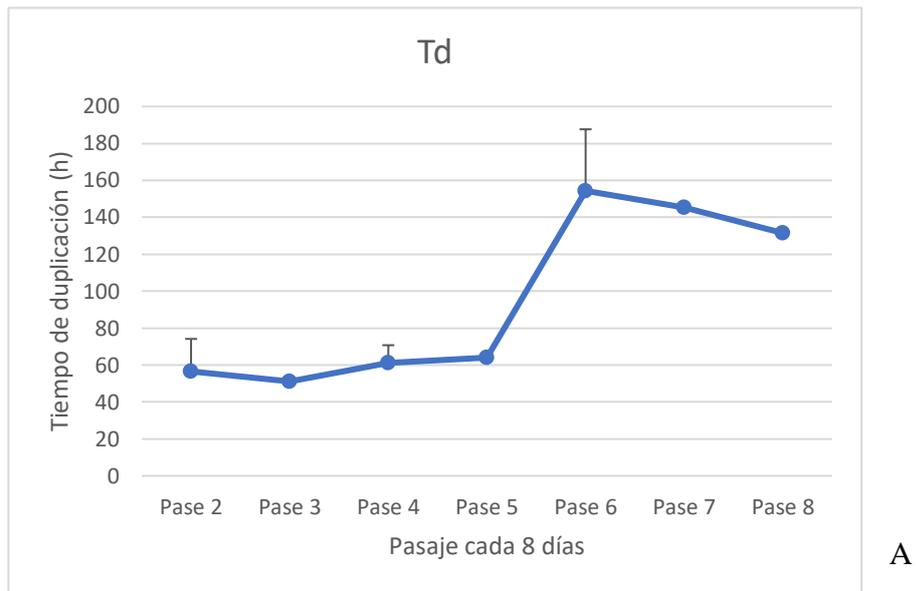


Fig. 11. Evaluación de la cinética de crecimiento de las CMMh cultivadas en medio DMEM + 10% de SFB. A: Tiempo de duplicación (Td) a través de los 8 pases. B: Duplicación acumulativa de la población (CPD) a través de los 8 pases, Los datos de A y B son la media más la desviación de los 8 pases o sub cultivos. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com). T-student $p < 0,05$.

Caracterización inmunofenotípica de CMM mediante citometría de flujo

Las CMMh derivadas de pulpa dental de dientes deciduos fueron analizadas mediante citometría de flujo determinando expresión de genes positivos al CD 73, CD 105, CD y marcadores negativos al CD 45, CD 34 y HLA-DR evaluados en el pase 7 y 9 los cuales se resuspendieron en 100 ul de buffer filtrado en medio DMEM + Glutamax™ suplementado con un 10% de SFB en donde corresponden como mínimo a 10 000 conteos. (Fig. 12) y Tabla 1.

Población en % de expresión de genes

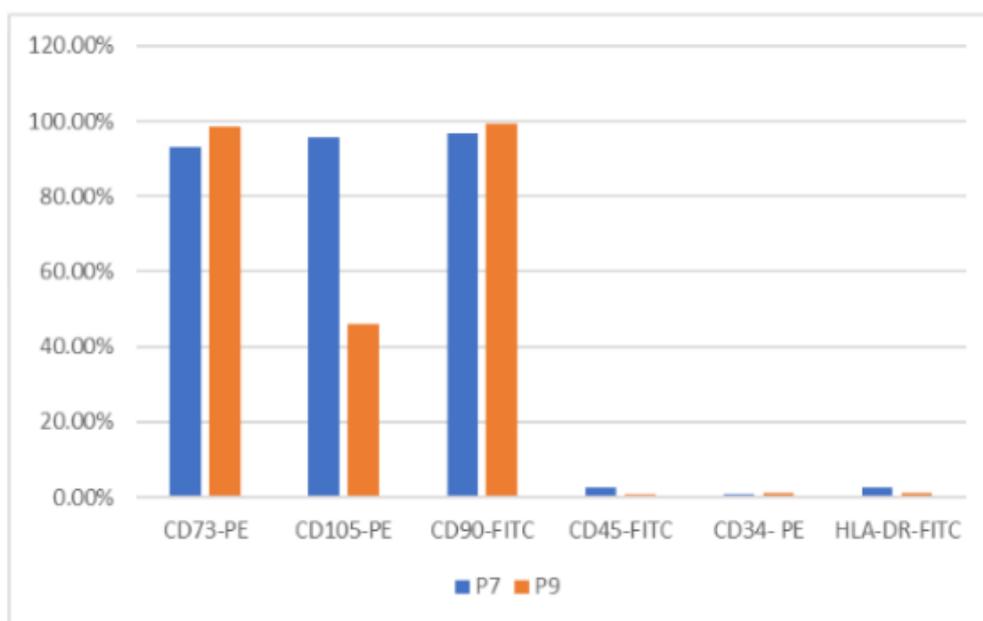


Tabla 1. Población en % de expresión de genes positivos y negativos de las CMMh o SHED.: Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com). T-student $p < 0,05$

Citometría de flujo de CMMh derivadas de pulpa de diente deciduo

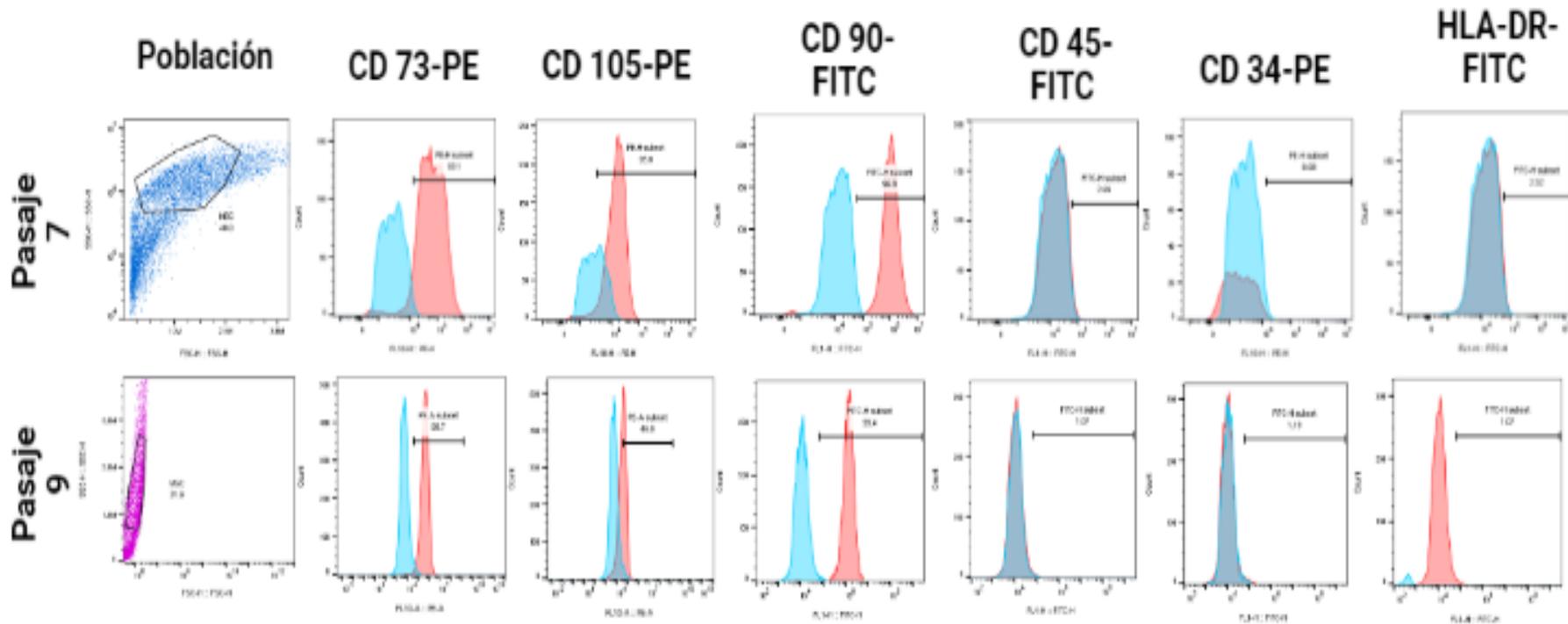


Fig. 12. Características fenotípicas de las CMMh cultivadas en medio DMEM +10% de SFB. Citometría de flujo en los pases 7 y 9 de los marcadores positivos de membrana CD 73, CD 90, CD 105 y marcadores de membrana negativos CD 45, CD 34 y HLA-DR. El eje Y simboliza el porcentaje de células marcadas. Los resultados equivalen a la media más la desviación estándar de al menos dos experimentos individuales. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.co)

valuación de la Competencia de Diferenciación de la CMMh derivado de pulpa dental de diente deciduo

Al culminar los pases 7 y 8 las CMMh de pulpa dental de diente deciduo fueron sembradas en medios de diferenciación y posteriormente examinadas utilizando la tinción Alizarin Red S, Oil Red como marcadores de linaje de osteocito y adipocito respectivamente en donde dichas células las cuales fueron capaces de diferenciarse a los linajes de osteocito y adipocito logrando demostrar los acúmulos de calcio y vesículas de grasa o lípidos respectivamente. Fig. (13 y 1



Fig. 13. Competencia de diferenciación a osteocito de las CMMh sembradas en medio de diferenciación y medio control (DMEM +10% de SFB). Se observa de rojo la acumulación de calcio gracias a la tinción Alizarin Red S al 1%. Las imágenes están en aumento 10x y 20x y son representativas de 1 experimento individual. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Resultados de Tridiferenciación adipocito

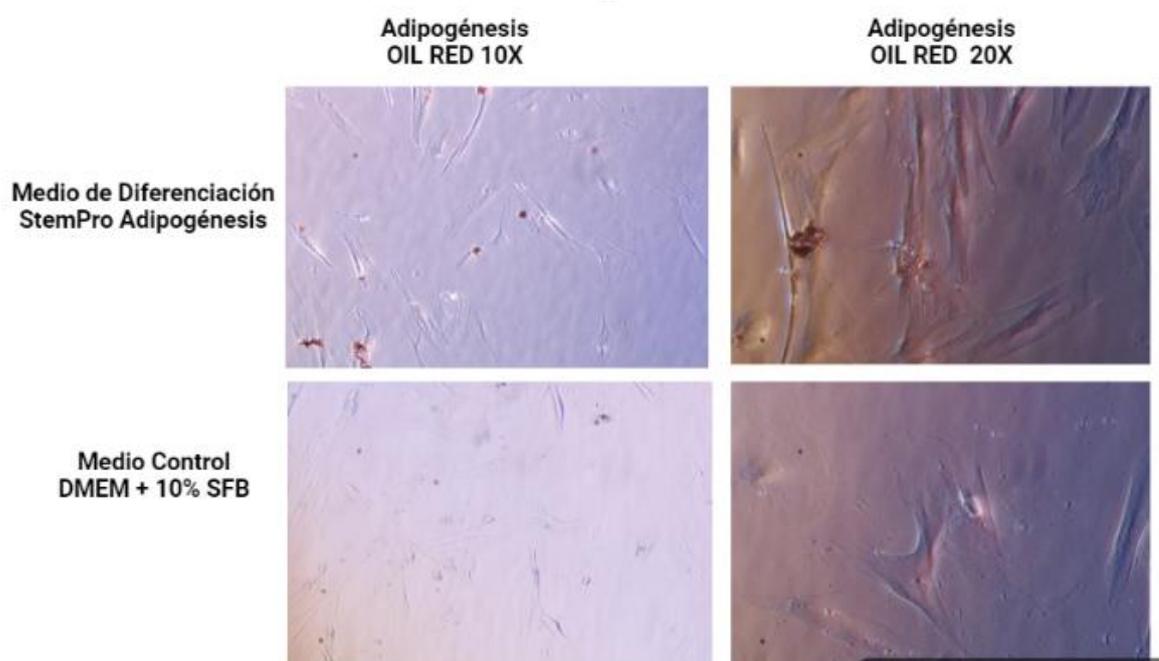


Fig. 14. Competencia de diferenciación a adipocito de las CMMh sembradas en medio de diferenciación y medio control (DMEM +10% de SFB). Se observa vesículas de grasa de color rojo gracias a la tinción Oil Red al 1%. Las imágenes están en aumento 10x y 20x y son representativas de 2 experimento individuales. Imagen elaborada en la aplicación BioRender (biorender.com).

Los resultados obtenidos han mostrado que ha sido posible aislar y cultivar CMMh de pulpa dental decidua durante 8 pases, presentando una forma fibroblástica característica de las CMMh. Se encontró que los cultivos presentan senescencia replicativa a partir del pase 6 y se acrecientan en los pases 7 y 8. La cinética de crecimiento, recuento de células viables mostró que las CMMh cultivadas presentaron tiempos de duplicación (entre 51 a 64 h que son adecuados para este tipo de cultivos) en los pases 2,3,4,5. En los pases 6, 7 y 8 estos tiempos de duplicación se alargan (hasta 131 y 154 h). El crecimiento de la línea celular muestra un doblaje poblacional acumulativo, medido en 8 pases, presentando capacidad de diferenciación y expresión de genes.

IV: DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos han mostrado que ha sido posible aislar y cultivar CMMh de pulpa dental decidua durante 8 pases presentando forma fibroblástica; similar resultado con el estudio realizado por (Werle et al., 2016) y (Zainuri et al., 2018) quien demostró que se puede aislar CMMh de pulpa dental de dientes deciduos sanos y careados con un 80% de proliferación mientras que (Tsai et al., 2017) mostró que la pulpa dental de dientes deciduos sanos y con caries leve o moderada sin pulpitis ceden MSC con éxito y los dientes con caries amplias o con pulpitis tienen mayor tiempo de duplicación y expresan mayor proliferación de citocinas proinflamatorias ((IL-6 y MCP-1) e innata respuesta inmune. Resultado similar en el estudio de (Naz et al., 2019- 2022) quien evidenció que las CMMh de dientes deciduos proliferan más rápido que CMMh de dientes permanentes y tienen además la forma fibroblástica.

En cuanto a la cinética de crecimiento, recuento de células viables este estudio mostró que las CMMh cultivadas presentaron tiempos de duplicación (entre 51 a 64 h adecuados para este tipo de cultivos) en los pases 2,3,4,5. En los pases 6, 7 y 8 estos tiempos de duplicación se alargan (hasta 131 y 154 h). El crecimiento de línea celular muestra un doblaje poblacional acumulativo, medido en 8 pases. Por su parte (Naz et al., 2019- 2022) evidenció que células criopreservadas de DPSC tienen mayor viabilidad que los SHED.

En este estudio se demostró que los SHED presentaron expresión de genes y capacidad de diferenciación similares resultados con respecto a los estudios de (Zainuri et al y Alcalá, M. 2018), (Naz et al., 2022).

En este estudio se encontró senescencia replicativa a partir del pase 6, acrecentándose en los pases 7 y 8 por lo cual Anitua et al.,(2018) afirma que existen factores que alteran la multiplicidad característica de la CMMh tales como: densidad de la siembra, entorno físico - químico, área del sustrato; además también el uso de medio suplementados con SFB que por su naturaleza de origen animal y su posible transmisión de patógenos y endotoxinas zoonóticas (Guiotto et al., 2020) por lo tanto puede ser un factor condicionante a reacciones inmunológicas y contaminación

biológica (Fuoco et al., 2020). Es posible que en este estudio la senescencia replicativa haya sido producto de algunos de estos factores condicionantes.

Según Anitua et al., (2018) determina que la dexametasona, suplemento con ácido L-ascórbico y fosfato de β -glicerol son los inductores de la osteogénesis y es la tinción Alizarin Red S la que confirma dicha acumulación de calcio después de la inducción y en cuanto a la diferenciación a adipocito afirma que la insulina, la dexametasona, 3 -isobutil – metilxantina (IBMX) e indometacina son los inductores de la diferenciación después de iniciada la inducción; lo cual se confirma con la tinción de color rojo gracias al tinte Oil Red en este estudio la diferenciación a condrocito no fue posible por falta del medio de diferenciación en el Laboratorio del IET de bioseguridad 2 de la UNTRM lugar donde se realizó esta tesis.

V: CONCLUSIONES

1. Las células madre mesenquimales de pulpa dental derivado de dientes deciduos o SHED se pueden aislar, cultivar y caracterizar in vitro.
2. Las células madre mesenquimales derivado de pulpa dental de dientes deciduos o SHED demostraron un patrón de proliferación, características inmunofenotípica y capacidad de diferenciación.

VI: RECOMENDACIONES

1. Retomar estudios de aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales derivados de Pulpa dental de dientes deciduos para obtener un banco de células in vitro de diferentes donantes.
2. Continuar con investigaciones de aislamiento, cultivo y caracterización de células madre mesenquimales derivados de otros órganos orales ya que según estudios anteriores existen otras fuentes de aislamiento de la cavidad oral que han demostrado su capacidad proliferativa de células madre mesenquimales.

VII: BIBLIOGRAFÍA

- Anitua, E., Troya, M., & Zalduendo, M. (2018). Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*, 20(4), 479-498. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.12.011>
- Alcalá, M. (2018). Multipotencialidad de la Población Celular de la Pulpa dental Humana mediante Citometría de Flujo. [Tesis de pregrado, Universidad San Martín de Porras, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Estomatología]. Repositorio Académico USMP. Citado el 15/07/2022. [Internet]. Disponible en: https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/4269/alcala_bmy.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Baker, C. L., & Pera, M. F. (2018). Capturing totipotent stem cells. *Cell stem cell*, 22(1), 25-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.011>
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). *Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review*. *Sultan Qaboos University medical journal*, 18(3), e264–e277. Disponible en: <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., ... & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 13(9), 1738-1755. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/term.2914>
- Cai, J., Chen, H., Xie, S., Hu, Z., & Bai, Y. (2022). Research Progress of Totipotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*, (ja). Disponible en: <https://doi.org/10.1089/scd.2022.0061>
- Corillocla Flores, R. A. (2020). Rendimiento celular en el procedimiento de aislamiento de células madre mesenquimales procedentes de tejido de cordón umbilical donados al Instituto de Hemaféresis y Terapia Celular (IHEMATEC). Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12866/8908>
- Dave, J. R., & Tomar, G. B. (2018). Dental Tissue– Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 46(5): 429-468. doi: 10.1615/CritRevBiomedEng.2018027342. PMID: 30806262.
- Daniela Ferreira Araújo, B., Luciana Oliveira, P., Isabel Cristina Rodrigues da, S., Ricardo Bentes, A., & Ana Cristina Barreto, B. (2018). Culture of human dental

pulp cells at variable times post-tooth extraction. *Brazilian oral research*, 32, e003.
Disponibile en: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0003>

- Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905
- Fernandes, T. L., Cortez de SantAnna, J. P., Frisene, I., Gazarini, J. P., Gomes Pinheiro, C. C., Gomoll, A. H., ... & Franco Bueno, D. (2020). Systematic review of human dental pulp stem cells for cartilage regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 26(1), 1-12. doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0140. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31744404:
- Fuoco, N. L., de Oliveira, R. G., Marcelino, M. Y., Stessuk, T., Sakalem, M. E., Medina, D. A. L., ... & Ribeiro-Paes, J. T. (2020). Efficient isolation and proliferation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells in xeno-free conditions. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2475-2486. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05322-9>
- Gan, L., Liu, Y., Cui, D., Pan, Y., Zheng, L., & Wan, M. (2020). Dental tissue-derived human mesenchymal stem cells and their potential in therapeutic application. *Stem cells international*, 2020. Disponible en <https://doi.org/10.1155/2020/8864572>
- Gonzalez-Vilchis, R. A., Piedra-Ramirez, A., Patiño-Morales, C. C., Sanchez-Gomez, C., & Beltran-Vargas, N. E. (2022). Sources, Characteristics, and Therapeutic Applications of Mesenchymal Cells in Tissue Engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1-37. doi: 10.1007/s13770-021-00417-1. Epub 2022 Jan 29. PMID: 35092596; PMCID: PMC8971271
- Guiotto, M., Raffoul, W., Hart, A. M., Riehle, M. O., & Di Summa, P. G. (2020). Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02489-4>
- Hosseini, S., Taghiyar, L., Safari, F., & Baghaban Eslaminejad, M. (2018). Regenerative medicine applications of mesenchymal stem cells. *Cell Biology and Translational Medicine*, Volume 2, 115-141. DOI 10.1007/5584_2018_213.

- Ji, H. L., Liu, C., & Zhao, R. Z. (2020). Stem cell therapy for COVID-19 and other respiratory diseases: Global trends of clinical trials. *World Journal of Stem Cells*, 12(6), 471. doi: [10.4252/wjsc.v12.i6.471](https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i6.471)
- Karakaya, I., & Ulusoy, N. (2018). Basics of dentin-pulp tissue engineering. *AIMS Bioengineering*, 5(3), 162-178. DOI: 10.3934/bioeng.2018.3.162
- Kawase-Koga, Y., Fujii, Y., Yamakawa, D., Sato, M., & Chikazu, D. (2020). Identification of neurospheres generated from human dental pulp stem cells in xeno-/serum-free conditions. *Regenerative Therapy*, 14, 128-135. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.11.006>
- Lambrichts, I., Driesen, R. B., Dillen, Y., Gervois, P., Ratajczak, J., Vanganswinkel, T., ... & Hilkens, P. (2017). Dental pulp stem cells: their potential in reinnervation and angiogenesis by using scaffolds. *Journal of endodontics*, 43(9), S12-S16. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.001>
- Malekfar, A., Valli, K. S., Kanafi, M. M., & Bhonde, R. R. (2016). Isolation and characterization of human dental pulp stem cells from cryopreserved pulp tissues obtained from teeth with irreversible pulpitis. *Journal of Endodontics*, 42(1), 76-81. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.joen.2015.10.001>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*, 120(1), 5-1. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- McKinnon. (2019). Curr Protoc Immunol. Author manuscript; available in PMC February 21. Disponible en: pessp.edu.br/site/blog/wp-content/uploads/2020/07/Flow-Cytometry-An-Overview.pdf
- Maqsood, M., Kang, M., Wu, X., Chen, J., Teng, L., & Qiu, L. (2020). Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life Sciences*, 256, 118002. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118002. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32585248.
- Naz, S., Khan, F. R., Zohra, R. R., Lakhundi, S. S., Khan, M. S., Mohammed, N., & Ahmad, T. (2019). Isolation and culture of dental pulp stem cells from permanent and deciduous teeth. *Pakistan journal of medical sciences*, 35(4), 997. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.12669/pjms.35.4.540>
- Naz, S., Khan, FR, Khan, I., Zohra, RR, Salim, A., Mohammed, N. y Ahmad, T. (2022). Comparative analysis of dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated teeth in terms of growth kinetics, immunophenotype, self-renewal and multi lineage differentiation potential for future perspective of calcified tissue

- regeneration. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 38 (5). Disponible en: <https://doi.org/10.12669/pjms.38.5.5187>
- NIH. (2016) Stem Cell Information Home Page. In Stem Cells Information [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, [cited, May, 17, 2022] Available at Clinical Trial.
- Pajuelo, C. (2021). XANADU como medio de expansión químicamente definido para células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Disponible en <https://hdl.handle.net/20.500.12672/17479>
- Potdar, P. D., & Jethmalani, Y. D. (2015). Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World journal of stem cells*, 7(5), 839-851. doi: [10.4252/wjsc.v7.i5.839](https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i5.839)
- Roato, I.; Chinigò, G.; Genova, T.; Munaron, L.; Mussano, F. (2021). Oral Cavity as a Source of Mesenchymal Stem Cells Useful for Regenerative Medicine in Dentistry. *Biomedicines*, 9, 1085. Disponible en. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091085>
- Salazar Vargas, G., Neyra Chagua, V., Pitot Álvarez, C., Muñoz Jáuregui, A., & Aguilar Mendoza, L. (2018). Estudios en neurociencias: aportes para la investigación en cultivo de células madre mesenquimales. *Persona*, (021), 109-117. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.26439/persona2018.n021.1993>
- Shi, X., Mao, J., & Liu, Y. (2020). Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem cells translational medicine*, 9(4), 445-464. Disponible en. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0398>
- Schmit, T., Klomp, M., & Khan, M. N. (2021). An overview of flow cytometry: Its principles and applications in allergic disease research. *Animal Models of Allergic Disease*, 169-182. DOI: 10.1007/978-1-0716-1001-5_13
- Sui, B., Wu, D., Xiang, L., Fu, Y., Kou, X., & Shi, S. (2020). Dental pulp stem cells: from discovery to clinical application. *Journal of endodontics*, 46(9), S46-S55. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.027>
- Tapia, R. (2013). Evaluación del efecto del óxido nítrico sobre la expresión génica en células madre embrionarias. Tesis Doctoral. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10433/609>

- Tsai, A. I., Hong, H. H., Lin, W. R., Fu, J. F., Chang, C. C., Wang, I., ... & Yen, T. H. (2017). Isolation of mesenchymal stem cells from human deciduous teeth pulp. *BioMed Research International*, 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2017/2851>
- Vendramini, V. O., Pouraghaei, S., Barbosa, R. M., Aloise, A. C., Muniz, J. R. F., Sperandio, M., ... & Moshaverinia, A. (2021). Influence of Dental Pulp Harvesting Method on the Viability and Differentiation Capacity of Adult Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/9952401>
- Wang, J., Chen, Z., Sun, M., Xu, H., Gao, Y., Liu, J., & Li, M. (2020). Sui, B., Wu, D., Xiang, L., Fu, Y., Kou, X., & Shi, S. (2020). Dental pulp stem cells: from discovery to clinical application. *Journal of endodontics*, 46(9), S46-S55. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.027>
- Wang, J., Chen, Z., Sun, M., Xu, H., Gao, Y., Liu, J., & Li, M. (2020). Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Tissue and cell*, 64, 101330. doi: 10.1016/j.tice.2020.101330. Epub 2020 Jan 10. PMID: 32473704
- Werle, S. B., Lindemann, D., Steffens, D., Demarco, F. F., de Araujo, F. B., Pranke, P., & Casagrande, L. (2016). Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clinical oral investigations*, 20(1), 75–81. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1477-5>
- Zainuri, M., Putri, R. R., & Bachtiar, E. W. (2018). Establishing methods for isolation of stem cells from human exfoliated deciduous from carious deciduous teeth. *Interventional medicine & applied science*, 10(1), 33–37. Disponible en: <https://doi.org/10.1556/1646.10.2018.06>
- Zeitlin, B. D. (2020). Banking on teeth—Stem cells and the dental office. *biomedical journal*, 43(2), 124-133. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.02.003>.
- Zainuri, M., Putri, R. R., & Bachtiar, E. W. (2018). Establishing methods for isolation of stem cells from human exfoliated deciduous from carious deciduous teeth. *Interventional medicine & applied science*, 10(1), 33–37. Disponible en: <https://doi.org/10.1556/1646.10.2018.06>

VIII: ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO N°1

PROCESO: DERIVACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MUESTRAS HUMANAS

Datos generales

Título del Proyecto de Tesis: “Aislamiento, Cultivo y Caracterización de Células Madre Mesenquimales derivado de pulpa dental de dientes deciduos”

Número de Protocolos Normalizados de Trabajo (PNT) que aplican para éste procedimiento: PNT-LTC-PG-001-v1, PNT-LTC-PG-002-v1, PNT-LTC-PG-003-v1, PNT-LTC-PG-004-v1, PNT-LTC-PG-005-v1, PNT-LTC-PG-006-v1, PNT-LTC-PG-007-v1, PNT-LTC-PG-013-v1, PNT-LTC-PG-014-v1 , PNT-LTC-PG-015-v1, PNT-LTC-RR-002-v1.

Patrocinador/Dirección: Proyecto MULDIPAC, Contrato N° 09-2019-FONDECYT-BMINC.INV.

Investigador principal: Bach. Gleny Coralí Castro Hidalgo.

Teléfono: 948150157

Centros participantes:

- Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (IET-UNTRM)
- Laboratorio Grupo PAIDI CTS576 - Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.
- Escuela de Estomatología de la UNTRM

INTRODUCCIÓN

La estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud; Escuela Profesional de Estomatología, Gleny Coralí Castro Hidalgo como parte de la realización de su tesis de título profesional está ejecutando investigaciones que tienen como objetivo la estandarización de un protocolo que permita aislar, cultivar y caracterizar células madre mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC, por sus siglas en ingles Dental Pulp

Stem Cells) Las células serán obtenidas a partir de fuentes no invasivas (dientes deciduales), las cuales son una fuente rica de DPSC. Actualmente estas células están siendo estudiadas a nivel mundial en el tratamiento de diversas enfermedades, demostrado un efecto beneficioso.

Esta investigación no la perjudicará a Ud ni a su niño/a de ninguna manera pues los tejidos derivados, luego de un proceso de exfoliación o rizólisis de los dientes deciduos (dientes de leche) son eliminados y/o desechados sin ningún fin establecido. Asimismo, son fuentes no invasivas. Por tal motivo le solicitamos nos done dicha fuente.

El propósito de la investigación tiene como hipótesis 1: Que las células madre mesenquimales de la pulpa dental decidua se pueden aislar, cultivar y caracterizar. La investigación tiene como objetivo general: Aislar, cultivar y caracterizar células madre mesenquimales de pulpa dental de dientes deciduos y como objetivos específicos: Diseñar un protocolo de aislamiento de células madre mesenquimales a partir de pulpa dental; estandarizar el cultivo de células madre mesenquimales a partir de pulpa dental y caracterizar las células madre mesenquimales derivadas de la pulpa dental.

Antecedentes de la Investigación.

Las células madre adultas son células multipotentes que tienen capacidad de dividirse y generar dos células hijas idénticas cuando son cultivadas en condiciones óptimas y capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares cuando son cultivadas en condiciones que promuevan dicha diferenciación. Estas células pueden aislarse a partir de diferentes tejidos, sangre periférica, y fluidos humanos utilizando protocolos de derivación específicos. Específicamente a partir de tejidos dentales se pueden aislar varios tipos de células madre adultas (figura 1), dos de las cuales son las células madre de pulpa dental (DPSC, por sus siglas en inglés, Dental Pulp Stem Cells) y las células madre de diente deciduo exfoliado humano (SHED, por sus siglas en inglés Stem Cells Human Exfoliated Deciduos) (Shi, X et al 2020; Sui, B et al 2020).



Figura 1: Clasificación de las células madre mesenquimales disponibles a partir de tejido dental humano.

figura adaptada a partir de Shi, X et al, 2020.

Desde el punto de vista de sus características biológicas las, DPSC y las SHED presentan los tres criterios mínimos para ser consideradas MSC propuestos por la Sociedad Internacional para terapia celular (Doiminici et al., 2006) es decir estas células son capaces de adherirse al plástico de las placas de cultivo; expresan CD73, CD90, CD105, mientras que no expresa CD34, CD45, y HLA-DR. o no expresa marcadores de membrana y tienen capacidad de diferenciarse hacia osteocito, adipocito y condrocito (Malekfar et al. 2016),. Recientemente se han descrito que tanto las DPSC, como las SHED, además de diferenciarse a los tipos celulares de origen mesodermal, también pueden diferenciarse a tipos celulares de origen ectodérmico (melanocitos, células gliales) y hacia tipos celulares de origen endodérmico como hepatocitos, células beta pancreáticas (Shi, X et. Al. 2020, Potdar, PD et al 2015). Adicionalmente, además de esta amplia multipotencia, las DPSC y SHED tienen capacidad de autorrenovarse después de una división simétrica (Kawase et al. (2020), Otra característica biológica relevante de las células DPSC y SHED, es su capacidad inmoduladora, de promoción de la angiogénesis, de regeneración de tejidos dañados, etc. (Zeiltin, 2020; Shi et al. 2020; Karakaya I & Ulusoy N, 2018). Todas estas características indican que su enorme potencial en la ingeniería tisular en odontología, principalmente en la regeneración y

renovación y restauración de tejidos perdidos (Karakaya I & Ulusoy N, 201; Anitua et al. 2018; Lambrichts et al. 2016)

Un aspecto relevante para esta tesis, es lo que se refiere a los protocolos de aislamiento y cultivo de las DPSC y SHED. En principio, está bien establecido que los explantes de origen deben ser de tejidos sanos, con los cuales se obtuvo una eficiencia del 100% a partir de dientes permanentes y del 75 % a partir de dientes deciduales, con la diferencia que la aparición de células los cultivos de dientes permanentes demoran más que las células de dientes deciduos (Naz, et al. 2019), las células obtenidas tienen las características descritas arriba. Cuando se utilizaron dientes con caries dental moderada, y severa, o tejido de pacientes que presentan pulpitis las células obtenidas expresan marcadores proinflamatorios tales como IL-6, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP) receptor tipo toll 1 (TLR1) y TLR8; TLR2, TLR3 y TLR6 (Tsai, et al. 2017).

En ese sentido, en esta tesis utilizando dientes deciduos provenientes de niños, que no presentan ninguna enfermedad odontológica optimizaremos un protocolo de obtención de explante, extracción, cultivo, caracterización y almacenamiento de células SHED.

Duración de la investigación: 1 año

Centros y países en el que se realizara la investigación:

- Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (IET-UNTRM), Chachapoyas, Perú.
- Laboratorio Grupo PAIDI CTS576 - Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, Sevilla, España.

Criterios de inclusión:

- Dientes deciduos provenientes de pacientes que no presente enfermedad odontológica.
- Pacientes que cuenten con consentimiento informado, firmado por su tutor legal.

Criterios de exclusión:

- Dientes deciduos de pacientes que cuenten con alguna enfermedad odontológica
- Pacientes que no cuenten con consentimiento informado del tutor o padre de familia

I. ¿POR QUÉ SE ESTÁ REALIZANDO ESTE ESTUDIO?

El presente estudio, podría producir células para el tratamiento frente a enfermedades pulpares, entre otras enfermedades. Estamos realizando este estudio para comprobar la

viabilidad del uso de estas células.

II. ¿POR QUÉ LE PEDIMOS QUE FORME PARTE DE ESTE ESTUDIO?

Solicitamos nos done los dientes deciduos de su menor hijo ya que es un producto descartado normalmente y la donación no generara ningún cambio en la boca del paciente. Asimismo, los dientes deciduales son fuentes no invasivas.

III. ¿EN QUÉ CONSISTE EL ESTUDIO Y QUÉ PRUEBAS LE REALIZAREMOS SI INGRESA AL ESTUDIO?

1. Después de la firma del consentimiento informado los dientes deciduales o comúnmente llamados dientes de leche serán recogidos inmediatamente comienzan a moverse en boca. Las intervenciones se realizarán siguiendo los procedimientos de asepsia.

2. Las fuentes de células madre de pulpa dental serán transportadas de forma estéril al IET-UNTRM, en donde se seguirán los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) para la obtención de células para continuar con el trabajo en el laboratorio. Todos los procedimientos que realizaremos no tendrán ninguna repercusión sobre usted. o su hijo/a.

IV. ¿CUÁLES SON LOS RIESGOS PARA EL PARTICIPANTE?

La extracción de los dientes deciduales serán cuando el diente se está moviendo en boca. Por lo tanto, NO REPRESENTA NINGUN RIESGO FISICO NI PSICOLOGICO por participar en este estudio. Ya que son fuentes NO invasivas.

V. ¿COMO SE BENEFICIARÁ EL PARTICIPANTE?

Según la Ley General de Donación y Trasplante de Órganos y/o Tejidos Humanos (N°29471), toda donación es altruista y por lo cual no tendrá ningún beneficio directo para usted.

VI. ¿USTED RECIBIRÁ DINERO POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

NO

VII. CONFIDENCIALIDAD

Toda la información y análisis obtenido de las muestras desde el ingreso al Área de proceso hasta su preservación, será codificada. Adicionalmente, la información se

encontrará bajo seguridad en el Instituto de Enfermedades Tropicales, siendo el director del instituto el único que tendrá acceso a dicha información.

Si nuestros experimentos son correctos podremos obtener una línea que será usada en la investigación, Si nuestros experimentos no resultan las muestras serán desechadas inmediatamente.

VIII. DECLARACIÓN DEL PARTICIPANTE

Su participación es totalmente VOLUNTARIA, podrá elegir SI QUIERE DONAR, también puede elegir si quiere QUE NO SE USE LA MUESTRA O RESULTADOS EN EL MOMENTO QUE DESEE.

IX. PARTICIPACION VOLUNTARIA

Usted será la persona quien decida su participación, ningún miembro del equipo de investigación, ni su médico tratante podrá obligarlo o presionarlo para que Ud. participe en el estudio.

X. INFORMACION ADICIONAL

Para obtener mayor información sobre la investigación y los resultados obtenidos en este estudio, Usted podrá conversar con los responsables:

Dr. Rafael Tapia Limonchi

Director del Instituto de Enfermedades Tropicales-UNTRM

Telf: 982621431

E-mail: rafael.tapia@untrm.edu.pe

Dr. Elías Alberto Torres Armas

Presidente del Comité de Ética.

Telf. 946570878

E-mail: Elias.Torres@untrm.edu.pe

XI. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Declaración voluntaria del participante.

El presente estudio me ha sido explicado completamente, así mismo he tenido la oportunidad de hacer preguntas, las que han sido respondidas a mi satisfacción. Por tal motivo acepto voluntariamente participar en este estudio. Entiendo que puedo negarme a participar en este estudio o retirarme en cualquier momento si así lo decido, sin tener que dar explicaciones y que mi decisión será respetada, sin ningún tipo de sanción y sin que cambie la atención que se me da en el centro sanitario (posta, centro médico, hospital, etc).

Si durante el estudio tengo algunas preguntas, puedo comunicarme con los investigadores cuyos datos aparecen en la parte superior. Si tengo alguna pregunta acerca de los aspectos éticos del estudio, o si me parece que mis derechos son lastimados al participar en este estudio, puedo comunicarme con el presidente del Comité de Ética de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza.

Yo, _____ de _____ años de edad, luego de haber leído y entendido el contenido de este documento, SI () / NO () ACEPTO participar en este estudio y que la muestra de _____ sea tomada, utilizada y analizada durante esta investigación, confirmando mi participación mediante la firma de este documento en presencia de la persona quien obtiene el consentimiento.

Firma del participante:

DNI del participante: _____

Nombre y Firma del Testigo: _____

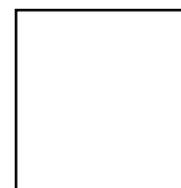
DNI del testigo: _____

Nombre y Firma del Investigador:

DNI del Investigador:

Fecha: _____, de _____ del 2021

Huella digital





CARTA N° 0013

Chachapoyas, 06 de julio del 2022

Bach Gleny Corali Castro Hidalgo
Investigadora Principal

Presente.-

Referencia : Acta del Comité Institucional de Ética en
Investigación de la Universidad Nacional Toribio
Rodríguez de Mendoza de Amazonas del 01-07-
2022.

De mi mayor consideración:

Me complace expresar mi saludo y enviar a Ud. la constancia de aprobación respectiva,
del **proyecto de investigación** titulado **“Aislamiento, Cultivo y Caracterización de
Células Madre Mesenquimales derivado de pulpa dental de dientes deciduo”**.

Así mismo, se recomienda tener en cuenta durante el proceso de investigación, seguir los
lineamientos contemplados en el reglamento de ética de investigación y adjuntar las
evidencias oportunamente; tener en consideración los roles de cada miembro del equipo
de investigación y evitar tener problemas de autoría posteriormente.

La fecha de aprobación tendrá vigencia desde el **inicio de la investigación** hasta el
término de la investigación según su cronograma. Los trámites para su renovación
deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento

Sin otro particular, reitero a usted las muestras de mi especial consideración.

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS
Comité Institucional de Ética de la Investigación (CIEI)

Dr. ELÍAS A. TORRES ARMAS
Presidente

C/c
ciei.



CONSTANCIA

CIEI-Nº 0013.

El que suscribe, presidente del comité institucional de ética en investigación de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, deja constancia que el proyecto de investigación titulado "Aislamiento, Cultivo y Caracterización de Células Madre Mesenquimales derivado de pulpa dental de dientes deciduo", ha sido evaluado y aprobado por el comité, no habiéndose encontrado objeciones en dicho proyecto de acuerdo a los estándares propuestos y que se ejecutará bajo el patrocinio del Instituto de Enfermedades Tropicales, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), Chachapoyas, Amazonas, Perú y el Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, España bajo la responsabilidad de **Bach Gleny Corali Castro Hidalgo** (Investigador principal 1) **PhD Juan Rigoberto Tejedo Huamán** y (Investigador principal 2).

Chachapoyas, 01 de julio de 2022.

UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS
Comité Institucional de Ética de la Investigación (CIEI)

Dr. ELÍAS A. TORRES ARMAS
Presidente

Dic
CIEI





