

**INMUNOCARACTERIZACIÓN *IN SITU* DE CÉLULAS MADRES MESENQUI-  
MALES DE PULPA DENTAL EN TERCEROS MOLARES Y REVISIÓN NA-  
RRATIVA DE PROTOCOLOS DE CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN.**

**POR: FERNANDA ROJAS MEDINA, KARLA SALAZAR FUENTES, MARIELA  
VASQUEZ GALLARDO, JUAN PABLO MATUS.**

**Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Desarrollo  
para optar al grado académico de Licenciado en Odontología**

**PROFESORES GUÍA**

**Tutor de Tesis, Bioquímico, Doctor en Ciencias Biológicas área Biología Celular y  
Molecular, Patricia Pastor Faúndez.**

**Enfermera, Magíster(c) en Epidemiología. Docente Facultad de Ciencias de la Sa-  
lud, Constanza Neira Urrutia.**

**Diciembre 2018**

**CONCEPCIÓN**

## **Agradecimiento**

A nuestras familias, quienes nos han apoyado en todo momento y siempre han estado presente cuando los hemos necesitado. Gracias por dedicarnos cariño, tiempo, paciencia, y por entregarnos valores que nos han convertido en las personas que somos.

A mi padre Alejandro Rojas Lopez, porque hasta en los momentos más difíciles sé que estuvo conmigo en este camino dándome la fuerzas que necesitaba.

A nuestros tutores de tesis, Patricia Pastor Faundez y Constanza Neira Urrutia, por la paciencia y el tiempo destinado, por todos los conocimientos entregados, las palabras de aliento y en especial por creer en nosotros.

A la tecnóloga medica Ximena Koch de la Universidad de Concepción, que fue parte importante en el desarrollo de investigación, gracias por su colaboración.

Al Laboratorio de Biología Celular de la universidad de Concepción, por aportar con sus servicios y permitir llevar a cabo nuestra investigación.

A Reinella Muñoz Guajardo y Nathalie Venegas que fue parte importante en el desarrollo de la investigación, ayudando en todo lo que se podía, entregándonos consejos y palabras de aliento.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	1
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	4
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	4
<b>RESUMEN</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>MARCO TEÓRICO</b>	10
<b>HIPÓTESIS</b>	21
<b>OBJETIVOS</b>	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
<b>RESULTADOS</b>	26
<b>DISCUSIÓN</b>	32
<b>CONCLUSIONES</b>	38
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	40

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Protocolo de aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales.	29
TABLA 2: Protocolo de diferenciación condrogénica.	30
TABLA 3: Protocolo de diferenciación osteogénica.	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Cortes histológicos del complejo dentino-pulpar de terceros molares teñidos con hematoxilina-eosina.	26
FIGURA 2: Inmunohistoquímica para el marcador CD73 en el complejo dentino-pulpar de terceros molares.	27
FIGURA 3: Inmunofluorescencia para el marcador CD73 en el complejo dentino-pulpar de terceros molares.	28

28

## RESUMEN

**Introducción:** En la pulpa dental, existen células precursoras capaces de realizar divisiones asimétricas y diferenciarse en distintos linajes celulares, como por ejemplo: osteoblastos, condroblastos o adipocitos. Estas células reciben el nombre de células madres mesenquimales o “*mesenchymal stem cells*”, las cuales son las protagonistas de numerosos estudios alrededor del mundo debido a su multipotencialidad terapéutica en distintas áreas de la medicina o de la odontología. **Objetivo:** Caracterizar mediante estudios inmunológicos *in situ* las células madres mesenquimales de pulpa dental obtenida de terceros molares en laboratorio de histología y analizar protocolos descritos de estudios *in vitro*. **Materiales y métodos:** Se realizó el estudio en dos fases. Para el estudio *in situ* se realizan cortes histológicos, según protocolo, de terceros molares incluidos extraídos en la clínica UDD. Los cortes, luego de procesarlos, fueron sometidos a tinciones de hematoxilina y eosina. Posteriormente fueron sometidos a técnicas de inmunohistoquímica para detectar la inmunoreactividad del marcador específico CD73, para así visualizar y localizar células madres mesenquimales. Para el estudio *in vitro* se revisaron protocolos de cultivo en publicaciones de 10 años de antigüedad en cuatro bases de datos (Pubmed, Web of science, EBSCOhost, Cochrane). **Resultados:** En el análisis histológico con la tinción hematoxilina-eosina se evidencia que el protocolo utilizado permite obtener la correcta arquitectura del complejo dentino-pulpar, por otro lado, mediante inmunohistoquímica, se logró identificar y localizar las células mesenquimales preferentemente en la región rica en células de la pulpa mediante el anticuerpo CD73 en las diluciones 1:100 y 1:75, utilizando microscopía en campo claro y fluorescencia. En la revisión narrativa, de 70 publicaciones, se reduce el número de estudios a 9, siendo éstos los que mostraban mejores resultados en sus cultivos primarios y en experimentos de diferenciación. **Conclusión:** Es posible obtener cortes histológicos y caracterizar mediante estudios inmunológicos *in situ* las células madres mesenquimales de pulpa dental obtenida de terceros molares y se logró

seleccionar los protocolos *in vitro* más utilizados y con mejores resultados para la obtención de cultivos primarios y su diferenciación en linaje óseo y cartilaginoso. Las células madres mesenquimales de pulpa dentaria son una importante alternativa promisoría para aplicaciones en ingeniería de tejidos orientada a la regeneración en medicina y odontología. Por lo que sería de gran relevancia, en estudios posteriores, lograr cultivar y diferenciar estas células, debido a su prometedora aplicación en el área de la odontología.

## INTRODUCCIÓN

El diente está formado por distintos tejidos, dentro de los cuales se encuentra la pulpa, que corresponde a un tejido conjuntivo laxo altamente vascularizado e innervado. La pulpa es fundamental en la formación del diente durante la odontogénesis y además es un tejido fundamental para el mantenimiento, defensa y vitalidad dentaria en la vida postnatal (Evans & Kaufman, 1981, citado en Das, Bonaguidi, Muro & Kessler, 2008). En el tejido pulpar se encuentran diversos tipos celulares, como los odontoblastos que forman dentina, fibroblasto que sintetizan la matriz extracelular de la pulpa, células inmunológicas y células madres mesenquimales o “*mesenchymal stem cells*” (Murray, Smith, Garcia-Godoy, & Lumley, 2008, citado en Brizuela, Galleguillos, Carrión, Cabrera, Luz, & Inostroza, 2013).

En relación con las células mesenquimales en la cavidad oral, los antecedentes bibliográficos destacan su presencia en pulpa dental y en ligamento periodontal por su importancia y relevancia en futuros tratamientos para regenerar tejidos dentarios. Por otro lado, se ha descrito su importancia en definir protocolos de cultivo primario y así promover su diferenciación a otros tejidos de origen mesodérmico (Yao, Pan, Prpic, & Wise, 2008, citado en Brizuela, Galleguillos, Carrión, Cabrera, Luz, & Inostroza, 2013).

En la actualidad existen diversos estudios *in vitro* de células madres mesenquimales pulpares, los datos bibliográficos muestran variaciones en la obtención, en el protocolo del cultivo primario, tipos de medios de cultivos utilizados, factores que promueven la diferenciación, entre otros. Es por ello, que uno de los objetivos de este estudio es realizar un

análisis sistemático de los protocolos publicados hasta la fecha y seleccionar los que muestran mejores resultados con la finalidad de poder definir los protocolos más citados y eficientes en el cultivo primario y en la diferenciación de estas células precursoras.

En relación a los estudios *in situ*, actualmente no existen trabajos donde identifiquen claramente y localicen las células mesenquimales madres pulpares en terceros molares incluidos, resultado de gran importancia ya que permitiría relacionar y validar la presencia de las células madres mesenquimales en los cultivos de pulpa dentaria descritos en literatura.

Uno de los aspectos más complejos en la obtención de cortes histológicos pulpares es mantener la integridad de los tejidos. Es por ello, que uno de los objetivos es poder estandarizar un protocolo de descalcificación que permita obtener cortes histológicos óptimos para así determinar la presencia de células madres mesenquimales utilizando la técnica de inmunohistoquímica.

De acuerdo a la importancia de determinar y localizar las células madres mesenquimales en pulpa *in situ* y dado que no se encontraron datos bibliográficos sobre estudios de células madres mesenquimales pulpares en cortes histológicos en terceros molares incluidos, el objetivo de la presente investigación es caracterizar mediante estudios inmunológicos *in situ* las células madres mesenquimales de pulpa dental obtenida de terceros molares en laboratorio de histología y realizar un análisis sistemático de los protocolos de cultivo y diferenciación.

## MARCO TEÓRICO

En el tejido pulpar se encuentran diversos tipos celulares, como los odontoblastos que forman dentina, fibroblasto que sintetizan la matriz extracelular de la pulpa, células inmunológicas y células madres mesenquimales o “*mesenchymal stem cells*”. (Murray, Smith, Garcia-Godoy, & Lumley, 2008, citado en Brizuela, Galleguillos, Carrión, Cabrera, Luz, & Inostroza, 2013).

Una célula madre mesenquimal es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse en distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente sino también de forma funcional. Atendiendo a su origen, se clasifican en embrionarias y adultas, en tanto que de acuerdo a su potencial y capacidad de diferenciación se clasifican en: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales (Mata-Miranda, Vázquez-Zapién & Virginia Sánchez-Monroy, 2013).

Alexis Carrel fue un cirujano innovador y premio Nobel, que realizó experimentos con trasplante y reparación de órganos, llevando avances al campo de la cirugía y cultivos celulares en 1912 (Mata-Miranda, Vázquez-Zapién & Virginia Sánchez-Monroy, 2013).

En los últimos años se ha producido un gran avance en la rama de las ciencias médicas, denominada medicina regenerativa, cuyo objetivo vanguardista es estimular o regenerar células, tejidos u órganos para restaurar o restablecer una función normal, perdida principalmente por fenómenos patológicos o degenerativos. (Hernández, Martínez & Cruz, 2007). El sistema estomatognático no está ausente de esos fenómenos; por el contrario, al

estar expuesto al medio externo, en condiciones desfavorables, los tejidos bucales son blanco fácil de numerosas enfermedades. Frente a este panorama, se han realizado diversos estudios sobre el uso de células madres mesenquimales en tejidos dentarios (Hernández, Martínez & Cruz, 2007).

Por otro lado, ya está establecido que cuando una célula madre mesenquimal se divide se obtiene una célula con el mismo potencial precursor y la otra célula va a seguir una vía de diferenciación determinada por el medio externo y las necesidades del tejido. Este proceso es conocido como división asimétrica, que es característico de todas las células madres mesenquimales *in vivo*. (Cárcamo-Orive & Trigueros, 2008)

Finalmente se diferenciará en otro tipo celular con una función especializada como por ejemplo una célula muscular, ósea, un eritrocito o una célula cardíaca (Texas Heart Institute, 2013).

Según los antecedentes bibliográficos las células madres mesenquimales se han clasificado según su origen, su potencial de diferenciación y según el tejido donde se adquieren su potencial precursor.

#### 1. Según su origen

- Células madres mesenquimales embrionarias: Derivan del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocito, por lo que desde el primer momento de su manipulación y destino han enfrentado una fuerte oposición en diferentes países, basada principalmente en aspectos éticos, religiosos y políticos (Dager, Salas, Pérez, Cosme & Pérez, 2014).

- Células madres mesenquimales adultas o posnatales: Estas células poseen ventajas sobre las células madres mesenquimales embrionarias, su manejo es más simple, pueden ser autólogas y, por lo que no causan trastornos inmunológicos, tampoco habría por lo tanto limitaciones éticas o legales. Además, no se ha comprobado que puedan producir cáncer, lo que contrasta con las de las células madres mesenquimales embrionarias; cuya obtención y expansión es más compleja, al ser alogénicas inducen una respuesta inmunitaria y en estudios experimentales causan tumores en animales de experimentación (Dager & cols., 2014).

2. Según su potencial de diferenciación:

- *Totipotenciales*: Son las capaces de originar desde un embrión hasta un individuo completo.

- *Pluripotenciales*: Pueden generar células de solo una de las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo.

- *Multipotenciales*: Al igual que las anteriores, tienen capacidad para desarrollar un conjunto de tipos de celulares, pero mucho más reducido.

- *Unipotenciales*: Se diferencian en un único tipo celular.

(Dager & cols., 2014)

3. Según el tejido donde se adquieren su potencial precursor.

Es importante entender el concepto de *nichos*, mencionado por Scofield (1978), ya que se trata de los elementos que rodean a las células madres mesenquimales cuando se encuentran en su estado nativo, incluidas las no troncales que puedan estar en contacto directo con ellas, así como también componentes de la matriz extracelular y las moléculas solubles que se hallan localmente cercanas. Se han descrito nichos en las siguientes localizaciones: médula ósea, piel, tejido adiposo, cordón umbilical, folículo piloso, intestinos, sistema nervioso central llamada nicho neurogénico (Pastor & cols., 2013) y en el último tiempo se han identificado nichos en la pulpa dental (Romero, Córdoba, Martínez, Gutiérrez, Durán & Munévar, 2014).

Estudios recientes han demostrado que las células madres mesenquimales de la cavidad oral poseen un potencial de multidiferenciación y, por lo tanto, pertenecen al grupo de las células madres mesenquimales adultas multipotenciales, esto se relaciona con estudios de diferenciación donde han obtenido células con linaje osteogénico, adipogénico y neurogénico (Dager & cols., 2014).

Por otro lado, en los últimos años las investigaciones basadas en la caracterización y diferenciación de células madres mesenquimales de origen dentario han identificado 4 nichos de estas células madres en la cavidad bucal: (González, Font & de Nova, 2011).

- Células madres mesenquimales en pulpa de dientes temporales.

- Células madres mesenquimales en pulpa de dientes permanentes.
- Células madres mesenquimales presentes en espacios periodontales.
- Células madres mesenquimales de la mucosa bucal.

En relación con los antecedentes bibliográficos basados en el estudio de estas células madres mesenquimales, se puede destacar a continuación algunos de ellos, sin embargo, falta información sobre el protocolo ideal de cultivo primario, y de las condiciones de cultivo para diferenciar las células en los linajes deseados. En relación con estudios en cortes histológicos hasta la fecha no existen trabajos donde identifiquen y localicen estas células madres mesenquimales.

**Células madres mesenquimales de dientes temporales exfoliados (*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED)*).**

Se aíslan células de la pulpa remanente de los dientes deciduos exfoliados las que se denominan SHED. Los diversos estudios revelan que ésta, contiene una población de células madres mesenquimales diferentes a las aisladas de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSC).

Conservadas, las SHED se consideran una importante fuente de células madres mesenquimales 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 el de la existencia, hasta ahora ignorada, de células epiteliales en la pulpa de estos dientes (Eceizabarrena, García & González, 2014).

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 crecimiento vascular endotelial (VEGF) para que las SHED se diferencien hacia células endoteliales (Gronthos, 2000).

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 favorecerían la guía eruptiva de los dientes permanentes, también pueden estar involucrados en la inducción ósea durante la erupción del permanente (Gronthos, 2000).

### **Células madres mesenquimales de la pulpa (*Dental Pulp Stem Cells* (DPSC)).**

Fueron las primeras células madres mesenquimales dentarias que se aislaron (Gronthos, 2000). Por analogía con las células madres mesenquimales de la médula ósea, se consideró que había 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 no ha sido hasta años después cuando se aislaron, determinando algunas de sus características.

González (2011) en su investigación destaca que el origen y localización exacta de estas células sigue siendo 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 DPSC se ve reducida. Para su uso terapéutico ha de tenerse en cuenta su interacción con biomateriales. Las células madres mesenquimales de la pulpa dental (DPSCs) han demostrado que poseen múltiples ventajas al respecto, además el acceso al lugar donde se encuentran estas células es fácil y de escasa morbilidad, su extracción es altamente eficiente, tienen una gran capacidad de diferenciación, y su demostrada interacción con biomateriales las hace ideales para la regeneración tisular.

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 DPSC fueron inyectadas intramiocárdicamente en los animales y a las 4 semanas, las ratas sometidas a este tratamiento celular mostraron una mejora en su función cardiaca (Gandía, Armiñán, García-Verdugo, Lledó, Ruiz & Miñana, 2008).

### **Células madres mesenquimales del ligamento periodontal (*Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSC)*).**

El ligamento periodontal tiene poblaciones de células que pueden diferenciarse tanto en cementoblastos como en osteoblastos. La presencia de múltiples tipos de células en el periodonto sugiere que este tejido contiene células madres mesenquimales llamadas

PDLSC 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 (González, 2011).

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 subgrupo de células madres mesenquimales capaces de diferenciarse hacia cementoblastos, así como hacia células formadoras de colágeno (González, 2011).

Para poder cultivar las células madres mesenquimales se deben conocer ciertos aspectos, como, por ejemplo; fenotipo en placas de cultivo, los marcadores inmunológicos o anticuerpos que reconozcan proteínas específicas del tipo celular en estudio, de esta forma es posible observar y evidenciar la presencia de células madres mesenquimales en cortes histológicos y en cultivos primarios, mediante las técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica (Dominici & cols., 2006).

Se han definido tres criterios, según Dominici & cols. (2006), para establecer a una célula como una célula madre mesenquimal:

- 1) Adherencia al plástico de la placa de cultivo

2) Inmunoreactividad frente a un antígeno específico (Utilización de anticuerpos determinados).

3) Potencial de diferenciación multipotencial (Diferenciación a diversos linajes celulares).

Primero las células deben tener adherencia al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar usando frascos o placas de cultivo. En segundo lugar, más del 95% de la población de células madres mesenquimales deben expresar los antígenos CD105, CD73 y CD90. Adicionalmente estas células no deben expresar los antígenos CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA clase II. Y finalmente, estas células deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones de cultivo específicas (Dominici & cols, 2006).

Como en este estudio se realizaran análisis histológicos, se registrará el uso de anticuerpos para la identificación de células madres mesenquimales.

Se utilizara el anticuerpo CD73 que es específico para ecto 5'-nucleotidasa, que es una proteína de membrana extracelular. La elección de CD73 está basada en diversos estudios que comprueban que es posible identificar células madres mesenquimales en diferentes tejidos por medio inmunoreacción de CD73 (Kang, Seon-Yle Ko, Chun-Jeih Ryu, & Young-Joo Jang, 2017).

*In situ* refiere al análisis de las DPSC en cortes histológicos, utilizando los marcadores previamente mencionados por medio de la técnica de la inmunohistoquímica. Esta técnica permite localizar moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos. La técnica,

por la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas, permite detectar cantidades ínfimas de moléculas en las células (Hernández & cols, 2011).

Uno de los aspectos más complejos en la obtención de cortes histológicos pulpares es mantener la integridad de los tejidos, ya que al ser el diente un tejido altamente mineralizado se debe someter previamente a un protocolo de descalcificación, proceso que dificulta la obtención de cortes que mantengan la arquitectura pulpar, dentinaria y/o la inmunoreactividad a marcadores. Es por ello, que uno de los objetivos es poder estandarizar un protocolo de descalcificación que nos permita obtener cortes histológicos óptimos para así determinar la presencia de células madres mesenquimales utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Esta técnica permite localizar moléculas específicas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos. Por la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas, es posible detectar claramente los tipos celulares que expresan la proteína (Hernandez, Inostroza, Carrion, Chaparro, Quintero & Sanz, 2011). *In vitro* se identificarán las DPSC en medios de cultivo utilizando también los marcadores CD105, CD90 y CD73 por medio de la técnica de la inmunocitoquímica. Esta técnica permite la tinción y localización de moléculas específicas para este tipo celular, previamente seleccionadas por los marcadores, en las células del cultivo (Hernández & cols, 2011).

Brizuela y cols. (2013), realizaron experimentos donde se aislaron y caracterizaron células madres mesenquimales provenientes de pulpa dental de terceros molares, sus cultivos fueron monitoreados por microscopia óptica y las células se inmunotipificaron por citometría de flujo utilizando diversos marcadores como CD73 y CD105, además mediante inmunocitoquímica determinaron su capacidad de diferenciación a tres linajes: óseo, cartilaginoso y adiposo. En estas condiciones experimentales se comprobó que las células aisladas y cultivadas de pulpa correspondían a células madres mesenquimales humanas.

En la actualidad existen diversos estudios *in vitro* de células madres mesenquimales pulpares, los datos bibliográficos muestran variaciones en la obtención, en el protocolo del cultivo primario, tipos de medios de cultivos utilizados, factores que promueven la diferenciación, entre otros. Es por ello, que uno de los objetivos de este estudio, será realizar un análisis sistemático de los protocolos publicados hasta la fecha y seleccionar los que muestra mejores resultados con la finalidad de poder definir los protocolo más citados y eficientes en el cultivo primario y en la diferenciación de estas células precursoras.

## **PREGUNTA Y PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es posible determinar la localización, aislar e inmunocaracterizar las “mesenchymal stem cells” en corte histológicos de pulpa dental obtenida de terceros molares jóvenes en Laboratorio de investigación, UDD?

## **OBJETIVOS DEL PROYECTO**

### **Objetivo general**

Caracterizar mediante estudios inmunológicos *in situ* de “mesenchymal stem cells” de pulpa dental obtenida de terceros molares en Laboratorio de Histología.

### **Objetivos Específicos**

1. Identificar y definir la localización de las “mesenchymal stem cells” de pulpa dentaria en cortes histológicos de terceros molares jóvenes mediante inmunohistoquímica.
2. Identificar fenotipos de “mesenchymal stem cells” *in vitro*
3. Caracterizar inmunocitoquímicamente las “mesenchymal stem cells” de pulpa dentaria.

### **Hipótesis**

Es posible caracterizar células madres mesenquimales *in situ* en tejido pulpar de terceros molares jóvenes mediante su aislamiento e identificación utilizando el inmunomarcador CD73, en laboratorio de histología, UDD.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio que constó de dos fases, una experimental *in situ* y otra de revisión narrativa de protocolos *in vitro*. Para la fase experimental *in situ*, se realizó la obtención de cortes histológicos de terceros molares extraídos en la clínica UDD y posteriormente la inmunocaracterización de células madres mesenquimales pulpares con el marcador CD73. Para la segunda fase, se analizaron protocolos de cultivo y diferenciación de células madres mesenquimales pulpares con la finalidad de seleccionar los protocolos más eficientes.

### **Estudio *in situ***

La muestra de terceros molares para obtener los cortes histológicos serán tratadas en no más de 24 horas post extracción, se llevaran al laboratorio para comenzar el tratamiento de la pieza para lograr un seriado de cortes histológicos, los cortes seleccionados serán utilizados para el análisis inmunohistoquímico y así lograr identificar, localizar y obtener una cantidad relativa de células madres mesenquimales en la pulpa dentaria. El análisis inmunohistoquímico se realizará en laboratorio de histología UDD, en estos cortes se identificarán las células con fenotipos mesenquimáticos e inmunorreactivas a los anticuerpos utilizados.

El procedimiento de los cortes histológicos será el siguiente:

**Descalcificación y fijación por inmersión:** Los dientes serán descalcificados y luego fijados por inmersión en formalina 10% v/v por 6 horas (formalina 25% v/v, ácido acético 5% v/v en solución saturada de ácido pícrico). Los dientes serán extraídos en la clínica

UDD y llevados en menos de 24 hrs al laboratorio en una solución descalcificante para posteriormente fijarlos en formalina.

**Deshidratación y aclaramiento.** Las muestras serán lavadas para extraer el exceso de fijador con agua corriente. Luego las muestras serán sometidas a una batería de soluciones alcohólicas crecientes (etanol 70%, 95% y cuatro baños de etanol 100%) por diferentes tiempos y serán aclaradas en 3 baños de benzoato de metilo y 2 baños de benzol.

**Inclusión en parafina.** Las muestras serán incluidas introduciéndolas en cuatro baños de parafina mantenidas en una estufa termorregulada a 60°C. Una vez confeccionados los bloques en un soporte metálico, estos serán enfriados rápidamente en agua corriente y trasladados a 4°C para desmontar las muestras del soporte metálico y así poder realizar los cortes histológicos.

**Obtención de cortes histológicos.** Los bloques de parafina con la muestras serán cortados con un micrótopo rotatorio (Reichert-Jung 2040) en láminas de 7µm. Estas láminas serán montadas en portaobjetos tratados con polilisina en un baño termoregulado entre 40°C y 45°C. Para poder localizar el área de estudio y obtener cortes adyacentes, se montaran cortes seriados (1 cada 10 cortes) y se les realizara una tinción histológica con Hematoxilina y eosina.

Los cortes histológicos serán desparafinados por inmersión en tres baños sucesivos de xilol y en una batería de etanol en concentraciones decrecientes por 5 min cada uno.

### **Inmunohistoquímica.**

Las muestras desparafinadas serán incubadas por 15 minutos en metanol con peróxido de hidrógeno 3% v/v para inhibir la actividad peroxidasa endógena. Los cortes serán lavados 3 veces en tampón Tris-fosfato 10 mM, y posteriormente incubados con el primer anticuerpo preparado en tampón Tris-fosfato y albúmina sérica de bovino 1% p/v. La incubación fue realizada en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 12 a 16 horas. Luego de lavar 3 veces el primer anticuerpo con Tris-fosfato, las muestras serán incubadas con los segundos anticuerpos conjugados con peroxidasa, diluidos en Tris-BSA por 2 horas en cámara húmeda y oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación con el segundo anticuerpo, las muestras serán lavadas 3 veces en tampón Tris-fosfato y luego la actividad peroxidasa se revelarán utilizando una solución de diaminobenzidina 0,7 mg/ml y peróxido de hidrógeno 3% v/v en tampón Tris-fosfato durante 15 minutos en oscuridad. La reacción fue detenida con lavados en agua destilada después de lo cual se procederá a realizar una tinción de contraste nuclear con Hematoxilina de Harris por 20 segundos. Luego los cortes serán deshidratados en una batería de alcoholes y xiloles. Y serán cubiertos con un cubreobjetos con el medio de montaje bálsamo de Entellán<sup>®</sup> para su visualización y preservación.

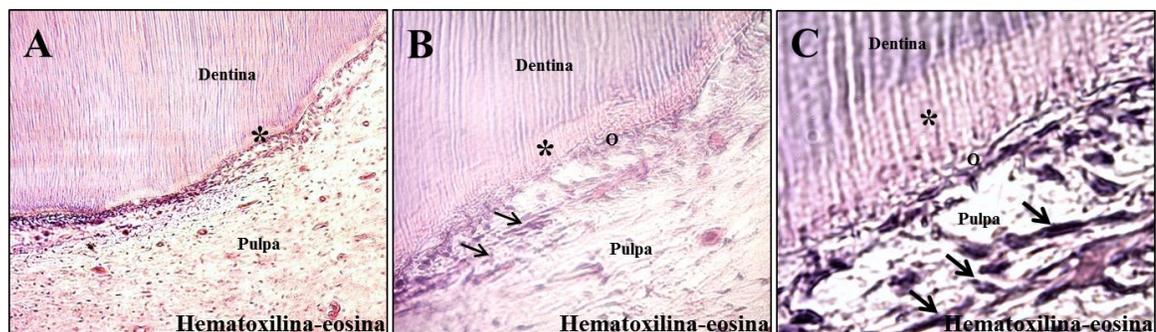
Para detectar el marcador específico CD73, las células adheridas en los cubreobjetos se fijarán con formaldehído al 4% por 10 minutos, se lavarán con buffer de fosfatos (PBS)

por 2 minutos repitiendo tres veces. Las células se permeabilizarán con metanol frío durante 10 minutos y se incubarán con el anticuerpo específico que reconoce a CD73, en una concentración de 1:100 incubado a 4°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de reacción se lavarán 3 veces por 10 minutos con PBS-Tritón 100x para eliminar la señal inespecífica del anticuerpo. La señal se obtendrá por incubar con un segundo anticuerpo acoplado a un fluoróforo, esta señal se observará bajo el microscopio de fluorescencia.

## RESULTADOS

### Estudio experimental: *In situ*

Una vez iniciado el estudio en cortes histológicos de pulpa dental de terceros molares incluidos, se analizaron los cortes teñidos con hematoxilina-eosina donde se realizaron respectivas fotografías logrando identificar el complejo dentino-pulpar y donde se observó claramente que los cortes obtenidos utilizando los protocolos descritos en este trabajo mantienen la arquitectura pulpar que se ha definido en bibliografía (Figura 1).

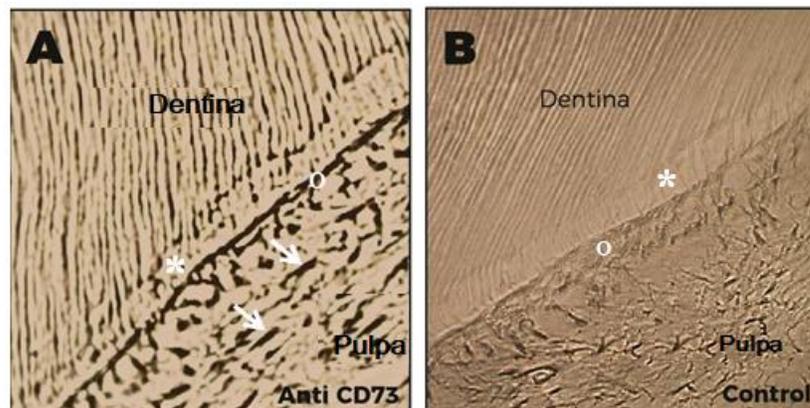


**Figura 1. Cortes histológicos del complejo dentino-pulpar de terceros molares teñidos con hematoxilina-eosina.**

Cortes longitudinales de terceros molares (A) Se identifica la dentina, túbulos dentinarios, pulpa y predentina (\*) que corresponde a la matriz orgánica. (B) Las flechas indican la zona rica en células de la pulpa, predentina (\*) y odontoblastos (O). (C) Se identifica la predentina (\*), odontoblastos (o) y las flechas indican la zona rica en células de la pulpa con la posible presencia de células mesenquimales.

Aumento en A: 100x. Aumento en B: 400x. Aumento en C: 1000x.

Posteriormente, se estandarizó el anticuerpo anti-CD73, realizando diferentes diluciones para obtener la inmunoreactividad más adecuada que permita visualizar la reacción del anticuerpo en los diferentes tipos celulares. Los análisis de los resultados nos indicaron que las diluciones 1:100 y 1:75 nos permitieron identificar inmunoreactividad para CD73 en la zona rica en células, sugiriendo la presencia de células mesenquimales pulpares. La reactividad positiva para el marcador se analizó en microscopía en campo claro (Figura 2) y mediante fluorescencia (Figura 3).

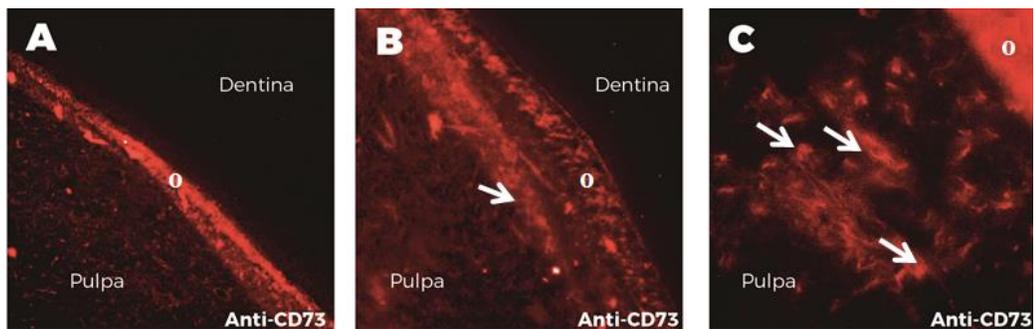


**Figura 2. Inmunohistoquímica para el marcador CD73 en el complejo dentino-pulpar de terceros molares.**

Cortes longitudinales de terceros molares observados en microscopía en campo claro e inmunoreactividad para CD73 (color café). (A) Se detecta inmunoreactividad del marcador CD73 en la capa odontoblástica (O) y en la zona rica en células de la pulpa, lo que

sugiere la presencia de células mesenquimales (flechas), predentina (\*) (B). Control negativo para el anticuerpo en la misma zona.

Aumento en A: 100x. Aumento en B: 400x.



**Figura 3. Inmunofluorescencia para el marcador CD73 en el complejo dentino-pulpar de terceros molares.**

Cortes longitudinales de terceros molares observados e inmunoreactividad para CD73 asociado a fluorescencia (en rojo). (A) Complejo dentino-pulpar, zona odontoblástica (O). (B) Con flecha se indica la reactividad positiva en la zona rica en células de la pulpa y en la zona odontoblástica (O). (C) Con flechas se indican inmunoreactividad en células de la zona rica en células de la pulpa, sugiriendo la marca en células mesenquimales pulpares. Estos datos nos muestran que las células odontoblásticas presentan inmunoreactividad de CD73 (O) como ha sido descrito en bibliografía.

Aumento en A: 100x. Aumento en B: 400x. Aumento en C: 1000x.

### Revisión narrativa: *In vitro*

La búsqueda arrojó 70 estudios. De primera instancia se eligen 20 los cuales describen el protocolo de obtención, cultivo e identificación de células madres mesenquimales y el protocolo de diferenciación a distintos linajes celulares como condrogénica y osteogénica. De estos 20 estudios, 9 describen de forma completa y clara el procedimiento de cultivo y de diferenciación de células madres mesenquimales. El criterio para la elección de los protocolos se basó en la metodología más utilizada y en los resultados obtenidos.

A continuación, se muestran las tablas de resumen con los datos obtenidos a partir de los estudios analizados.

**Tabla 1. Protocolo de aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales.**

Pieza	3er molar
Edad	18-55 años
Procesamiento	Digestión enzimática con 3mg/mL colagenasa 1 + 4mg/mL
Sembrado	10 <sup>4</sup> cel x cm <sup>2</sup>
Medio de Cultivo	αMEM 10% SBF; 100μM L-ácido ascórbico 2 Fosfato; 2mM L-Glutamina; 100 Unidades/mL Penicilina; 100 μg/mL Estreptomicina.
Pasaje o Semana	2-5 pasaje

Fijador	Paraformaldehído 4%
Ac Célula Madre	Vimentina – Nestina – Stro1- CD 34/44/45/ <b>73</b> /90/105/146

**Tabla 2. Protocolo de diferenciación condrogénica.**

Sembrado	$2.5 \times 10^4$ cel x cm <sup>2</sup>
Medio de cultivo	D-MEM + 1% Insulina Transferrina Selenio + 1% Dexametasona + 10ng/mL TGF $\beta$ 1 +50mg/mL Ascorbato 2 Fosfato
Fijación	Paraformaldehído 4% por 20 min.
Técnica para corroboración de diferenciación	Inmunohistoqca para Agrecan – Tinción Safranina O – Tinción con Azul Alcian

**Tabla 3. Protocolo de diferenciación osteogénica.**

Sembrado	1.8 x 10 <sup>4</sup> cel/cm <sup>2</sup>
Medio de Cultivo	α-MEM 10% SBF; 5% dexametasona + 50mg/mL ascorbato fosfato + 10mM βGlicerolFosfato + 1% Penicilina + 1% Estreptomicina.
Fijación	Paraformaldehído 4% o formalina 10% por 20 min.
Técnica para corroboración de diferenciación	Inmunohistoquímica para osteocalcina - PCR para sialoproteínas, osteocalcinas, sialofosfoproteínas; fosfatasa alcalina – Tinción con Alizarina Red – Tinción con Hematoxilina eosina.

## DISCUSIÓN

En los últimos años se ha descubierto que existe una diversidad de nichos de células madres en diversos tejidos del organismo, con la finalidad de recambiar y regenerar tejidos envejecidos o dañados por patologías degenerativas (Casagrande, Cordeiro, Nör & Nöör, 2011, citado en Brizuela, Galleguillos, Carrión, Cabrera, Luz, & Inostroza, 2013).

En condiciones determinadas, estas células pueden dividirse indefinidamente conservando siempre una población estable de células mesenquimales, que en condiciones apropiadas y con estímulos correctos puede diferenciarse hacia diferentes linajes celulares especializados del organismo adulto (Evans & Kaufman, 1981, citado en Das, Bonaguidi, Muri & Kessler, 2008). Actualmente este potencial precursor de las células madres está siendo ampliamente estudiado con la finalidad de descubrir nuevos tratamientos para diversas patologías y terapias de regeneración celular. Es por esto, que es fundamental, el conocimiento, localización, caracterización y diferenciación de estas células precursoras.

Uno de los nichos de células madres descritos actualmente corresponde a las células madres mesenquimales de pulpa dental, donde existen diversos estudios sobre el cultivo primario y de diferenciación. Por ejemplo, Brizuela y cols. (2013), lograron aislar y caracterizar células madres mesenquimales en cultivos y posteriormente diferenciar estas células en 3 linajes distintos. Tal estudio, respalda la gran capacidad proliferativa de las células madres mesenquimales pulpares y comprueba que, a partir de la pulpa de un diente, se

puede generar un potencial terapéutico para poder ser utilizado en medicina y odontología regenerativa.

Dentro de las distintas clasificaciones de células madres se encuentran las células madres mesenquimales de dientes temporales exfoliados o '*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*' (SHED).

Los dientes deciduos son considerados una importante fuente de células madres mesenquimales y de fácil obtención (González, 2011). Además, al comparar las células madres mesenquimales de dientes deciduos con las de dientes permanentes, se ha establecido que las primeras presentan una mayor velocidad de proliferación y una mayor capacidad de diferenciación (Zheng, Liu, Zhang, Zhang, Li & Shi, 2009). Estas características son la principal motivación de investigadores para realizar estudios sobre células madres en dientes temporales, lo que se relaciona con el mayor número de datos bibliográficos de estudios en dientes deciduos que en dientes permanentes.

Al realizar la revisión bibliográfica sobre los estudios *in vitro* de células madres mesenquimales pulpares obtenidas de dientes permanentes, se encontraron diversos estudios, donde existían variaciones en el procesamiento de la muestra, los tipos de medios de cultivos utilizados, factores añadidos, pasajes celulares y los anticuerpos para realizar la inmunocitoquímica, entre otras variables (Osathanon, Sawangmake, Nowwarote & Pava-sant, 2014). A pesar de los variados métodos existentes de aislamiento, cultivo y diferenciación de células madres mesenquimales pulpares, hemos identificado la gran dificultad

de obtener el cultivo primario. Es por esto, que mediante esta revisión narrativa se seleccionaron los protocolos de cultivo primario y de diferenciación en base a la metodología más utilizada y con resultados relevantes. De esta manera se simplificaron los protocolos de cultivo para posteriores investigaciones en esta importante área.

En relación con los estudios *in situ* no se encontraron evidencia de células madres mesenquimales de pulpa en dientes permanentes, una de las razones es la complejidad en la obtención de cortes histológicos. Las piezas dentarias están compuestas por tejidos duros y blandos, siendo el esmalte el tejido más mineralizado del cuerpo, por lo tanto, el de mayor dureza (Rivera Ossa & Arola, 2012). Presenta un 95% de matriz mineral, 4% de matriz orgánica y 1% de agua. Sin embargo, la dentina y el cemento también presentan una matriz calcificada. Por esta característica estructural de los componentes del diente, previa a la obtención de cortes histológicos es fundamental realizar el proceso de descalcificación (Petrone, Garizoain, García, Andrini, García & Inda, 2015). Este proceso dificulta la obtención de cortes histológicos que mantengan la arquitectura celular del tejido y que en sus células permanezcan los marcadores proteicos para ser detectados por inmunohistoquímica. Por otro lado, si el proceso de descalcificación no se realiza en el tiempo requerido por la muestra, el tejido puede mantener cierta dureza lo que hace imposible obtener cortes histológicos. El tiempo en el descalcificador es variable y depende del espesor de la muestra y del porcentaje de matriz inorgánica en el tejido.

Es por esto que en primera instancia se realizaron dos procesos de descalcificación uno por dos semanas con ácido fórmico 20-25% lo cual no obtuvo los resultados esperados al momento de cortar las muestras ya que el tejido permanecía con una alta dureza, por lo tanto para las siguientes muestras se decidió cambiar el protocolo y dejar el diente en ácido fórmico 20-25% por 4 semanas logrando obtener cortes histológicos donde existían zonas que mantenía la arquitectura como se ha descrito en el complejo dentino-pulpar, resultados que se observan al realizar la tinción hematoxilina-eosina, logrando identificar dentina con los túbulos dentinarios, predentina y las zonas de la pulpa.

Cabe destacar, que existen otros métodos de descalcificación para obtener los cortes histológicos, como, por ejemplo, ácido nítrico al 5%, solución de Von Ebner, ácido clorhídrico al 5%, entre otros. Estos caen en la categoría de ácidos fuertes, y son principalmente utilizados para descalcificar tejido óseo.

El siguiente paso que se realizó fue la estandarización de las concentraciones del anticuerpo CD73 este paso es necesario para obtener una correcta visualización o inmunoreactividad del anticuerpo en las muestras histológicas, se realizaron las siguientes diluciones: 1:1000 - 1:500 - 1:200 - 1:100 - 1:75 - 1:50, siendo las diluciones 1:100 y 1:75 las que permitieron localizar las células madres mesenquimales en la zona rica en células en la pulpa dental de terceros molares incluidos. Siendo esta zona el lugar donde se han descrito estas células en la bibliografía de textos de histología bucodental.

La inmunoreactividad fue detectada en campo claro por la acción peroxidasa y mediante inmunofluorescencia, esta última permite una mayor eficiencia de la inmunoreactividad.

Según González (2011), el antígeno STRO-1 es el más utilizado para la identificación de células madres mesenquimales dentarias, como para las procedentes de la médula ósea, sin embargo, en este estudio se comprueba y se establece además la posibilidad de realizar marcajes para identificar células madres mesenquimales pulpares con el marcador CD73. Este anticuerpo ha sido utilizado en algunos estudios *in vitro* de estas células como los descritos por Brizuela y cols. (2013). Cabe destacar que no existen evidencias del uso de ninguno de estos marcadores en muestras histológicas obtenidas de terceros molares incluidos, por lo que este estudio tiene una gran relevancia en la identificación y localización de estas células (*in situ*) en dientes permanentes.

La importancia de este estudio radica en evidenciar la posibilidad de identificar y localizar células madres mesenquimales en pulpa dental de terceros molares incluidos, para luego, en futuros estudios, lograr aislarlas, diferenciarlas y así lograr utilizarlas como alternativa terapéutica (Casagrande, Cordeiro, Nör & Nöör, 2011) en diferentes afecciones o enfermedades en los seres humanos.

Cabe destacar que la actualidad ciertas patologías se tratan con cultivos de células madres mesenquimales y en un futuro este campo se va a ampliar considerablemente, y para poder utilizar algún tipo celular en diversos experimentos, ya sea de diferenciación o trabajar

con inyecciones de células madres en animales de laboratorio, es imprescindible manejar y estandarizar las condiciones ideales cultivo y de procedimientos *in situ*.

## CONCLUSIONES

Con el estudio experimental *in situ*, se logró obtener un protocolo de descalcificación dental que permitió realizar cortes histológicos de 7 micras, los cuales por medio de la tinción con hematoxilina y eosina (núcleo-citoplasma) permitió evidenciar las diferentes estructuras dentarias, manteniéndose la arquitectura descrita del complejo dentino-pulpar. Es necesario preservar la arquitectura y la integridad de los tipos celulares para realizar los estudios inmunohistoquímicos, los cuales permitieron identificar y localizar las células mesenquimales pulpares en terceros molares incluidos, datos que hasta la fecha no han sido publicados.

Por lo tanto, mediante en el presente estudio se inmunocaracterizó y localizó las células madres mesenquimales pulpares de terceros molares por medio del inmunomarcador CD73.

Con la revisión narrativa, se logró seleccionar y resumir protocolos para cultivo primario de células madres mesenquimales y protocolos para su diferenciación en los linajes osteogénicos y condrogénicos. Se consiguió, además, definir que las diferencias entre estudios radican principalmente en el uso de nuevos medios de cultivo y factores de crecimientos que generan variaciones en el crecimiento de las células madres mesenquimales pulpares y su diferenciación.

La selección de los protocolos de cultivo realizados en este estudio facilitará la búsqueda de información para futuros proyectos de investigación de células madres mesenquimales pulpares.

Las células madres mesenquimales constituyen una unidad natural de generación celular durante la embriogénesis y regeneración en la vida adulta, son capaces de dividirse indefinidamente y diferenciarse en distintos linajes celulares y se ha demostrado que las mismas juegan un importante papel en la regeneración de diferentes estructuras del complejo bucofacial, además de un rol fundamental en la diferenciación de las células del complejo pulpo-dentinario, el ligamento periodontal, y en la regeneración de estructuras esqueléticas cráneo-faciales. Por lo anterior, este estudio adquiere gran relevancia, puesto que las células madres mesenquimales de pulpa dentaria son una alternativa promisoriosa para aplicaciones en ingeniería de tejidos orientada a la regeneración en medicina y odontología. Por lo que sería de gran importancia en estudios posteriores, lograr cultivar y diferenciar estas células, debido a su prometedora aplicación en el área de la odontología.

## **REFERENCIAS**

Aksel, H., & Huang, G. (2017). Combined Effects of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein 2 on Odonto/Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro. *ELSEVIER*, 930-935.

Ba, P., Duan, X., Fu, G., Lv, S., Yang, P., & Sun, Q. (2017). Differential effects of p38 and Erk1/2 on the chondrogenic and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. PubMed, 63-68.

Brizuela, C., Galleguillos, G., Carrion, A., Cabrera, P., Luz, C., & Inostriza, S. (2013). Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano. Morphol, 739-746.

Cárcamo-Orive, I., & Trigueros, C. (2008). Células madre mesenquimales y trasplante hematopoyético. ResearchGate, 3-6.

Casagrande, L., Cordeiro, M., Nör, S., & Nöör, J. (2011). Dental pulp stem cells and regenerative dentistry. MedLine, 1-7.

Castagnino JM. Células madre embrionarias. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2005;39(3):277-8.

Cruañas Hernández AM, Martínez Castro E, Bermudo Cruz CL. Estomatología regenerativa. De las células madre a la ingeniería tisular. Rev 16 de abril. 2007

Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM.. (2006, diciembre). Location of putative stem cells in human periodontal ligament.. J Periodontal Res., 41, 6. 2017, mayo 24, De PubMed Base de datos.

Dager, E. S., Salas, N. L., Pérez, Y. U., Cosme, Y. R., & Deyá, Y. N. (2014). Endodontic regeneration with stem cells. SciELO, 1029-3019.

Das, S., Bonaguidi, M., Muro, K., & Kessler, J. (2008). Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. PubMed, 24-32.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ & Horwitz EM. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. International Society of Cellular Therapy, 8, 3. (2017, mayo 24).

Eceizabarrena, I.I., García, M.J., & González, S. (2014). Células madre de la pulpa dentaria. Reduca, 175-179.

Flores-Figueroa E, Montesinos J & Mayani Células troncales mesenquimales: Historia, biología y aplicación clínica (Abril, 2006) .De Scielo base de datos.

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

Goldberg, M. & Smith, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 15(1):13-27, 2004.

González, L.. (2011). Investigación con células madre de origen dentario. Actualización.. 2017, de Gaceta Dental Sitio web: <http://www.gacetadental.com/2011/09/investigacion-con-clulas-madre-de-origen-dentario-actualizacin-25547/#> (citado 2017, mayo 24)

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:13625-13630

Hernandez B, Inostroza V, Carrion A, Chaparro P, Quintero H & Sanz R. Prolifracion de celulas madres mesenquimales obtenidas de tejido gingival humano sobre una matriz de quitosano: Estudio *in vitro* (Agosto, 2011).

Hernández Ramírez P. Regeneración biológica. Secretos de la naturaleza. Rev. Cubana Hematol Inmunol Med Transf. 2006;22(3)

Hernández, P. (2009). Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. SciELO, 1561-2996.

Hilkens, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., y otros. (2013). Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. Springer Link, 65-78.

Huang, G., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. PMC, 792-806.

Jang, J., Lee, H., Cho, K., Shin, H., Kang, M., Park, S., y otros. (2016). In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods. PubMed, 283-295.

Kang, K.-J., Seon-Yle Ko, Chun-Jeih Ryu, & Young-Joo Jang. (2017). A monoclonal antibody recognizes undifferentiation-specific carbohydrate moieties expressed on cell surface of the human dental pulp cells. ELSEVIER, 85-93.

Kiraly, M., Porcsalmy, B., Pataki, A., Kadar, K., Jelitai, M., Molnar, B., y otros. (2009). Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. PubMed, 55-67.

Kumabe S, Nakatsuka M, Kim GS, Jue SS, Aikawa F, Shin JW, Iwai Y.. (2006, febrero). Human dental pulp cell culture and cell transplantation with an alginate scaffold.. Okajimas Folia Anat Jpn., 82, 4. 2017, mayo 24, De PubMed Base de datos.

Liang, Z., Kawano, S., Chen, W., Sadrkhani, M., Lee, C., Kim, E., y otros. (2018). Minced pulp as sources of pulpal mesenchymal stem cells with odontogenic differentiation capacity. PubMed, 80-86.

Marrazzo, P., Paduano, F., Palmieri, F., Marrelli, M., & Tatullo, M. (2016). Highly Efficient In Vitro Reparative Behaviour of Dental Pulp Stem Cells Cultured with Standardised Platelet Lysate Supplementation. Hindawi, 90-106.

Miranda M, Vazquez G & Sanchez V. Generalidades y aplicaciones de las células madres. (Mayo, 2013). De Scielo base de datos.

Munévar Niño JC, Becerra Calixto AP, Bermúdez Olaya B. Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica. Act Odont Venez. 2008

Muñoz, R. R. (2013). EMBRIOLOGÍA, HISTOLOGÍA Y FISIOLOGÍA PULPAR. Ciudad de México: UNAM.

Osathanon, T., Sawangmake, C., Nowwarote, N., & Pavasant, P. (2014). Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. PubMed, 24-35.

Paduano, F., Marrelli, M., White, L., Shakesheff, K., & Tatullo, M. (2016). Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Hydrogel Scaffolds Derived from Decellularized Bone Extracellular Matrix and Collagen Type I. *PLOSOne*, 87-92.

Pastor P, Cisternas P, Salazar K, Silva-Alvarez C, Oyarce K, Jara N, Espinoza F, Martínez AD & Nualart F.. (2013, agosto 13). SVCT2 vitamin C transporter expression in progenitor cells of the postnatal neurogenic niche.. *Front Cell Neurosci*, 7, 119. 2017, mayo 24, De PubMed Base de datos.

Petrone, S., Garizoain, G., García, R., Andrini, L., García, L., & Inda, A. (2015). Análisis histológico del esmalte dentario desde una perspectiva antropológica. *SEDICI*, 50-62.

Pisciotta, A., Riccio, M., Carnevale, G., Beretti, F., Gibellini, L., Maraldi, T., y otros. (2012). Human Serum Promotes Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro and In Vivo. *PLOSOne*, 55-67.

Ramos T, Sanchez- Abarca L, Muntión S, Preciado S, Puig N, López- Ruano G, Hernandez-Hernandez A, Redondo A, Ortega R, Rodriguez C, Sanchez-Guijo F & Del cañizo C. MSC surface markers ( CD44, CD73, and CD90) can indentify human MSC derived extracellular vasicles by convetional flow cytometry. (Enero, 2016). De NCBI base de datos.

Riccio, M., Resca, E., Maraldi, T., Pisciotta, A., Ferrari, A., Bruzzesi, G., y otros. (2010). Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. *PMC*, 54-61.

Rivera, C., Ossa, A., & Arola, D. (2012). Fragilidad y comportamiento mecánico del esmalte dental. *Revista Ingeniería Biomedica*, 87-99

Romero, S., Córdoba, K., Martínez, C. A., Gutiérrez, J. G., Durán, J. Y., & Munévar, J. C. (2014). Candidate markers, culture strategies and DPSC perspectives used as cellular therapy in dentistry. *Revista Odontológica Mexicana*, 156-163.

Sadat, T., & Torshabi, M. (2017). In vitro proliferation and osteogenic differentiation of endometrial stem cells and dental pulp stem cells. *Cell Tissue Bank*, 239-247.

Struys, T., Moreels, M., Martens, W., Wolfs, E., Donders, R., & Lambrechts, I. (2010). Ultrastructural and Immunocytochemical Analysis of Multilineage Differentiated Human Dental Pulp- and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Tissues Organs*, 50-62.

Westin, C., Trinca, R., Zuliani, C., Coimbra, I., & Moraes, A. (2017). Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan scaffold in the presence of kartogenin. *PubMed*, 594-602.

Zhang, Y., Xing, Y., Jia, L., Ji, Y., Zhao, B., Wen, Y., y otros. (2018). An in vitro comparative study of multisources derived mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *PubMed*, 34-50.

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. J Periodontol. 2010; 81:934-944. (Hernández, 2009)

Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH & Shi S (2009). Stem Cells form Deciduous Tooth Repair Mandibular Defect in Swine. J Dent Res. 2009; 88(3):249-254.