



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

**MULTIPOTENCIALIDAD DE LA POBLACIÓN CELULAR DE LA
PULPA DENTAL HUMANA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

**PRESENTADA POR
MARITZA YOVANA ALCALA BENITES**

**ASESORA
ESPERANZA RAQUEL AYÓN HARO**

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO 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

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**MULTIPOTENCIALIDAD DE LA POBLACIÓN CELULAR DE LA
PULPA DENTAL HUMANA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

TESIS PARA OPTAR

EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

PRESENTADO POR:

MARITZA YOVANA ALCALA BENITES

ASESOR:

DRA. ESPERANZA RAQUEL AYÓN HARO

LIMA, PERÚ

2018



DEDICATORIA:

La finalización de mi tesis de pre-grado, quisiera dedicarle a mi papá al cielo y a mi mamá por su lucha y apoyo constante.

Conjuntamente a todas las personas que me apoyaron y animaron para este extenso camino, siendo inexplicable el sentimiento.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar a Dios por su infinita misericordia y por su muestra de amor que cada día me da.

A mi madre, por la lucha constante y persistente con la que me enseña a ver la vida.

A mi asesora, la Dra. Raquel Ayón, por la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Investigación. Le agradezco por su apoyo, su tiempo y esfuerzo en todo momento.

Contenido

INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	8
1.1 Antecedentes de la Investigación	8
1.2 Bases Teóricas	11
1.3 Definición de Términos Básicos	21
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	22
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	24
3.1 Diseño Metodológico	24
3.2 Diseño Muestral	24
3.3 Técnicas de Recolección de Datos	24
3.4 Técnicas Estadísticas para el Procesamiento de la Información	30
3.5 Aspectos Éticos	30
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	30
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	38
VI CONCLUSIONES	41
VII RECOMENDACIONES	41
FUENTES DE INFORMACIÓN	42
ANEXO N°1: MATRIZ DE CONSISTENCIA	47

RESUMEN

Con el tiempo se ha realizado estudios y se ha comprobado que las células madre de la pulpa dental tienen la capacidad para formar células con carácter osteogénico, adipogénico y neurogénico. La multipotencialidad de una célula es la capacidad para diferenciarse en diferentes tipos de células especializadas de un mismo tejido. En el Perú no se ha desarrollado estudios sobre la multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental humana. Se busca con la presente tesis dar un sustento teórico para así abrir una nueva línea de investigación en regeneración tisular a partir de la pulpa de una pieza dental extraída. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo determinar el porcentaje de la expresión de la multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental humana, mediante el análisis por citometría de flujo. La muestra celular se obtuvo de las pulpas de 4 terceras molares extraídas de pacientes con un rango de 22-28 años de edad, que acudieron al Centro Odontológico de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres. Las células obtenidas de la pulpa dental humana fueron aisladas mediante el método de digestión enzimática y se determinó la viabilidad celular con el colorante azul de tripán para luego ser analizada por citometría de flujo. Se utilizaron los marcadores CD90, CD105, CD45, CD34, CD117, CD11b, CD3, sugeridos por la Sociedad Internacional para la Terapia celular (SITC) para la identificación de células madre de la pulpa dental en procesos de investigación científica *in vitro*. Como resultados, el marcador CD90 obtuvo un rango de 57.25%-66.21%, CD105 obtuvo un rango de 2.69%-21.59% y la expresión de los marcadores CD34, CD45, CD117, CD11b y CD3 fue negativa. Se concluye que la población celular expresó marcadores de células madre mesenquimales con diferente nivel de expresión.

Palabras Claves: Multipotentes, antígenos de superficie, mesenquimal, citometría de flujo, célula madre, diferenciación celular.

ABSTRACT

Over time, studies have been carried out and it has been proven the dental pulp stem cells have the ability to form cells with osteogenic, adipogenic and neurogenic character. The multipotentiality of a cell is a characteristic to differentiate into different types of specialized cells of the same tissue. In Peru, studies on the multipotentiality of the cellular population of the human dental pulp have not been developed. It is thought with the present thesis to provide a theoretical sustenance to open a new line of research of tissue regeneration from the pulp of an extracted dental piece. Therefore, the present study aims to determine the percentage of multipotentiality expression of the dental pulp cell population through the flow cytometric analysis. The cellular sample was obtained from 4 third molars taken from patients between 22 and 28 years of age, who attended University of San Martin de Porres School of Dentistry-Dental Center. The cells obtained from the human dental pulp were isolated using the enzymatic digestion method and the cell viability was determined with the trypan blue dye, then analyzed by flow cytometry. The markers CD90, CD105, CD45, CD34, CD117, CD11b and CD3, suggested by the International Society for Cell Therapy (SITC) were used for the identification of dental pulp stem cells in in vitro scientific research processes. As results, the CD90 marker obtained a range of 57.25% 66.21%, CD105 obtained a range of 2.69%-21.59% and the expression of the markers CD34, CD45, CD117, CD11b and CD3 was negative. It is concluded that cell population expressed markers of mesenchymal stem cells with different level of expression.

Key words: Multipotent, surface antigens, mesenchymal, flow cytometry, stem cell, cell differentiation.

INTRODUCCIÓN

La pulpa dental posee una importante población celular que cuenta con odontoblastos, fibrocitos, fibroblastos, células madre mesenquimales, macrófagos y linfocitos¹. Se han realizado estudios donde se ha demostrado la multipotencialidad de una célula madre en la pulpa dental². La multipotencialidad corresponde a la capacidad de la célula para dar origen a distintos tipos celulares de un mismo tejido o capa embrionaria³. Teniendo como base estudios que nos muestran que las células madre de la pulpa dental humana pueden formar tejido osteogénico, condrogénico, adipogénico, miogénicos y neurales⁴. Este trabajo es el primer estudio en Perú que determina la expresión de multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental mediante la prueba de citometría de flujo. Dando así un sustento teórico - científico y un camino a un nuevo campo de investigación en la odontología peruana.

La importancia del estudio de las células madre de la pulpa dental en los campos de la odontología, como la periodoncia, cirugía bucal y endodoncia será dirigida a tratamientos integrales. La capacidad de células madre de producir hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento disminuiría la utilización de injertos óseos y a la misma vez reemplazaría tejidos perdidos a causa de enfermedades periodontales⁵. En el campo de cirugía ayudaría a procesos de neoformación para tratar problemas óseos maxilo-mandibulares⁶. En el campo de endodoncia, la terapia con células madre ayudaría a diseñar vasos sanguíneos funcionales con el propósito de formar pulpa dental normal modificando el tratamiento endodóntico⁷.

Se podría beneficiar al paciente como al clínico debido al empleo en la práctica clínico-quirúrgica diaria, puesto que el paciente podría en una misma intervención recibir un tratamiento que incluyese la utilización de sus propias células madre. A su vez el clínico ofrecería una mejor opción terapéutica a sus pacientes y un menor tiempo quirúrgico comparado con los métodos reconstructivos tradicionales^{6,7}. Siendo el producto final incentivar a futuros estudios experimentales de la Universidad de San Martín de Porres.

Estudios sugieren que las células de la pulpa dental constituyen una población celular heterogénea y presentan una población de células madre multipotentes, proliferativas y autorenovadoras⁸. De modo que las células madre derivadas de la pulpa dental ofrecen una gran esperanza cada vez más significativa en medicina y odontología regenerativa. Por lo tanto, la presente tesis tiene como objetivo general determinar la multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental humana mediante la expresión positiva y negativa de marcadores en las células de la pulpa dental.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes de la Investigación

LIAN Z. *et al.* 2018, compararon el fenotipo de las células madre de la pulpa dental humana extraída por dos métodos, explante y disgregación enzimática. Para la disgregación enzimática utilizaron colagenasa 3 mg/ml y dispasa 4 mg/ml. Para la inmunofenotipificación usaron la prueba de citometría de flujo. Utilizaron también pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, siglas en inglés) y Western Blott. Respecto a la expresión de CD90, las células que fueron extraídas por explante expresaron 99% y las células extraídas por disgregación enzimática expresaron 100%. En la expresión de CD44 los resultados fueron similares. Ambos grupos de células expresaron niveles bajos de CD34 y CD45. Como conclusión demostraron que no hubo diferencia en el análisis fenotípico al utilizar diferentes métodos de aislamiento celular⁹.

LIU Y. *et al.* 2018, evaluaron las células madre de la pulpa dental de dientes permanentes humanos (CMPD), células madre de dientes deciduos humanos (SHEDs, siglas en inglés) y células madre de la médula ósea (CMMO). Detectaron los marcadores CD90, CD73, CD105 y demostraron la expresión de la molécula, muerte celular programada (PD-1). Para CMPD y SHEDs los resultados de citometría fueron doblemente positivos para CD73, CD90, CD105 y PD-1. De acuerdo al análisis de RT-PCR, SHEDs expresaron mayores niveles de ARNm de PD-1 que CMPD. En el análisis de tinción inmunofluorescente, PD-1 se expresó

con tinción roja en SHEDs y CMPD. Demostrando así el papel de PD-1, para controlar la proliferación celular y la diferenciación multipotencial de células madre mesenquimales de la pulpa dental¹⁰.

PONNAIYAN D. et al. 2014, compararon la multipotencia, el potencial clonogénico, el crecimiento y la expresión de CMPD y CMMO mediante análisis de citometría de flujo y RT-PCR. En el análisis de citometría de flujo para reconocer como células madre mesenquimales a ambos grupos, los resultados fueron positivo \geq a 90% para CD90, CD29 y negativos \leq a 5% para CD34 y CD45. Las CMPD expresaron baja expresión de CD105 y sugirieron que es debido a que el marcador se encuentra asociado a hematopoyesis y migración celular. Verificaron mediante RT-PCR la diferenciación celular, en la línea osteogénica las CMPD se tiñeron más y para la diferenciación adipogénica las CMMO tuvieron un mayor porcentaje. Como conclusión dieron que las fuentes de células madre mesenquimales de ambos grupos poseen diferentes potenciales de diferenciación¹¹.

PATIL et al. 2014, evaluaron la expresión de marcadores, la tasa de proliferación y la morfología de las células madre de la pulpa dental, folículo dental y papila dental. La muestra fue un diente, utilizaron el método de disgregación enzimática y cultivaron. Caracterizaron las células madre mediante la prueba de citometría de flujo, tuvieron como marcadores más relevantes CD90, CD73, CD44, CD34 y CD45. Confirmaron la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica mediante métodos histoquímicos. Los resultados de la expresión de CD90 fue 99.7 % para células del folículo dental, 99.5 % para CMPD y 98.5 % para células de la papila dental. No hubo diferencia significativa en la expresión negativa de los marcadores CD45 y CD34. A su vez compartieron características similares en morfología, tasas de proliferación y diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica¹².

BRIZUELA C. et al. 2013, evaluaron la capacidad de diferenciación de CMPD y células madre del folículo dental humano. Las muestras fueron terceras molares impactadas y el método de extracción fue por explante. Las células fueron analizadas por citometría de flujo con los marcadores CD90, CD44, CD105, CD45 y CD34. Realizaron la diferenciación osteogénica y observaron minerales con rojo

alizarina. La diferenciación condrogénica la detuvieron cuando observaron micro-masa celular y la diferenciación adipogénica al observar adipocitos. Concluyeron que las células mesenquimales del folículo dentario tuvieron mayor potencial de diferenciación al expresar osteocitos, condrocitos y adipocitos mientras que las células de la pulpa solo expresaron osteocitos y condrocitos¹³.

PONNAIYAN D. et al. 2012, analizaron el fenotípico de las CMPD y las células madre mesenquimales del ligamento periodontal (PDLSCs, siglas en inglés). La muestra fueron 4 molares impactadas, su digestión enzimática fue con colagenasa 2 mg/ml tipo I y dispasa 4 mg/ml durante 1 hora. El análisis inmunofenotípico se realizó por citometría de flujo con la expresión positiva de los marcadores CD90, CD73, CD105, CD166 y negativos para marcadores CD34 y CD45. CD105 se expresó en 23.2% de CMPD y en 5.8% de PDLSCs respectivamente. CD90 se expresó en 99.5% de CMPD y en 99.6% de PDLSCs; y CD73 se expresó en 99.2% de CMPD y en 96.4% de PDLSCs. Como conclusión, mostraron que las células madre mesenquimales dependiendo del tejido relacionado podrían tener características distintas a pesar de su fuerte expresión de marcadores¹⁴.

MAGALLANES et al. 2010, evaluaron el aislamiento, la caracterización y la diferenciación celular de células madre derivadas de la pulpa dental humana. La muestra fueron 5 premolares. Utilizaron el medio *Dulbeccos modified eagle medium* (DMEM, siglas en inglés), colagenasa 3 mg/ml y dispasa 4 mg/ml. Para el cultivo celular agregaron DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB), antibióticos, antifúngicos, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio. A los 14 días observaron al microscopio, células alargadas, aplanadas de tipo fibroblástico. Para el análisis de inmunocitoquímica, utilizaron marcadores membranales, STRO-1 y CD44 específicos de células progenitoras mesenquimales. Para la diferenciación celular hacia un fenotipo mineralizante analizaron la expresión de dos proteínas, sialoproteína ósea (BSP) y osteopontina (OPN) mediante PCR e inmunocitoquímica. Como resultado obtuvieron que las células madre derivadas de la pulpa dental presentaron las principales características, ser clonogénicas y multipotenciales debido a su diferenciación a un fenotipo mineralizante¹⁵.

1.2 Bases Teóricas

2.2.1 Multipotencialidad

La multipotencia es la capacidad de una célula madre en diferenciarse en múltiples tipos de células especializadas funcionalmente maduras. Dentro de la literatura clasificamos a las células madre: embrionaria, adulta e inducida. Siendo la mejor candidata la célula adulta debido a sus características biológicas, dentro de esta clasificación encontramos a las células madre hematopoyéticas y mesenquimales¹⁶. A las células madre mesenquimales se les considera precursoras multipotentes debido a su capacidad por diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*. Se ha demostrado que a pesar de aislarse y expandirse luego de los diferentes pasajes en los medios de cultivo no pierden su capacidad mesenquimal multipotente, convirtiéndolas así en células con alto potencial para desarrollar investigaciones en medicina regenerativa^{16,17}.

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC) debido a la ambigüedad e inconsistencia que se ha dado en los últimos años, ha establecido criterios de identificación de células madre mesenquimales únicamente para fines de investigación. Estos criterios se indican a continuación:

- a) Utilizando citometría de flujo, los marcadores CD105, CD90 y CD73 deben presentar una expresión positiva $\geq 95\%$ y los marcadores CD45, CD34, CD11b, CD14 y CD19 deberían tener una expresión $\leq 2\%$ o negativa.
- b) Las células madre mesenquimales deben ser adherentes al plástico, mantenerse aún después de su expansión en los pasajes de los cultivos.
- c) La capacidad de diferenciación en cultivo *in vitro* de las células madre mesenquimales debe ser hacia osteoblastos, condrocitos y adipocitos¹⁸.

2.2.2 Marcadores de multipotencialidad

En el 2006, Beyer Nardi *et al.* demostraron que fenotípicamente la expresión de algunos marcadores: CD90+, CD105+, CD29+, STRO-1+, CD34/35-, ayudan a la clasificación del grupo de células madre mesenquimales humanas¹⁹.

La población celular de CMPD se caracteriza por la expresión de los antígenos de superficie celular utilizando métodos basados en anticuerpos. Al ser las CMPD una población heterogénea no todas expresan los mismos marcadores y no tienen el mismo porcentaje de expresión¹⁶.

CD 90 También llamado Thy-1, proteína ligada la interacción célula-célula y matriz-célula²⁰. Wiesmann *et al.*, demostraron que CD90 se expresó durante la proliferación pero que disminuyó cuando las células van diferenciándose en células de tipo osteoblástico²¹.

CD105: También llamado endoglina, se encuentra dentro de los co-receptores accesorios para el factor de crecimiento (TGF- β), a su vez regula la proliferación celular, la diferenciación, la migración y la adhesión²². Varma *et al.*, estudiaron la expresión de CD105 en las células madre del tejido adiposo donde demostraron una gran diferencia en la expresión de tal marcador. Su expresión es mucho mayor en el análisis del cultivo que al ser recién aisladas²³. Aun así, el estudio sugiere que dicho marcador puede no ser útil para la detección *in vivo* de células madre mesenquimales²⁰.

CD34: Es una glicoproteína de membrana, se utiliza como un marcador para ayudar en la identificación y aislamiento de células madre hematopoyéticas. Actualmente se ha dispuesto como marcador para ayudar a identificar otras células madre específicas de tejido, incluidas las células satélites de los músculos y los precursores de la epidermis.

Dentro de sus funciones, se incluye potenciar la proliferación y bloquear la diferenciación de células madre. A su vez la familia de proteínas CD34 tiene buena adhesión de linfocitos al endotelio vascular especializado en tejidos linfoides²⁴.

CD45: Es una glicoproteína de superficie celular de leucocitos más abundantes, principalmente sobre las células hematopoyéticas. También llamada pan-leucocitario, CD45 ha sido reconocido como miembro de la proteína tirosina fosfatasas (PTP, siglas en inglés). Se considera importante en la proliferación de linfocitos T estimulado por antígenos y desarrollo tímico²⁵.

CD117: es una glicoproteína transmembrana, familia del receptor tirosina quinasas²⁶. Ahmadi *et al.* demostraron que CD117 se expresa en leucemias por lo que se cree que es un marcador confiable para identificar la diferenciación mieloide. A su vez recomendó incluir en el panel primario del análisis de citometría de flujo a dicho marcador debido a su alta especificidad²⁷.

CD11b: Es un miembro de la familia de la integrina. CD11b se expresa en la superficie de muchos leucocitos, incluidos monocitos, neutrófilos, células asesinas naturales, granulocitos y macrófagos. Por lo tanto, SITC lo incluye en el panel de antígenos con expresión $\leq 2\%$ para células madre mesenquimales¹⁸.

CD3: Es un miembro de la familia de las inmunoglobulinas, se localiza en la superficie celular de linfocitos T inmaduros o llamados también timocitos. Se expresa en un alto porcentaje de células T.

2.2.2 La pulpa dental

La pulpa dental es un tejido conectivo en el cual existen diferentes tipos de células, donde podemos encontrar fibroblastos, odontoblastos, pericitos, células endoteliales, y células mesenquimales indiferenciadas, entre otros²⁸.

La pulpa dental se puede dividir en cuatro zonas:

- a) Zona Odontoblástica: compuesta principalmente por odontoblastos, se encuentra en contacto con la predentina.
- b) Zona Acelular o Capa basal de Weil: la presencia o ausencia de elementos se encuentra regulada por el estado funcional de la pulpa.
- c) Zona Central de la pulpa dental: en esta zona encontramos los troncos nerviosos y vasculares, siendo la célula más destacada el fibroblasto²⁹.

Dentro de la pulpa encontramos diferentes células:

- a) Odontoblastos: Por su alta capacidad secretora representan la principal dirección de diferenciación para las células derivadas de la pulpa dental que producen y secretan colágeno I en el espacio extracelular y forman la interfaz pre-dental. Además de los componentes de colágeno, los odontoblastos también sintetizan sialofosfoproteína destinaria, matriz de dentina, fosfoproteína ácida, decorina y biglicano²⁸.
- b) Fibroblastos: Son las más abundantes y presentan forma de estrella. Estos sintetizan colágeno tipo I y II y se encuentran en toda la pulpa, pero principalmente en la zona central.
- c) Macrófagos: Forman parte de la respuesta inmunológica frente a un daño, tienen actividad fagocítica y actúan como reservorio para sustancias extrañas que son destruidos por acción de enzimas lisosomales.
- d) Células dendríticas: Células que presentan antígenos con el propósito de activar a los linfocitos T.
- e) Linfocitos: Se activan con la presencia de antígenos, para la vasodilatación pulpar. En una pulpa sana se encuentran linfocitos T.
- f) Células madre mesenquimales: Se encuentran en la zona central y celular de la pulpa dental³⁰.

2.2.3 Células madre

La célula madre (CM) o *stem cell* se define como células capaces de dividirse continuamente y producir células progenitoras con capacidad de dar lugar a células con potencial de origen osteogénico, condrogénico, adipogénico y neuronal³¹. Las primeras células madre fueron halladas en la médula ósea pero con el tiempo se ha ido descubriendo más lugares donde podemos encontrarlas, tales como en el músculo cardíaco, esquelético, cerebro, retina, páncreas, cordón umbilical y tejido graso. Las células madres se pueden agrupar según su origen: embrionarias y adultas; según su tejido: médula ósea, piel, tejido, pulpa; y según su potencial de diferenciación: células totipotentes, células pluripotentes, células multipotentes, células oligopotentes y células unipotentes⁷.

Las células madre embrionarias son células que se obtienen de la masa celular interna de un embrión en sus primeros días. Las células madre adultas son células que se encuentran dentro de un tejido específico de un organismo ya

formado. Las células madre inducidas son aquellas células adultas que se han transformado en células pluripotentes debido a la adición de un reducido grupo de genes ^{7,32}.

Podemos mencionar las ventajas y desventajas de las CM embrionarias y CM adultas. Las ventajas de las CM embrionarias es su capacidad de formar cualquier célula de tipo inmortal y fácilmente asequible, la desventaja es su obtención compleja. Presenta problemas éticos-legales y crea un alto porcentaje de tumores en los animales de experimentación. Por otro lado, la obtención de células madre adultas es sencilla, pueden ser autólogas y no presentan limitantes. Los reportes no han demostrado que produzcan neoplasias. Su desventaja es la complejidad para obtenerlas en altos porcentajes, el tiempo de duración en los cultivos es corto, y existe riesgo de que las células puedan perder viabilidad y lleven mutaciones que causen enfermedades³².

De acuerdo a la capacidad de diferenciación, las células madre totipotenciales corresponden exclusivamente al cigoto y los descendientes de las dos primeras divisiones ya que dan origen a formar el embrión y el trofoblasto de la placenta. Las células madre pluripotenciales tienen la capacidad de diferenciarse en las tres líneas germinales, como la masa celular interna del blastocito, sin embargo, no tienen la capacidad de formar la placenta. Las CM multipotenciales, limitadas a diferenciarse a un linaje celular específico de acuerdo a su ubicación y CM unipotenciales, son aquellas que generan un tipo celular específico ^{32,33}.

2.2.4 Nichos de la célula madre

El nicho es un microambiente donde se encuentran las células madre. A través del tiempo se han realizado estudios para identificar la interacción que existe entre las células y su hábitat. Esta interacción es regulada por quimiocinas, CXCL12, la más importante, que tiene como función favorecer la supervivencia, adhesión y localización de las células madre en la médula ósea. CXCL12 es esencial para el desarrollo hematológico temprano y está presente principalmente en las células endoteliales y células madre mesenquimales. Para que las células madre se mantengan en homeostasis dentro del nicho los siguientes factores deben mantenerse en armonía; los osteoblastos, la matriz extracelular, electrolitos extracelulares, prostaglandinas y señales adrenérgicas.

El propósito de la regulación de las células madre dentro de un ciclo circadiano es el desplazamiento de las células en el organismo para mantener el equilibrio frente a un daño orgánico o una enfermedad. Por lo tanto, el nicho es un hábitat complejo donde los osteoblastos tienen un papel esencial para mantener las células madre en homeostasis y en armonía dentro de éste³⁴.

Songtao Shi, en el año 2003 evaluó la presencia de STRO-1, marcador que se encuentra en diversos tipos de células madre mesenquimales, para localizar los nichos de CMPD. Él demostró que STRO-1 se expresó en las paredes externas de los vasos sanguíneos de la pulpa dental, por lo tanto, sugirió que las CMPD residen en su microvasculatura de origen³⁵.

2.2.5 Las células madre de la pulpa dental

En el año 2000 el Dr. Gronthos publica que los dientes permanentes presentan células madre⁸. Luego en el año 2003 Miura *et al.* demostraron que, en las células de los dientes primarios, también se encuentran células madre multipotentes que son capaces de diferenciarse, él las nombra “Células Madre Humanas de Dientes Exfoliados” (SHEDs, siglas en inglés)³⁶.

Las células de la médula ósea como las células de la pulpa dentaria proceden de la cresta neural ya que existen reportes que muestran que los tejidos de la pulpa de dientes deciduos presentan los marcadores STRO-1 y CD146. Es por ello comparten cierta actividad génica y comportamiento biológico similar³⁵. Chai *et al.*, muestran que el desarrollo del odontoblasto se origina en línea directa de las células de la cresta neural, así como embriológicamente una gran parte de los tejidos dentales³⁷. Se ha reportado que las células madre de la pulpa dental pueden encontrarse en la región perivascular de la pulpa dental debido a que los marcadores CD146+ y STRO-1 no se presentan alrededor del tejido fibroso y se encuentran limitados en las paredes de los vasos sanguíneos³⁵. Diversos autores se han dedicado al estudio de los diferentes grupos de células en la cavidad bucal y clasifican a las células madre en células madre del ligamento periodontal (PDLSCs, siglas en inglés), células madre del folículo dental (DFPCs, siglas en inglés), células madre del diente deciduo, células madre de la papila dental (SCAP, siglas en inglés) y CMPD⁶.

Asimismo, las investigaciones sobre células madre se han enfocado en regeneración. Gronthos *et al.* realizaron un estudio *in vitro* e *in vivo* donde compararon la capacidad osteogénica de CMPD y CMMO. El estudio *in vitro* demostró que los cultivos de CMPD tardan 5-6 semanas para formar nódulos condensados con altos niveles de calcio a diferencia de los cultivos de CMMO que en 3-4 semanas inducidas con el mismo medio producen extensas láminas de depósitos cálcicos. Asimismo, demostraron *in vivo* que los trasplantes de CMPD expresaron componentes de la matriz dentinaria como sialoproteína ósea y osteocalcina. Demostrando así que las CMPD tienen un alto potencial de generar un complejo dentina/pulpa dentro de condiciones similares a CMMO⁸.

Wang *et al.* cultivaron células madre pulpaes con origen xenogénico *in vitro* e *in vivo* para demostrar que un microambiente con estas células genera la potencialidad para diferenciarse en un linaje odontogénico. Mostraron que la probabilidad para formar una estructura que contenga dentina de manera regular y células similares a odontoblastos es alta cuando existen factores liberados por un medio que contengan células germinales de dientes con origen humano y xenogénico. Siendo así un potencial en la bioingeniería con la fabricación del sistema de un diente³⁸.

Respecto a los avances en la regeneración neurogénica de las células madre de la pulpa dental, Fuji H. *et al.* estudiaron las células madre de los dientes deciduos exfoliados y llegaron a la conclusión que estas células son potencialmente útiles en el desarrollo del tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Demostraron que las neuronas dopaminérgicas nigroestriadas podrían ser suficientemente inducidas a partir de las células madre de dientes exfoliados y que estas células tendrían beneficios. Además, demostraron que los efectos paracrinos de las células madres de los dientes exfoliados contribuyeron la neuroprotección contra la neurodegeneración inducida por la toxicidad de 6-OHDA y un crecimiento acelerado *in vitro*³⁹.

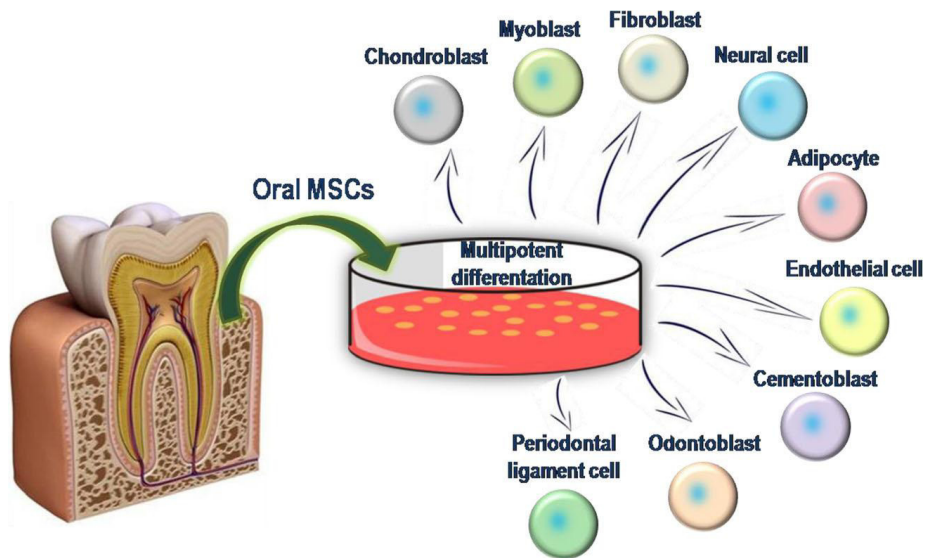


Figura 01. Diferenciación multipotente de células mesenquimales de la pulpa dental.

FUENTE: Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev.* 2016 Oct; 12(5):511-23.

2.2.6. Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica cuantitativa que se utiliza para el análisis de células u otras partículas en suspensión. La base de su mecanismo radica en pasar células alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. El resultado de esta acción puede presentarse de dos maneras. La generada por la dispersión de luz y la relacionada con la emisión de luz por fluorocromos presentes en la célula al ser excitada por un rayo luminoso. Las señales que son detectadas se convertirán en impulsos eléctricos que se amplificarán y se convertirán en señales digitales que serán procesadas en una computadora⁴⁰.

Con el paso de los años el software utilizado por la citometría de flujo ha ido mejorando y teniendo nuevas versiones con el objetivo de detectar con mayor fiabilidad las poblaciones que representan el 0,01% de los eventos es decir 1 célula en 10,000⁴¹.

Los criterios intrínsecos en los que se basa la citometría de flujo en relación a su evaluación celular son las definiciones de dispersión frontal o *Forward Scatter Channel* (FSC) y dispersión lateral o *Side Scatter Channel* (SSC). El primero nos informa el tamaño celular y el siguiente la complejidad. La valoración de estos criterios se desarrolla mediante gráficas, pueden ser monoparamétricas y

diparamétricas. Un ejemplo de monoparamétricas es el histograma, donde se encuentran dos ejes “X” y “Y”. “X” representa la intensidad de la fluorescencia y “Y” el número de células a las que se le ha medido la intensidad. El ejemplo de diparamétrica es el “dot-plot”, donde la intensidad de fluorescencia se representa a modo de puntos. En ambas gráficas se puede delimitar agrupaciones celulares con características específicas mediante ventanas citométricas (“*gates*”) o cuadrantes⁴².

Para lograr un buen mecanismo del análisis citométrico, se requiere protocolos que se podrían resumir en 3 fases: a) tener la suspensión de células, b) traslado de las células a unos tubos con anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes o fluorocromos (Isotiocianato de fluoresceína o FITC, ficoeritrina o PE) y c) lavados cíclicos para eliminar debris⁴³.

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben la luz a una establecida longitud de onda emitiendo otra diferente. Se determinan por sus espectros de excitación y emisión que varían de acuerdo al tipo de fluorocromo a utilizar^{39, 40}. La integración de fluorocromos se debe a que la fluorescencia celular espontánea es limitada, por lo tanto, es necesario introducir la fluorescencia a las células mediante el marcaje con anticuerpos combinado con fluorocromos⁴².

Dentro de los fluorocromos más utilizados encontramos:

- a) Isotiocianato de fluoresceína (FITC, siglas en inglés) es un colorante que se utiliza con un marcador para la detección de antígenos sobre las superficies celulares⁴⁴. Su canal de fluorescencia es color “verde”, su nivel de excitación máxima es 494 nm y su nivel de emisión máxima es de 519 nm. Teniendo así un alto nivel de eficiencia de transferencia de energía⁴³.
- b) Ficoeritrina, cuya abreviatura es “PE”, es una molécula altamente brillante debido a sus elevados cromóforos. Su canal de fluorescencia es color “amarillo”, su nivel de excitación máxima es 496 nm y su nivel de emisión máxima es de 578 nm.
- c) PerCP-Cy 5.5”, fluorocromo denominado “conjugado doble” debido a que traslada su energía a la molécula cianina generando una emisión más larga que Peridina clorofila (PerCP, siglas en inglés). Su canal de fluorescencia es de color “rojo”, su nivel de excitación máxima es 482 nm y su nivel de emisión máxima es de 695 nm⁴³.

- d) Aloficocianina, cuya abreviatura es “APC”, contiene 6 cromóforos por molécula, al que también se le denomina “muy brillante”. Su canal de fluorescencia es de color “rojo”, su nivel de excitación máxima es 650 nm y su nivel de emisión máxima es de 660 nm⁴³.
- e) V450, fluorocromo de alta sensibilidad, color “violeta”. Su nivel de excitación máxima es de 404 nm y su nivel de emisión máxima es de 448 nm⁴⁴.

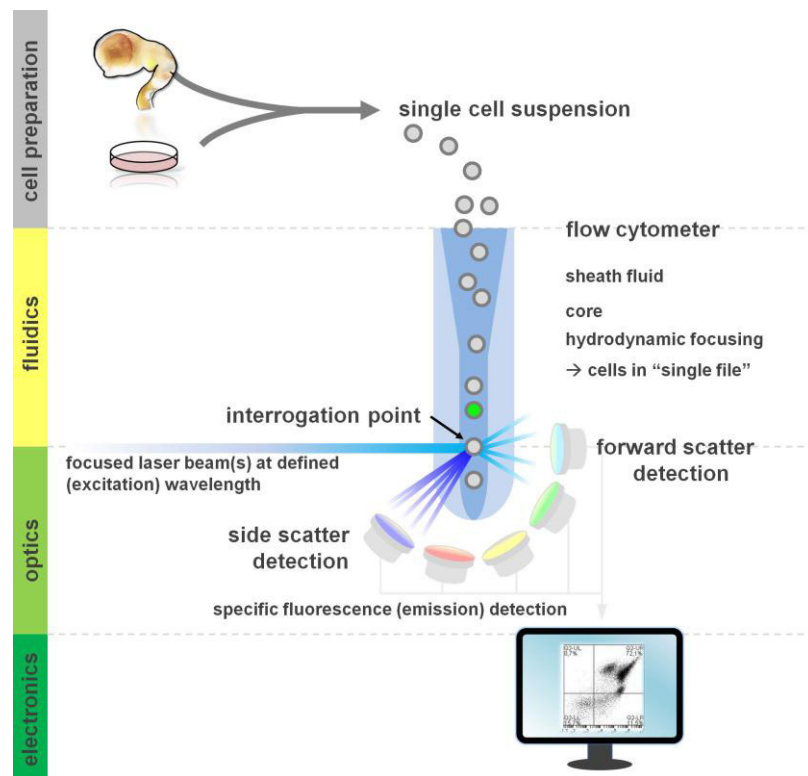


Figura 02. Principio de análisis de citometría de flujo y componentes de un citómetro de flujo.

FUENTE: Menon V, Thomas R, Ghale AR, Reinhard C, Pruszek J. Flow cytometry protocol for surface and intracellular antigen analyses of neural cell types. J Vis Exp. 2014 Dec; 18;(94):1-11.

La técnica de citometría de flujo en la identificación, caracterización y aislamiento de células madre se considera una herramienta sumamente útil debido a su capacidad para realizar rápidamente mediciones cuantitativas en células individuales dentro de una población heterogénea. Sin embargo, debido a la variedad extensa de estas células se requiere complementar con otras técnicas. La ventaja de analizar por citometría de flujo frente a la técnica de PCR es que ésta diferencia células viables y muertas. A su vez mide la proporción de células positivas⁴⁵. Nery *et al.* realizaron estudios de citometría de flujo en las células madre mesenquimales, dando así una base para la importancia de ésta en la caracterización de poblaciones celulares recomendando usar Solución Salina Tamponada con fosfato (*PBS*, siglas en inglés) con albúmina sérica (*BSA*, siglas en inglés) al 0.1% para impedir la degeneración de las membranas celulares^{45,46}.

1.3 Definición de Términos Básicos

Células Multipotentes: Células que puede dar origen a todos los tipos celulares de un determinado linaje. Ejemplo: células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales.

CD90: También llamado Thy-1, marcador de precursores mesenquimales tempranos²¹.

CD105: Llamado también “endoglina”, regula los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina y el colágeno²³.

CD34: Identifica células en los capilares y en la adventicia de los vasos sanguíneos, progenitoras hematopoyéticas²⁴.

CD45: Antígeno expresado en manera constitutiva en células hematopoyéticas, identifica leucocitos y permanece estable en células maduras²⁵.

CD117: Expresado en células sanguíneas, precursores mieloides²⁷.

CD11b: Identifica leucocitos maduros, expresado en células hematopoyéticas. A su vez identifica la línea granulocítica: neutrófilos, monocitos, etc¹⁸.

CD3: Antígeno que se utiliza para la identificación y cuantificación del porcentaje de linfocitos T¹⁶.

7AAD: 7-aminoactinomicina D, marcador de viabilidad que identifica las células no viables uniéndose al núcleo.

Medio esencial modificado mínimo de Eagle (DMEM): Es un medio utilizado para el cultivo celular desarrollado por Harry Eagle. Contiene vitaminas y aminoácidos.

Isotiocianato de fluoresceína o FITC: Colorante con una fluorescencia color “verde”, que se usa para el diagnóstico celular y se emplea en exámenes citológicos de muestras de origen humano⁴⁴.

Ficoeritina o PE: Colorante fluorescente de color “amarillo”, denominado “altamente brillante”.

PerCP-Cy 5.5: Denominado “conjugado doble” con canal de fluorescencia color “rojo”⁴³.

V450: Colorante fluorescente de color “violeta”, con una absorción máxima de 404 nm y un pico de emisión de 448 nm.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Formulación de Hipótesis

2.1.1 Hipótesis general

La población celular de la pulpa dental presenta un alto nivel de expresión de multipotencialidad.

2.1.2 Hipótesis específicas

H1- La población celular de la pulpa dental presenta expresión de multipotencialidad.

Ho-La población celular de la pulpa dental no presenta expresión de multipotencialidad.

2.2 Variables y Definición Operacional

2.2.1 Variables y definiciones

Variable Independiente: Población celular de la pulpa dental humana.

Variable Dependiente: Expresión de multipotencialidad.

2.2.2 Operacionalización de variables

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	CATEGORÍA O VALOR	TIPO	ESCALA
Principal (es)					
Independiente	Población celular de la pulpa dental	Células viables de la pulpa dental.	Presencia – Ausencia.	cualitativo	nominal
Dependiente	Multipotencialidad	CD90 CD105 CD34 CD45 CD117 CD11b	Porcentaje 0-100%	cuantitativo	De razón
Intervinientes	Edad	22-28	intervalo	cuantitativo	De razón

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Diseño Metodológico

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo y transversal.

Descriptivo: Se describió la población celular a través de los datos de la citometría de flujo.

Prospectivo: Se obtuvo la población celular y datos de la citometría de flujo post exodoncia de las piezas dentarias.

Transversal: Se analizó los datos de la citometría de flujo inmediatamente después de obtener la población celular de la pulpa dental de terceras molares extraídas.

3.2 Diseño Muestral

Población:

Células de la pulpa dental de premolares y terceras molares post exodoncia de pacientes que acudieron al Centro Odontológico- Universidad de San Martín de Porres.

Muestra

El presente estudio utilizó células de la pulpa dental provenientes de 04 terceras molares de diferentes pacientes entre 22-28 años de edad. Los pacientes fueron informados del presente estudio y firmaron el consentimiento de donación voluntaria de sus terceras molares extraídas, aceptando colaborar en el estudio.

Criterios de inclusión:

- Terceras molares extraídas de pacientes sanos que no presenten lesión cariosa.
- Terceras molares extraídas por motivos profilácticos y/o ortodónticos con no más de 24 horas post exodoncia y procesamiento de la pieza dental.
- Terceras molares extraídas mediante técnica de exodoncia simple.
- Terceras molares extraídas en estadio de Nolla 10.

Criterios de exclusión:

- Terceras molares que radiológicamente presenten fracturas.
- Terceras molares extraídas por odontosección.
- Terceras molares con afecciones periodontales.
- Escasa población celular obtenida del procesamiento de las piezas dentales post exodoncia.

3.3 Técnicas de Recolección de Datos

Antes de la exodoncia simple los pacientes firmaron el consentimiento informado (Anexo 01). Las piezas dentales fueron extraídas en el Centro Odontológico de la Universidad de San Martín de Porres entre febrero y junio 2018.

Los datos registrados en la ficha diseñada para el estudio fueron: código de la pieza, edad del paciente, género del paciente, fecha y hora de la exodoncia, hora de inicio del procesamiento, número total de la población celular y porcentaje de viabilidad.

Procedimiento:

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las normas vigentes por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres. Las muestras fueron terceras molares extraídas en el Centro Odontológico de la Universidad de San Martín de Porres. El paciente realizó enjuagatorios con Clorhexidina 0.12% por 1 minuto antes de la exodoncia. Inmediatamente después de la exodoncia la pieza dental fue depositada en un tubo estéril que contenía:

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM); Medio de transporte con Baja glucosa 1 g/litro, bicarbonato de sodio, piruvato de sodio y L-glutamina.
- Antibióticos (Penicilina 100 U/ml y Estreptomicina 100 µg/ml)
- Anfotericina B 250 µg/ml.

El transporte de la pieza dental hasta el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Martín de Porres – Sede Santa Anita se realizó en cadena de frío conservándolo a 4°C. En la cabina de flujo

laminar se limpió la pieza con gasa embebida con etanol al 70%. Inmediatamente se sometió la pieza a tres baños (Figura 03).

- 1er baño: DMEM+ PE-ST 1 % + Nistatina 16 µg/ml por 30 minutos
- 2do baño: DMEM por 20 minutos
- 3er baño: DMEM+ PE-ST 1 % + Nistatina 16 µg/ml por 20 minutos

Luego de los tres baños, fuera de la cabina de flujo laminar se fracturó la pieza con el método de fractura mecánica (Figura 04). Se trasladó a la cabina de flujo laminar la pieza fracturada en una gasa y se colocó en una placa Petri (Figura 05). Se separaron únicamente los restos pulpares en las placas petri y se cortaron con una hoja de bisturí # 15 en trozos de 1 mm y 2 mm (Figura 06). Los restos cortados se llevaron a un microtubo y se realizó la digestión enzimática de los fragmentos con 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa tipo II (Figura 07). Se llevó a la incubadora durante 45 minutos en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y 3% O₂ (Figura 08)⁴⁷.

Al finalizar el tiempo de incubación, se filtraron los restos pulpares. Luego se trasladaron a un tubo de 15 ml y se llevaron a centrifugar a 1100 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante quedando únicamente el *pellet* en el fondo del tubo. Se resuspendió con 1 ml de Solución Salina Tamponada con fosfato.

Se retiró 10 µL de la suspensión celular obtenida y 10 µL del colorante azul de tripán al 0.4%. Inmediatamente se colocó la mezcla homogénea en la cámara de Neubauer y se llevó al microscopio óptico (Figura 09). Se procedió al conteo de la población celular para obtener la viabilidad^{47, 48}.

Para el conteo celular se consideró a las células azules (muertas) y a las células blancas (vivas), en cada cuadrante. Se utilizaron las siguientes formulas:

$$\text{N}^\circ \text{ células} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas} \times \text{factor de dilución} \times 10^4 \times \text{Vol. Solución}}{\text{N}^\circ \text{ de cuadrantes contados}}$$

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

Al obtener buena cantidad de células y una alta viabilidad, se transfirió a un tubo de 15 ml, en cadena de frío, conservándolas a 4°C.

Para determinar los marcadores de multipotencialidad se trasladó la muestra al Instituto de Investigación y Aplicación Celular. Se utilizó el citómetro de flujo BD FACSCanto*II.

Posteriormente se trasladó 100 μ L de la suspensión celular a un nuevo tubo de 5 ml. Se centrifugó a 2500 rpm por 4 minutos. Se añadieron los siguientes marcadores ligados a sus fluorocromos: CD90-FITC (BD Pharmingen™, San Diego), CD105-PE (BD Biosciences, San José), CD34-PerCP-Cy 5-5 (BD Biosciences, San José), CD117-PE (BD Biosciences, San José), CD11b-APC (BD Biosciences, San José), CD3-APC (BD Biosciences, San José), CD45-V450 (BD Biosciences, San José) (Figura 10). Se mantuvo durante 30 minutos a 18°C. En toda población celular se encuentran glóbulos rojos, por lo tanto, se agregó al mismo tubo 1 ml de solución lisante a base de amonio (BD FACS™ Lysing Solution, San José) y se mantuvo a temperatura ambiente por un tiempo de 15 minutos. Luego se centrifugó a 2500 rpm por 4 minutos. Se agregó al tubo 3 ml de PBS y se centrifugó por 5 minutos. Finalmente se llevó la muestra al citómetro de flujo BD FACSCanto*II.

La viabilidad celular se determinó colocando el tubo con la suspensión celular al vórtex VWR Estándar Mini Vórtex por 2 minutos y se trasladó 100 μ L a un nuevo tubo de 5 ml, llevándolo a centrifugar a 2500 rpm por 4 minutos. Se añadió colorante 7 AAD (Beckman Coulter Stem-Kit™ Reagents, San José) y se mantuvo por 30 minutos a una temperatura de 18°C. Luego se agregó una solución lisante a base de amonio y se llevó a incubar en las mismas condiciones por un tiempo de 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 4 minutos, agregando al tubo 3 ml de PBS al tubo. Se volvió a centrifugar el tubo en las mismas condiciones y finalmente se llevó al citómetro Beckman Coulter.

Todos los datos se registraron en el Software de Adquisición “BD FACSDIVA™ Software- BD Biosciences”.

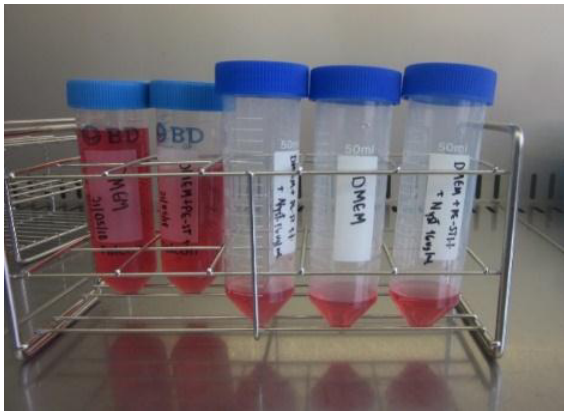


Figura 03. Baños antibióticos.



Figura 04. Método de fractura.



Figura 05. Extracción de la pulpa dental.

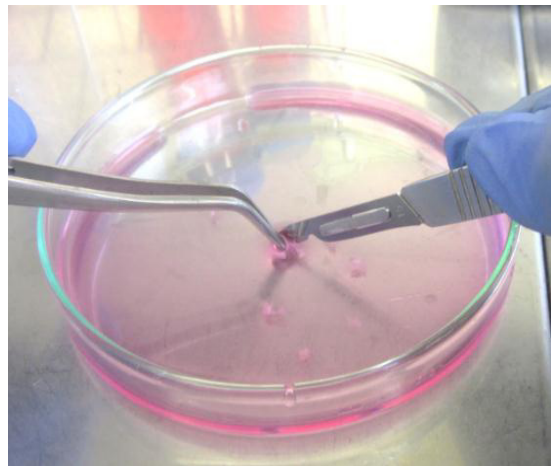


Figura 06. Restos de la pulpa dental.

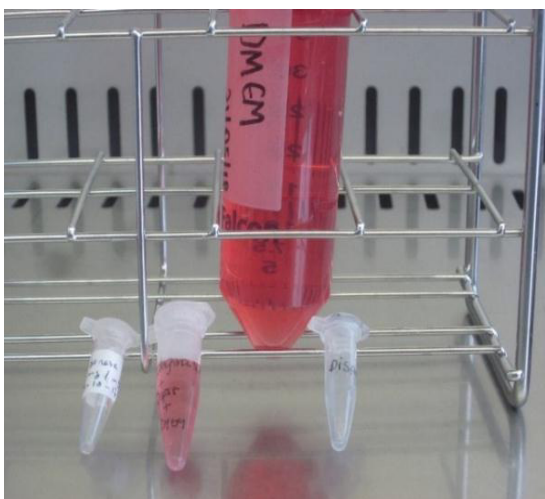


Figura 07. Baño enzimático.



Figura 08. Incubadora CO2Cell 50 Standard.

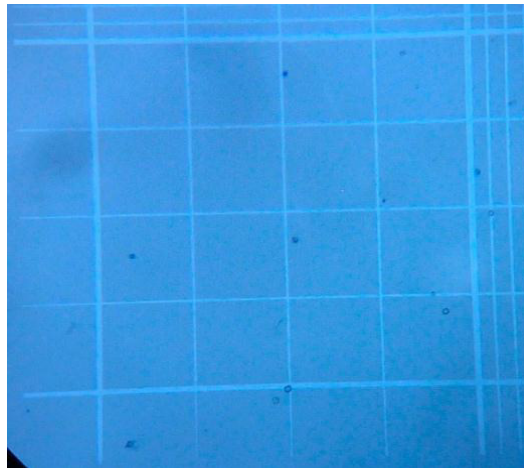


Figura 09. Conteo celular con el microscopio óptico.



Figura 10. Marcadores de multipotencialidad. CD90-FITC, CD105-PE, CD34, PerCP-Cy 5-5, CD117-PE, CD11b-APC, CD3-APC y CD45-V450.



Figura 11. Citómetro de flujo BD FACSCanto* II.



Figura 12. Citómetro de flujo "Cytomics FC500"



Figura 13. Reactivos para viabilidad. 7-AAD, CD45-FITC y CD34-PE.

Los datos obtenidos se registraron en la ficha de recolección de datos (Anexo N°2).

3.4 Técnicas Estadísticas para el Procesamiento de la Información

Para el procesamiento de datos se utilizó el Software de Adquisición “BD FACSDIVA™ Software- BD Biosciences”. Los resultados se expresaron en gráficos paramétricos y biparamétricos.

3.5 Aspectos Éticos

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación.

Los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio firmaron un consentimiento informado de donación voluntaria de su pieza dental. (Anexo N°1).

El investigador declara no tener conflicto de intereses.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

En el presente estudio se emplearon 04 molares correspondientes a 04 pacientes cuyas edades oscilaban entre un rango de 22 y 28 años de edad con el objetivo de determinar la multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental de

piezas dentales humanas. Se utilizó el análisis por citometría de flujo mediante marcadores de multipotencialidad.

Según la SITC la expresión de antígenos CD90 y CD105 debe ser positiva frente a presencia de células mesenquimales y la expresión de los antígenos CD45, CD34, CD3, CD117 y CD11b debe ser negativa debido a que son marcadores de células hematopoyéticas¹⁸.

Mediante el uso del programa "BD FACSDIVA™ Software-BD Biosciences" se facilitó un gráfico de puntos "Dot Plot" (Figura 14). Donde se expresó el FSC (Eje "X" y SSC (Eje "Y"), el primero nos proporciona el tamaño celular y el siguiente la complejidad. En la figura se ha separado mediante un "gate", una población de células de la pulpa dental humana que compartían un tamaño y complejidad dentro de la muestra.

En las figuras 15A, 16A, 17A y 18A se observan los histogramas monoparamétricos con la población celular de la pulpa dental humana. Se relaciona el eje "X" y eje "Y" correspondiente a la intensidad de fluorescencia y al número de células respectivamente. Se encuentran en escala logarítmica decimal, las escalas logarítmicas son de gran importancia debido a que agrupa señales altas y logra distinguir al control negativo. Las regiones color verde y fucsia representan la población celular con los marcadores CD105, CD90, CD45, CD34, CD3, CD117, CD11b y la región color rojo representa el control negativo. Para el control negativo se utilizó la expresión de los marcadores CD3 y CD45. Así se demostró que dentro de la población celular no se encontraron linfocitos.

Los rangos que se obtuvieron de los marcadores positivos para células madre mesenquimales fueron para CD90 (57.25%-66.21%), del marcador CD105 fue (2.69%-21.59%) y negativo (0%) a los marcadores CD45, CD34, CD11b, CD3, CD117. La interpretación de resultados se ha dado mediante comparación de curvas.

En las figuras 15B, 16B 17B y 18B se observan gráficos biparamétricos (diagrama de puntos). Donde el eje "X" representa la intensidad de fluorescencia del marcador CD90-FITC y el eje "Y" representa la intensidad de fluorescencia del marcador CD105-PE, respectivamente. Ambas expresiones fueron positivas para

células madre mesenquimales, por lo tanto, la población demostró una tinción doble positiva, detectando un gran tamaño y complejidad dentro de la muestra.

En la figura 19, se observa un gráfico de puntos para la viabilidad celular, donde el primer cuadrante "G" indica las células vivas. El rango que se obtuvo del marcador 7-AAD fue de (77.11%-96.41%). Por lo tanto, a mayor intensidad de fluorescencia aumenta la muerte celular.

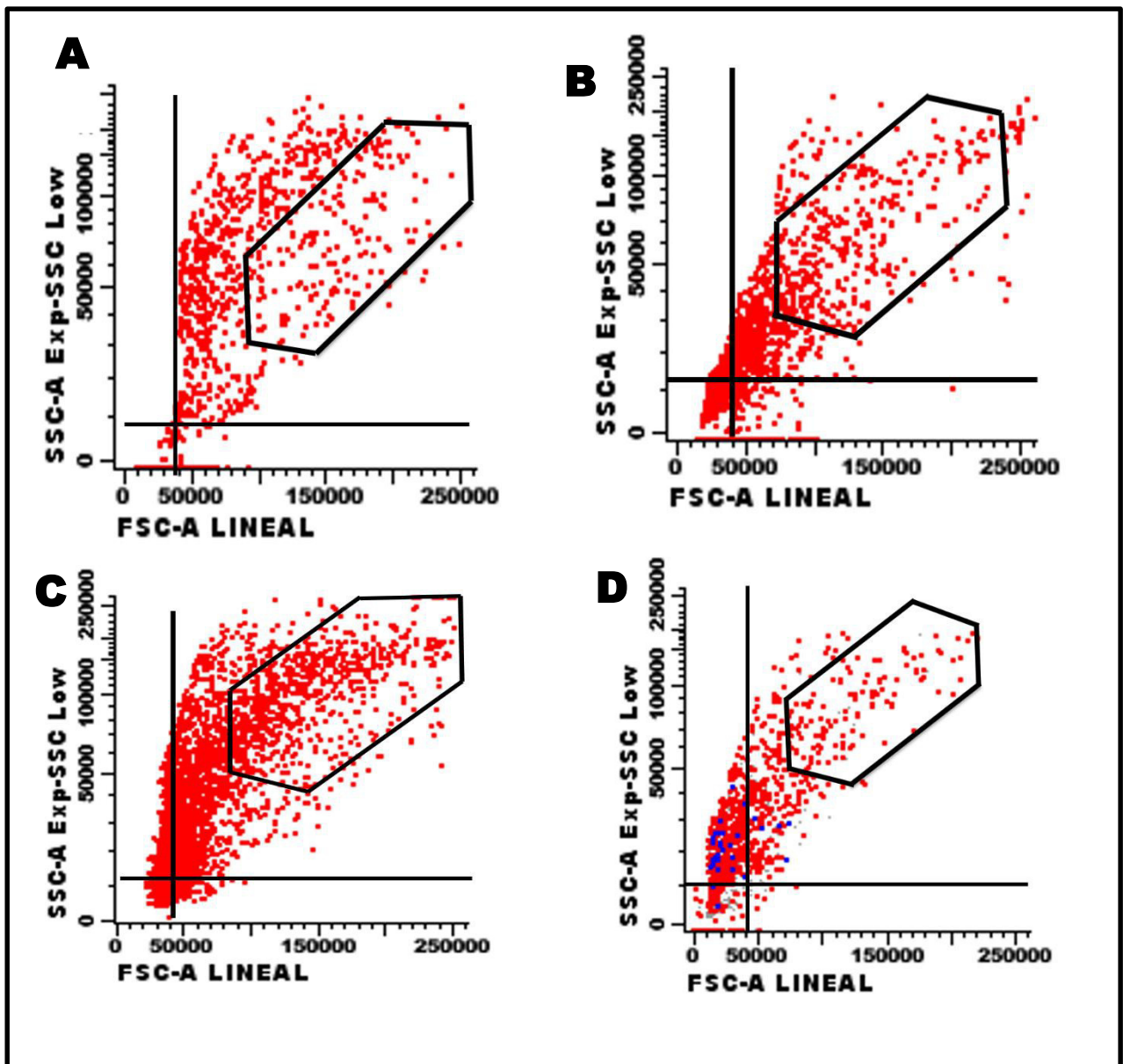


Figura 14. Gráfico de puntos ("Dot plot") que relaciona el tamaño celular con su complejidad de 04 muestras de poblaciones celulares obtenidas de la pulpa dental. A. Muestra 1, B. Muestra 2, C. Muestra 3, D. Muestra 4.

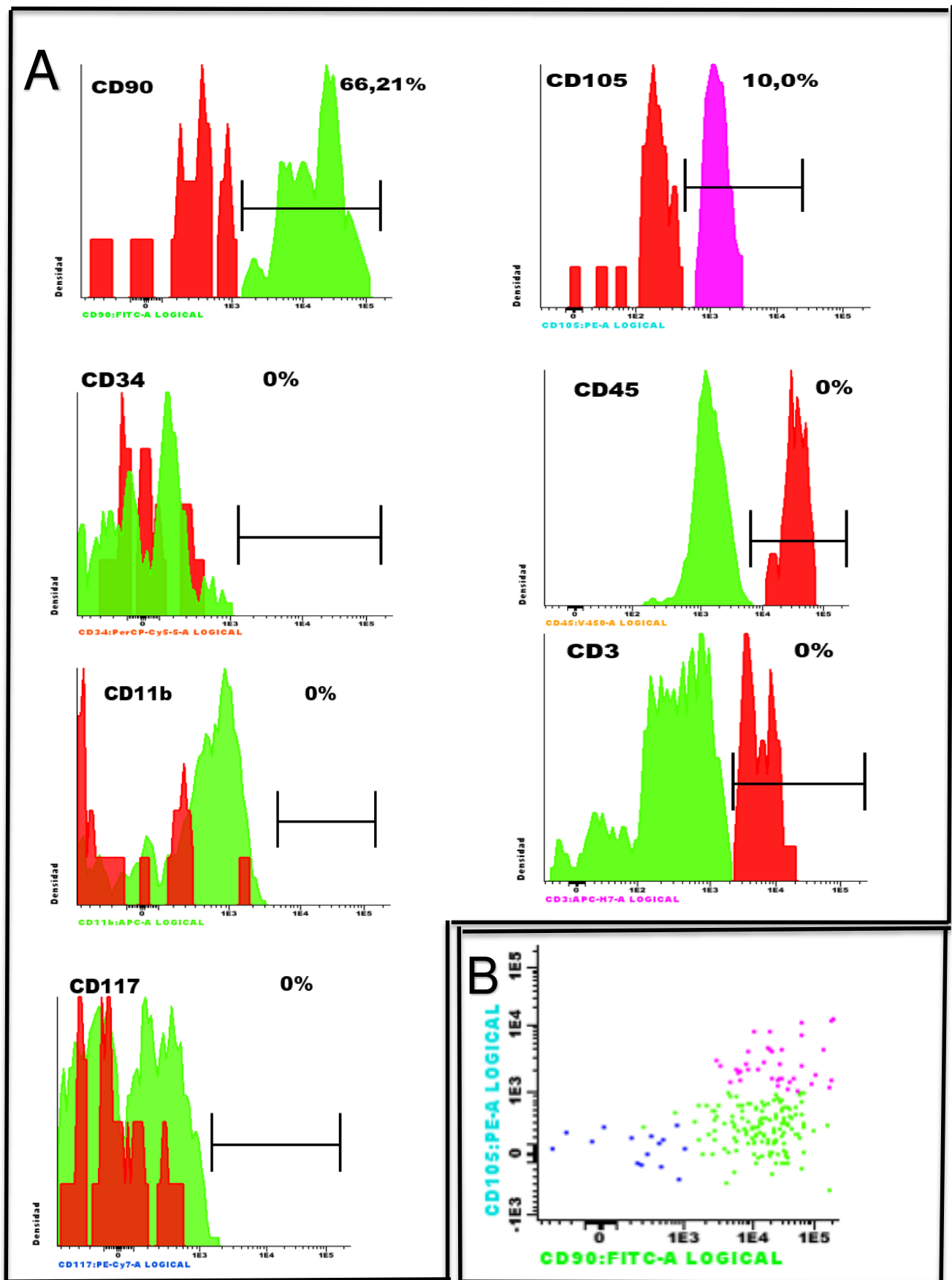


Figura 15. A. Análisis mediante citometría de flujo: Marcadores que expresan multipotencialidad CD90 (66,21%), CD105 (10%), CD45 (0%), CD34 (0%), CD117 (0%), CD11b (0%), CD3 (0%). B. Análisis de CMPD con doble tinción para CD105-PE y CD90-FITC y que se ve tanto en A como en B.

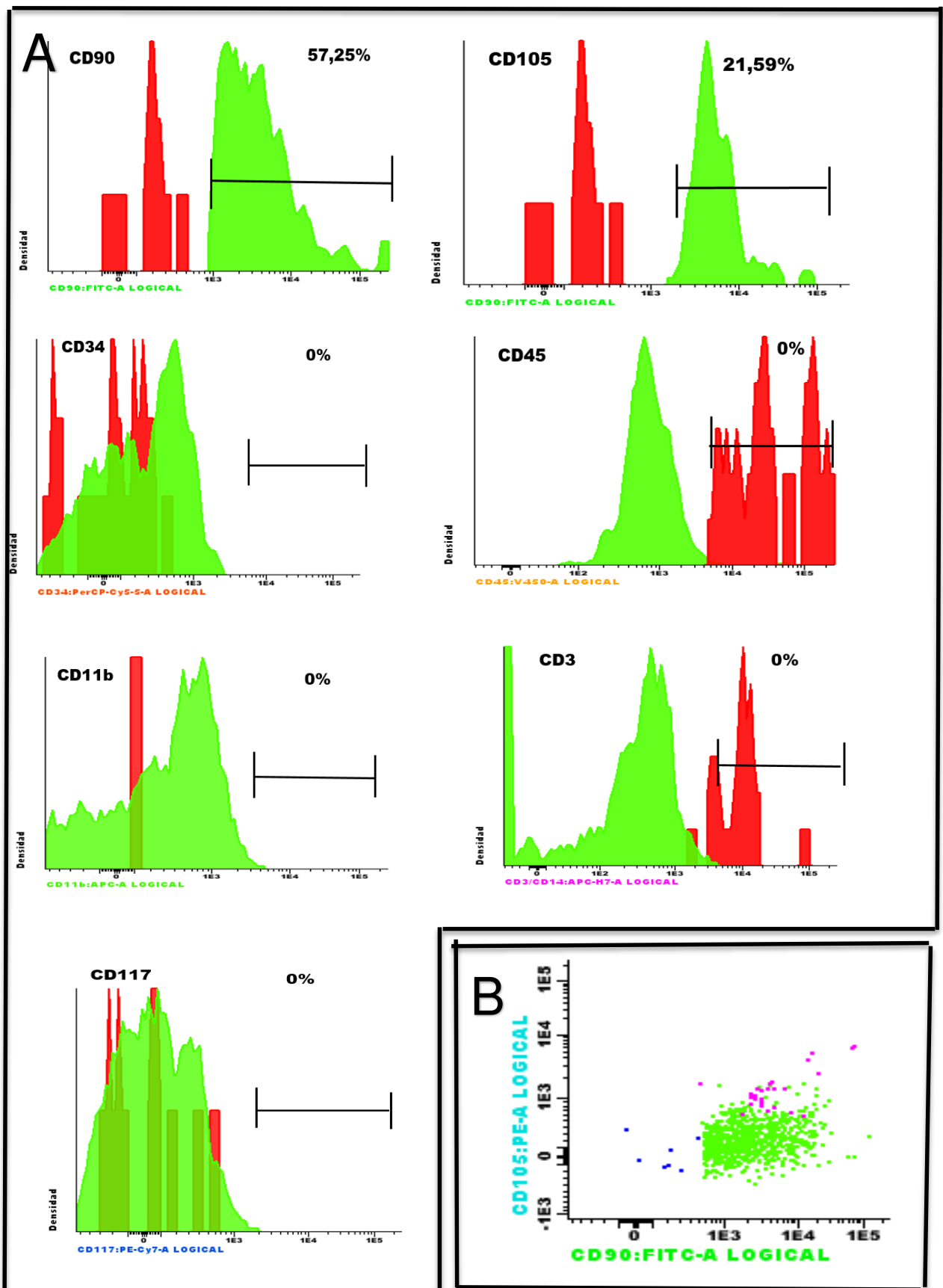


Figura 16. A. Análisis mediante citometría de flujo: Marcadores que expresan multipotencialidad CD90 (57,25%), CD105 (21,59%), CD45 (0%), CD34 (0%), CD117 (0%), CD11b (0%), CD3 (0%). B. Análisis de CMPD con doble tinción para CD105-PE y CD90-FITC.

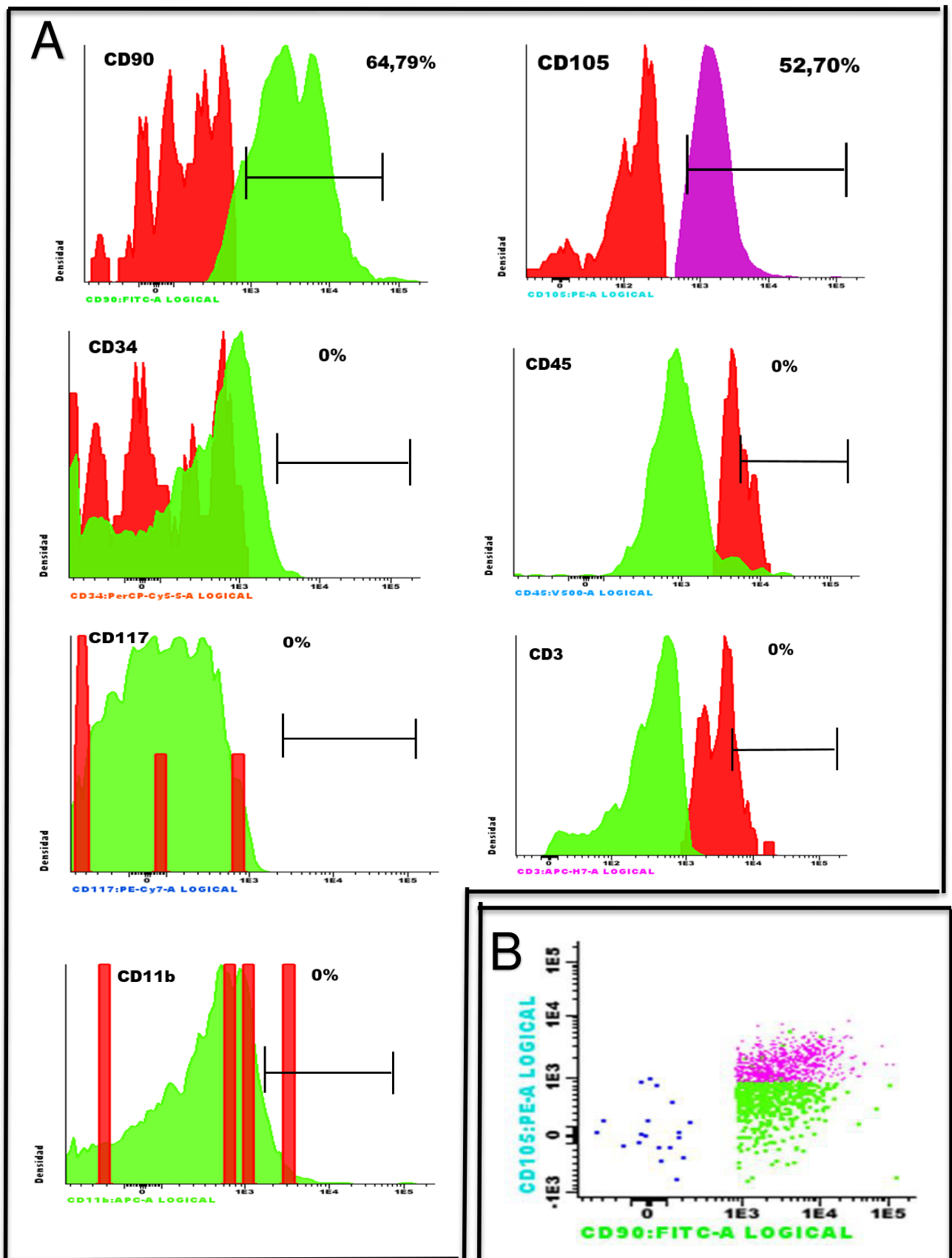


Figura 17. A. Análisis mediante citometría de flujo: Marcadores que expresan multipotencialidad CD90 (64,79%), CD105 (52,70%), CD45 (0%), CD34 (0%), CD117 (0%), CD11b (0%), CD3 (0%). B. Análisis de CMPD con doble tinción para CD105-PE y CD90-FITC.

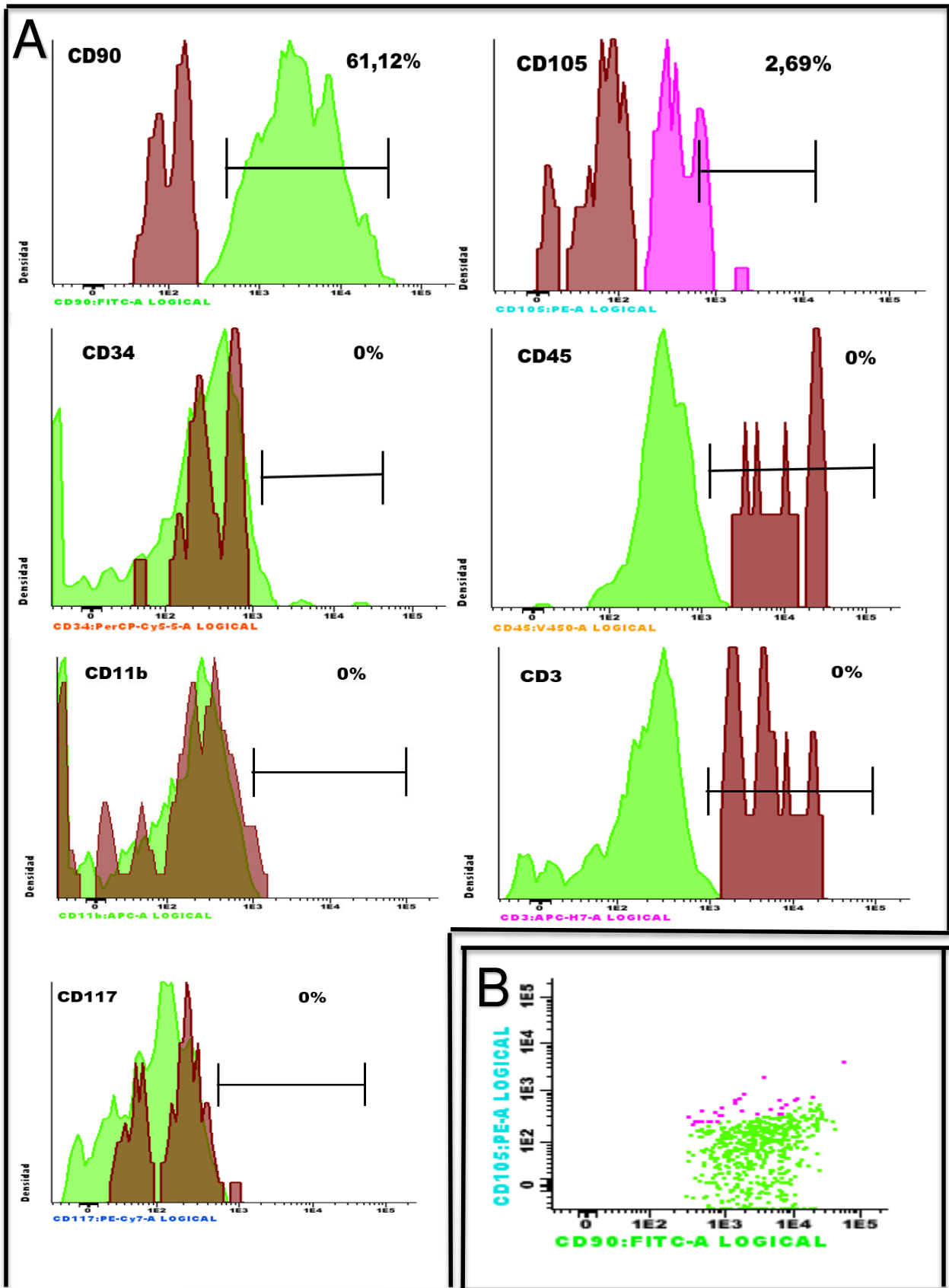


Figura 18. A. Análisis mediante citometría de flujo: Marcadores que expresan multipotencialidad CD90 (61,12%), CD105 (2,69%), CD45 (0%), CD34 (0%), CD117 (0%), CD11b (0%), CD3 (0%). B. Análisis de CMPD con doble tinción para CD105-PE y CD90-FITC.

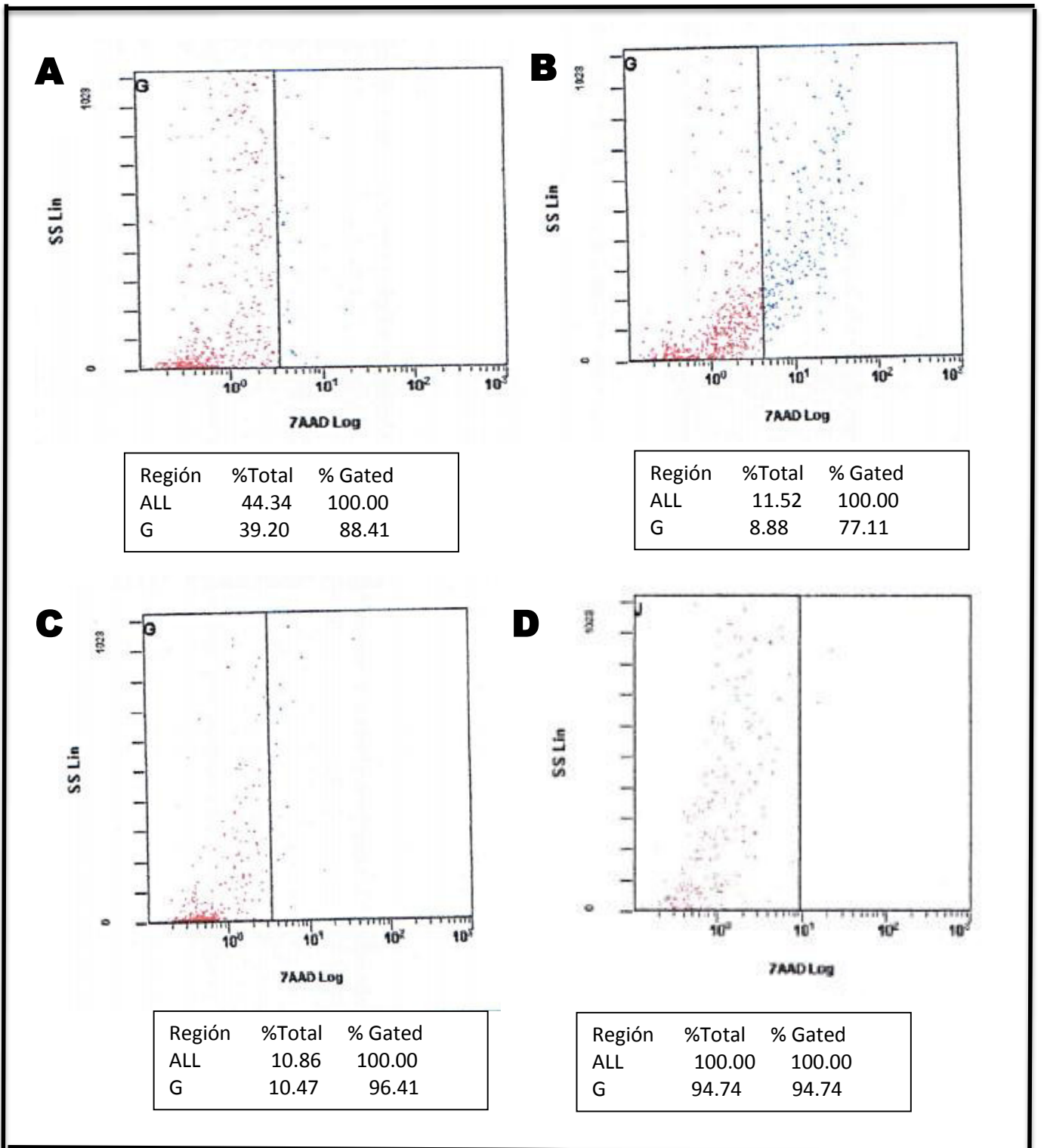


Figura 19. Análisis mediante citometría de flujo: 7-AAD; Marcador que expresa viabilidad con un rango de (77.11%-96.41%). A. Muestra 1, B. Muestra 2, C. Muestra 3, D. Muestra 4.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

El presente estudio demostró la expresión de marcadores de membrana frente a células madre de la pulpa dental humana. Siguiendo con los criterios del SITC, las células madre deben ser positivas a los marcadores CD90, CD105 y negativas a CD45, CD34, CD117, CD11b y CD3. Se obtuvo un rango positivo para los marcadores CD90 (57.25%-66.21%), CD105 (2.69%-21.59%), una expresión negativa (0%) para CD45, CD34, CD117, CD11b y CD3. Sin embargo, actualmente no existe un perfil fenotípico universal aceptado para la caracterización de células madre, por lo tanto se utiliza un perfil de expresión génica con marcadores de membrana que podrían variar por diferentes razones, diferencia de tiempo de aislamiento, cultivo y medio ambiente. La expresión positiva o negativa de los presentes marcadores mediante el análisis de citometría de flujo no confirma la existencia de células madre, pero sí indica la probabilidad que sean células madre.

La ventaja de analizar por citometría de flujo frente a otras técnicas es que ésta diferencia células viables y muertas. A su vez mide la proporción de células positivas⁴⁵.

Atari *et al.* determinaron la expresión de los marcadores en CMPD mediante citometría de flujo. Los marcadores que utilizaron fueron CD105 con un porcentaje de expresión 90.77%, CD73 con 72% y CD34 con 0.06% y CD45 con 0.02%¹⁰. Por lo tanto, estos marcadores cumplieron los criterios del SITC al igual que este estudio pero contrastan en los resultados en mayor porcentaje de expresión⁴⁷. También utilizaron la prueba de RT-PCR para determinar la expresión de marcadores embrionarios entre CMPD y células madre inducidas, como resultado los niveles de OCT3/4 y Nanog fueron más altos en CMPD. Este resultado se puede atribuir a que ellos analizaron la muestra por citometría de flujo y RT-PCR luego de realizar cultivos, a diferencia del presente estudio en el cual las células fueron analizadas después de ser aisladas directamente de la pulpa dental.

Jang *et al.* compararon tres métodos de aislamiento de células madre de la pulpa dental, por disgregación enzimática, explante y combinación de ambas. Utilizaron los marcadores CD105, CD90, CD73, CD45 y CD34 para la citometría de flujo.

Como resultado los porcentajes por disgregación enzimática presentaron menor valor, CD105 se expresó en 80.5% y CD73 en 98.3%, excepto el marcador CD90 siendo el más alto porcentaje 97.8% entre los tres métodos⁴⁹. Valores que son mayores en comparación a la presente tesis y que puede deberse a que ellos realizaron cultivos para analizar las células madre aisladas. En el presente estudio se utilizó colagenasa y dispasa para separar toda la población celular de la pulpa dental, de acuerdo al protocolo de disgregación enzimática que utilizó Atari et al. & Kraft et al.

Patil *et al.* evaluaron la caracterización fenotípica de las células madre la pulpa dental, de la papila dental y del folículo dental. Los marcadores que utilizaron fueron CD90, CD73, CD34 y CD45. CD90 para las CMPD se expresó en 99.5% y CD73 se expresó en 97.3%¹². A diferencia, en el presente estudio se utilizó los marcadores CD90, CD34 y CD45, pero no presentaron un alto porcentaje. Puede deberse a que ellos analizaron por citometría de flujo a las dos semanas de cultivo luego de alcanzar una confluencia del 70%. En la presente investigación se analizó inmediatamente después de obtener la población celular de la pulpa dental.

Ponnaiyan *et al.* compararon el análisis fenotípico de las células madre de la pulpa dental y del ligamento periodontal mediante los marcadores CD105, CD90, CD34 y CD45. Para las CMPD, CD105 se expresó en 23.2%, CD90 (99.5%), CD34 (0.5%) y CD45 (0.05%)¹⁴. Estos resultados coinciden con la presente investigación al utilizar la misma fuente, la pulpa dental, por la baja expresión del marcador CD105, que expresó 21.59%. Puede ser debido al origen ectomesenquimal propio de la pieza dental.

Asimismo, Ponnaiyan *et al.* en un estudio posterior analizaron el fenotipo de células madre de la pulpa dental y células madre de la médula ósea. Utilizaron los marcadores CD29, CD90, CD105, CD34 y CD45 para citometría de flujo y para confirmar la capacidad de diferenciación adipogénica y osteogénica utilizaron RT-PCR. CD90 y CD29 tuvieron un alto porcentaje >90 %, mientras que CD105 expresó un nivel bajo, 34.59% para CMPD¹¹. Teniendo como base estudios anteriores, el marcador CD105 se expresa, aunque en niveles muy bajos en células progenitoras hematopoyéticas, por lo tanto, se asocia a la hematopoyesis

junto a la migración celular¹¹. Estos hallazgos coinciden con el presente estudio que se encontró un bajo nivel del marcador CD105. Se ha reportado que las células madre del tejido adiposo al ser recientemente aisladas expresan niveles bajos del marcador CD105, pero con los pasajes de cultivo el porcentaje se vuelve más alto²³. Esto podría explicar el bajo nivel hallado en las células aisladas de la pulpa dental de esta tesis.

Los resultados demuestran que la población celular de la pulpa dental humana expresa los marcadores requeridos por el SITC evidenciando así que la población celular de la pulpa dental presenta un alto nivel de expresión de multipotencialidad.

Los avances *in vitro* que se han desarrollado en base a células de la pulpa dental humana han sido favorables. Una ventaja de las células madre adultas es su sencilla obtención. Éstas son una fuente accesible de CMPD y al ser autólogas no causarán una respuesta inmunológica indeseable cuando se utilicen a nivel clínico.

Una adecuada fuente celular de células madre mesenquimales va a favorecer el efecto de una buena terapia a nivel clínico. Las terceras molares son una buena elección debido a que es alto su porcentaje de extracción, siendo estas descartadas. El hecho de poseer la pulpa más joven hace que sean consideradas células más indiferenciadas. Así es que son una fuente abundante de células adultas y se tiene un futuro prometedor para la medicina regenerativa.

Se requieren más investigaciones *in vivo* para comprender sus características, esto favorecerá a los futuros estudios para elegir la fuente de células madre más adecuada para las aplicaciones clínicas en el futuro. De esta manera se busca abrir una nueva línea de investigación en el Perú, siendo a nuestro conocimiento el primer estudio realizado en nuestro país sobre el tema de células madre de origen dental. Sin embargo, se requiere agregar más pruebas como PCR e Inmunocitoquímica para una mejor determinación de células madre de la pulpa dental humana.

VI CONCLUSIONES

Acorde a los resultados que se obtuvieron en el presente estudio, se concluyó que:

1. Según el protocolo utilizado la expresión de CD90 positiva fue intermedia para identificación de células madre.
2. La expresión del marcador CD105 para células madre fue positiva baja.
3. La expresión del marcador CD34 fue negativa.
4. La expresión del marcador CD45 fue negativa.
5. La expresión del marcador CD11b fue negativa.
6. La expresión del marcador CD3 fue negativa.
7. La población celular de la pulpa dental humana presenta expresión de multipotencialidad.

VII RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar investigaciones con mayores características poblacionales para así obtener una mayor precisión en los resultados.
- Realizar investigaciones que complementen los resultados como PCR e inmunocitoquímica.
- Utilizar el método de cultivos para siguientes investigaciones en la rama dental.
- Realizar el mismo estudio, pero comparando con otras fuentes de origen dental de células madre para ver su expresión frente a los marcadores.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Villa García-Torres, Flores Hernández, Santibáñez-Escobar. Células madre de la pulpa dental (DPSC): perspectivas terapéuticas en enfermedades crónico degenerativas. *Salud Jalisco*. 2017 septiembre; 4(3):168-77.
2. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb; 12(2):126-31.
3. Flores-Figueroa E, Montesinos J, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia biología y aplicación clínica. *Rev. Invest. Clin*. 2006; 58(5):498-511.
4. Jucht D, Rujano R, Romero M, Rondon L. Utilización de células madre en el ámbito odontológico. Revisión de la literatura. *Acta Bioclinica* [Revista en Internet]. 2014 [Consultado 5 julio de 2017]; Disponible en <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/4966>.
5. Betancourt K, Barciela J, Guerra Menéndez J, Cabrera N. Uso de células madre en el complejo bucofacial. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2012; 16(5):651-61.
6. Valencia R, Espinosa R, Sadia M, Velasco Neri J, Nario H. Panorama actual de las células madre de la pulpa de dientes primarios y permanentes. *Rodyb* 2013; 2(2):1-33.
7. González Orta L, Font Rytzner A. Investigación con células madre de origen dentario. Actualización. *Gaceta Dental*. [Revista en Internet]. [2011 Mar 23]. [Consultado 10 julio de 2017] Disponible en <https://www.gacetadental.com/2011/09/investigacin-con-clulas-madre-de-origen-dentario-actualizacin-25547>.
8. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey G, Shi S. Células madre de la pulpa dental *in vitro* and *in vivo*. *PNAS*. December 2000; 97(25):13625-30.
9. Liang Z, Kawano S, Chen W, Sadrkhani MS, Lee C, Kim E, Moshaverinia A, Kim RH, Kang MK. Minced Pulp as Source of Pulpal Mesenchymal Stem Cells with Odontogenic Differentiation Capacity. *J Endod*. 2018 Jan; 44(1):80-6.
10. Liu Y, Jing H, Kou X, Chen C, Liu D, Jin Y, Lu L, Shi S. PD-1 is required to maintain stem cell properties in human dental pulp stem cells. *Cell Death Differ*. 2018 Feb; 22:1-10.

11. Ponnaiyan D, Jegadeesan V. Comparison of phenotype and differentiation marker gene expression profiles in human dental pulp and bone marrow mesenchymal stem cells. *Eur J Dent.* 2014 Jul; 8(3):307-13.
12. Patil R, Kumar BM, Lee WJ, Jeon RH, Jang SJ, Lee YM, Park BW, Byun JH, Ahn CS, Kim JW, Rho GJ. Multilineage potential and proteomic profiling of human dental stem cells derived from a single donor. *Exp Cell Res.* 2014 Jan 1; 320(1):92-107.
13. Brizuela C, Galleguillos S, Carrión F, Cabrera C, Luz P, Inostroza C. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *Int. J. Morphol.* 2013; 31(2) 739-74.
14. Ponnaiyan D, Bhat KM, Bhat GS. Comparison of immuno-phenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Int J Immunopath Ph.* 2012 Jan-Mar; 25(1):127-34.
15. Magallanes Fabián M, Carmona Rodríguez B, Álvarez Pérez M. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Rev. Odont. Mex.* 2010; 14(1):15-20.
16. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein L. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12(2) 126-31.
17. Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy.* 2018 Apr; 20(4):479-98.
18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular. Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4):315-7.
19. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; (174):249-82.
20. Lin C, Xin Z, Dai J, Lue T. Commonly Used Mesenchymal Stem Cell Markers and Tracking Labels: Limitations and Challenges. *Histol Histopathol.* 2013; 28(9): 1109–16.
21. Wiesmann A, Bühring H-J, Mentrup C, Wiesmann H-P. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head & Face Medicine.* 2006; 2(8):1-17.

22. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro LV, Kovacs K, Lloyd RV. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.* 2011 Jun; 31(6):2283-90.
23. Varma M, Breuls R, Schouten T, Jurgens W, Bontkes H, Schuurhuis G, Van Ham S, Van M. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007; 16 (1): 91-104.
24. Nielsen J, McNagny K. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci.* 2008 Nov 15; 121(22):3683-92.
25. Trowbridge I, Thomas M. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol.* 1994; (12):85-116.
26. Dirnhofer S, Zimpfer A, Went P. The diagnostic and predictive role of kit (CD117). *Ther Umsch.* 2006 Apr; 63(4):273-8.
27. Ahmadi A, Poorfathollah AA, Aghaiipour M, Rezaei M, Nikoo-ghoftar M, Abdi M, Gharib A, Amini A. Diagnostic value of CD117 in differential diagnosis of acute leukemias. *Tumour Biol.* 2014 Jul; 35(7):6763-8.
28. Chen Y, Sheng-Teng H, Yan F, Peng-Fei Zhou, Luo K. Dental pulp stem cells express tendon markers under mechanical loading and are a potential cell source for tissue engineering of tendon-like tissue. *Int. J Oral Sci.* 2016; 8(4):213-22.
29. Abreu Correa J, Marbán Gonzales R, Morffi Lopez I, Ortiz de la Cruz I. Complejo dentino pulpar. Estructura y diagnóstico. *REMIJ.* 2011; 12(1):82-9.
30. Colombo J, Moore A, Hartgerink J, D'Souza R. Scaffolds to Control Inflammation and Facilitate Dental Pulp Regeneration. *J Endodontics.* 2014; 40: 6-12.
31. Rendón J, Jiménez L, Urrego P. Células madre en Odontología. *Rev. CES. Odont.* 2011; 24(1)51-8.
32. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 Sep; 88(9):792-806.

33. Escobedo-Cousin MH, Madrigal J. Las células madre y el nicho. *Rev Hematol. Mex* 2011; 12(2):82-5.
34. Mata-Mirada M, Vazquez G, Sanchez V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *PRH* 2013; 27(3):194-9.
35. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003 Apr; 18(4):696-704.
36. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 May 13; 100(10):5807-12.
37. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development.* 2000 Apr; 127(8):1671-9.
38. Wang YX, Ma ZF, Huo N, Tang L, Han C, Duan YZ, Jin Y. Porcine tooth germ cell conditioned medium can induce odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011 May; 5(5):354-62.
39. Fuji H, Matsubara K, Ito A, Ohno K, Minoru U, Yamamoto A. Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats. *Elsevier.* 2015; 16(13): 59-72.
40. Barrera L, Drago E, Pérez J, Sainz T, Zamora A, Gómez F, Mendoza F. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2004; 17(1): 42-55.
41. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008 Apr 15; 111(8):3941-67.
42. Otero M, Gonzales-Navarro E. Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo. *SEQC.* 2013; 17:62-70.
43. Laguado J. Aplicaciones De La Citometría De Flujo En Microbiología, Veterinaria Y Agricultura. *Revista MVZ Córdoba.* 2007; 12(2): 1077-95.
44. Gutiérrez E, Samón T, Miranda A, Fernández G, Higginson D, Sierra G. Obtención de un conjugado anti Ig G de ratón-FIS mediante la tecnología Ig Y para uso como anticuerpo secundario en la detección de superficie celular. *Redalyc.* 2007; 38(1):85-9.

45. Donnenberg V, Ulrich H, Tárnok A. Cytometry in Stem Cell Research and Therapy. NIH. 2013; 83(1):1–4.
46. Nery A, Nascimento I, Glaser T, Bassaneze V, Krieger J, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. Cytometry A. Pubmed. 2013 Jan; 83(1):48-61.
47. 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(Pt 14): 3343-56.
48. Kraft D, Bindsløv D, Melsen B, Abdallah B, Kassem M, Klein-Nulend J. Mechanosensitivity of dental pulp stem cells is related to their osteogenic maturity. Eur J Oral Sci. 2010 Feb;118(1):29-38.
49. Jang JH, Lee HW, Cho KM, Shin HW, Kang MK, Park SH, Kim E. In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods. Restor Dent Endod. 2016 Nov; 41(4):283-95.

ANEXO N°1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO:				
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
General	General Determinar la expresión de multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental.	General La población celular de la pulpa dental presenta un alto nivel de expresión de multipotencialidad.	Bases Teóricas La multipotencia es la capacidad de una célula madre en diferenciarse en múltiples tipos de células especializadas funcionalmente maduras. Para el estudio referente a células madre, se utilizan marcadores multipotenciales como CD90, CD105, CD45, CD34, CD11b, CD3, CD117 para el análisis de citometría de flujo. Dentro de la literatura clasificamos a las células madre: embrionaria, adulta e inducida. Siendo la mejor candidata la célula adulta debido a sus características biológicas, dentro de	Diseño Metodológico Transversal Descriptivo Prospectivo
	Específicos	Específicas		Diseño Muestral Muestreo Probabilístico
	Determinar el porcentaje en la expresión positiva de los marcadores de células mesenquimales.	La población celular de la pulpa dental presenta expresión de multipotencialidad.		Técnica de Recolección de Datos Observación
Determinar el porcentaje en la expresión negativa del marcador de células hematopoyéticas.	La población celular de la pulpa dental no presenta expresión de multipotencialidad.		Variables	

		<p>esta clasificación encontramos a las células madre hematopoyéticas y mesenquimales¹⁶. A las células madre mesenquimales se les considera precursoras multipotentes debido a su capacidad por diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos <i>in vitro</i>. Se ha demostrado que a pesar de aislarse y expandirse luego de los diferentes pasajes en los medios de cultivo no pierden su capacidad mesenquimal multipotente, convirtiéndolas así en unas células con alto potencial para desarrollar investigaciones en medicina regenerativa.</p>	<p>Independiente: población celular de la pulpa dental humana.</p>
			<p>Dependiente: expresión de multipotencialidad.</p> <p>Intervinientes: edad.</p>

ANEXO N°1: CONSENTIMIENTO DE DONACIÓN

CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Proyecto: Multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental humana mediante citometría de flujo.

Responsable del proyecto: Maritza Yovana Alcalá Benites.

Por medio del presente documento hago constar que acepto voluntariamente mi participación en el estudio titulado “**Multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental humana mediante citometría de flujo**” a cargo de la investigadora Maritza Yovana Alcalá Benites, bachiller de la Facultad de Odontología-Universidad de San Martín de Porres. El diente que doy mi consentimiento a extraer es la(s) pieza(s) _____, 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 la pulpa de mi(s) diente(s) y analizarla(s).

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 realizaran usando instrumentos estériles materiales desechables 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 ocasionara ningún tipo de gasto.

Que sobre la información proporcionada se tomará medidas para proteger la confidencialidad y solo con fines estadísticos – científicos, que en ningún caso se publicará mi identidad. Sé también 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: Yovana Alcalá Benites, teléfono: 954122104 y Dra. Esperanza Raquel Ayón, con dirección Av. Las Calandrias 151, 291 – Santa Anita, Lima, teléfono 3620064 Anexo 3391 y Dr. Juvenal Lihon Sánchez, presidente del Comité de ética en Investigación de FO-USMP, con dirección Av. San Luis 1267-Telefono 999660102.

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.

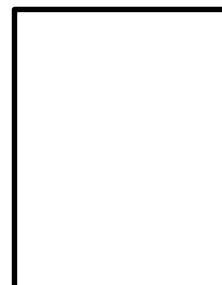
Apellidos y nombres:

DNI: Firma:

Apellidos y nombres del testigo:

DNI: Firma:

Lima,..... de..... de 2018.



ANEXO N°2: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Muestra	Edad	Marcadores de Multipotencialidad							Doble tinción
		CD90	CD105	CD3	CD11b	CD45	CD34	CD117	CD90/ CD105
1.	28a	66.21%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	3.97%
2.	28a	57.25%	21.59%	0%	0%	0%	0%	0%	2.58%
3.	23a	64.79%	52.70%	0%	0%	0%	0%	0%	57.25%
4.	22a	61.12%	2.69 %	0%	0%	0%	0%	0%	2.69%

N°	Coloración 7-AAD	
	Número de células	Viabilidad
1.	2.97x10 ⁵	88.41%
2.	2.47x10 ⁴	77.11%
3.	2.04x10 ⁴	96.41%
4.	7.2x10 ³	94.74%