



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO COMPARATIVO DEL MÉTODO DE FRACTURA
MECÁNICA Y EL MÉTODO DE CORTE EN LA VIABILIDAD
DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL HUMANA**

PRESENTADO POR

XIOMARA ANGÉLICA FLORES CÓNDOR

ASESORA:

ESPERANZA RAQUEL AYON HARO

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

LIMA – PERÚ

2016



**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

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO COMPARATIVO DEL MÉTODO DE FRACTURA MECÁNICA
Y EL MÉTODO DE CORTE EN LA VIABILIDAD
DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL HUMANA**

TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER:

XIOMARA ANGÉLICA FLORES CÓNDOR

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

LIMA – PERÚ

2016

**EFFECTO COMPARATIVO DEL MÉTODO DE FRACTURA MECÁNICA
Y EL MÉTODO DE CORTE EN LA VIABILIDAD
DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL HUMANA**

Asesora: C.D. Dra. Esperanza Raquel Ayon Haro

Jurado de Tesis:

- Dr. Hans Morgenstern Orezzaoli, Presidente
- Dra. María Chu Morales, Vocal
- Dra. Esperanza Raquel Ayon Haro, Vocal

Agradecimientos

A Dios y a mis padres, quienes me lo han dado todo, gracias por su incondicional apoyo siempre.

Agradezco profundamente a mi asesora, la Dra. Esperanza Raquel Ayón Haro que ha hecho parte fundamental de mi formación académica, brindándome sus conocimientos y apoyo permanente durante este proceso.

Al doctor Rafael Morales por su asesoría durante la estadística de la tesis, y a todas las personas que de una u otra manera me apoyaron durante este periodo.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
• PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
• OBJETIVOS	9
• ANTECEDENTES	10
• HIPÓTESIS Y VARIABLES	11
• MARCO TEÓRICO	12
HIPÓTESIS Y VARIABLES	25
MATERIAL Y MÉTODO	26
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46
ANEXOS	51

RESUMEN

Los avances científicos en la creación de biomateriales de restauración, tecnología de cultivo celular, ingeniería de tejidos y biología molecular emplean en sus estudios células de la pulpa dental. Principalmente se realizan investigaciones en células madre mesenquimales de la pulpa dental. Los métodos de extracción de la pulpa dental empleados en la literatura son diversos. Pero aún no está claro qué método es el más conveniente. Por ello, el propósito de este estudio fue optimizar el protocolo de extracción de células de la pulpa dental humana, al determinar el método más eficaz para la viabilidad celular. En la presente investigación se comparó el método de fractura mecánica (grupo 1) y el método de corte (grupo 2). Para ello se extrajo el tejido pulpar de dientes completamente desarrollados y sanos de 32 pacientes entre 18 a 40 años. Para determinar la viabilidad celular, se usó el colorante azul de tripán. Posteriormente en el microscopio se contaron las células teñidas de azul (muertas) y las células birrefringentes (vivas). Al análisis estadístico se observaron evidencias suficientes para concluir que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados ($p = 0,006$). Por lo tanto la presente investigación concluye que al emplear el método de fractura mecánica para la extracción del tejido pulpar, se logra obtener porcentajes de viabilidad celular más altos en comparación al método de corte.

ABSTRACT

Scientific advances in the creation of restorative biomaterials, *in vitro* cell culture technology, tissue engineering and molecular biology use dental pulp cells. Mainly investigations are conducted in dental pulp stem cells (DPSCs). The extraction methods of dental pulp used in the literature are different. However, it is not clear yet which method is the most convenient. Therefore, the purpose of this study was to optimize the extraction protocol of human dental pulp cells, to determine the most effective method for cell viability. In this research, the methods of fracture mechanics (group 1) and cutting (group 2) were compared. Dental pulp tissue was removed of fully developed and healthy teeth of 32 patients between 18 to 40 years. To determine the cell viability, trypan blue dye was used. The cells were counted in the microscope, blue stained cells (dead) and birefringent (living). Statistical analysis showed significant differences between the groups ($p = 0.006$). This investigation concludes that the use of fracture mechanics method for the extraction of the dental pulp tissue allows to obtain higher percentages of cell viability compared to cutting method.

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la última década, las investigaciones en odontología se han concentrado en el uso de células para el desarrollo de nuevos materiales biológicos a partir de la introducción de métodos de cultivo celular y cultivo de tejidos (1). En este contexto, la pulpa dental ha surgido como una valiosa fuente de células, entre las que encontramos: odontoblastos, fibroblastos, fibrocitos, células madre mesenquimales, macrófagos, células dendríticas y linfocitos (2). Este tejido tiene la ventaja de presentar un fácil acceso debido a que se consigue después de una extracción dentaria, con baja morbilidad y es altamente eficiente; asimismo sus células presentan interacción con algunos biomateriales (3). Por ello, se han realizado estudios de viabilidad en fibroblastos y células madre de la pulpa dental para evaluar la citotoxicidad de materiales dentales, tales como resinas compuestas, cementos de endodoncia y productos odontológicos a base de plantas (4-8). Además, se ha demostrado que las células madre de la pulpa dental se diferencian en neuronas, cardiomiocitos, condrocitos, osteoblastos, células del hígado y células beta de los islotes del páncreas (9). De este modo, las células madre derivadas de la pulpa dental son una fuente prometedora de células trasplantables en medicina regenerativa para el tratamiento de varias enfermedades humanas, incluyendo problemas dentales (10). Por todo lo descrito, las células madre de la pulpa dental son potencialmente útiles en el campo de la endodoncia, periodoncia (secuelas de enfermedad periodontal), cirugía maxilofacial (deformidades esqueléticas), y para complementar la terapia de implantes dentales, entre otros (11, 12).

En estudios previos de aislamiento y cultivo celular de la pulpa dental, se han realizado dos métodos para obtener el tejido pulpar después de la extracción dental; como son: el método de fractura mecánica, en el que se utiliza un martillo pequeño para quebrar el diente mediante un golpe (2) y el método de corte, que se realiza a nivel de la línea amelo cementaria, mediante el uso de un micromotor con un disco diamantado dental (13,14). Posterior a la exposición de la pulpa dental se realiza la extracción de este tejido con pinzas delgadas, en ambos casos.

Los estudios de viabilidad celular constituyen un importante control de calidad, especialmente en aquellas poblaciones celulares con un alto potencial para su utilización en ingeniería tisular. El primer paso para el uso de células de la pulpa dental, es seleccionar el método más indicado para su obtención. Asimismo, es necesario optimizar los protocolos de cultivo, aumentar la eficiencia y seguridad

de las células de la pulpa dental (10). Es importante mencionar que en nuestro país hay pocas investigaciones que utilicen células de la pulpa dental. Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue contrastar el efecto de los métodos de extracción pulpar, el método de fractura mecánica y el método de corte, en la viabilidad de las células de la pulpa dental de dientes extraídos de pacientes adultos atendidos en la Clínica Especializada en Odontología de la Universidad de San Martín de Porres desde marzo a agosto del año 2016.

Los resultados de esta investigación ayudan a optimizar el protocolo de aislamiento de células de la pulpa dental. Ya que gracias a la ejecución de este estudio de viabilidad, se ha logrado seleccionar el método de fractura mecánica como el más eficiente para obtener un mayor porcentaje de células vivas de la pulpa dental, en comparación al método de corte. En consecuencia este método podrá ser aplicado en estudios posteriores que utilicen fibroblastos de la pulpa dental para desarrollar pesquisas de citotoxicidad en fármacos y en biomateriales. Así como también en investigaciones de ingeniería tisular, que empleen células madre de la pulpa dental

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

Objetivo General

- Determinar qué método de extracción de la pulpa dental es más eficiente, el método de corte o el método de fractura mecánica, en la viabilidad de la población total celular de la pulpa dental.

Objetivos Específicos

- Determinar si existe correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia con la viabilidad celular de la pulpa dental.
- Determinar si existe correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia con el número total de células de la pulpa dental.
- Determinar si existe correlación entre la viabilidad celular y el número total de células de la pulpa dental.

- Determinar si existe correlación entre la viabilidad celular y el número total de células según el tipo de pieza.
- Determinar si existe correlación entre la viabilidad celular y el número total de células según la edad.
- Comparar el número total células obtenidas por ambos métodos de extracción de células de la pulpa dental.
- Contrastar la viabilidad celular obtenida por ambos métodos de extracción de células de la pulpa dental.

ANTECEDENTES

Suchanek et al (2007). El objetivo de este estudio fue establecer protocolos de aislamiento y cultivo de células madre de la pulpa dental (DPSCs) ya sea de dientes permanentes o de dientes exfoliados, y comparar estas células con cultivos de células mesenquimales progenitoras. Las células madre mesenquimales progenitoras (MPCs) fueron aisladas de la médula ósea humana del fémur. Los dos tipos de células fueron cultivadas bajo las mismas condiciones en un medio con 2 % of FCS suplementado con los factores de crecimiento PDGF and EGF. Se cultivó más de 60 duplicaciones de población en medios de cultivo diseñados células madre mesenquimales de médula ósea. Después de alcanzar el límite de Hayflick, todavía tenían cariotipo normal. En comparación con las MPCs de la médula ósea, las DPSCs compartieron características biológicas similares y propiedades de las células madre. Los resultados de sus experimentos probaron que las DPSCs y las MPCs son altamente proliferativas, células clonogénicas que pueden ser expandidas más allá del límite de Hayflick y permanecer citogenéticamente estables. Debido a su alto potencial de proliferación y diferenciación, las DPSC pueden convertirse en una fuente más atractiva y fácilmente accesible de células madre adultas con fines terapéuticos (15).

Syed-Picard F et al. (2014). En este estudio, se diseñaron andamios auto-ensamblados con tejidos (3D) a partir de células de la pulpa dental y se evaluaron como un dispositivo para la regeneración de la pulpa. Estos tejidos de ingeniería se colocan en el conducto radicular de diente humano, el cual se tapó en un extremo con cemento de fosfato de calcio, luego todo el sistema se implantó por vía subcutánea en ratones. Para la obtención del tejido pulpar se

utilizó la técnica de fractura mecánica con un martillo pequeño, la tinción histológica indicó que después de tres y cinco meses de las implantaciones, las raíces de los dientes que contienen tejidos de ingeniería en andamios mantuvieron un tejido celular, mientras que las raíces de los dientes sin el andamio permanecieron predominantemente vacías. La inmunotinción indicó que el tejido que se encuentra en los canales de la raíz que contienen tejidos con andamios, contenía células de odontoblastos similares organizados lo largo de la longitud de la pared de la raíz. Este estudio muestra que andamios auto ensamblados con tejidos 3D de ingeniería a partir de células de la pulpa dental, pueden regenerar un tejido de pulpa dental vital en un sistema de conductos radiculares y, por tanto, son prometedores para el tratamiento de endodoncia (2).

Karamzadeh R et al. (2012). En este estudio se separó el tejido pulpar humano a partir de los terceros molares, mediante el uso un disco diamantado se cortó el diente a nivel de la línea amelocementaria, luego se extrajo el tejido pulpar con pinzas delgadas. Se utilizó dos protocolos existentes para el aislamiento de células madre de la pulpa dental, es *decir* la disociación enzimática del tejido pulpar (CEDIP-ED) y la derivación de explantes de tejido (DPSC- OG). Luego, estas células se caracterizaron en linaje conjuntivo, asociándose a marcadores hematopoyéticos (CD73, CD90, CD105 y CD44), / marcadores endoteliales (CD34, CD45 y CD11b), marcador perivascular, como CD146 y también STRO-1. Después, estos dos protocolos se compararon en base a la potencia de diferenciación en odontoblastos por lo tanto se utilizaron la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (QPCR) y rojo de alizarina tinción para la evaluación de la expresión de los genes relacionados con la mineralización. Sus resultados indicaron mayor capacidad de mineralización en el protocolo de disociación enzimática. Sin embargo, estudios adicionales, tales como la evaluación de la formación de la estructura tubular *in vivo* e *in vitro*, se requieren para determinar cuál de estos dos procedimientos es aplicable para las terapias de regeneración de tejidos de dentina y pulpa funcionales. (16).

HIPÓTESIS

- Hi: el método de fractura es más eficiente en la viabilidad celular de la pulpa dental.
- Ho: el método de fractura no es más eficiente en la viabilidad celular de la pulpa dental

MARCO TEÓRICO

LA PULPA DENTAL

Los dientes tienen su origen en las capas primitivas blastodérmicas, el ectodermo y el mesodermo. La capa ectodérmica dará lugar al esmalte, mientras que las células mesenquimales darán lugar a los tejidos mesodérmicos: dentina, pulpa y cemento (16,17).

La pulpa es un tejido conjuntivo laxo situado dentro de una capa rígida de dentina mineralizada. Es sensible a los estímulos térmicos y conserva su capacidad para formar dentina a lo largo de toda la vida. La pulpa está compuesta por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica. Alberga elementos como: nervios, vasos sanguíneos, fibras colágenas y reticulares, sustancia fundamental, odontoblastos, fibroblastos, células inmunocompetentes, entre otras. Es la forma madura de la papila dentaria y el único tejido blando del diente.

Las células mesenquimales periféricas de la pulpa dental se diferencian hacia odontoblastos, el resto se diferencian hacia fibroblastos. Muchas de las células mesenquimales permanecen indiferenciadas, de esta manera conservan su potencial de diferenciación.

La pulpa presenta un sistema microcirculatorio de arteriolas y vénulas. Depende de las pocas arteriolas que entran a través de los orificios radiculares, su sistema vascular disminuye con la edad (16,17).

Zonas Histológicas De La Pulpa Dental

De acuerdo a la disposición de sus componentes, se pueden diferenciar 4 zonas morfológicas en la pulpa dental:

Zona odontoblástica

Es el estrato celular más externo de la pulpa, se localiza bajo la predentina. Se compone de los cuerpos celulares de los odontoblastos dispuestos en empalizada. Debajo de los odontoblastos se encuentran las células de Höhl, que son preodontoblastos. También se encuentran los componentes fibrilares de Von Korff, que intervienen en la formación de la matriz dentinaria. La forma de los odontoblastos en la porción coronal de la pulpa joven es de forma cilíndrica alta, en la porción media de la pulpa radicular son células cúbicas, cerca del orificio apical las células son planas (16, 17).

Zona subodontoblástica u oligocelular de Weil

Esta zona es pobre en células y rica en colágeno. Se encuentra bajo la capa odontoblástica. Es una zona estrecha que puede no aparecer en pulpas jóvenes en donde la dentina se genera con rapidez o en las pulpas viejas en donde se genera dentina reparadora. Está formada por: capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y finas prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos. Asimismo a este nivel se encuentran las células dendríticas de la pulpa y está ocupada parcialmente por el plexo de Rashkow. Este plexo se caracteriza por la presencia de numerosos filetes nerviosos que ingresan a la pulpa por el foramen apical. Algunos filetes nerviosos pueden pasar a través de los odontoblastos y terminar en la predentina o dentina.

Zona rica en células

Está localizada debajo de la zona subodontoblástica y se caracteriza por su alta densidad celular. Destacan las células ectomesenquimales o células madre de la pulpa y tiene una proporción elevada de fibroblastos que originan las fibras de Von Korff. Esta zona es más prominente en la pulpa coronal que radicular y contiene: fibroblastos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos.

Zona central

La pulpa propiamente dicha, está formada por tejido conectivo laxo, además contiene vasos sanguíneos y nervios mayores. Su población celular está representada principalmente por fibroblastos, células ectomesenquimales, células dendríticas y macrófagos de localización perivascular (16).

Poblaciones Celulares De La Pulpa Dental

Odontoblastos:

Son las células específicas del tejido pulpar, sus cuerpos celulares están situados en periferia pulpar, debajo de la predentina y sus prolongaciones se alojan en los túbulos de la dentina. Los odontoblastos sintetizan los componentes de la predentina (colágeno, glicoproteínas) y son responsables por su mineralización.

El odontoblasto maduro es una célula altamente diferenciada que ha perdido la capacidad de dividirse, el cuerpo de este mide aproximadamente de 50 a 60 μm de largo y la extensión promedio de su prolongación citoplasmática en el interior del túbulo dentinario, puede oscilar de 0,2 a 0,7 mm (17). Los nuevos odontoblastos que se originan en los procesos reparativos de la dentina, lo

hacen a expensas de las células madre de la pulpa dental (16). Según Morales *et al.* en el 2014, la media del número total de odontoblastos en el tejido pulpar fue de $0,409 \times 10^5 / \text{mm}^3$ (18).

Fibroblastos:

Son las células principales y más abundantes del tejido pulpar, forman la capa rica en células. Los fibroblastos secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares, elásticas y la sustancia fundamental de la pulpa. Según Wang *et al.* en el año 2008 el tamaño de los fibroblastos humanos varía de 15 a 35 μm (19).

Los fibroblastos tienen por función formar, mantener y regular el recambio de la matriz extracelular. Son células multifuncionales, pues tienen también la capacidad de degradar el colágeno como respuesta ante distintos estímulos fisiológicos del medio interno. Se piensa también que estas células pueden tener la capacidad de originar nuevos odontoblastos en la periferia de la pulpa. (1, 16).

En los procesos de reparación o inflamación del tejido conectivo suele variar la morfología del fibroblasto, así como el número de células. Es decir, que los fibrocitos pueden desdiferenciarse y volver a ser fibroblastos ante distintos estímulos (16).

Células ectomesenquimales o células madre de pulpa dental:

Son células inmaduras, indiferenciadas que pueden autoreplicarse y constituyen una población celular de reserva pulpar por su capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o en fibroblastos. Otros estudios también han demostrado que estas células tienen capacidad de diferenciación osteogénica, condrogénica, neurogénica y miogénica, según el estímulo que actúe sobre ellas (15, 16). Según Atari *et al.* en el año 2012 el diámetro de las células mesenquimales de la pulpa varía de 6 a 20 μm (20). Generalmente se ubican en la región subodontoblástica o en la proximidad de los capilares sanguíneos. La pulpa dental es una fuente rica de células pluripotenciales, adecuadas para la ingeniería de tejidos, ya que tienen la ventaja de no ser rechazadas por el cuerpo, mayor capacidad proliferativa que otras células, lo que le permite cultivarse más rápidamente, por períodos más largos y mayor capacidad regenerativa. Pueden llegar a regenerar hueso, cemento, dentina, ligamento periodontal y pulpa dental (21).

Se utiliza la pulpa dental de los dientes deciduos, los premolares que casi siempre son extraídos para fines de tratamiento ortodóntico, los terceros molares y dientes supernumerarios (22, 23).

Una de las ventajas en comparación con las células madre de la médula ósea, es que la obtención no es invasiva. Su obtención no requiere una intervención quirúrgica adicional y pueden obtenerse en varios momentos de la vida. Lo más importante es que estas células no son obtenidas de embriones humanos por lo que no presentan los habituales problemas éticos a los que se enfrentan este tipo de investigaciones (24).

Macrófagos:

Estas células tienen su origen en los monocitos. Pertenecen al sistema fagocítico mononuclear, tienen capacidad de fagocitosis y participan en el mecanismo de defensa. Según Krombach *et al.* el diámetro de los macrófagos en promedio es de 21 μm (25). Su función consiste en digerir microorganismos, remover bacterias y eliminar células muertas. Además de su actividad fagocítica, participan en la función inmunológica (al fagocitar partículas extrañas y presentarlas a los linfocitos). A nivel del tejido pulpar el macrófago estimulado juega un papel clave en la respuesta inflamatoria e inmune durante la pulpitis (16).

Células Dendríticas:

Se acumulan en la región perivascular en la zona central de la pulpa y en la región odontoblástica. Estas células se caracterizan por expresar moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (16). Según Szakal *et al.* en promedio el tamaño de estas células es de 15-20 μm de largo y 0.1-0.3 μm de diámetro (26). La función de las células dendríticas de la pulpa consiste en participar en el proceso de iniciación de la respuesta inmunológica primaria. Las células capturan los antígenos, los procesan y luego migran hacia los ganglios linfáticos regionales a través de los vasos linfáticos. Una vez allí las células maduran transformándose en potentes células presentadoras de antígenos que posteriormente exponen a las células linfoides tipo T (16).

Otras células del tejido pulpar:

Al examinar los componentes de la pulpa, se pueden identificar otros tipos celulares como: linfocitos, células plasmáticas y, en ocasiones eosinófilos y mastocitos. La existencia de estas células es muy evidente en los procesos inflamatorios (16).

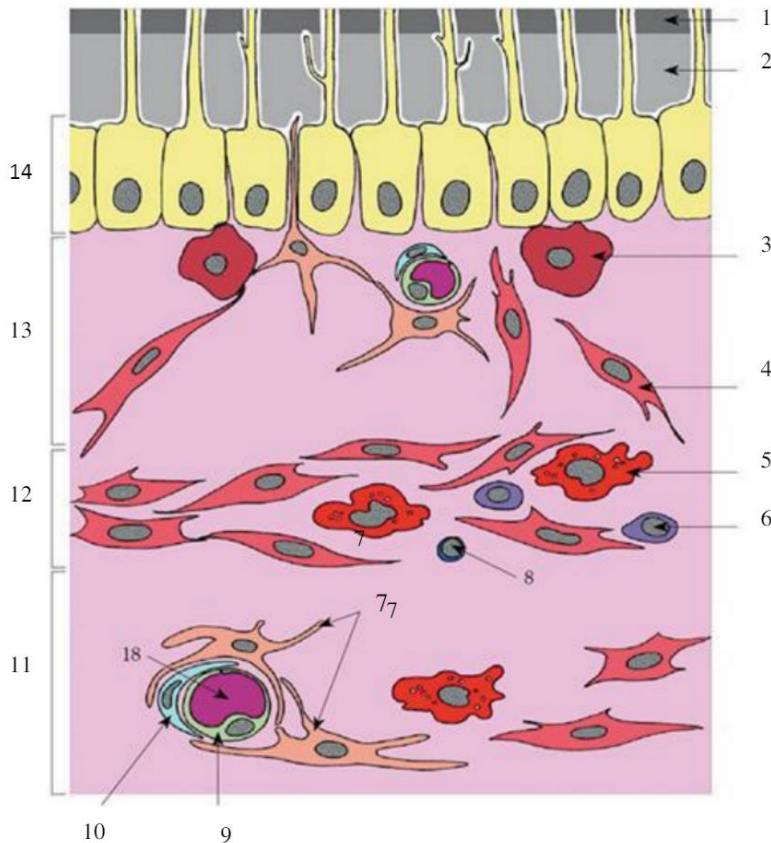


Figura 1. Poblaciones celulares de la pulpa dental

1. Dentina 2. Predentina 3. Célula subodontoblástica 4. Fibroblasto 5. Macrófago
6. Células mesenquimáticas 7. Célula dendrítica 8. Linfocito 9. Célula endotelial
10. Pericito 11. Zona central de la pulpa 12. Zona rica en células 13. Zona oligocelular
14. Zona odontoblástica 18. Capilar

Fuente: Gómez M, Campos A. Histología y embriología bucodental. 3ªEd. México: Panamericana; 2009. p. 225.

Fibras

Fibras colágenas:

El colágeno tipo I constituye en un 60 % de las fibras de colágeno. La distribución y proporción de las fibras colágenas difiere según la región. En la pulpa coronaria son escasas y dispuestas en forma irregular. En la zona radicular adquieren una disposición paralela y están en una mayor concentración. La densidad y el diámetro de las fibras aumentan con la edad (16).

Fibras reticulares:

Las fibrillas de colágeno tipo III asociadas a fibronectina forman las fibras reticulares. Las fibras reticulares son fibras muy finas que se distribuyen de forma abundante en la papila dental. Estas fibras se disponen al azar en el tejido pulpar y constituyen el plexo de Von Korff a nivel de la región odontoblástica. Las fibras reticulares pueden aumentar de diámetro con la edad, pero están en una menor proporción que las fibras colágenas (16).

Fibras elásticas:

Las fibras elásticas son muy escasas y se localizan únicamente en las paredes de los vasos sanguíneos. Su principal componente es la elastina (16).

Fibras de oxitalán:

En la pulpa dental en desarrollo se han identificado fibrillas onduladas de oxitalán. Se les considera como fibras elásticas inmaduras (16).

Sustancia fundamental

La sustancia fundamental, está constituida principalmente por proteoglicanos y agua. El ácido hialurónico, dermatan sulfato y condroitin sulfato son los más importantes glicosaminoglicanos en la pulpa dental. El ácido hialurónico le confiere viscosidad y cohesión, por lo que el tejido conectivo es gelatinoso. Además, este proteoglicano es el encargado de mantener la fluidez, regular el transporte de metabolitos e impedir la difusión de microorganismos. La sustancia fundamental se comporta como un verdadero medio interno, a través del cual las células reciben los nutrientes provenientes de la sangre arterial; asimismo elimina los productos de desechos hacia la circulación (16).

Funciones De La Pulpa Dental

La microvasculatura pulpar tiene un rol importante en la nutrición y oxigenación, transporte de desechos metabólicos y regulación de la inflamación (16).

Inductora

El mecanismo inductor del complejo dentino-pulpar se da durante la amelogénesis, ya que se deposita dentina para que se produzca la síntesis y el depósito del esmalte (16).

Formativa

La función principal de la pulpa es formar dentina. Esta capacidad se mantiene mientras la pulpa dental sea vital. La elaboración de la dentina está a cargo de los odontoblastos, y según el momento en que ésta se produce, existen distintos tipos de dentina: primaria, secundaria y terciaria o reparativa. Esta última se elabora en respuesta a distintos estímulos, por ejemplo: biológicos (caries), físicos (calor, presión), o químicos (sustancias nocivas provenientes de algunos materiales dentales) (16).

Nutritiva

La pulpa nutre la dentina a través de las células odontoblásticas y los vasos sanguíneos subyacentes, los nutrientes viajan hacia la dentina a través de túbulos creados por los odontoblastos (16).

Sensitiva

La pulpa, mediante los nervios sensitivos, responde, ante los diferentes estímulos o agresiones con dolor dentinal o pulpar. Las fibras nerviosas de la pulpa dental, son terminaciones del trigémino y entran al conducto radicular a través del foramen apical. Al alcanzar la pulpa cameral las fibras del nervio se comienzan a dividir y a enviar ramas hacia la dentina. Existen 2 vías de conducción nerviosa en la pulpa, la vía representada por las fibras A de conducción rápida y la vía compuesta por las fibras C de conducción lenta. Las fibras A producen dolor lancinante, rápido, agudo, mientras que las fibras C provocan un dolor sordo, lento y apagado (16).

Defensiva o reparadora

Después de una injuria, el tejido pulpar tiene una gran capacidad reparativa. Las dos líneas de defensa de la pulpa dental son: 1) formación de dentina peritubular, con estrechamiento de los conductos, para impedir la penetración de microorganismos hacia la pulpa. 2) formación de dentina terciaria, reparativa o de irritación. Esta dentina es elaborada por los nuevos odontoblastos que se originan de las células madre de la pulpa (16). Durante la degradación de la dentina, citoquinas y factores de crecimiento se liberan. Estas citoquinas juegan un papel clave en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación de nuevas células secretoras de dentina (18). Además, las moléculas de señalización, incluyendo el factor derivado de células estromales (SDF-1 α), factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF), factor de crecimiento derivado

de plaquetas (PDGF), factor de células madre (SCF), y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) fueron utilizados para lograr la formación de tejido pulpar (19).

VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se puede definir como el número de células sanas (viables) en una muestra. Una célula viable es aquella que puede proliferarse, manteniendo su morfología y funcionalidad (15). Existen varias técnicas para evaluar la viabilidad celular. Los métodos de laboratorio para estudiar la viabilidad y funcionalidad celular son múltiples y variados, y están basados esencialmente en criterios morfológicos, bioquímicos y metabólicos. Entre ellos destacan: la evaluación de la integridad de la membrana celular, los ensayos a través de biosensores de fluorescencia, los estudios de morfología celular, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X, y las técnicas de determinación de la expresión génica.

Métodos de evaluación de la integridad de la membrana celular

Una célula viable tendrá su membrana intacta, mientras que una célula apoptótica tendrá la membrana celular alterada, por lo que permitirá el paso de moléculas, que en condiciones normales no se difundirían, o por lo contrario, no permite el paso de moléculas que en condiciones normales atravesarían la membrana. Los métodos basados en la permeabilidad de la membrana son los más numerosos y utilizados.

Métodos basados en la utilización de colorantes orgánicos o sustancias con propiedades de fluorescencia

El principio básico consiste en la utilización de un colorante, que penetra y colorea las células vivas o muertas. La proporción de las células coloreadas o no, refleja el número de células vivas o muertas, y por lo tanto, la viabilidad de la población celular. El conteo de las diferentes poblaciones celulares puede ser efectuado por métodos microscópicos, citometría de flujo, espectrofotometría, entre otros. Se dividen en ensayos de exclusión y de inclusión. (6).

En los ensayos de inclusión los más utilizados son el diacetato de fluoresceína o la calceína. Estos atraviesan la membrana plasmática, se hidrolizan por las enterasas y dan lugar a fluorescencia dentro de la célula, siempre que esta se encuentre en estado funcional. Entre los ensayos de exclusión, encontramos los colorantes orgánicos como azul tripán, eosina, rojo Congo y eritrosina B. Dentro de los colorantes con propiedades fluorescentes encontramos al yoduro de propidio y el bromuro de etidio (6, 27).

El azul tripán (azul diamina, azul niágara) es un colorante que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas. Su nombre se deriva de su capacidad para matar a los tripanosomas, parásitos causales la enfermedad de Chagas en América y Leishmaniasis. El azul tripán es una diamina, derivada de la toluidina, una de las diversas bases isómeras de fórmula $C_{14}H_{16}N_2$, derivadas del tolueno. Las células vivas con la membrana celular intacta no son coloreadas debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana; sin embargo, el azul tripán atraviesa la membrana de las células muertas. Por lo tanto, al microscopio óptico, se cuentan como muertas las células teñidas de azul y como vivas las células que no captaron el colorante (28). El número de células se determina mediante el recuento en la cámara de Neubauer, utilizando la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ células} = \frac{N^{\circ} \text{ células vivas} \times \text{factor de dilución} \times 10.000 \times \text{Vol. Solución}}{N^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

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

METODOLOGÍAS SOBRE LA OBTENCIÓN DE PULPA DENTAL EN DIENTES PERMANENTES

Selección del paciente

Estado de salud general y bucal del paciente

Se deben seleccionar pacientes sistemáticamente sanos para extraer el tejido pulpar, además es importante que el paciente no refiera consumo de drogas y/o cigarrillo, ya que la citotoxicidad de la nicotina inhibe los procesos de mineralización de las células pulpares y se ha comprobado su citotoxicidad en las células madre del ligamento periodontal (29). Asimismo los pacientes que participaran en el estudio deben ser sometidos a tratamientos de higiene oral profesional por una semana previo a la extracción dental para disminuir su carga microbiana (30).

Lo ideal es seleccionar pacientes sanos (para evitar transmisión de diversas enfermedades durante la manipulación de los dientes) y que no presenten infecciones orales. A su vez, el diente seleccionado debe estar libre de enfermedades ya que son notables las diferencias en las características de proliferación de las DPSCs de dientes con un tejido pulpar que presenta inflamación comparado con los dientes sanos (29, 31).

Edad

En las diferentes metodologías generalmente se emplean dientes de pacientes con un promedio de edad entre los 19 a 30 años para obtener DPSCs humanas, pero se ha demostrado que es posible aislar DPSCs de dientes permanentes de pacientes menores de 19 años, los cuales presentan características similares y son de fácil obtención, ya que es una edad en la que se realizan exodoncias de terceros molares y premolares por indicación de ortodoncia (29, 31).

Aunque es menos común la extracción de dientes sanos en pacientes mayores de 30 años, diversos autores han empleado dientes de pacientes mayores de 30 años con resultados exitosos (32, 33). Según Bressan *et al.* en su estudio con pacientes de 16 a 66 años observó una buena capacidad proliferativa para todas las edades. Sin embargo a partir de los 25 años se observó una reducción del tiempo de duplicación fuertemente correlacionada con el aumento de la edad (34).

Género

Pierdomenico *et al.* en el año 2005, intentaron establecer si existían diferencias entre la población celular de dientes obtenidos de mujeres y hombres, donde se observó que no se presentaban diferencias al realizar una comparación entre el género masculino y femenino (35). Aunque la mayoría de las investigaciones, no describen la muestra teniendo en cuenta el género, se puede inferir que muchos de estos estudios emplean dientes obtenidos de hombres y mujeres, y al observar sus resultados, en todos sus estudios fue posible el aislamiento, cultivo, caracterización e incluso la diferenciación de células madre de la pulpa dental (DPSCs). Pierdomenico *et al.* concluyeron que el género del paciente del que se extrae la pieza dental no es un factor que influye en la obtención de DPSCs (36).

Características de los dientes empleados

Selección del diente

Como se mencionó anteriormente el requisito es que estos dientes se encuentren sanos en el momento de su extracción, por lo que se observa un mayor empleo de terceros molares y premolares, debido a que son los dientes que generalmente se extraen por indicación ortodóntica cuando se encuentran sanos (31, 37). En el año 2014 Sato *et al.* describieron la obtención del tejido pulpar para aislamiento de células madre de dientes supernumerarios como el mesiodens (38). La selección del diente es un proceso que se relaciona

íntimamente con la disponibilidad de las piezas dentales, más no con el volumen de los diente o su posición en los maxilares (36).

Conservación del diente post- Exodoncia

Después de la exodoncia los especímenes se deben desinfectar con etanol al 70%. Los dientes se deben colocar en un medio de transporte de para su traslado a otros laboratorios, ya que requieren un medio húmedo que preserve la vitalidad del tejido pulpar.

Ahmed *et al.* emplearon una combinación de DMEM con penicilina, estreptomocina y 10% de suero fetal bovino (39). Shekar *et al.* emplearon MEM con 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomocina (40), Samiei *et al.* utilizaron DPBS con 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomocina y anfotericina B (41). Autores como Karamzadeh *et al* y Shekar *et al.* reportaron que la temperatura en que se debe conservar los dientes es a 4°C, además se debe realizar una limpieza del medio de conservación presente en la superficie dental, previo a la extracción del tejido pulpar (15, 40). Por lo tanto es necesario emplear un medio de conservación del diente para preservar las propiedades biológicas del tejido pulpar, especialmente cuando deben ser transportados para su procesamiento, independiente del medio que se emplee, es conveniente el uso de antibióticos para evitar la contaminación (36). Asimismo Perry *et al.* compararon tres medios de conservación, solución salina de fosfato (PBS, Sigma Chemical, St. Louis, MO), hipotermosol (HTS, Solucion de BioLife, Bothell, WA), y medio basal mesencult® (Tecnologías StemCell, Vancouver, BC, Canadá) donde observó que es posible obtener DPSCs de dientes conservados después de 120 horas de su extracción, y el medio que presentó mejor comportamiento fue PBS, ya que obtuvo un mayor número de DPSCs después de 120 horas de conservación (42).

Tiempo de preservación de los dientes antes de extraer el tejido pulpar

Perry *et al.* indicaron que el aislamiento de DPSCs es factible hasta 120 horas después de la extracción del diente al ser almacenados a 4°C en diferentes medios. Por lo tanto, el aislamiento inmediato a la extracción del diente no es absolutamente necesario. Sin embargo se obtuvieron mayor cantidad de células entre las 0 a 24 horas y a partir de las 72 a 120 horas disminuyó notablemente la cantidad de células obtenidas. Se deberían realizar más estudios para determinar hasta qué cantidad de horas transcurridas después de la exodoncia se obtienen gran cantidad de células (42).

Métodos de extracción pulpar

Método de corte a nivel de la unión amelocementaria

Se realiza un corte de 0,5 a 1 mm de profundidad a nivel de la unión amelocementaria, por medio de un disco de baja velocidad estéril, luego se procede a la extracción del tejido pulpar por medio de diversos instrumentos como curetas, limas endodónticas, pinzas. Este es el método más empleado, desde el año 2000 cuando Gronthos *et al.* lo llevaron a cabo (43). Por ser un método funcional, autores como Abdullah *et al.* decidieron emplearlo en su metodología realizada en el año 2014 (32). Sin embargo este método también se ha realizado con fresas cilíndricas de alta velocidad, lo que podría causar sobrecalentamiento del tejido pulpar (44).

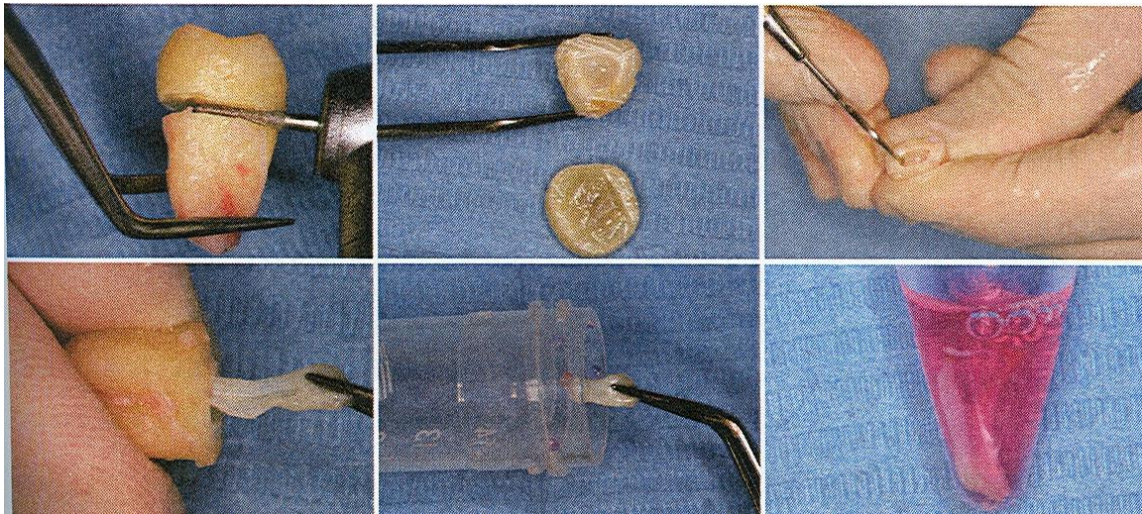


Figura 2. Extracción de la pulpa dental mediante el método de corte.

Fuente: El Alami M. Obtención de células madre de la pulpa dental. Caracterización y adaptación a diversas condiciones de oxígeno. [Tesis de doctorado]. Valencia: Universidad de Valencia; 2013.

Corte longitudinal

Se realiza una ranura longitudinal con discos estériles de diamante a 1 mm de profundidad, sin alcanzar el tejido pulpar, se separa los fragmentos dentales y se extirpa el tejido pulpar con un limas endodónticas. En el año 2010 Macedo *et al.*, emplearon este método (45).



Figura 3. Método de corte longitudinal

Fuente: Macedo M, *et al.* Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent teeth pulp. *Braz J Oral Sci.* 2010. 9(4):427-33.

Fractura de la corona y las raíces dentales por medio de fórceps

La fractura de la corona y las raíces dentales se realiza por medio de fórceps, luego se procede a la extracción del tejido pulpar en condiciones estériles, este fue un método empleado en un inicio por Pierdomenico *et al.* en el año 2005 (38) y utilizado por Hilkens *et al.* en el año 2014 debido a que mediante este método se previene el sobrecalentamiento del tejido pulpar por el uso de discos o fresas para separar el tejido (46).

Extracción de la pulpa a través del foramen apical

La extracción de la pulpa a través del foramen apical del conducto se realiza por medio de limas endodónticas, al emplear este método en dientes inmaduros el tejido que se extrae puede ser diferente al de la pulpa dental, obteniendo cultivos de células madre de papila apical. Este método fue empleado por Suchánek *et al.* en el año 2007 (15).

Fractura del diente con martillo

Autores como Syed-Picard *et al.* utilizaron un martillo pequeño para quebrar el diente mediante un golpe y así exponer el tejido pulpar, posteriormente se extrae la pulpa dental con pinzas y/o curetas en condiciones estériles (2).

HIPÓTESIS Y VARIABLES

- Hi: el método de fractura es más eficiente en la viabilidad celular de la pulpa dental.
- Ho: el método de fractura no es más eficiente en la viabilidad celular de la pulpa dental

Título: Efecto comparativo del método de fractura mecánica y el método de corte en la viabilidad de las células de la pulpa dental humana						
VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	TIPO	ESCALA
INDEPENDIENTE Método de extracción del tejido pulpar	Procedimientos de laboratorio que se realizan para la extracción del tejido pulpar dental	Métodos de extracción pulpar de terceras molares y premolares	Método de fractura mecánica Método de corte	Presencia Ausencia Presencia Ausencia	Cualitativa	Nominal
DEPENDIENTE Viabilidad de las células de la pulpa dental	Número de células de la pulpa dental, que tienen la capacidad de proliferar manteniendo su morfología y funcionalidad.	Observación microscópica de células vivas o viables las cuales no captan el azul de tripán mientras que las células muertas (no viables) sí lo hacen.	Células viables	Porcentaje de células con membrana citoplasmática intacta de color claro	Cuantitativa	De razón
INTERVINIENTE						
TIEMPO	Período determinado durante el que se realiza una acción	Horas desde que se extrae hasta que se empieza el experimento	Horas	3-20 horas transcurridas	Cuantitativo	De razón
EDAD	Suma de años que ha transcurrido desde el nacimiento	Suma de años que ha transcurrido desde el nacimiento	Edad cronológica	18-40 años	Cuantitativo	De razón

MATERIAL Y MÉTODO

Población

Se obtuvieron células de la pulpa dental de piezas extraídas quirúrgicamente de pacientes adultos cuyo rango de edad comprendió de 18 a 40 años que se atendieron en el Centro Quirúrgico de la Clínica Especializada en Odontología de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres, durante el periodo marzo-agosto 2016.

Todos los pacientes fueron informados de las características del estudio, y aceptaron libremente colaborar con el mismo, aportando el diente extraído, el cual fue siempre extraído por motivos ajenos a este estudio. Los pacientes firmaron un consentimiento informado que adjunto en el anexo.

Criterios de Inclusión

- Pacientes entre 18 y 40 años de edad.
- Piezas dentales sanas

Criterios de exclusión

- Paciente con enfermedad sistémica no controlada.
- Pieza dental fracturada durante la exodoncia.
- Pieza dental con odontosección.
- Pieza dental con ápice abierto.

Muestra

En el estudio se utilizaron los tejidos pulpares de 32 piezas dentales, divididas en dos grupos de 16 dientes cada uno.

Grupo 1: método de fractura mecánica

Grupo 2: método de corte

Recolección de datos

Los datos fueron registrados en un cuaderno de experimentos, en el cual se colocaron los siguientes datos: diente extraído, sexo y edad del paciente, fecha de la exodoncia, horas desde la exodoncia hasta iniciar el experimento, método de extracción pulpar realizado, número total de células y porcentaje de viabilidad celular.

Procedimientos

El tejido pulpar se obtuvo de terceras molares y premolares totalmente desarrolladas y sanas, que fueron extraídas quirúrgicamente de un adulto joven y sano que presente la indicación de exodoncia por otros motivos ajenos al estudio. El procedimiento se llevó a cabo, de conformidad con las directrices dictadas por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres.

Se transportaron las piezas dentales en frascos estériles con suero fisiológico y rotulado con los siguientes datos: diente extraído, sexo y edad del paciente y fecha de la exodoncia. Luego se colocó el frasco en un contenedor a 4 °C para transportarlos hasta el Laboratorio de Investigación de Biología Oral y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres, donde se realizó el método de extracción de la pulpa dental, dentro de una cabina de flujo laminar.

- 1) Se preparó 20 ml de Minimum essential medium (MEM) + 0.5 % Penicilina-Estreptomicina (PE-ST). Figura 7.
- 2) Se realizó un baño al diente extraído con MEM + 0.5% PE-ST (5 ml) por 20 minutos en un tubo de 50 ml. Figura 7.
- 3) Se realizó la extracción del tejido pulpar según dos métodos (2 grupos):
Fractura mecánica (grupo 1) con un martillo, cubiertas previamente el diente con gasas humedecidas con alcohol al 70%, luego se procedió a fracturar al diente. Figura 8.
Corte con un disco diamantado dentado (grupo 2) montado en un micromotor. Se corta el diente entre la línea amelocementaria y la furca a 28 000 rpm, irrigando intermitentemente con suero fisiológico. Figura 9.
- 4) Se colocaron los pedazos del diente fracturado en una placa Petri con MEM. Figura 10.
- 5) En la cabina de flujo laminar se extrajo la mayor cantidad de pulpa cameral con pinzas estériles. Figura 11.
- 6) Se trituro la pulpa con dos láminas portaobjetos y se enjuagó con MEM. Figura 12.
- 7) Se pipeteó varias veces con 1 ml MEM. Figura 13.
- 8) Se recogió el MEM en el tubo de 15 ml y se centrifugó a 1100 rpm por 10 minutos. Figura 14 y 15.
- 9) Se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se resuspendió el botón celular (pellet) en 6 ml MEM.

- 10) Para determinar la viabilidad celular se mezcló 10 μL de la suspensión celular con 10 μL de azul tripán.
- 11) Se colocó 10 μL de la mezcla en la cámara del hemocitómetro. Figura 16.
- 12) Se procedió al conteo por separado a las células azules (muertas) y a las células birrefringentes o blancas (vivas) que sean observadas en cada uno de los cuadros por considerar. Figura 18.

$$\text{N}^\circ \text{ células} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas} \times \text{factor de dilución} \times 10.000 \times \text{Vol. Solución}}{\text{N}^\circ \text{ de cuadrantes contados}}$$

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

Reactivos:

- Azul tripán al 0.4%
- Minimum Essential Medium
- Penicilina-Estreptomicina



Figura 4. Azul tripán al 0.4%



Figura 5. Minimum Essential Medium



Figura 6. Preparación azul tripán al 0,25 %

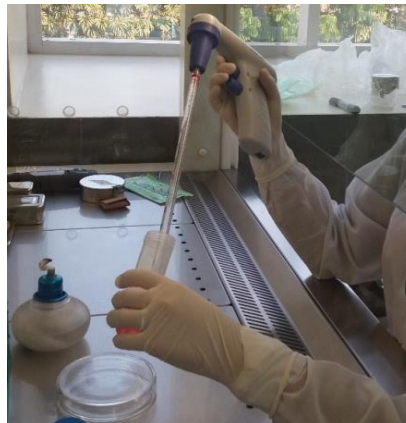


Figura 7. MEM + 0,5 % PE-ST



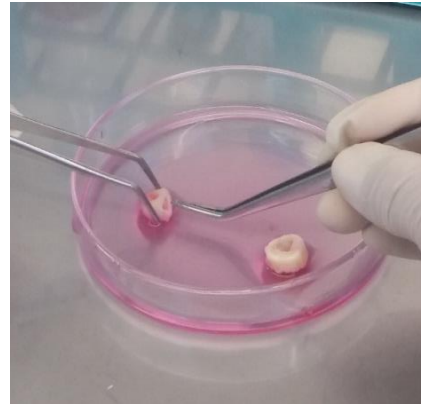
Figura 8. Método de fractura



Figura 9. Método de Corte



Método de
fractura mecánica



Método de corte

Figura 10. Extracción de la pulpa según el método fractura y corte.

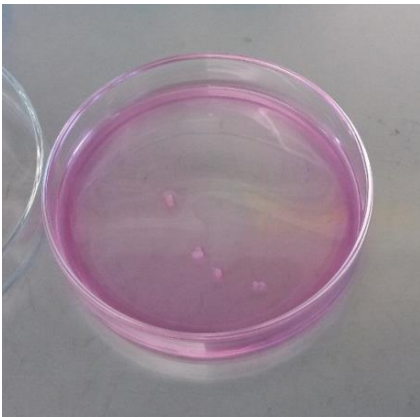


Figura 11. Pulpa fragmentada

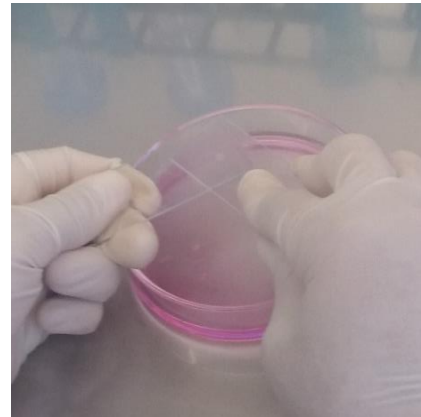


Figura 12. Trituración de la pulpa

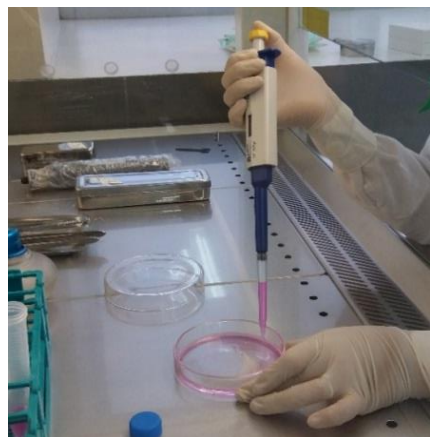


Figura 13. Pipeteo de la
suspensión celular

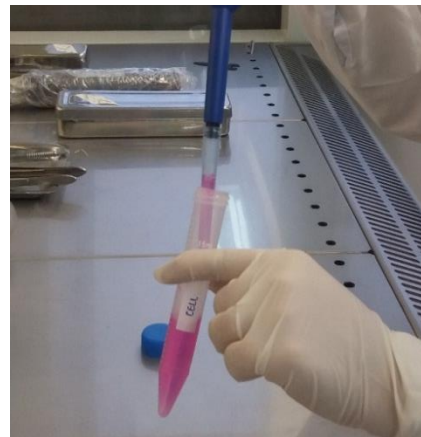


Figura 14. Recolección de la
suspensión celular



Figura 15. Centrifugación



Figura 16. 10 μ L en el hemocitómetro

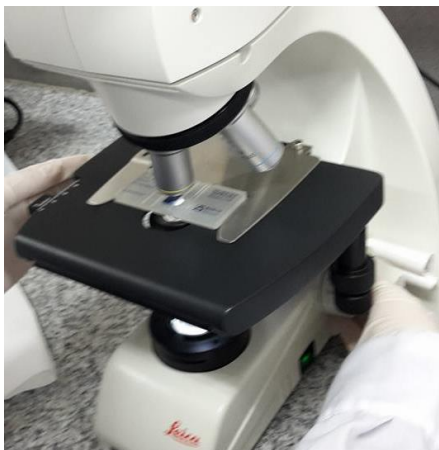


Figura 17. Hemocitómetro en el microscopio

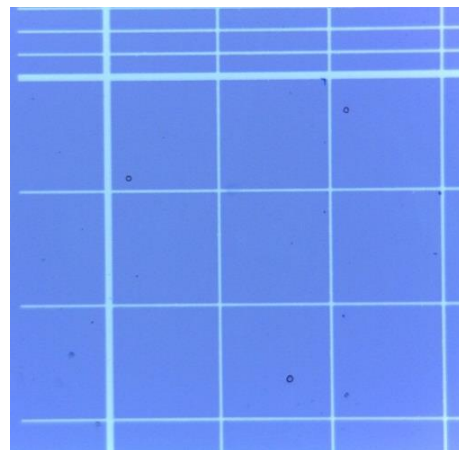


Figura 18. Microscopio óptico 10X

Análisis estadístico

Para el procesamiento de datos se usó un ordenador Core i7, donde se utilizó el software SPSS® v22 (IBM software). En el caso de las distribuciones de las variables numéricas viabilidad celular, en ambos métodos de extracción pulpar; se realizó un análisis a través de la prueba Shapiro-Wilk, donde se determinó la presencia de distribución normal; seleccionando para la comparación la prueba paramétrica t-Student para muestras independientes. Para todas las pruebas de hipótesis se utilizó un nivel de significancia de 0,05.

RESULTADOS

En este estudio se emplearon 32 pulpas correspondientes a 32 pacientes, cuyas edades estaban entre 18 y 40 años. Con el objetivo de determinar el método más eficiente en la obtención de células viables de la pulpa dental, se probaron dos métodos de extracción de tejido pulpar. Se utilizó el colorante azul tripán para diferenciar a las células vivas y muertas. Al realizar el conteo en el microscopio óptico, se consideró viable a las células redondas birrefringentes y muertas a las células teñidas de azul. Para determinar la viabilidad celular, se dividió el número de células vivas entre el número total de células y se multiplicó por cien.

A. Frecuencia de las variables categóricas analizadas

Tabla 1. Frecuencias de las variables: pieza dental, género y edad según el método de corte y el método de fractura mecánica.

Variable	Método de corte		Método de fractura mecánica	
	Frecuencia	Porcentaje %	Frecuencia	Porcentaje %
Pieza				
18	1	6,25	5	31,25
28	5	31,25	2	21,9
34	1	6,25	1	6,25
35	1	6,25	0	0
38	3	18,75	5	31,25
44	1	6,25	1	6,25
45	0	0	1	6,25
48	4	24,00	1	6,25
Premolares	3	18,75	3	18,75
Molares	13	81,25	13	81,25
Género				
Masculino	2	12,5	8	50
Femenino	14	87,5	8	50
Edad				
11-20	2	12,5	3	18,75
21-30	9	56,25	11	68,75
31-40	5	31,25	2	12,50

En la tabla 1 se puede observar que las piezas dentales 18, 28, 38 y 48 obtuvieron la mayor frecuencia. Además las piezas dentales utilizadas en su mayoría correspondían a pacientes del sexo femenino y la mayoría de los pacientes estaban entre 21 y 30 años.

B. Correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia con la viabilidad celular

Con el objetivo de encontrar correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia y la viabilidad celular, primero se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para determinar la prueba a utilizar.

Tabla 4. Prueba de normalidad y correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia y la viabilidad celular

Variable	Valores	Shapiro-Wilk	Significancia Rho de Spearman
Tiempo Transcurrido	3-20 horas	0,000	0,785
Viabilidad	85,65%	0,231	

En la tabla 4 se puede observar que la variable tiempo transcurrido desde la exodoncia no presentó ajuste a la curva normal, por lo que se optó por utilizar una prueba de correlación no paramétrica (Rho de Spearman). Además no se observaron evidencias suficientes para concluir que existe correlación estadísticamente significativa entre las variables analizadas, $p > 0,05$.

C. Correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia con el número total de células

Con el objetivo de encontrar correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia y el número total de células, también se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk; para determinar la prueba a utilizar.

Tabla 5. Prueba de normalidad y prueba de correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia y el N° total de células

Variable	Valores	Shapiro-Wilk	Significancia Rho de Spearman
Tiempo Transcurrido	3-20 horas	0,000	0,321
N° total Células	6,64x10 ⁷	0,008	

En la tabla 5 se puede observar que ambas variables no presentan ajuste a la curva normal, por lo que se optó por aplicar la prueba Rho de Spearman. Se observó que no existe correlación estadísticamente significativa entre los grupos analizados, $p > 0,05$.

D. Correlación entre la viabilidad celular y el número total de células

Con el objetivo de encontrar correlación entre la viabilidad celular y el número total de células, primero se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para determinar la prueba a utilizar.

Tabla 6. Prueba de normalidad y prueba de correlación entre la viabilidad celular y el N° total de células

Variable	Media	Shapiro-Wilk	Significancia Rho de Spearman
Viabilidad	85,65%	0,231	0,200
N° total de Células	6,64x10 ⁷	0,008	

En la tabla 6 se puede observar que la variable N° total de Células no presenta ajuste a la curva normal, por lo que se optó por utilizar una prueba de correlación no paramétrica (Rho de Spearman). Los resultados de la prueba arrojaron que no existe correlación entre la viabilidad celular y el número total de células, $p > 0,05$.

E. Correlación del número total de células y la viabilidad celular según el tipo de pieza

Con el propósito de encontrar correlación entre el número de células y la viabilidad celular según premolares y molares, se aplicó la prueba Rho de Spearman.

Tabla 7. Correlación del número de células y la viabilidad según las piezas

	Frecuencia	Porcentaje	N° Células (Media)	Viabilidad (Media)	Sig. Rho Spearman
Premolares	6	18,8	$6,05 \times 10^7$	84,0%	0,468
Molares	26	81,3	$6,78 \times 10^7$	86,0%	0,092
Total	32	100			

En la tabla 7 no se observaron diferencias estadísticamente significativas para concluir que existe correlación entre el número de células y la viabilidad según el tipo de pieza, $p > 0,05$.

F. Correlación entre el número total de células y la viabilidad celular según la edad

Con el objetivo de encontrar correlación entre número total de células y la viabilidad celular según la edad, se aplicó la prueba Rho de Spearman.

Tabla 8. Prueba de correlación entre el número de células y la viabilidad celular según la edad

	Variable	Media	Significancia Rho de Spearman
Edad (18-40 años)	N° Células	85,65%	0,944
	Viabilidad	6,64x10 ⁷	0,532

En la tabla 8 no se observan diferencias estadísticamente significativas para concluir que existe correlación entre el número total de células y la viabilidad celular según la edad, $p > 0,05$.

G. Comparación del número total de células según el método de corte y el método de fractura mecánica

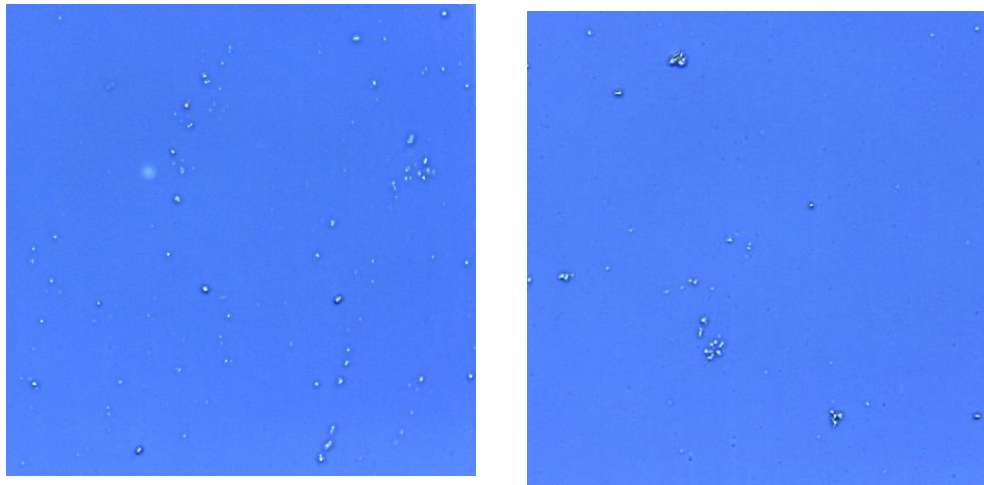
1) Método de fractura mecánica

Se utilizaron 16 tejidos pulpares, correspondientes a 16 pacientes. El método de fractura mecánica utiliza un martillo para fracturar el diente y exponer el tejido pulpar, evitando el sobrecalentamiento del diente. El número total de células promedio para el método de fractura mecánica fue: $7,53 \times 10^7$

2) Método de corte

Se utilizaron 16 tejidos pulpares, correspondientes a 16 pacientes. El método de corte utiliza un disco dentado de baja velocidad e irrigación constante a nivel de la unión amelocementaria, para exponer el tejido pulpar. El número total de células promedio para el método de corte fue: $5,75 \times 10^7$.

Figura 19. Células de la pulpa dental observadas en el microscopio óptico



Método de
fractura mecánica

Método de corte

Tabla 9. Comparación del número total de células obtenidas según el método de fractura mecánica y el método de corte.

Métodos	Fractura mecánica	Corte
N	16	16
Media	$7,54 \times 10^7$	$5,74 \times 10^7$
DS	$4,22 \times 10^7$	$2,22 \times 10^7$
Shapiro-Wilk	0,089	0,822
t-Student	0,144	

En la tabla 9 se observa que número total de células promedio para el método de corte fue: $5,75 \times 10^7$ y para el método de fractura mecánica fue: $7,53 \times 10^7$. Según la prueba de normalidad Shapiro-Wilk el número de células en ambos métodos tienen una distribución similar a la curva

normal. Es por ello que se compararon ambos grupos mediante la prueba paramétrica t-Student para muestras independientes. Hay una tendencia de obtener mayor número de células con el método de fractura mecánica. Sin embargo, se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p > 0,05$), por lo tanto se puede concluir que el número de células obtenidas por ambos métodos serán similares. Se presentaron dos valores atípicos (inusuales) en el método de fractura mecánica: $16,5 \times 10^7$ y $17,1 \times 10^7$. Estos datos fueron valores elevados y no coincidían dentro del gráfico de caja y bigotes.

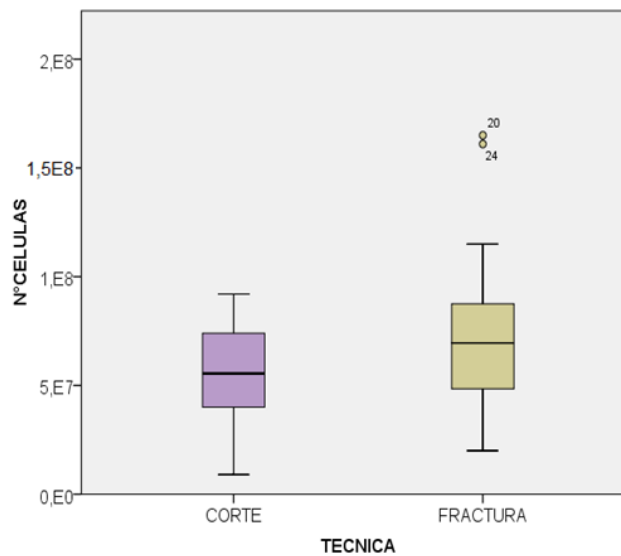


Gráfico 1. Comparación del N° células obtenido por los métodos de corte y de fractura mecánica

H. Porcentaje de viabilidad celular según el método de corte y el método de fractura mecánica

En la tabla 10 se observa que el porcentaje promedio de viabilidad celular para el método de corte fue: 83,5 % y para el método de fractura mecánica fue: 87,7%. Se presentaron dos valores atípicos (inusuales), uno en el método de fractura mecánica y otro en el método de corte, 81 y 73 % respectivamente; en este caso fueron valores mínimos que no coincidían dentro del gráfico de caja y bigotes. Según la prueba de normalidad Shapiro-Wilk el número de células en ambos métodos tienen una distribución similar a la curva normal. Es por ello que se compararon ambos grupos mediante la prueba paramétrica t-Student para muestras independientes. Se observan

diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos analizados ($p < 0,05$).

Tabla 10. Comparación de la viabilidad celular obtenida según el método de método de corte y el de fractura mecánica.

Métodos	Fractura mecánica	Corte
N	16	16
Viabilidad % Media	87,72	83,59
DS	3,33	4,49
Shapiro-Wilk	0,295	0,904
t-Student	0,006	

Por lo tanto aceptamos la hipótesis de investigación y rechazamos la hipótesis nula, lo que nos permite llegar a la conclusión que el método de fractura mecánica es más eficiente para obtener un alto porcentaje de viabilidad celular de la pulpa dental en comparación con el método de corte.

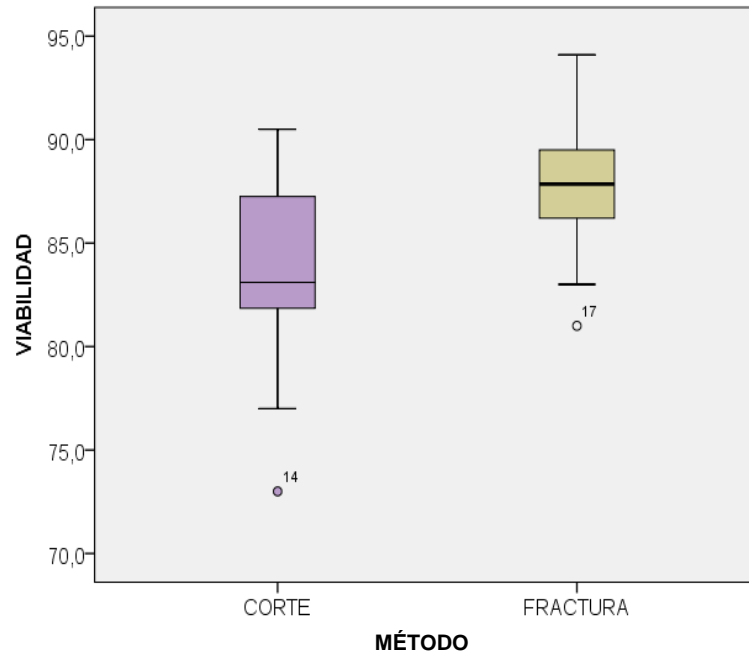


Gráfico 2. Comparación de la viabilidad celular obtenida por los métodos de corte y de fractura mecánica.

DISCUSIÓN

Existen muchos protocolos para la extracción de la pulpa dental, en los cuales se han usado diferentes instrumentos como: discos de corte de baja velocidad, fresas diamantadas de alta velocidad, fórceps, martillo, limas, etc.

La realización de una ranura de 0,5 a 1 mm de profundidad por medio de un disco de baja velocidad estéril, alrededor de la unión amelocementaria ha sido empleada por muchos autores como Karamzadeh, Abdullah y Samiei en los años 2012, 2010 y 2013 respectivamente (14, 32, 41).

El Alami en el año 2013 ha realizado el método con fresas cilíndricas de alta velocidad, que podrían causar sobrecalentamiento del tejido pulpar, sin embargo logró obtener altos porcentajes de células madres de la pulpa dental, entre el 33 al 100% por cada grupo de estudio (44). La aplicación de agua en forma continua provoca un bajo nivel de sobrecalentamiento de la pulpa dental (36).

La fractura de la corona y las raíces dentales por medio de fórceps, ha sido aplicada por Pierdomenico, en el año 2005, también por Agha-Hosseini en el año 2010, y por Hilkens, en el año 2014 (36, 47, 46). Syed-Picard en el año 2014 usó un martillo aplicando el mismo método, donde se previene el sobrecalentamiento del tejido pulpar por el uso de discos o fresas (2). Sin embargo, se corre el riesgo de pulverizar demasiado el diente o de no lograr exponer la pulpa dental. Por lo que se requiere de experiencia y adecuada técnica por parte del investigador.

La extracción de la pulpa a través del foramen apical del conducto por medio de limas, se realiza en dientes inmaduros (15). El tejido que se extrae puede ser diferente, obteniéndose células madre de la pulpa dental y de la papila apical (36). En el año 2009 Huang *et al.* realizaron la extracción del tejido pulpar de dos dientes anteriores indicados para tratamiento de conducto, realizada con limas endodónticas (49). Este método es poco convencional, pero se logró aislar células madre de la pulpa dental (36).

Suchánek *et al.* en el año 2007 compararon tres métodos de extracción pulpar: el corte a nivel de la unión amelocementaria, el uso de fórceps para fracturar los tejidos duros del diente y la obtención pulpar a través del foramen con limas endodónticas. Ellos pudieron aislar células madre de la pulpa dental con las técnicas de fragmentación con fórceps y con la obtención del tejido pulpar a

través del ápice. Sin embargo, con el método de corte a nivel de la unión amelocementaria (realizada con una fresa diamantada de alta velocidad), no lograron aislar células madre de la pulpa dental (15).

En esta investigación, el número total de células obtenidas con el método de corte fue en promedio $5,74 \times 10^7$ y con el método de fractura mecánica $7,54 \times 10^7$. Al aplicar la prueba t-Student, no se encontraron diferencias significativas entre el número total de células de ambos métodos. Debido a que no encontramos estudios que reporten la concentración total de células de la pulpa dental, no pudimos contrastar nuestros resultados con los de otros investigadores. Por lo tanto este trabajo fue el primer estudio, que realizó un conteo de toda la población celular de la pulpa dental. Como referencia podemos citar estudios en el que solo han trabajado con un tipo celular. Souza *et al.* y Karamzadeh *et al.* reportaron la obtención de 5×10^4 y $2,5 \times 10^5$ células madre de la pulpa dental respectivamente, ellos aplicaron el método de corte con baja velocidad (14, 45).

Según nuestros resultados, el método de fractura con martillo mostró un mayor porcentaje de viabilidad celular (87,72%) en contraste con el método de corte (83,59%). Al aplicar la prueba t-Student se obtuvo una diferencia significativa, lo que comprueba la superioridad del método de corte para obtener células vivas. Este resultado se puede deber a que el método de fractura mecánica con martillo no provoca calor constante, lo que asegura una tasa de viabilidad celular más alta. En contraste, el método de corte produce un sobrecalentamiento del tejido, a pesar de la irrigación intermitente. Como consecuencia muchas células de la pulpa dental mueren. Los resultados obtenidos según el método de corte difieren con lo reportado por Suchánek *et al.* quienes se enfocaron en obtener células madre de la pulpa dental, mediante el método de corte con una fresa diamantada de alta velocidad e irrigación constante. Ellos no lograron obtener células madre de la pulpa dental (15). Sin embargo, en nuestro trabajo se tomó la precaución de usar un micromotor de baja velocidad dentro de una cabina flujolaminar, logrando obtener células de la pulpa dental. Entre las que pueden encontrarse células madre de la pulpa dental. No obstante, en este estudio no se utilizaron las técnicas de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de citometría de flujo para identificar esta población celular.

En nuestro estudio, el tiempo que tardamos en empezar a extraer la pulpa dental en el laboratorio después de la exodoncia, fue en un intervalo de 3 a 20 horas. Según la prueba Rho de Spearman, no se encontró correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia con la viabilidad celular y el número

total de células. Este resultado se puede atribuir a que el intervalo de tiempo evaluado fue corto (no más de 20 horas). A diferencia de Perry *et al.* quienes trabajaron con intervalos más grandes (de 0 a 120 horas). De acuerdo a sus resultados, se logró aislar células madre de la pulpa dental hasta 120 horas después de la exodoncia. Pero se observó un declive marcado en la concentración celular a las 72 horas, de allí en adelante el número de células obtenidas fue mucho menor (42).

En este trabajo, se ha utilizado la pulpa dental de pacientes entre 18 y 40 años. Al aplicar la prueba Rho de Spearman, no se encontró correlación entre la edad con la viabilidad celular y el número total de células, esto se debe probablemente a que en nuestra investigación el rango de edad fue corto. Según la literatura, se han obtenido células de la pulpa dental de pacientes con diferentes rangos de edad. Horibe *et al.* realizaron un estudio donde compararon la obtención de células madre de la pulpa dental de pacientes entre 19 a 30 años, con otros pacientes entre 44 a 70 años. El grupo de pacientes de mayor edad mostró un pequeño declive en las propiedades de las células madre: migración, potencial de diferenciación y proliferación (33). Sin embargo, Bressan *et al.* en su estudio con pacientes de 16 a 66 años. Observó una mejor habilidad proliferativa de las células madre de la pulpa dental, en los pacientes de 25 años a más (34). Considerando los estudios anteriores y los resultados de este trabajo, concluimos que la pulpa dental obtenida de pacientes de todas las edades, pueden emplearse satisfactoriamente en los estudios basados en células.

Para correlacionar el número total de células y la viabilidad celular según el tipo de pieza (premolar y molar), se aplicó la prueba Rho de Spearman. Sin embargo, no se encontró correlación entre estas variables. Este resultado pudo deberse a la diferencia del número de dientes utilizados por tipo de pieza, ya que se analizaron 6 premolares contra 26 molares. No hemos encontrado estudios que reporten una comparación entre la obtención de células de la pulpa dental según premolares y molares. Pero podemos mencionar estudios que han utilizado dientes permanentes anteriores, para obtener células madre de la pulpa (48). Asimismo se ha reportado la obtención de células madre de mesiodens aplicando el método de corte con alta velocidad (38). Como se mencionó anteriormente, el requisito principal es que estos dientes se encuentren sanos en el momento de su extracción. Debido a que las terceras molares y premolares son los dientes que generalmente se extraen sanos por indicación de ortodoncia, se ha observado un mayor empleo de estos dientes. No obstante, se ha reportado la presencia de células madre en el tejido pulpar con inflamación (vital). Estas células tienen la capacidad para formar matriz

mineralizada tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que es una fuente interesante de células madre mesenquimales. Al compararse las células madre obtenidas de dientes con inflamación pulpar contra las células de dientes sanos, se evidencia que presentan valores inferiores en el potencial de autorrenovación y expansión *in vitro*. (49, 50). La selección del diente es un proceso que está más relacionado con la disponibilidad de las piezas dentales, más no con el volumen del diente o su posición en los maxilares (36).

Este trabajo contribuye a la optimización del protocolo de aislamiento y cultivo de células de la pulpa dental, el cual será útil para lograr una concentración celular eficiente y será base para desarrollar pesquisas posteriores de viabilidad, citotoxicidad, así como en el campo de medicina regenerativa. A nuestro mejor conocimiento, este es el primer trabajo que compara la viabilidad celular y el número total de células de la pulpa dental según el método de corte y el método de fractura mecánica con martillo. Nuestros resultados indican que se obtiene un porcentaje mayor de viabilidad celular con el método de fractura, aunque las concentraciones totales de células son similares en ambos métodos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que:

- Con el uso del método de fractura mecánica se obtiene un porcentaje más elevado de viabilidad celular (células vivas) que con el método de corte.
- El número de población total celular obtenida por el método de fractura mecánica con martillo es similar al obtenido por el método de corte.
- No existe correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia hasta el inicio de la extracción del tejido pulpar (3-20 horas) con la viabilidad celular, en ambos métodos de extracción de la pulpa dental.
- No existe correlación entre el tiempo transcurrido desde la exodoncia hasta el inicio de la extracción del tejido pulpar (3-20 horas) y el número total de células, en ambos métodos de extracción de la pulpa dental.
- No existe correlación entre la viabilidad celular y el número total de células, en ambos métodos de extracción de la pulpa dental.
- No existe correlación entre el número de células y la viabilidad celular según premolares y molares, en ambos métodos de extracción de la pulpa dental.
- No existe correlación entre número total de células y la viabilidad celular según la edad del paciente (18-40 años), en ambos métodos de extracción de la pulpa dental.

REFERENCIAS

1. Zorzeto A. Avaliação in vitro do cultivo de fibroblastos gengivais humanos em matriz dérmica acelular. [Tesis de maestría]. Sao Paulo: Universidade de Sao Paulo; 2008.
2. Syed-Picard F, Ray H, Kumta P, Sfeir C. Scaffoldless Tissue-engineered Dental Pulp Cell Constructs for Endodontic Therapy. *J Dent Res.* 2014; 93(3):250-5.
3. 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. Mezey E, ed. *PLoS ONE.* 2012; 7(11):489-95.
4. Zare M, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity Evaluation of Iranian Propolis and Calcium Hydroxide on Dental Pulp Fibroblasts. *J Dent Res.* 2014; 8(3):130-3.
5. Shafiei F, Tavangar MS, Razmkhah M, Attar A, Alavi A. Cytotoxic effect of silorane and methacrylate based composites on the human dental pulp stem cells and fibroblasts. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014; 19 (4): 350-8.
6. 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: Universidad de Córdoba; 2010.
7. Quezada R. Citotoxicidad del aloe vera y el formocresol en las células mesenquimales de pulpa dental. [Tesis de maestría]. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2014.
8. Tetè S, Zizzari VL, Borelli B, De Colli M, Zara S, Sorrentino R, Scarano A, Gherlone E, Cataldi A, Zarone F. Proliferation and adhesion capability of human gingival fibroblasts onto zirconia, lithium disilicate and feldspathic veneering ceramic in vitro. *Dent Mater J.* 2014; 33 (1):7.
9. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012 Jul; 56(3):151-65.
10. Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2015; 7(5): 839-51.
11. Ducret M, Fabre H, Degoul O, et al. Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: current strategies and future investigations. *Frontiers in Physiology.* 2015; 6:213-8.
12. Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011; 22(1):3-13.

13. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009 Oct; 59(2):150-7.
14. 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; (69): 43-72.
15. Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R et al. Human Dental Pulp Stem Cells – Isolation and Long Term Cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2007; 50(3):195-201
16. Gómez M, Campos A. *Histología y embriología Bucodental*. 3ª Ed. México: Panamericana; 2009: 218-25.
17. Simon S. *Molecular Characterisation of Odontoblast during Primary, Secondary and Tertiary dentinogenesis*. [Tesis doctoral]. Paris: University of Birmingham; 2009.
18. Morales R, Trujillo E, Cantín M. Caracterización Estereológica de Odontoblastos en Pulpas Dentarias Humanas Sanas y con Pulpitis Reversible. *Int. J. Morphol.* [Internet]. 2014 Mar [citado 2016 Sep 20]; 32 (1): 154-60.
19. Wang J, Dodd C, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE; Wound Healing Research Group. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Lab Invest*. 2008 Dec; 88(12):1278-90.
20. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández D, Barajas M, Carrasco MA, Jung HS, Alfaro FH, 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 Jul 15; 125(14):3343-56.
21. Yang J, Yuan G, Chen Z. Pulp Regeneration: Current Approaches and Future Challenges. *Front Physiol*. 2016 Mar 7; 7: 58.
22. Soto E, Vargas L, Oropeza M, Cano P, Morán A, García M. Células pluripotenciales de la pulpa dental humana. *Odont Act* 2014; 11(130): 4-14.
23. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Jan;45(1):124-31.
24. Sreenivas SD, Rao AS, Satyavani SS, Reddy BH, Vasudevan S. Where will the stem cells lead us? Prospects for dentistry in the 21st century. *J Indian Soc Periodontol*. 2011; 15 (3):199-204.
25. Krombach F, Münzing S, Allmeling AM, Gerlach JT, Behr J, Dörger M. Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environmental Health Perspectives*. 1997; 105(5):1261-3.

26. Szakal AK, Gieringer RL, Kosco MH, Tew JG. Isolated follicular dendritic cells: cytochemical antigen localization, Nomarski, SEM, and TEM morphology. *J Immunol.* 1985 Mar; 134(3):1349-59.
27. 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: Universidad de Granada; 2009.
28. Ramírez Rámiz, A. Estudio celular y molecular en cultivos de fibroblastos tratados con fármacos inductores de agrandamiento gingival. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2007.
29. Kellner M, Steindorff MM, Stempel JF, Winkel A, Kühnel MP, Stiesch M. Differences of isolated dental stem cells dependent on donor age and consequences for autologous tooth replacement. *Arch Oral Biol.* 2014 Jun; 59(6):559-67.
30. Tirino V, Paino F, d'Aquino R, Desiderio V, De Rosa A, et al. Methods for the Identification, Characterization and Banking of Human DPSCs: Current Strategies and Perspectives. *Stem Cell Rev.* 2011; 7(3): 608-15.
31. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, Miyaki S, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res.* 2008 Jul; 87(7):676-81.
32. Abdullah MF, Abdullah SF, Omar NS, Mahmood Z, Fazliah Mohd Noor SN, Kannan TP, Mokhtar KI. Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes. *Cell Biol Int.* 2014 May; 38(5):582-90.
33. 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 May 28; 9(5):e98553.
34. 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. *PLoSOne.* 2012; 7(11):e49146.
35. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation.* 2005 Sep 27; 80(6):836-42.
36. Perdomo A. Metodología sobre obtención de muestra, cultivo y caracterización in vitro de células madre mesenquimales humanas obtenidas de la pulpa de dientes permanentes. Revisión narrativa de la

- literatura. [Tesis de especialidad]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
37. Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, Tsai SY, Jeng JH, Kawata T, Huang HM. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod.* 2010 Aug; 36(8):1336-40.
 38. Sato M, Toriumi T, Watanabe N, Watanabe E, Akita D, Mashimo T, Akiyama Y, Isokawa K, Shirakawa T, Honda MJ. Characterization of mesenchymal progenitor cells in crown and root pulp from human mesiodentes. *Oral Dis.* 2015 Jan; 21(1):86-97.
 39. Ahmed N, Aboul E, Zakhary S, Badry T, Ramzy M. Isolation of Dental Pulp Stem Cells and their In Vitro Differentiation into Odontoblast-like Cells. *Maced J Med Sci.* 2011; (2): 1-8.
 40. Shekar R, Ranganathan K. Phenotypic and growth characterization of human mesenchymal stem cells cultured from permanent and deciduous teeth. *Indian J Dent Res.* 2012 Nov-Dec; 23(6):838-9.
 41. Samiei M, Aghazadeh M, Movassaghpour A, Fallah A, Aminabadi N, Pakdel S, et al. Isolation and Characterization of Dental Pulp Stem Cells from Primary and Permanent Teeth. *J Am Sci.* 2013; 9(12): 153-7.
 42. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, Hockema JJ, Woods EJ, Goebel WS. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *TissueEng Part C Methods.* 2008 Jun; 14(2):149-56.
 43. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-5.
 44. El Alami M. Obtención de células madre de la pulpa dental. caracterización y adaptación a diversas condiciones de oxígeno. [Tesis de doctorado]. Valencia: Universidad de Valencia; 2013.
 45. Souza L, Bittar J, Silva I, Toledo O, Brígido M, Fonseca M. Comparative isolation protocols and characterization of stem cells from human primary and permanent teeth pulp. *Braz. J. Oral Sci.* 2010; 9(4): 427-33.
 46. Hilkens P, Fanton Y, Martens W, Gervois P, Struys T, Politis C et al. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Res.* 2014; (12): 778–90.
 47. Agha-Hosseini F, Jahani M, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant.* 2010; 24(2): 23 – 8.
 48. Huang A, Chen Y, Chan A, Shieh T, Lin L. Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Stem/Stromal Cells From Nonextracted Crown-

- fractured Teeth Requiring Root Canal Therapy. *J Endod.* 2009; 35(5): 673-81.
49. Alongi D, Yamaza T, Song Y, Fouad A, Romberg E, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med.* 2010; 5(4): 617-31.
50. Pereira LO, Rubini MR, Silva JR, Oliveira DM, Silva IC, Poças-Fonseca MJ, Azevedo RB. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int Endod J.* 2012 Dec; 45(12):1080-90.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____
Identificado con DNI _____, domiciliado en _____ y
Número telefónico _____

Siendo legalmente capaz y estando en pleno uso de mis facultades mentales, autorizo la donación de un(os) diente(s) _____ en esta fecha a la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres. Soy consciente que este(os) diente(s) será(n) utilizado(s) para el proyecto de tesis: EFECTO COMPARATIVO DEL MÉTODO DE FRACTURA MECÁNICA Y EL MÉTODO DE CORTE EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL HUMANA. Soy consciente que este(os) diente(s) fue(ron) extraído(s) por indicación profesional para mejoría de mi salud, como está documentado en mi ficha clínica.

Estoy informado que el proyecto de tesis mencionado deberá haber sido previamente aprobado por el Comité de Ética respectivo, siendo preservada mi identidad.

Estoy informado de mi derecho a modificar esta declaración en cualquier momento.

Lima, _____ de _____ del 2016

Firma del donador o responsable
DNI: _____



Índice derecho

Firma del Cirujano dentista
Nombre: _____
DNI: _____
CPO: _____