



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SECCIÓN DE POSGRADO

**MEDIO DE TRANSPORTE CON Y SIN LA ADICIÓN DE
ANFOTERICINA B EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA
PULPA DENTAL**

**PRESENTADA POR
ANGELA GRACIELA GAVIDIA PACHECO**

ASESORA

ESPERANZA RAQUEL AYÓN HARO

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANA DENTISTA

LIMA – PERÚ

2018



**Reconocimiento - No comercial – Compartir igual
CC BY-NC-SA**

La autora permite transformar (traducir, adaptar o compilar) a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



USMP
UNIVERSIDAD DE
SAN MARTÍN DE PORRES

FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

**MEDIO DE TRANSPORTE CON Y SIN LA ADICIÓN DE
ANFOTERICINA B EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA
PULPA DENTAL**

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

**PRESENTADO POR
BACH. ANGELA GRACIELA GAVIDIA PACHECO**

**ASESORA:
DRA. ESPERANZA RAQUEL AYÓN HARO**

LIMA - PERÚ

2018

DEDICATORIA:

A mis padres, Carlos y Marianela, mi gran ejemplo a seguir.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a Dios y a mi familia, por hacer posible este logro y por todo el apoyo brindado siempre.

A mi asesora, la Dra. Esperanza Raquel Ayón Haro, por su gran ayuda, enseñanzas y por su guía para el desarrollo de esta investigación.

Al Mg. Jorge Alejandro Reyes Saberbein, por el apoyo incondicional durante el proceso de este trabajo.

A la doctora Marieta Petkova, por su asesoría con la estadística de la tesis.

A mis amigos y colegas, por su preocupación y por animarme día a día a concluir con la tesis.

A los miembros del Laboratorio de Investigación de Biología Oral y Molecular, por la colaboración y su compañerismo.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	8
1.1. Antecedentes de la Investigación	8
1.2. Bases Teóricas	12
1.3. Definición de Términos Básicos	23
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	25
2.1. Formulación de Hipótesis.....	25
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	27
3.1. Diseño Metodológico	27
3.2. Diseño muestral.....	28
3.3. Técnicas de recolección de datos	29
3.4. Técnicas Estadísticas para el Procesamiento de la Información.....	33
3.5. Aspectos Éticos.....	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	34
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
FUENTES DE INFORMACIÓN	45
ANEXOS	51

RESUMEN

Una de las fuentes de obtención de las células madre es la pulpa dental humana, la cual se puede conseguir con procedimientos sencillos y poco invasivos. Para que el aislamiento de células de la pulpa dental sea exitoso, es de vital importancia seguir protocolos estrictos, también utilizar un adecuado medio de transporte para evitar la contaminación desde el momento de la extracción de la pieza dental hasta su procesamiento en el laboratorio. Debido a ello, en esta investigación, el objetivo fue comparar dos medios de transporte y evaluar la viabilidad celular en ambos grupos. Se compararon dos grupos, el grupo 1 fue transportado en un medio con los antibióticos penicilina – estreptomina; en el grupo 2, se utilizó un medio de transporte con los antibióticos ya mencionados más la adición de anfotericina B. Se recolectaron treinta y tres piezas dentales de pacientes entre 18 y 29 años de edad. Para la evaluación de la viabilidad celular, se utilizó el colorante azul de tripán. Luego se realizó el conteo celular en un hemocitómetro, en el microscopio. Al análisis estadístico se obtuvo que el número de células y la viabilidad celular fue mayor en el grupo 2 que en el grupo 1. Con los resultados de este estudio se concluyó que es recomendable utilizar anfotericina B en conjunto con los antibióticos en el medio de transporte. De esa manera lograr mantener un ambiente aséptico para dicho transporte y obtener una mayor cantidad de células viables.

Palabras clave: Viabilidad Celular, Pulpa Dental, Anfotericina B

ABSTRACT

One of the stem cells sources is the human dental pulp, which can be obtained with simple and non-invasive procedures. For the isolation of dental pulp cells to be successful, it is vital to follow strict protocols, considering techniques and the necessary care to avoid contamination from the moment of extraction of the tooth until its delivery in the transport medium. Thus, in this investigation, the objective was to compare two transport media and evaluate the cell viability in both groups. Two groups were compared, the teeth of group 1 were transported in a medium with the antibiotics penicillin-streptomycin; in group 2, the transport medium contained the already mentioned antibiotics together with amphotericin B. Thirty three teeth were collected from patients between 18 and 29 years old. For the evaluation of cell viability, trypan blue dye was used. Then, the cell count was performed with a hemocytometer using a microscope. Statistical analysis showed that the average number of cells and the percentage of cell viability was higher in group 2 than in group 1. With the results of this study it was concluded that it is advisable to use amphotericin B, in addition with antibiotics in the transport media. Therefore, to achieve an aseptic environment and obtain a major quantity of viable cells.

Key words: Cell Survival, Dental Pulp, Amphotericin B

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las células madre son un tema de mucho interés para el campo de investigación y para la medicina regenerativa, gracias al desarrollo de nuevas técnicas para regenerar tejidos dañados por injurias o enfermedades¹. La pulpa dental humana es una de las alternativas como fuente de obtención de una gran variedad de células. Este tejido incluye células madre que poseen un potencial alto de proliferación y una capacidad de diferenciación multilinaje. El acceso al tejido pulpar y la obtención del mismo, se realiza con procedimientos sencillos y poco invasivos. Esto es una ventaja en la medicina y odontología regenerativa en contraste con los procedimientos para obtener células madre de otras fuentes, como por ejemplo células madre de la médula ósea².

El éxito del aislamiento de células de la pulpa dental como, por ejemplo células madre o fibroblastos, exige seguir protocolos estrictos para su obtención, teniendo en cuenta las técnicas y cuidados necesarios durante todo el procedimiento, el cual comienza desde la extracción del diente. Debido a la presencia de alrededor 600 especies microbianas en boca, es importante realizar la desinfección del diente extraído y transportarlo en un medio lo más aséptico posible. Para evitar la contaminación del cultivo, se añaden fármacos como antibióticos y antifúngicos en el medio de transporte, y medios de cultivo. A la fecha, en nuestro país, no existen reportes de estudios experimentales del medio de transporte para las piezas dentales de las cuales se obtienen células de la pulpa dental; asimismo, son muy pocos los estudios a nivel de células madre mesenquimales y de otras células de la pulpa dental³. Es por eso que el objetivo de este estudio fue comparar los medios de transporte de la pieza dental, adicionando los antibióticos penicilina-

estreptomina (PE-ST) y el antifúngico anfotericina B, en la viabilidad celular. En consecuencia, esta investigación nos permite elegir el medio de transporte más adecuado para analizar la viabilidad celular que garantizará un óptimo rendimiento y resultados fidedignos en los futuros estudios de células de la pulpa dental, aplicados en la medicina regenerativa para tratar diversas enfermedades, como la regeneración ósea, problemas congénitos, tumores, traumatismos del macizo craneofacial.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de la Investigación

MAGALLANES M *et al.* (2010) El objetivo de este estudio fue aislar, caracterizar e inducir la diferenciación celular de células madre de la pulpa dental. Utilizaron premolares de pacientes jóvenes de un intervalo de edades entre 12 y 18 años. Inmediatamente después de la exodoncia, piezas dentales fueron colocadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Para el aislamiento celular, colocaron las pulpas dentales en colagenasa tipo I y dispasa, luego las lavaron con DMEM y suero fetal bovino (SFB) al 10%. Los extractos digeridos de las pulpas dentales las dejaron crecer en un medio de cultivo, el cual consistió en DMEM con SFB, suplementado con los antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL), también se adicionó el antifúngico fungisona (0.3 µg/mL). Después de cinco semanas de cultivo celular, pudieron observar la formación de colonias clonogénicas, las cuales fueron positivas a los anticuerpos CD-44 y STRO-1. Además, estas células se diferenciaron hacia un fenotipo mineralizante. Según los

resultados concluyeron que a partir de pulpas dentales humanas es posible aislar células madre adultas con la capacidad de ser inducidas a tejido mineralizado⁴.

FERRO F *et al.* (2012) En este estudio tuvieron como finalidad aislar células madre de la pulpa dental y evaluar la proliferación, la morfología, la expresión de marcadores y el potencial de diferenciación osteoblástica, comparando los medios de cultivo. Un medio contenía suero humano, mientras que el otro medio contenía suero fetal bovino. Las pulpas dentales se obtuvieron de dientes deciduos humanos con exfoliación normal, de niños entre 5 a 9 años. Para un grupo se utilizaron medios de cultivo con diferentes porcentajes de suero humano 2,5%; 1,25%; 0,5%; 0,25% y así pudieron definir la concentración más adecuada. En el otro grupo añadieron al medio suero fetal bovino al 10% y 25 mg de gentamicina. Las células madre de la pulpa dental cultivadas en el medio con suero humano mostraron más uniformidad en la expresión de marcadores de células madre, mayor proliferación y potencial osteoblástico, comparando con las células madre cultivadas en suero fetal bovino al 10%. Concluyeron que al utilizar un medio con un bajo porcentaje de suero humano hay menores riesgos patógenos, por lo tanto puede ser una alternativa en vez de utilizar suero fetal bovino en los medios⁵.

DERAKHSHANI A *et al.* (2015) Este estudio tuvo como propósito indagar si las células de la pulpa de dientes extraídos por motivo de enfermedad periodontal avanzada poseen propiedades de células madre mesenquimales. Realizaron las exodoncias a pacientes de edades entre 17 y 55 años y las piezas dentales se transportaron en solución PBS. Obtuvieron las pulpas dentales de 15 dientes sanos y 15 dientes con enfermedad periodontal avanzada. Para el medio de cultivo utilizaron Minimal Essential Medium (MEM) con 100 U/ mL de penicilina-G, 100 µg

/ml de estreptomina y 1 µg /mL de anfotripsina B y se incubaron a 37°C. Evaluaron la proliferación celular y los marcadores de células madre mesenquimales. En los resultados se obtuvieron células madre mesenquimales indiferenciadas en ambos grupos, por lo que concluyeron que es posible aislar células madre mesenquimales de la pulpa de dientes que presenten enfermedad periodontal⁶.

Antecedentes específicos

MARTÍN-PIEDRA M *et al.* (2014) En este estudio evaluaron la viabilidad celular a largo plazo de subcultivos de células madre de pulpa dental humana. Para el estudio obtuvieron pulpa dental de terceras molares, sin enfermedad periodontal, de pacientes jóvenes de un rango de edades entre 18 y 30 años. Después de la exodoncia, las piezas las colocaron en el medio de transporte que contenía DMEM al cual adicionaron 600 U/mL de penicilina, 0,6 mg/mL de estreptomina y 1,5 µg/mL de anfotericina B. Para el medio de cultivo utilizaron DMEM con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibiótico y antifúngico. Evaluaron viabilidad celular utilizando azul de tripán. En este estudio concluyeron que las células correspondientes a los pasajes de cultivo del 11 al 14 mostraron una adecuada función celular, proliferación y viabilidad⁷.

YILDIRIM S *et al.* (2016) Compararon los efectos de células madre mesenquimales de diferentes tipos de tejido dental. Para esto se aislaron células madre de dientes deciduos exfoliados, células madre de la pulpa dental y células madre de folículos dentales. Los dientes se obtuvieron de tres niños entre 8 y 15 años de edad y de tres adultos de 20 a 25 años. Los folículos sanos de terceras molares fueron

recolectados de 3 dientes sanos de pacientes entre 20 y 25 años. Los dientes y folículos fueron transportados en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), con la adición de penicilina – estreptomicina al 1%. Como resultados se obtuvieron que las células madre de folículos dentales tuvieron mayor capacidad de diferenciación en osteocitos, adipocitos y condrocitos comparando con los otros dos grupos. Además, las células madre de folículos dentales mostraron un mayor efecto inmunomodulador, por lo cual sugirieron que pueden ser utilizadas para tratar enfermedades autoinmunes, inflamatorias y alérgicas⁸.

CAMEJO M *et al.* (2013) El fin de este estudio fue establecer el cultivo de las células madre mesenquimales de la pulpa dental humana. Obtuvieron pulpa dental de terceras molares de pacientes entre 15 y 24 años de edad. Después de las exodoncias, las piezas dentales fueron transportadas en un medio de transporte constituido por medio F12 con doble dosis de antibióticos y antimicóticos, a 4°C. En el laboratorio realizaron el proceso de aislamiento celular y emplearon azul de tripán para evaluar viabilidad celular. El medio de cultivo consistió en DMEM-F12, suero fetal bovino al 15%, ácido ascórbico 2-fosfato, L-glutamina y adicionaron penicilina, estreptomicina y anfotericina B (antibiótico-antimicótico). Las células mesenquimales de la pulpa dental mostraron un óptimo crecimiento en el medio de cultivo. Concluyeron que debido a ciertas características como la capacidad de adherirse a las placas de cultivo, la morfología fusiforme, la formación de colonias altamente proliferativas y la expresión de marcadores de superficie, había presencia células madre mesenquimales en las poblaciones de células de la pulpa dental humana que aislaron⁹.

1.2. Bases Teóricas

2.1.1 Medio de transporte

Se emplea para recolectar, transportar y conservar la pieza dental. Con el medio de transporte se asegura la viabilidad del microorganismo o de las células, desde el momento de la extracción del diente hasta realizar su estudio en el laboratorio. Las características que debe tener un medio de transporte para preservar la viabilidad celular es tener un pH balanceado. Según estudios se ha demostrado que entre los rangos de 6,6 a 7,8 de pH hay viabilidad celular por mayor tiempo. Asimismo, la osmolalidad fisiológica, es ideal en el rango de 290 a 330 mOsm/ Kg. En su composición debe incluir nutrientes celulares y el líquido debe ser estéril^{10,11}.

2.1.2 Anfotericina B

La anfotericina B es antibiótico de tipo polieno y antifúngico derivado del *Streptomyces nodosu*¹². Este fármaco tiene una molécula que se compone por una porción hidrófila de varios carbonos hidroxilados, y otra porción hidrófoba con siete átomos de carbono unidos por dobles enlaces (poliénico) y una cadena lateral de micosamina¹³. Por su composición, este fármaco presenta un comportamiento anfótero, del cual deriva su nombre¹⁴. Puede actuar como un fungistático o fungicida dependiendo la sensibilidad del hongo y de la concentración que pueda alcanzar el fármaco¹³.

Mecanismo de acción

Se fija a los esteroides, con mayor afinidad a los ergosteroides de células fúngicas y bacterianas¹⁵. Debido a la fijación, la estructura de la membrana se altera, se forman poros compuestos de pequeños agregados de anfotericina B y esteroides.

Como resultado, se da una despolarización de la membrana y el aumento de permeabilidad que dependerán de ciertos factores como la dosis, forma de administración del fármaco y la fase de crecimiento celular. Este fármaco presenta un amplio espectro, actúa frente al *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Absidia spp*, *Mucor spp*, *Rhizopus spp*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix*, *Candida spp.* (por ejemplo, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*)^{13,16}.

2.1.3 Penicilina

La penicilina es un antibiótico betalactámico, descubierto en 1928 por Alexander Fleming. Se logró desarrollar como agente terapéutico diez años después de su descubrimiento, tres años más tarde se comienzan a realizar ensayos clínicos en pacientes con sepsis por *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Su estructura química está formada por un núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, conformado por una estructura β -lactámico-tiazolidínica anillada, unida a una cadena lateral variable¹⁷.

Mecanismo de acción

Inhibe diferentes pasos de la síntesis de peptidoglicano, que es una sustancia que le da forma, rigidez y estabilidad a la membrana celular de la mayoría de bacterias¹⁷. Actúa contra las bacterias Gram positivas, *Neisseria spp*, *Streptococcus* A, B, C viridans, neumococos, gonococos, enterococos, *Pasteurella multocida*, infecciones por meningococos, neumococos, anaerobios, fusoospiroquetales, estafilococos¹⁸.

2.1.4 Estreptomicina

La estreptomicina es uno de los antibióticos más antiguos, del tipo de los aminoglucósidos, derivado de *Streptomyces griseus*, tiene un espectro estrecho¹⁹.

Mecanismo de acción

Este fármaco afecta la integridad de la membrana plasmática y el metabolismo del RNA, su acción más importante es la inhibición de proteínas a nivel de la subunidad ribosómica 30s, actuando como bacteriostática o bactericida. Actúa contra los bacilos aerobios gramnegativos. Las especies sensibles a este fármaco son: *Mycobacterium tuberculosis*, *H. ducreyi*, *Brucella*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Nocardia granulomatosis*, algunas cepas de *E. coli*, *H. influenzae*, *V. cholerae*, *Shigella*, *Klebsiella*, enterococos y algunos cocos Gram positivas, siempre empleando concentraciones altas. Muchos microorganismos crean resistencia frente a este fármaco¹⁹.

2.1.5 La pulpa dental

La pulpa es un tejido conjuntivo laxo, tiene origen embriológico en la papila dental. Está compuesta por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica²⁰. También la conforman proteoglucanos y glucosaminoglucanos, con vascularización e inervación, además de elementos circulatorios de la linfa²¹. La pulpa está rodeada por dentina y se comunica con el ligamento periodontal a través del agujero apical, por donde salen vasos y nervios^{20, 21}.

En la pulpa se pueden diferenciar tres zonas de población celular:

Zona odontoblástica: zona más superficial de la pulpa. Se pueden encontrar odontoblastos quienes sintetizan los tipos de dentina.

Zona subodontoblástica u oligocelular de Weil: es la zona con poca cantidad de células. Se distinguen con facilidad en la zona coronaria de dientes recién erupcionados. En esta capa está el plexo nervioso de Raschkow, el plexo subodontoblástico y los fibroblastos subodontoblásticos. También hay células dendríticas de la pulpa.

Zona rica en células: en esta zona están las células madre de la pulpa y fibroblastos. La densidad celular es elevada.

Zona central de la pulpa: compuesta por tejido conectivo laxo con gran cantidad de vasos, nervios y diferentes tipos de células. Se pueden identificar fibroblastos, macrófagos y células ectomesenquimales^{21, 22}.

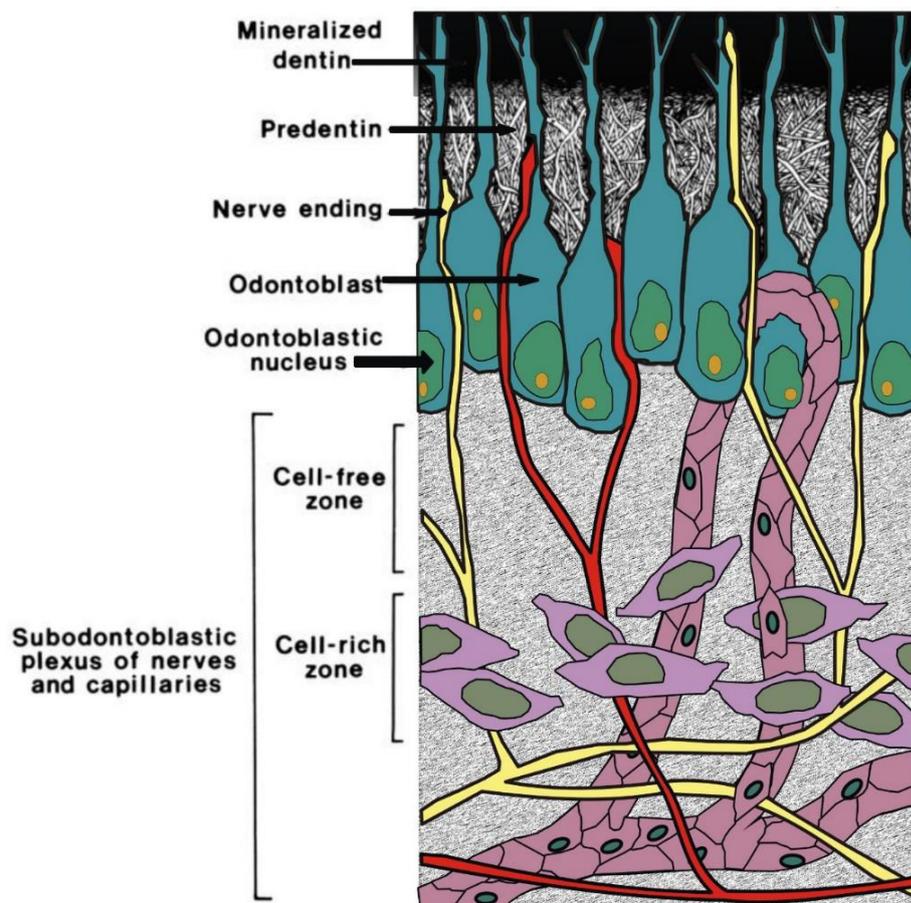


Figura 1. Zonas morfológicas de la pulpa dental

Pashley D, Walton R, Slavkin H. Histology and Physiology of the Dental Pulp. En: Ingle J. Endodontics. México. 2003: 33.

Células de la pulpa dental

Odontoblastos: son células primordiales de la pulpa dental, se encargan de formar una capa periférica, sintetizar matriz y controlar la mineralización de la dentina. Hay mayor número en la zona coronal y de forma cilíndrica; en la zona cervical y media de la raíz hay menor cantidad y presentan una forma aplanada. Los nuevos odontoblastos se originan de las células madre de la pulpa dental y participan en procesos reparativos de la dentina^{20, 23}.

Fibroblastos: Son de cantidad considerable en el tejido conectivo pulpar, su mayor concentración está en la pulpa coronal, formando la capa rica en células. Se encargan de sintetizar y mantener el colágeno y la sustancia básica de la pulpa, modifican la estructura pulpar en procesos patológicos. También forman, mantienen y regulan el recambio de la matriz extracelular^{20, 23, 24}.

Células ectomesenquimales o células madre de pulpa dental:

También llamadas mesenquimales indiferenciadas. Se originan del ectodermo y mesodermo. Se pueden diferenciar en odontoblastos o fibroblastos, dependiendo el estímulo que actúe en ellas. Están presentes en la zona subodontoblástica o cercanas a los capilares sanguíneos, razón por la que las llaman pericitos o células perivasculares^{20, 24, 25}.

La pulpa dental es una fuente rica en células pluripotenciales, con capacidad de diferenciarse en distintos tipos de células como los odontoblastos. Por su origen mesenquimal se pueden diferenciar en osteoblastos, condrocitos, adipocitos. Por su origen de la cresta neural (origen ectodérmico), tienen capacidades de neurogénesis²⁶; por eso son aptas para su uso en la ingeniería de tejidos. Igualmente tienen las ventajas de no ser rechazadas por el cuerpo y tener una

alta capacidad proliferativa lo que le permite cultivarse más rápido, por períodos más largos y tener una capacidad regenerativa superior²⁷.

La piezas dentales en las que se pueden encontrar mayor cantidad de células pluripotenciales son las piezas deciduas, las premolares que constantemente se extraen por motivos de tratamientos ortodónticos, terceras molares y dientes supernumerarios²⁷.

La pulpa dental comparando con otras fuentes de células madre mesenquimales como por ejemplo las de la médula ósea, es de fácil accesibilidad y el proceso poco invasivo para la obtención de las células. Además no presentan preocupaciones éticas ni controversias como las que existen con las células madre embrionarias²⁸.

Otras células del tejido pulpar:

Otros tipos celulares que se encuentran en la pulpa dental son: Células plasmáticas, linfocitos y en los procesos inflamatorios están presentes los eosinófilos y mastocitos²⁹.

2.1.6 Viabilidad Celular

La viabilidad celular es la cantidad de células sanas que se encuentran en una muestra. Para considerarlas viables, estas tienen que ser capaces de proliferarse, conservando su función y morfología. La viabilidad celular puede ser determinada por diferentes métodos^{30, 31}. Entre los métodos para determinar de la viabilidad y funcionalidad celular están la evaluación de la integridad de la membrana celular, ensayos funcionales, los biosensores de fluorescencia, estudios de morfología

celular, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X y técnicas de determinación de la expresión génica mediante microarrays³².

Métodos de evaluación de la integridad de la membrana celular

Con estos métodos se reconoce a una célula es viable por su membrana intacta, mientras que una célula apoptótica tendrá una membrana alterada, por eso habrán moléculas en el medio intracelular que no eran permitidas, o también puede ocurrir un rechazo de moléculas que eran previamente aceptadas en la célula. Entre los diferentes test desarrollados para evaluar la integridad de la membrana plasmática están: los métodos basados en el empleo de colorantes o sustancias fluorescentes, los métodos basados en tinciones catiónicas, los métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas en el medio extracelular ³².

Los métodos basados en la utilización de colorantes orgánicos son los más utilizados. Dentro de estos métodos podemos mencionar a los ensayos de inclusión y de exclusión. En los de ensayos de exclusión, las células vivas no se tiñen ya que excluyen al colorante debido a la resistencia de su membrana; mientras que la membrana de las células muertas está dañada y permite el ingreso del colorante, quedando teñidas³¹. Los resultados obtenidos se analizan con técnicas de microscopía, por citometría de flujo o con ELISA³³. Los colorantes que se emplean con mayor frecuencia son el azul tripán, la eosina, rojo Congo y la eritrosina, de los cuales el azul tripán es el más utilizado. Dentro de los ensayos de inclusión se utilizan la calceína o el diacetato de fluoresceína. Estas moléculas atraviesan la membrana plasmática, se hidrolizan por enterasas intracelulares y dan lugar a la fluorescencia en el interior de la célula; las células no dañadas son

capaces de retener fluorescencia, de esta manera se evalúa la integridad de la membrana celular³³.

El azul tripán fue introducido por Paul Enrich en 1904, para el tratamiento de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, por eso recibe el nombre de “azul tripán”. En 1967, este colorante fue utilizado por primera vez en oftalmología para teñir la córnea y conjuntiva, con fines diagnósticos ³⁴. Se le conoce con otras denominaciones como azul diamina, azul vital o azul Niágara. Es un colorante que tiñe tejidos y células muertas, empleado en estudios de viabilidad. También se utiliza contra la enfermedad de Chagas en América y la Leishmaniasis, ya que mata a los tripanosomas, causantes de estas enfermedades. Es uno de los colorantes más utilizados en los ensayos de exclusión, el cual va a teñir las células muertas, ya que no puede atravesar la membrana de las células vivas³⁵. Al microscopio óptico se distinguirán las células muertas teñidas de color azul y las vivas no estarán teñidas^{35, 36}. Se obtuvo el número total de células realizando el conteo celular en un hemocitómetro con un microscopio óptico, utilizando la siguiente fórmula³⁶.

$$\text{N}^\circ \text{ células} / \text{Vol. Solución} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas} \times \text{factor de dilución} \times 10000}{\text{N}^\circ \text{ de cuadrantes contados}}$$

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células vivas} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ total de células}}$$

2.1.7 Obtención, recepción y transporte de la muestra

Al obtener una muestra, existe riesgo de contaminación por la presencia de bacterias, hongos, virus, entre otros microorganismos. Por eso es importante considerar la protección de la muestra obtenida ³⁷.

2.1.7.1 Medidas de bioseguridad durante la obtención y procesamiento de la muestra.

Para la obtención de muestras se recomienda utilizar frascos descartables de plástico. Deben estar rotulados con los datos del paciente como el nombre completo o algún código. Al obtener las muestras, se deben sellar herméticamente los recipientes. Es importante conservar las muestras a una temperatura adecuada para evitar la pérdida del agente a estudiar ³⁷.

2.1.7.2 Transporte de la muestra

El transporte es el traslado de una muestra desde un hospital o clínica hacia un laboratorio y viceversa. En el transporte, se considera a la muestra como una sustancia infecciosa, ya que se sabe que contienen patógenos como hongos, virus, bacterias, parásitos, rickettsias y priones ³⁷.

Las sustancias infecciosas las dividen en dos categorías:

- ✓ Categoría A: cuando hay exposición y contacto físico de esta sustancia, puede provocar incapacidad permanente o enfermedad fatal en humanos y animales. Según las Naciones Unidas, cuando esta sustancia infecciosa afecta solo a humanos o a humanos y animales, como por ejemplo el *Mycobacterium tuberculosis* o Hepatitis B, se le asigna el código UN 2814. Si solo afecta a animales, como el *Mycoplasma mycoides*, se coloca el código UN 2900.

- ✓ Categoría B: es la sustancia cuyas características no la incluyen en la categoría B. El código que se utiliza para este tipo de sustancias es UN 3373, además el nombre que debe llevar la muestra es “Sustancia Biológica, Categoría B”. El número UN 3245 es para organismos modificados genéticamente. Si el contenido de los desechos clínicos y médicos, derivados de tratamientos médicos realizados en animales o en humanos o para la bioinvestigación son de categoría B, el número que se les asigna es UN 3291 ³⁷.

2.1.7.3 Proceso de transporte

El proceso de transporte de la muestra comprende la selección del embalaje, elegir el empaque adecuado, rotularlo adecuadamente y realizar la documentación, bajo responsabilidad del remitente. El contenedor debe estar identificado con la señal de peligro biológico ³⁷.

2.1.7.4 Instrucciones de embalaje

De acuerdo con las normas de las Naciones Unidas, las muestras de categoría A, solo se pueden transportar bajo las instrucciones de embalaje P620. Para el transporte de las muestras de categoría B, los recipientes deben cumplir con los requerimientos de embalaje P650 ³⁷.

Recipiente primario: este recipiente contiene la muestra. Su material puede ser de vidrio o plástico impermeable y debe estar correctamente etiquetado. Debe tener un cierre hermético para impedir las fugas, de preferencia con tapones

de rosca o de corcho sujetado con alambre, cinta adhesiva u otro material seguro. Este recipiente se debe envolver en un material absorbente como toallas de papel, con la finalidad de absorber el líquido en caso ocurra algún derrame ³⁷.

Recipiente secundario: este recipiente debe ser resistente e impermeable, protegerá al recipiente primario. La parte exterior del recipiente secundario debe estar rotulada con información de la muestra ³⁷.

Envoltura exterior: protege al recipiente secundario de elementos externos durante el transporte. Si la muestra es perecedera se debe incluir en una caja térmica o de teknopor, esta debe estar rotulada adecuadamente con advertencias, por ejemplo indicar un rango de congelación que puede ser entre 2 °C a 4 °C ³⁷.

2.1.8 Selección del paciente

Edad

Para la selección de la muestra, estudios anteriores han considerado un promedio de rango de edad entre 19 y 30 años. También hay investigaciones en las cuales han utilizado dientes de pacientes menores de 19 años obteniendo excelentes resultados, debido a que las características que presentan son similares a las muestras del rango de edad ya mencionado. Además, en otros estudios los resultados demostraron que existe una alteración mínima en las células madre

mesenquimales de la pulpa de dientes de pacientes con una edad mayor a los 30 años, por lo que también se considera de gran utilidad los dientes de pacientes de mayor edad³⁸⁻⁴⁰.

1.3. Definición de Términos Básicos

Medios de transporte: Sustancia utilizada para transportar la muestra biológica, evitando la multiplicación de microorganismos y asegurando la viabilidad celular, desde el momento de la toma de muestra hasta su posterior estudio en el laboratorio.

MEM: al inglés significa Minimum Essential Medium, es uno de los medios de cultivo celular artificiales más utilizados.

Anfotericina B: macrólido con un amplio espectro antifúngico.

PE-ST: Penicilina – estreptomicina, solución conformada por 10000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL, es utilizada en cultivos celulares para evitar la contaminación bacteriana.

Penicilina: La penicilina G es el antibiótico betalactámico que inhibe la síntesis de peptidoglicano. Actúa contra las bacterias Gram positivas (estreptococos y estafilococos) y Gram negativas (como gonococos y meningococos).

Estreptomicina: La estreptomicina es un antibiótico del tipo de los aminoglucósidos, actúa inhibiendo la síntesis proteica a nivel de la subunidad

ribosómica 30s. Tiene actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, principalmente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Células de la pulpa dental: se pueden distinguir los siguientes tipos celulares, inmersos en una matriz extracelular (sustancia fundamental y fibras): odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y células mesenquimales indiferenciadas.

Viabilidad celular: porcentaje de células vivas de la pulpa dental, capaces de proliferarse conservando su morfología.

Ensayos de exclusión: consiste en que las células vivas no se tiñen, pues la resistencia de su membrana excluye al azul de tripán; pero las células muertas que tienen la membrana dañada, permite el ingreso del colorante y quedan teñidas.

Edad: en este estudio, el rango de edad de los pacientes fue de 18 a 29 años. Sin embargo, según otros estudios, la pulpa dental de dientes de pacientes mayores a 30 años, también son de gran utilidad.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de Hipótesis

2.1.1. Hipótesis general

El medio de transporte con la adición de anfotericina B permite obtener una mayor viabilidad de las células de la pulpa dental.

2.1.2. Hipótesis específicas

- ✓ H_0 : La viabilidad celular obtenida de la pulpa de dientes extraídos, es menor adicionando anfotericina B en el medio de transporte conteniendo penicilina y estreptomina.
- ✓ H_a : La viabilidad celular obtenida de la pulpa de dientes extraídos, es mayor adicionando anfotericina B en el medio de transporte conteniendo penicilina y estreptomina.

2.2. Variables y Definición Operacional

VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	CATEGORÍA O VALOR	TIPO	ESCALA
Independiente: Medio de transporte de la pieza dental con y sin la adición de anfotericina B.	Medio de transporte con penicilina y estreptomycinina.	Presencia Ausencia	Sin anfotericina B	Cualitativa	nominal
	Medio de transporte con penicilina y estreptomycinina y anfotericina B.	Presencia Ausencia	Con anfotericina B		
Dependiente: Viabilidad de las células de la pulpa dental.	Resultado expresado en porcentaje (%).	Proporción de número de células con membrana citoplasmática intacta de color claro en relación a todas las células, utilizando el método de exclusión con la tinción con azul tripán.	0 – 100%	Cuantitativa	razón
	Células viables		0 - 5x10 ⁶ células	Cuantitativa	
Intervinientes: Edad	Edad cronológica	Número de años cumplidos	18-29 años	Cuantitativa	razón

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Diseño Metodológico

Este estudio tuvo un diseño metodológico de tipo: analítico, experimental, prospectivo y transversal.

Analítico: se compararon dos grupos:

Grupo 1: penicilina + estreptomina

Grupo 2: penicilina + estreptomina+ anfotericina B

Experimental: se manipuló la condición del medio de transporte con y sin la adición de la anfotericina B y se llevó a cabo *in vitro*.

Prospectivo: se obtuvo la pulpa dental en un tiempo máximo de 24 horas después de la exodoncia, procesándose inmediatamente al llegar al laboratorio. Al término de este proceso, se obtuvieron los datos de viabilidad celular.

Transversal: se obtuvo la pulpa dental de la pieza extraída y se recogieron los datos en un determinado momento.

El diseño es experimental solo de post test con grupo control. Esquema del diseño.

GRUPO	ASIGNACIÓN	PRE-TEST	MANIPULACIÓN	POST-TEST	
1	R	-----			O
2	R	-----	X		O

Donde:

R – designación aleatoria, X – Intervención o manipulación, O – Observación-evaluación.

3.2. Diseño muestral

Población

Las células de la pulpa dental se obtuvieron de premolares y terceras molares, de pacientes adultos jóvenes entre 18 a 29 años de edad, extraídas quirúrgicamente por indicación profesional, en el Centro Quirúrgico del Centro Odontológico de la Universidad de San Martín de Porres, durante el periodo mayo-octubre 2017.

Muestra

En el estudio se utilizaron pulpas dentales de 33 piezas dentales en total, divididas en dos grupos, considerando como dato de viabilidad del autor Martín-Piedra⁷.

Grupo 1: 16

Grupo 2: 17

Cálculo del tamaño de muestra para comparar dos grupos con variable cuantitativa

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 * (S_1^2 + S_2^2)}{(X_1 - X_2)^2}$$

Alfa (Máximo error tipo I)	$\alpha =$	0.050
1- $\alpha/2$ = Nivel de Confianza a dos colas	1- $\alpha/2 =$	0.975
$Z_{1-\alpha/2}$ = Valor tipificado	$Z_{1-\alpha/2} =$	1.960
Beta (Máximo error tipo II)	$\beta =$	0.200
1- β = Poder estadístico	1- $\beta =$	0.800
$Z_{1-\beta}$ = Valor tipificado	$Z_{1-\beta} =$	0.842
Varianza del grupo 1	$s_1^2 =$	49.0
Varianza del grupo 2	$s_2^2 =$	529.0
Diferencia propuesta	d =	17.0

Tamaño de cada grupo	n =	15.70
----------------------	-----	--------------

S_1^2 varianza en la muestra 1 = $7^2 = 49$

S_2^1 varianza en la muestra 2 = $23^2 = 529$

d diferencia esperada que distingue las muestras = 17 (93-76)

Criterios de Inclusión

- Pacientes entre 18 y 29 años de edad.
- Piezas dentales sanas.
- Premolares y terceras molares.
- Piezas dentales extraídas por indicación profesional.

Criterios de exclusión

- Paciente con enfermedad sistémica no controlada
- Pieza dental con fractura producida durante la exodoncia u odontosección de la misma.

3.3. Técnicas de recolección de datos

Recolección de datos

Los datos se registraron en un cuaderno de experimentos, donde se anotaron los datos de conteo celular por cada grupo.

Procedimientos

El tejido pulpar se obtuvo de las terceras molares y premolares totalmente desarrolladas y sanas, que fueron extraídas quirúrgicamente por indicación ortodóntica en pacientes jóvenes sin enfermedades sistémicas. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con las directrices dictadas por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres.

Primero se realizaron las exodoncias e inmediatamente las piezas dentales fueron almacenadas y transportadas según el “Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos del Ministerio de Salud”³⁷. El grupo 1 estuvo

conformado por piezas dentales que se transportaron en frascos estériles individualmente con el medio de transporte al cual se le agregó penicilina y estreptomicina. El grupo 2 consistió en piezas dentales transportadas en frascos estériles individualmente con el medio de transporte, al cual se le adicionó penicilina, estreptomicina y anfotericina B. Las piezas se mantuvieron a 4-8°C, en un cooler con geles de hielo, hasta llegar al laboratorio. Luego, dentro de la cabina de flujo laminar, se retiró la pieza dental con una gasa embebida en alcohol al 70%⁴¹ y se colocó en un tubo con el MEM más PE-ST al 0,5% durante 20 minutos. Posteriormente se realizó la extracción del tejido pulpar con el método de fractura mecánica utilizando un martillo, cubriendo previamente el diente con una gasa estéril. En seguida, se colocó la pieza fracturada en una placa Petri con MEM más PE-ST y se extrajo con pinzas estériles la mayor cantidad posible de pulpa cameral, la cual se trituró. La pulpa triturada fue recogida en un tubo con MEM con el fin de obtener una suspensión celular. A continuación se centrifugó a 1100 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular o *pellet* con MEM. Luego se tomó un volumen de 10 µl de la suspensión y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de exclusión con el colorante de azul de tripán. Se realizó el conteo celular con el hemocitómetro y el microscopio óptico compuesto. Las células vivas se observaron transparentes y las células muertas estaban teñidas de azul. Por último se obtuvo el valor de porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células / Vol. Solución} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas} \times \text{factor de dilución} \times 10000}{\text{N}^\circ \text{ de cuadrantes contados}}$$

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células vivas} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ total de células}}$$

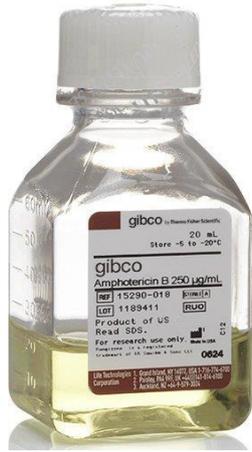


Figura 2. Anfotericina B



Figura 3. Penicilina - estreptomicina

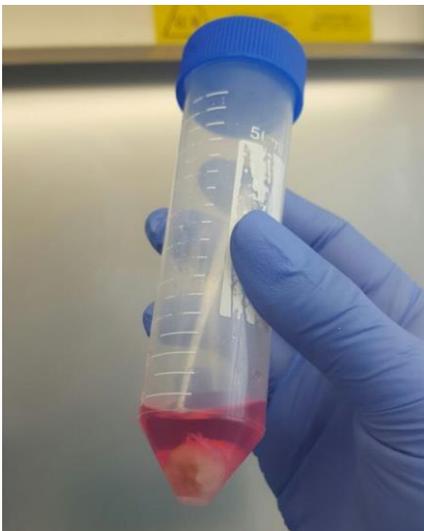


Figura 4. Pieza dental en MEM + 0,5 % PE-ST

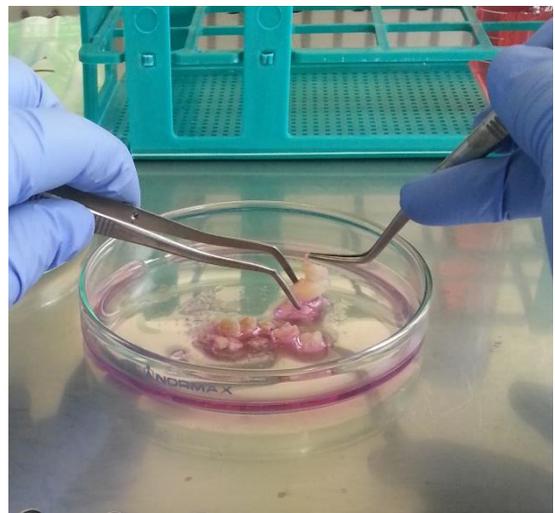


Figura 5. Obtención de la pulpa según el método fractura

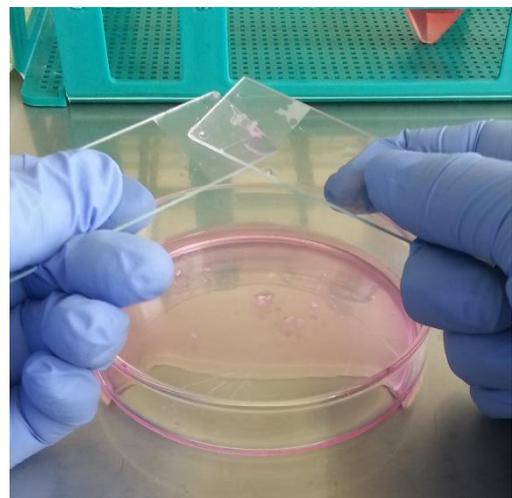
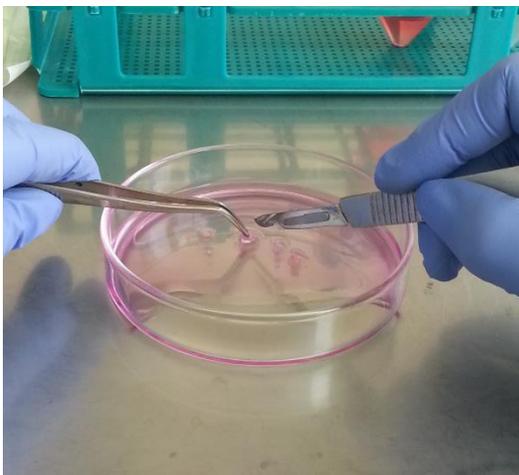


Figura 6 y 7. Corte y trituración de la pulpa

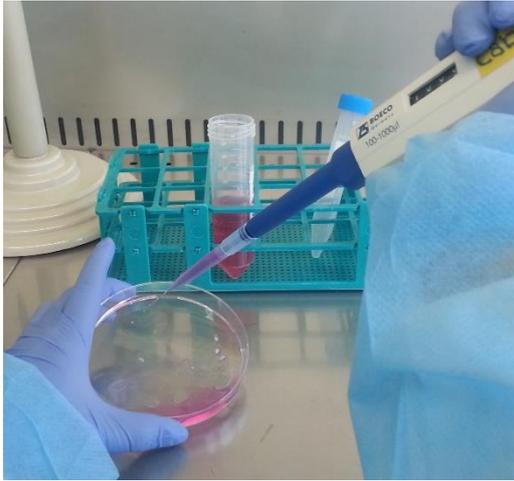


Figura 8. Pipeteo de la suspensión celular

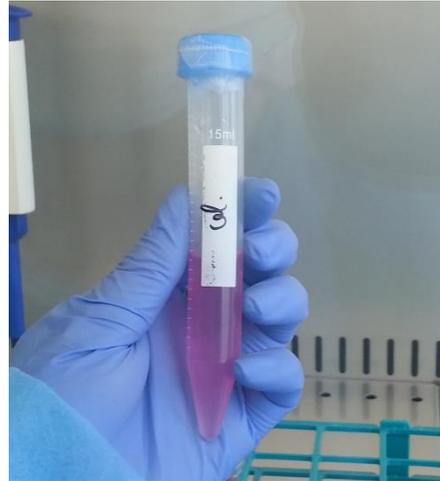


Figura 9. Recolección de la suspensión celular



Figura 10. Centrifugación

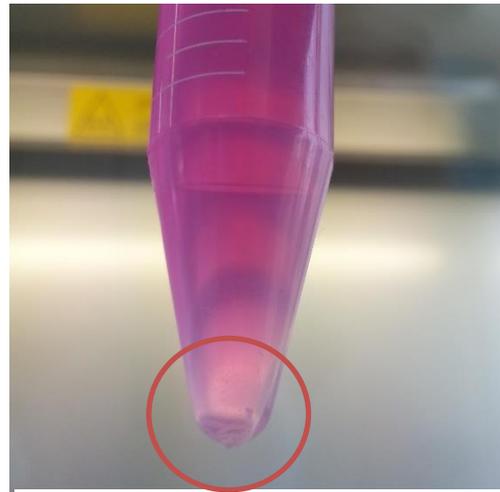


Figura 11. Pellet



Figura 12. Hemocitómetro



Figura 13. Hemocitómetro en el microscopio óptico

3.4. Técnicas Estadísticas para el Procesamiento de la Información

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS, en su versión 21. Se elaboró una base de datos y se obtuvieron las medidas descriptivas de resumen.

Se tomó un intervalo de confianza al 95% ($P = 0,05$) para aceptar que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos. Se usó la prueba T de Student para comparar dos medias de datos paramétricos. Para los datos que no cumplían con la condición mencionada, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Además se emplearon la prueba estadística de chi cuadrado y las de correlación de Pearson y la de Spearman.

3.5. Aspectos Éticos

Las premolares y terceras molares extraídas se obtuvieron de los pacientes atendidos en el Centro Quirúrgico del Centro Odontológico de la Universidad de San Martín de Porres. Previo consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres (Ver ANEXO 3).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

En esta investigación se utilizaron 33 pulpas de piezas dentales, entre terceras molares y premolares. Los pacientes fueron jóvenes, de un rango de edad entre 18 y 29 años. Las características de edad, sexo, tipo de pieza y tiempo transcurrido para el procesamiento de las dos muestras son similares, no existen diferencias significativas entre ellas ($P>0,05$) (tabla 1).

Tabla 1. Descripción de la muestra

Característica	Grupo con medio de transporte sin anfotericina B	Grupo con medio de transporte con anfotericina B	Valor de <i>P</i>
Edad	21,56±3,09	23,12±3,99	0,223 ^a
Sexo	Masculino 7 (43,8%) Femenino 9 (56,3%)	Masculino 4 (23,5%) Femenino 13 (76,5%)	0,218 ^b
Tipo de pieza	tercera molar 16 (100%)	tercera molar 15 (88,24%) premolar 2 (11,76%)	-----
Tiempo transcurrido para procesamiento	12,06±9,55	12,08 ±9,06	0,929 ^c

^a t de Student ^b Chi Cuadrado ^c U de Mann Whitney

Se compararon dos medios de transporte con la finalidad de determinar el medio más eficiente para obtener células viables de la pulpa dental. Para el conteo celular al microscopio se empleó el colorante azul de tripán, se diferenció las células vivas por tener forma redonda con un halo definido, mientras que las muertas estaban totalmente teñidas de azul. Los resultados de viabilidad celular se hallaron con la ayuda de las fórmulas ya mencionadas.

Al comparar ambos grupos, se pudo observar que tanto el número de células como el porcentaje de viabilidad celular, es mayor en el grupo 2. Dicho resultado fue estadísticamente significativo (tabla 2).

Tabla 2. Número de células y viabilidad celular comparando ambos grupos de medio de transporte.

Parámetro de comparación	Medio de transporte sin anfotericina B				Medio de transporte con anfotericina B				U de Mann Whitney
	Media	D.S.	IC 95%	N	Media	D.S.	IC 95 %	n	
Número de células totales	2127656,25	819516,86	Límite inferior 1690966,54 Límite superior 2564345,96	16	2731147,06	967062,66	Límite inferior 2233929,32 Límite superior 3228364,79	17	z= -2,23 P=0,026*
Viabilidad celular %	58,88	5,98	Límite inferior 55,69 Límite superior 62,068		67,79	4,02	Límite inferior 65,73 Límite superior 69,87		z= -3,78 P=0,0001*

*Existe diferencia estadísticamente significativa a $P < 0,05$

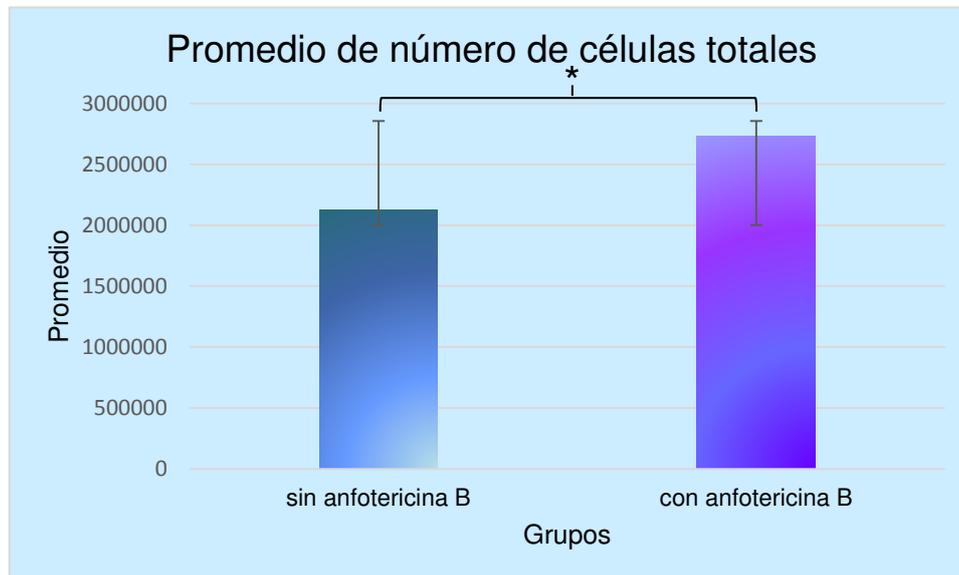


Figura 14. Comparación del número de células totales obtenidas de ambos grupos.

*Existe diferencia estadísticamente significativa a $P < 0,05$

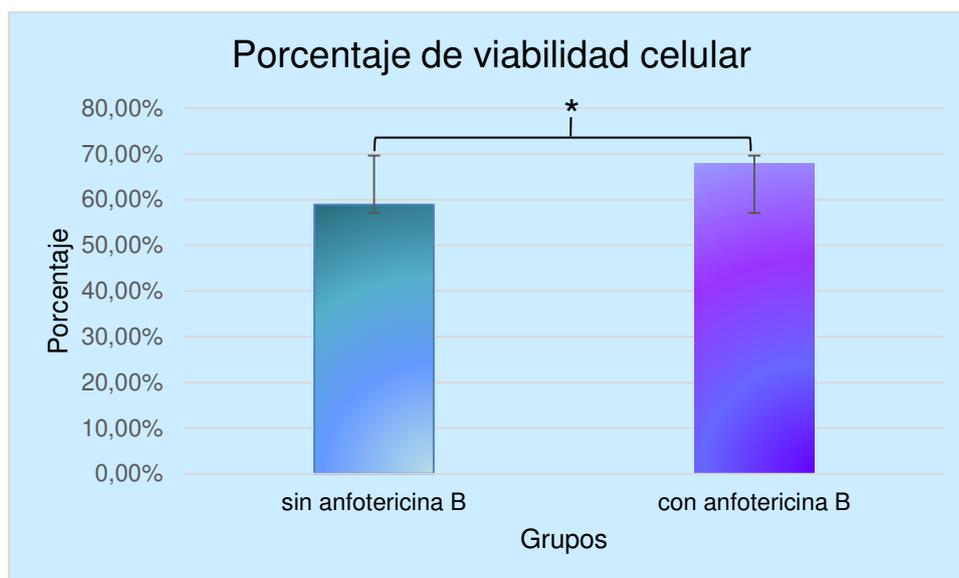


Figura 15. Comparación del porcentaje de viabilidad celular obtenidos de ambos grupos.

*Existe diferencia estadísticamente significativa a $P < 0,05$

En el grupo 1, en el género femenino, se observó ligeramente mayor número de células y mejor porcentaje de viabilidad celular comparado al género masculino ($P = 0,711$ y $0,266$ respectivamente), sin embargo dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (tabla 3).

Tabla 3. Número de células y viabilidad celular de según sexo en el grupo de medio de transporte sin anfotericina B.

Parámetro de comparación	Sexo								U de Mann Whitney
	Masculino			N	Femenino			n	
	Media	D.S.	IC 95%		Media	D.S.	IC 95 %		
Número de células totales	1 972 142,86	460 415,18	Límite inferior 1 546 329,83 Límite superior 2 397 955,88	2 248 611,11	1 030 853,04	Límite inferior 1 456 227,32 Límite superior 3 040 994,90	7	9	$z=-0,370$ $P=0,711$
Viabilidad celular %	56,32	6,84	Límite inferior 49,99 Límite superior 62,64	60,88	4,65	Límite inferior 57,30 Límite superior 64,45			$z=-1,111$ $P=0,266$

En el grupo 2, el número de células promedio fue ligeramente superior en la pulpa de las personas del sexo masculino. Mientras que la viabilidad celular fue muy similar entre varones y mujeres. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el número de células y tampoco en la viabilidad celular ($P = 0,174$ y $0,651$ respectivamente) entre el sexo masculino y femenino en el grupo con anfotericina B (Tabla 4).

Tabla 4. Número de células y viabilidad celular según sexo en el grupo de medio de transporte con anfotericina B.

Parámetro de comparación	Sexo								U de Mann Whitney
	Masculino				Femenino				
	Media	D.S.	IC 95%	n	Media	D.S.	IC 95 %	n	
Número de células totales	3 068 750,00	553 509,64	Límite inferior 2 187 992,65 Límite superior 3 949 507,35	4	2 627 269,23	1 058 617,94	Límite inferior 1 987 552,81 Límite superior 3 266 985,65	13	$Z=-1,359$ $P=0,174$
Viabilidad celular %	68,59	3,55	Límite inferior 62,94 Límite superior 74,24	4	67,55	4,26	Límite inferior 64,98 Límite superior 70,13	13	$Z=-0,453$ $P=0,651$

Se observó correlación débil negativa entre la edad y número de células, no significativa estadísticamente en ambos grupos sin y con anfotericina B ($P = 0,445$ y $P = 0,320$ respectivamente). Por otro lado, se observó correlación moderada positiva entre edad y viabilidad celular, sin embargo no hubo diferencia significativa en ambos grupos ($P = 0,064$ y $P = 0,103$ respectivamente) (tabla 5).

Respecto a la correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia y el número de células hubo correlación negativa fuerte estadísticamente significativa en ambos grupos, sin y con anfotericina B ($P = 0,001$ y $P = 0,034$ respectivamente). La correlación entre el tiempo transcurrido y la viabilidad

celular también fue negativa de magnitud casi moderada pero no significativa estadísticamente en ambos grupos ($P = 0,055$ y $P = 0,233$) (tabla 5).

Tabla 5. Correlación de la edad y el tiempo transcurrido desde la exodoncia con el número de células y la viabilidad celular.

	Edad			
	Medio de transporte sin anfotericina B		Medio de transporte con anfotericina B	
	Correlación	Valor de P	Correlación	Valor de P
Número de células totales	-0,205 ^a	0,445	-0,257 ^a	0,320
Viabilidad celular %	0,473 ^a	0,064	0,409 ^a	0,103
	Tiempo transcurrido desde la exodoncia			
	Medio de transporte sin anfotericina B		Medio de transporte con anfotericina B	
	Correlación	Valor de P	Correlación	Valor de P
Número de células totales	-0,534 ^b	0,034*	-0,735 ^b	0,001*
Viabilidad celular %	-0,489 ^b	0,055	-0,306 ^b	0,233

a. Correlación de Pearson b. Correlación de Spearman

*Existe diferencia estadísticamente significativa a $P < 0,05$

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

En investigaciones anteriores se han utilizado diferentes medios de transporte y fármacos en distintas concentraciones con el fin de mantener el medio lo menos contaminado posible. Algunos emplean solo antibióticos como penicilina, estreptomicina, gentamicina; otros agregan también antifúngicos como la anfotericina B⁴⁻⁹. Yildirim *et al.* utilizaron un medio de transporte de DPBS con los antibióticos PE-ST al 1%⁸. Camejo *et al.* añadieron 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 4 µg/mL de anfotericina B al medio de transporte para mejorar las condiciones de asepsia⁹.

En los resultados obtuvimos mayor cantidad de células en el grupo al cual se le adicionó anfotericina B, en comparación con el grupo que tuvo solo los antibióticos PE-ST. El número promedio de células del grupo 2 fue de $2,73 \times 10^6$, comparado al grupo 1 que presentó un promedio de $2,13 \times 10^6$. Se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney, y se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa. Con eso concluimos que al agregar la anfotericina B al medio de transporte, se obtendrán mayor cantidad de células de la pulpa dental. No se ha podido comparar el número promedio de células que se obtuvieron en este estudio con investigaciones anteriores ya que no mencionan el dato. Sin embargo, Camejo *et al.* lograron obtener la cantidad de células madre de la pulpa dental necesarias para poder realizar cultivos exitosamente⁹.

Con respecto al porcentaje de viabilidad, los resultados en el grupo que se transportó en medio con PE-ST más anfotericina B fue de 67,79%, en contraste al grupo transportado en medio con solo PE-ST que fue de 58,88%. A la prueba de U de Mann Whitney, se obtuvo una diferencia significativa, lo que indica que se

obtiene un porcentaje de viabilidad mayor al agregar el antifúngico en el medio de transporte. Esto es debido a que, incluyendo ambos fármacos (PE-ST+anfotericina B) existe un mayor espectro de actividad antibacteriana. En el estudio de Martín-Piedra *et al.* transportaron las piezas dentales en un medio conformado por DMEM con PE-ST y anfotericina B, llegando a obtener un porcentaje de viabilidad >75% ⁷. El resultado fue mayor al de este estudio, la razón podría ser porque utilizaron DMEM en su medio de transporte, mientras que en esta investigación se utilizó solución de cloruro de sodio al 9%.

En este estudio, se utilizó la pulpa dental de molares y premolares extraídas en pacientes entre 18 y 29 años. Para hallar la correlación entre el número total de células con respecto a la edad del donante, se aplicó la prueba de correlación de Pearson. El resultado tuvo una tendencia de correlación negativa, es decir, que a mayor edad del donante, hay una ligera disminución del número de células de la pulpa dental. Sin embargo el resultado fue estadísticamente no significativo. En el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la edad la correlación fue positiva y el resultado fue estadísticamente no significativo. El resultado puede deberse a que se utilizó un rango de edad corto. Para poder corroborar los datos, el tamaño de la muestra debería ser mayor al que se obtuvo en este estudio y con un rango de edad más amplio. Según investigaciones anteriores que han considerado pacientes con diferentes rangos de edades, han obtenido buenos resultados de viabilidad celular. Por ejemplo, en el estudio que realizaron Horibe *et al.*, utilizaron piezas dentales de pacientes de un grupo con un rango de edad de 19 a 30 años y otro grupo entre 40 y 70 años, observando que a mayor edad hay una ligera disminución en las características de viabilidad celular, aunque es muy similar a las características de viabilidad de los donantes jóvenes ³⁹. Otros autores como Bressan que consideró

donantes de 16 a 66 años y Kellner quien realizó un estudio con pacientes entre 12 y 30 años de edad, también llegaron a demostrar que existe una mínima alteración en las características de viabilidad de las células de la pulpa dental en relación a la edad del donante³⁸⁻⁴⁰. Con los resultados de este estudio y las referencias, se concluye que es posible considerar los dientes de pacientes de diferentes edades de gran utilidad para las investigaciones de células de la pulpa dental.

El tiempo que transcurrió desde el momento de la exodoncia de la pieza dental hasta la obtención de la pulpa dental en el laboratorio, fue en un intervalo de 2 a 24 horas. Según los resultados, con respecto al tiempo transcurrido, se obtuvo que hay una correlación negativa entre el tiempo y el número total de células, es decir que mientras más tiempo pase, la cantidad de células irá disminuyendo. Con respecto al tiempo transcurrido y el porcentaje de viabilidad celular, también existe una correlación negativa, pero con un resultado estadísticamente no significativo. En forma similar, estos hallazgos fueron observados por Perry *et al.*, sin embargo ellos pudieron obtener células viables hasta 120 horas después de la extracción del diente ⁴².

Los resultados de la relación entre el número de células y la viabilidad celular según el sexo del donante, fueron estadísticamente no significativos. No se encontraron estudios con el número total y viabilidad de células de la pulpa dental según la relación mencionada. Sin embargo existen antecedentes como los de Chu y Hill, quienes también obtuvieron datos estadísticamente no significativos de la relación del sexo del donante con el número y la viabilidad de células madre de la pulpa dental ^{43, 44}. No se pudieron hallar resultados con respecto a la correlación del

número total de células y la viabilidad celular según el tipo de pieza dental (molar o premolar), ya que solo hubo dos premolares utilizados en el grupo 2.

Este es el primer estudio realizado para comparar la viabilidad celular y el número total de células de la pulpa dental en relación con el medio de transporte con y sin la adición del antifúngico anfotericina B. Este estudio contribuye a la optimización de protocolos en el transporte de piezas dentales para el posterior aislamiento de células de la pulpa dental. Al utilizar anfotericina B en el medio de transporte, se obtiene un medio con menor contaminación para la muestra, pudiendo conservarla mejor hasta el momento de ser procesada en el laboratorio. Con este aporte se logrará obtener mayor cantidad de células viables de la pulpa dental, las cuales se pueden emplear para realizar cultivos celulares y otros trabajos de ingeniería tisular.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en este estudio, se concluyó que:

- Se obtuvo un mayor porcentaje de viabilidad celular en el grupo que se transportó en un medio más penicilina-estreptomicina y anfotericina B, con respecto al grupo transportado en medio con penicilina-estreptomicina.
- El número de población total celular que se obtuvo del grupo transportado en medio con penicilina-estreptomicina más anfotericina B fue mayor al grupo que se transportó en medio con penicilina-estreptomicina.
- Existe una correlación negativa entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia hasta el inicio de la extracción del tejido pulpar con el número de células de la pulpa dental.
- No existe una correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia hasta el inicio de la extracción del tejido pulpar con la viabilidad celular de la pulpa dental.
- No existe correlación entre el sexo del paciente con el número de células o con la viabilidad celular de la pulpa dental.
- No existe correlación entre la edad del paciente con el número de células o con la viabilidad celular de la pulpa dental.

RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos en esta investigación, es recomendable utilizar un medio de transporte al cual se le adicione anfotericina B. Esto ayudará en mejorar el protocolo, logrando obtener mayor cantidad de células y buenos resultados de viabilidad celular.

En próximas investigaciones, se sugiere utilizar más cantidad de premolares en cada grupo para así poder comparar datos de viabilidad con respecto al tipo de pieza dental.

También se recomienda tener un rango más amplio de edad de los pacientes para una mejor comparación de la viabilidad celular respecto a la edad.

Para lograr obtener mayor cantidad de células viables, se debería considerar un tiempo de 24 horas desde la extracción de la pieza dental hasta la obtención de la pulpa dental.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L, Ferrari A, Bruzzesi G, De Pol A. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Dev Biol.* 2015 Mar; 15(14): 2-16.
2. Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp.* 2012 Nov 24; (69): 43-72.
3. Flores X. Efecto comparativo del método de fractura mecánica y el método de corte en la viabilidad de las células de la pulpa dental humana. [Tesis para optar el título de cirujano dentista]. Lima: Facultad de Odontología, Universidad de San Martín de Porres; 2016.
4. Magallanes M, Carmona B, Álvarez M. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de la pulpa dental. *Rev Odont Mex.* 2010; 14(1): 15-20.
5. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F. Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. *PLoS One.* 2012; 7(11): 489-95.
6. Derakhshani A, Raof M, Dabiri S, Farsinejad AR, Gorjestani H, Yaghoobi MM, Shokouhinejad N, Ehsani M. Isolation and evaluation of dental pulp stem cells from teeth with advanced periodontal disease. *Arch Iran Med.* 2015 Apr; 18(4):211-7.

7. Martin-Piedra M, Garzon I, Oliveira A, Alfonso-Rodríguez C, Carriel V, Scionti G, Alaminos M. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cells cultures. *Cytotherapy*. 2014; 16(2): 266-77.
8. Yildirim S, Zibandeh N, Genc D, Ozcan EM, Goker K, Akkoc T. The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:4682875.
9. Camejo M, Merentes E, Márquez L, González O. Aislamiento y caracterización de las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana. *Acta Odontológica Venezolana*. 2013; 51(3).
10. Oyanguren S. Medios de almacenamiento para preservar dientes avulsionados. *Odontol Pediatr*. 2011; 10(1): 28-38.
11. Quintana C. Medios de almacenamiento y transporte para dientes avulsionados. *Odontol. Sanmarquina* 2007; 10(2): 24-28.
12. Rast DM, Bartnicki-Garcia S. Effects of amphotericin B, nystatin, and other polyene antibiotics on chitin synthase. *Proc Natl Acad Sci*. 1981; 78(2):1233-6
13. Catalán M, Montejo J. Antifúngicos sistémicos. *Farmacodinamia y farmacocinética*. *Iberoam Micol*. 2006; 23: 39-4.
14. Goodman L, Gilman A. *The pharmacological basis of therapeutics*. 8°Ed. U.S.A.: Mc Graw Hill; 1990. p.1165.
15. Serhan G, Stack CM, Perrone GG, Morton CO. The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by a distinct mechanism to amphibian-derived antimicrobial peptides. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014; 13 (18): 1-4.

16. De Mol P, Meis JF. Disseminated Rhizopus microsporus infection in a patient on oral corticosteroid treatment: a case report. *Neth J Med.* 2009; 67(1):25-8.
17. Lozano D, Larrondo H, Herrera M, Rivero E, Zamora R, Araujo L. Penicilinas. *Acta Médica.* 1998; 8(1):28-39.
18. Tripathi K. *Farmacología en Odontología. Fundamentos.* 1ºEd. Argentina: Médica Panamericana; 2008. p. 427-29.
19. Bailón M. *Uso de técnicas separativas miniaturizadas como alternativa a la determinación de antibióticos beta-lactámicos en fármacos, aguas y alimentos.* [Tesis doctoral]. Granada: Facultad de Ciencias, Universidad de Granada; 2009.
20. Gómez M, Campos A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental.* 3ºEd. México: Panamericana; 2009. p. 232-43.
21. Gartner L, Hiatt J. *Texto Atlas de Histología.* 3º Ed. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2010. p. 371.
22. Pashley D, Walton R, Slavkin H. *Histology and Physiology of the Dental Pulp.* En: Ingle J. *Endodontics.* México. 2003: 25-61.
23. Torabinejad M, Walton R. *Endodoncia Principios y Práctica.* 4º Ed. España: Elseiver; 2010. p. 7-12.
24. Rozas C. *Evaluación de la citotoxicidad de dos cementos ionómeros vítreos en un modelo experimental de fibroblastos gingivales humanos. Estudio estructural y microanalítico.* [Tesis doctoral]. Córdoba: Facultad de Odontología, Universidad de Córdoba; 2010.
25. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology.* 8º Ed. Canadá: Elseiver; 2013.p.183.
26. Martínez E. *Characterization of Dental Pulp Pluripotent-like Stem Cells (DPPSC) and their mesodermal differentiation potential.* [Tesis doctoral].

- Barcelona: Instituto de Investigación de Medicina Regenerativa, Universidad Internacional de Cataluña; 2017.
27. Quezada R. Citotoxicidad del aloe vera y el formocresol en las células mesenquimales de pulpa dental. [Tesis de maestría]. Nuevo León: Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León; 2014.
28. Sreenivas SD, Rao AS, Satyavani SS, Reddy BH, Vasudevan S. Where will the stem cells lead us? Prospects for dentistry in the 21 century. *J Indian Soc Periodontol.* 2011 Jul;15 (3):199-204.
29. Maldonado L. Respuesta histológica de la pulpa dental con formocresol 1:5 e hipoclorito de sodio al 5% en dientes pulpotomizados de *Oryctolagus cuniculus*. [Tesis para optar el título de cirujano dentista]. Lima: Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016.
30. Martín-Piedra M, Garzón I, Sánchez M, Alaminos M. Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana. *Actual. Med.* 2012;97 (786): 6-12.
31. Carrera L, Pirajan I, Urrea M, Gómez M, Monroy L, Sanchez R. Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con *Chlamydia trachomatis*. *NOVA.* 2015; 12 (21): 17-29.
32. Vico M. Evaluación de la viabilidad y caracterización genética de células endoteliales transdiferenciadas a partir de células madre de la gelatina de Wharton. [Tesis doctoral]. Granada: Facultad de Medicina, Universidad de Granada; 2009.
33. Martín-Piedra M. Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad

- para su uso en Ingeniería Tisular. [Tesis doctoral]. Granada: Facultad de Medicina, Universidad de Granada; 2014.
34. Brockmann T, Blanchard V, Heretsch P, Brockmann C, Bertelmann E. Photochemical degradation of trypan blue. *PLoS One*. 2018; 13(4): 1 - 15.
 35. Ramírez Rámiz, A. Estudio celular y molecular en cultivos de fibroblastos tratados con fármacos inductores de agrandamiento gingival. [Tesis doctoral]. Barcelona: Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona; 2007.
 36. Nunes B, Augusto L, Eurides D, Franco L, Binda L, Araújo C. Aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de médula ósea de conejos. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2011; 45 (1): 113-8.
 37. Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos (en línea) 2005 (acceso febrero 2017); (108 páginas). Disponible en:
http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/18.pdf
 38. Kellner M, Steindorff M, Stempel J, Winkel A, Kühnel M, Stiesch M. Differences of isolated dental stem cells dependent on donor age and consequences for autologous tooth replacement. *Arch Oral Biol*. 2014; 59(6): 559-67.
 39. Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, Takei Y, Kurita K, Nakashima M. Isolation of a Stable Subpopulation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells (MDPSCs) with High Proliferation, Migration, and Regeneration Potential Is Independent of Age. *PLoS One*. 2014; 9(5): 1-13.
 40. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D, Sivoletta S, Zavan B. Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. *PLoS One*. 2012; 7(11): 1-12.
 41. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández D, Barajas M, Carrasco M, Jung H, Hernández F, Casals N, Prosper F, Ferrés-Padró E, Giner L. Dental pulp

- of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J. Cell Sci.* 2012; 125 (14): 3343-56.
42. Perry B, Zhou D, Wu X, Yang F, Byers M, Chu G, Hockema J, Woods E, Scoot W. Collection, Cryopreservation, and Characterization of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Banking and Clinical Use. *Tissue Engineering Part C, Methods.* 2008; 14 (2): 149-56.
43. Chu R. Age and sex-related differences in dental pulp stem cells. [Tesis de maestría]. Iowa: Facultad de Ciencias Orales, Universidad de Iowa; 2013.
44. Hill H. Adult Permanent (Extracted) Teeth as a Source of Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells (DPSC): A Pilot Study. [Tesis de maestría]. Las Vegas: Escuela de Medicina Dental, Universidad de Nevada; 2013.

ANEXOS

ANEXO N°1: Matriz de consistencia

TÍTULO: MEDIO DE TRANSPORTE CON Y SIN LA ADICIÓN DE ANFOTERICINA B EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL				
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
General <ul style="list-style-type: none"> ¿Cuál es el efecto de la anfotericina B en la viabilidad de las células de la pulpa dental? 	General <ul style="list-style-type: none"> Determinar la viabilidad de las células de la pulpa dental en el medio de transporte con anfotericina B. 	General <ul style="list-style-type: none"> La viabilidad celular será mayor al adicionar anfotericina B en el medio de transporte en el proceso de obtención de células de la pulpa dental. 	Bases Teóricas Medios de transporte: Sustancia utilizada para transportar la muestra biológica, evitando la multiplicación de microorganismos y asegurando la viabilidad celular. Anfotericina B: macrólido con un amplio espectro antifúngico. Penicilina: La penicilina G es el antibiótico betalactámico que inhibe la síntesis de peptidoglicano. Actúa contra las bacterias Gram positivas (estreptococos y estafilococos) y Gram negativas (como gonococos y meningococos). Estreptomicina: antibiótico del tipo de los aminoglucósidos, actúa inhibiendo la síntesis proteica a nivel de la subunidad ribosómica 30s. Tiene actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, principalmente al <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Células de la pulpa dental: se pueden distinguir los siguientes tipos celulares, inmersos en una matriz extracelular (sustancia fundamental y fibras): odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y células madre mesenquimales indiferenciadas. Viabilidad celular: porcentaje de células vivas de la pulpa dental, capaces de proliferarse conservando su morfología. Ensayos de exclusión: consiste en que las células vivas no se tiñen, pues la resistencia de su membrana excluye al azul de tripán; pero las células muertas que tienen la membrana dañada, permite el ingreso del colorante y quedan teñidas.	Diseño Metodológico Experimental Diseño Muestral Muestreo Probabilístico Técnica de Recolección de Datos Observación VARIABLES Independiente: Medio de transporte de la pieza dental con y sin la adición de anfotericina B Dependiente: Viabilidad de las células de la pulpa dental. Intervinientes: Edad
	Específicos	Específicas		
	<ul style="list-style-type: none"> Determinar el porcentaje de viabilidad celular obtenida de la pulpa de dientes extraídos, adicionando en el medio de transporte penicilina, estreptomicina y anfotericina B. 	<ul style="list-style-type: none"> H0: La viabilidad celular obtenida de la pulpa de dientes extraídos, será menor adicionando anfotericina B en el medio de transporte conteniendo penicilina y estreptomicina. 		
	<ul style="list-style-type: none"> Determinar el porcentaje de viabilidad celular obtenida de la pulpa de dientes extraídos, adicionando en el medio de transporte penicilina y estreptomicina. 	<ul style="list-style-type: none"> Ha: La viabilidad celular obtenida de la pulpa de dientes extraídos, será mayor adicionando anfotericina B en el medio de transporte conteniendo penicilina y estreptomicina. 		
	<ul style="list-style-type: none"> Contrastar la viabilidad celular de ambos medios de transporte de células de la pulpa dental. 			

ANEXO N°3: Consentimiento informado

Institución: Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres

Proyecto: Medio de transporte con y sin la adición de anfotericina B en la viabilidad de las células de la pulpa dental

Responsable del Proyecto: Angela Graciela Gavidia Pacheco

Por medio del presente documento hago constar que acepto voluntariamente mi participación en el estudio titulado **“Medio de transporte con y sin la adición de anfotericina B en la viabilidad de las células de la pulpa dental”** a cargo de la investigadora principal Angela Graciela Gavidia Pacheco, bachiller de la Universidad San Martín de Porres. Se me ha explicado clara y suficientemente el propósito del estudio el cual es obtener células de los dientes. Comprendo que el procedimiento consistirá en utilizar el tejido de la pulpa del diente extraído y analizarlo en el microscopio para investigaciones futuras.

Se me ha explicado y he comprendido con claridad que los procedimientos pueden representar algún tipo de riesgo para mí o molestia y además puede haber posibilidad de eventos inesperados durante el estudio a pesar que se realizarán usando instrumentales estériles, material desechable y por personal calificado. También existe la posibilidad de NO alivio o empeoramiento de los síntomas de la patología en estudio.

Se me ha aclarado que mi participación en el estudio no me ocasionará ningún tipo de gasto.

Que sobre la información proporcionada se tomará medidas para proteger la confidencialidad y sólo con fines estadísticos - científicos, que en ningún caso se publicará mi identidad. Sé también con claridad que el examen o procedimiento de recolección de mi diente que se realizará será de beneficio para mí, ya que será agregado a mi historia clínica sin costo.

Para cualquier consulta o reclamo lo hará a los investigadores: Angela Graciela Gavidia Pacheco, teléfono 991982369 y Dra. Esperanza Raquel Ayón Haro, con dirección Av. Las Calandrias 151, 291 - Santa Anita, Lima, teléfono 3620064 Anexo 3391 y al Presidente del Comité de ética en Investigación de la FO-USMP, con dirección Av. San Luis 1267-Teléfono 3464762 – anexo 138.

Firmo este documento habiendo sido antes informado que puedo retirarme del estudio en cualquier momento sin que ello acarree sanción o pérdida de los beneficios del cuidado por el profesional investigador.


Apellidos y nombres:

DNI: Firma:

Apellidos y nombres del testigo:

DNI:....., Firma:

Lima,.....de.....de 2017



Huella digital

CONSTANCIA

EL SECRETARIO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN MARTIN DE PORRES

HACE CONSTAR:

Que, la Bach. Angela Graciela Gavidia Pacheco ha realizado la recolección de muestras en el Centro Quirúrgico del Centro Odontológico de la USMP en el periodo del 24 mayo hasta el 11 octubre del presente año.

Estas piezas dentales, han sido procesadas en el Laboratorio de Investigación a cargo de la Dra. Esperanza Ayón Haro y serán utilizadas en el desarrollo de su tesis titulada "Medio de transporte con y sin la adición de anfotericina B en la viabilidad de las células de la pulpa dental" para optar el título profesional de Cirujano Dentista.

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente a los dieciocho días de octubre de dos mil diecisiete.



USMP
UNIVERSIDAD DE
SAN MARTÍN DE PORRES

FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

San Luis, 06 de octubre de 2017

CARTA N° 094-2017-INVE-FO-USMP

Señorita

ÁNGELA GRACIELA GAVIDIA PACHECO

Bachiller En Odontología

Presente.-

Es grato dirigirme a usted para saludarla cordialmente y a la vez informarle que su proyecto de investigación titulado: “MEDIO DE TRANSPORTE CON Y SIN LA ADICIÓN DE ANFOTERICINA B EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL”, ha sido aprobado por el Comité Revisor de Investigación ACTA N°009-2017 (06/04/2017) y por el Comité de Ética en Investigación ACTA N°001-2017 (16/05/2017).

Es lo que se le informa para los fines que estime conveniente.

Sea propicia la ocasión para expresarle mi deferencia y consideración.

Atentamente;

Dr. RAFAEL MORALES VADILLO
Director del Instituto de Investigación
Facultad de Odontología - USMP

Dr. JUVENAL ARÍSTIDES SÁNCHEZ LIHÓN
Presidente del Comité de Ética en Investigación
Facultad de Odontología - USMP