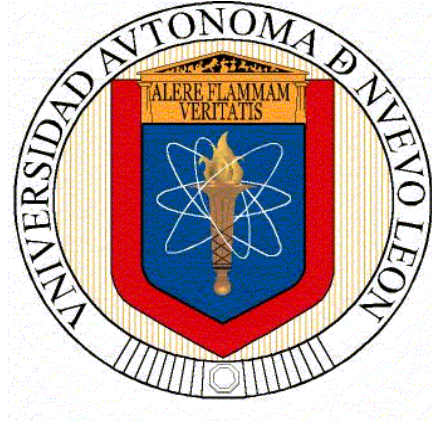


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL
DE DIENTES PRIMARIOS**

POR

C.D. MARTHA BEATRIZ GUAJARDO MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD
EN ODONTOPEDIATRÍA**

SEPTIEMBRE, 2012

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Nombre: Martha Beatriz Guajardo Mtz. No. de Matrícula: 1054046

Especialización y/o Maestría: Maestría en Ciencias Odontológicas
con Especialidad en Odontopediatría



Domicilio actual

Calle: Bolivia Número: 503

Colonia: Vista Hermosa CP: 64020

Municipio: Monterrey Estado: Nuevo León

Ciudad: Monterrey

Teléfono: 8348.99.64 y 8346.08.62

Email: dramabe.odontopediatra@gmail.com

Monterrey, N.L. 30 de agosto del 2012

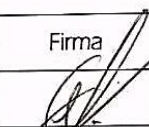


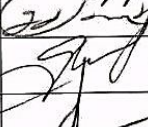
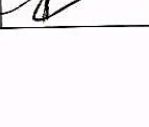
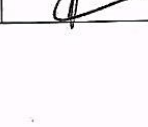



Monterrey, N. L. a 30 de agosto del 2012

COMITÉ DE TESIS
DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UANL.
Presente.-

Por medio de la presente, pongo a su consideración la evaluación de la Tesis
"AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL DE DIENTES PRIMARIOS."

Para la aprobación de solicitud de Examen Profesional de Maestría en Ciencias
Odontológicas con Especialidad en ~~Odontopediatría~~.

C. D. MARTHA BEATRIZ GUAJARDO ~~MARTÍNEZ~~

Nombre de los Miembros del Comité	Fecha de entrega	Firma	Fecha de aceptación	Firma
Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos	30/08/2012			
Dra. Martha Elena García Martínez	3/09/2012		11/09/2012	
Dr.a. Juana Nelly Leal Camarillo	5-09-12		Sept-12-Sept-12	
Dra. Hilda H. H. Torre Martínez	4/09/2012		10/09/2012	
Dra. Rosalva González Meléndez	4/sep/2012			
Dr. Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda	30/8/12		6/8/12	

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL
DE DIENTES PRIMARIOS

ASESORES

M.C., C.D. DRA EN CIENCIAS MYRIAM A. DE LA GARZA RAMOS
DIRECTOR DE TESIS

C.D. POSGRADUADO EN ORTODONCIA M.C PhD
HILDA TORRE MTZ
ASESOR CIENTIFICO

DR. EN BIOTECNOLOGIA APLICADA A CIENCIAS FARMACEUTICAS.,
QFB CON MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
ALBERTO GOMEZ TREVIÑO
ASESOR EXTERNO

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL
DE DIENTES PRIMARIOS

C.D., E.O., M.C PHD MARTHA ELENA GARCIA MARTINEZ
COORDINADORA DEL POSTGRADO DE ODONTOPEDIATRÍA. UANL

C.D., M.E.O. PHD SERGIO EDUARDO NAKAGOSHI CEPEDA
SUBDIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UANL

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL EN DIENTES PRIMARIOS

APROBACIÓN DE LA TESIS

LOS MIEMBROS DEL JURADO ACEPTAMOS LA INVESTIGACIÓN
APROBAMOS EL DOCUMENTO QUE AVALA LA MISMA,

COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ODONTOPEDIATRÍA.

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

M.C., C.D. DRA EN CIENCIAS MYRIAM A. DE LA GARZA RAMOS
PRESIDENTE

MC. MARTHA E. GARCIA MARTINEZ
C.D., ESP. PHD EN ODONTOPEDIATRÍA,
SECRETARIO

M.C HILDA TORRE MARTINEZ
C.D POSGRADUADO EN ORTODONCIA
VOCAL

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi luz, por estar conmigo todos los días de mi vida y por la misión encomendada de tratar a los niños siempre con una sonrisa.

A mis Padres, por su amor y apoyo incondicional, por apoyarme a construir mis sueños, por creer en mí, por estar a mi lado, por sus motivaciones y consejos.

A mis compañeros de generación # 24, por compartir tantos momentos juntos y más que una amistad, una hermandad para toda la vida.

Y a todas las personas que nos cruzamos en el camino durante esta etapa que marcó mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Elena García por su guía y motivación durante mis estudios.

A la Dra. Ana María Salinas, por sus consejos y orientación en momentos importantes.

A mis asesores:

Dr. Alberto Gómez, por su tiempo, colaboración y consejos para realizar este proyecto y llevarlo a cabo.

Y sobre todo por compartir desinteresadamente sus amplios conocimientos y experiencias.

Dra. Hilda Torre, por su tiempo y apoyo siempre, para que esta tesis se presentará.

¡Muchísimas gracias Doctora!

Aparte de haber sido mi maestra, es una persona que quiero y Admiro mucho.

Dra. Miriam de la Garza, mi directora de tesis, quién fue un pilar clave para la elaboración de este proyecto.

Por sembrarme la semilla del conocimiento científico. Gracias doctora, estoy segura de que publicaremos ésta tesis.

RESUMEN

Martha Beatriz Guajardo Martínez
Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de Graduación: Septiembre, 2012

Título del Estudio: **Aislamiento de células madre de la pulpa dental en dientes primarios**

NUMERO DE PAGINAS: 59

Candidato para el grado de **Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Odontopediatría.**

Área de Estudio: Biología Molecular

Propósito y Método del Estudio: Desarrollar la técnica de obtención de células madre a partir de tejido pulpar de dientes primarios en los niños que asistieron al Posgrado de Odontopediatría de la U.A.N.L., en los que estuvo indicada pulpotomía y/ ó próximos a exfoliarse con extracción indicada, Se obtuvieron las muestras con sus lineamientos de obtención establecidos y en laboratorio, se diseñaron primers para los genes TPD52 (Gene Bank BE974098) y WNT16 (Gene Bank AF169963), se realizó la extracción de RNA, ya obtenida se procedió a una retro transcripción y por último una PCR (reacción en cadena de polimerasa) para establecer las temperaturas de alineación óptima para los primers con la muestra.

Al término se transfirieron a un gel de agarosa 1% y se corrió durante 45 minutos en la cámara de electroforesis. Posteriormente se observaron con éxito las bandas.

Contribuciones y Conclusiones: Se confirmó la presencia de células madre en las bandas en la cámara de electroforesis.

Director de Tesis: _____

ABSTRACT

Martha Beatriz Guajardo Martínez

Date of Graduation: September 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León

Faculty of Dentistry

Title of Studio: Isolation of Stem Cells in the pulpar dental of primary teeth

NUMBER OF PAGES: 59

Candidate Master of Science Specialty in Pediatric Dentistry

Study Area: Molecular Biology

Study purpose and method: Develops the technology of obtaining Stem Cells from pulpar of primary teeth in the children who were present at Odontopediatría's Postdegree of U.A.N.L., in that was indicated pulphotomy and / or near to exfoliate with indicated extraction.

The samples were obtained by his limits of obtaining established and in laboratory, were designed primers for the genes TPD52 (Gene Bank BE974098) and WNT16 (Gene Bank AF169963), there was realized RNA'S, already obtained extraction one proceeded to a retrotranscription and finally a PCR (chain reaction of polymerase) to establish the temperaturas of ideal alignment for the primers with the sample.

Finally, transfer to a gel of agarosa 1% and it ran during 45 minutes in the chamber of electroforesis. Later, the bands were observed successfully.

Contributions and Conclusions: Confirmed Stem Cells in the bands at the chamber of electroforesis.

Advisor Signature: _____

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
Aprobación de la Tesis	IV
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
Tabla de Contenido	IX
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: EL PROBLEMA	4
1.1 Planteamiento del Problema	4
1.2 Objetivos de la Investigación	4
1.2.1 Objetivo General	4
1.2.2 Objetivos Específicos	4
1.3 Justificación de la Investigación	5
CAPITULO II. FUNDAMENTOS TEÓRICO	6
2.1 Antecedentes	6
2.1.1 Concepto de células madre	6
2.1.2. Aplicación de células madre	7
2.1.3. Diferencias entre células de dientes primarios y permanentes	22
2.1.4. Características de las células madre	23
2.1.4. Características de células madre en la pulpa dental	27
2.1.4.1 Papel de células madre en el tejido pulpar	28
2.1.4.2 Diferentes usos de células madre	30
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Universo de estudio	33
3.1.1. Población	33
3.1.2 Criterios de inclusión	34
3.1.3 Criterios de exclusión	34
3.2 Variables incluidas en el estudio	34
3.2.1 Variables dependientes	34
3.2.2. Variables Independientes	35
3.3 Recolección y procesamiento de las pulpas	35
3.4. Tamaño de muestra	36
3.5. Ética del estudio	36
3.6 Norma 013	36
3.7 Actividades clínicas	37
3.8. Actividades de laboratorio	38

3.9 Diseño de Primers para los genes	38
3.9.2 Retrotranscripción	42
3.9.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)	44
CAPITULO IV: RESULTADOS	47
CAPITULO V: DISCUSIÓN	49
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	51
VII. LITERATURA CITADA	53

INTRODUCCIÓN

Las Células Madre, conocidas como Stem Cells., Son las células maestras de nuestro organismo, mismas que dan origen a todos los tejidos y órganos del cuerpo.¹²

Han sido utilizadas satisfactoriamente cientos de veces en todo el mundo y pueden

ofrecer un remedio a condiciones tales como:

- Parkinson y Alzheimer
- Diabetes juvenil
- Lesiones hepáticas
- Lesiones de médula espinal
- Esclerosis Múltiple y enfermedades crónico-degenerativas
- Artritis y lesiones en las articulaciones
- Algunos tipos de cáncer
- Lesiones en los huesos
- Infartos y otras enfermedades cardíacas
- Producción de piel nueva en quemaduras graves
- Producción de nuevas córneas.

A la fecha, existen estudios que avalan el potencial de las células madre en su renovación y capacidad de diferenciación, así como también su capacidad de responder a señales ambientales específicas y generar nuevas células madre o para seleccionar un patrón de diferenciación en particular.²³

Existen estudios sobre células madre obtenidas de tejidos pulpares dentales que ponen en evidencia que éstas, pueden ser diferenciadas, cultivadas y desarrolladas *in vitro* para ser trasplantadas dentro del mismo organismo del cual fueron obtenidas, primeramente, reduciendo así, la posibilidad de ser rechazadas y promover la regeneración del tejido *in vivo*.⁴⁵

El estudio de las células madre de pulpa dental y establecimiento de metodologías de obtención de las mismas, manejo, aislamiento, almacenaje, cultivo e inducción a diferenciación, puede servir como modelo para investigaciones posteriores y el desarrollo de nuevas tecnologías, que permitan el perfeccionamiento del proceso de diferenciación de células de diferentes tipos a partir de células multipotenciales en la obtención de mejores opciones durante los tratamientos dentales y en las diferentes áreas de odontología.⁵⁶

Las numerosas alternativas de proveer una mejor evolución en cirugías y/o tratamiento a pacientes con labio y paladar hendido, con cáncer en tejidos bucales, con quistes peri orales, dentarios o maxilares, con osteoporosis o con tejidos neuronales dañados, disfunciones de la articulación témpora-mandibular y demás patologías bucales, comúnmente encontradas durante la practica odontológica.⁵⁸

La obtención de células madre en el tejido pulpar de dientes primarios nos abre un mundo a la medicina del futuro ya que la medicina personalizada es la vía más prometedora para tratar enfermedades y lesiones que pudieran ocurrir en el transcurso de la vida de nuestros pacientes.³³

Este es un estudio: Observacional, longitudinal, prospectivo y descriptivo.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del Problema

¿Será posible obtener Células Madre a partir de Tejido pulpar de dientes primarios?

1.2 Objetivo de la Investigación

1.2.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue desarrollar la técnica de obtención de células madre a partir del tejido pulpar de 84 dientes primarios en los pacientes que acudieron al Postgrado de la Facultad de Odontología de la UANL.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Diseñar primers para los genes TPD52 (Gene Bank BE974098) y WNT16 (Gene Bank AF169963).
2. Extraer RNA de cada muestra.
3. Elaborar un método para llevar a cabo la retro transcripción.
4. Realizar una PCR para establecer la temperatura de alineación óptima para los primers.
5. identificar los genes TPD52 y WNT16 que correspondan a células mesenquimales.

1.3 JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

La investigación de células se ha trasladado del laboratorio a pruebas humanas y el resultado es verdaderamente innovador, pues abre una gran posibilidad de esperanza médica para el futuro

"Estas pruebas médicas presentan evidencia sobre cómo las células madre dentales pueden convertirse en una herramienta prometedora de la medicina moderna".

En el presente estudio se desarrolló la metodología para la obtención de pulpas dentales en forma estéril para su posterior cultivo en el laboratorio. Las pulpas se obtuvieron a partir de dientes primarios de pacientes infantiles en los que esté indicada la pulpotomía y pulpas de dientes provenientes de la primera dentición previos a su exfoliación.

El tejido extraído se colocó en un vial para su transporte al Laboratorio de Biología Molecular de esta Facultad.

Posteriormente, por medio de técnicas de extracción de RNA, retro transcripción, PCR (reacción en cadena de polimerasa) y gel de agarosa., Se caracterizó la población celular del tejido pulpar, para identificar las "Células Madre", las cuales fueron cuantificadas para cada muestra obtenida. Por otra parte, se aislaron las células madre para su posterior cultivo y ensayo de diferentes técnicas para la obtención de linajes celulares.

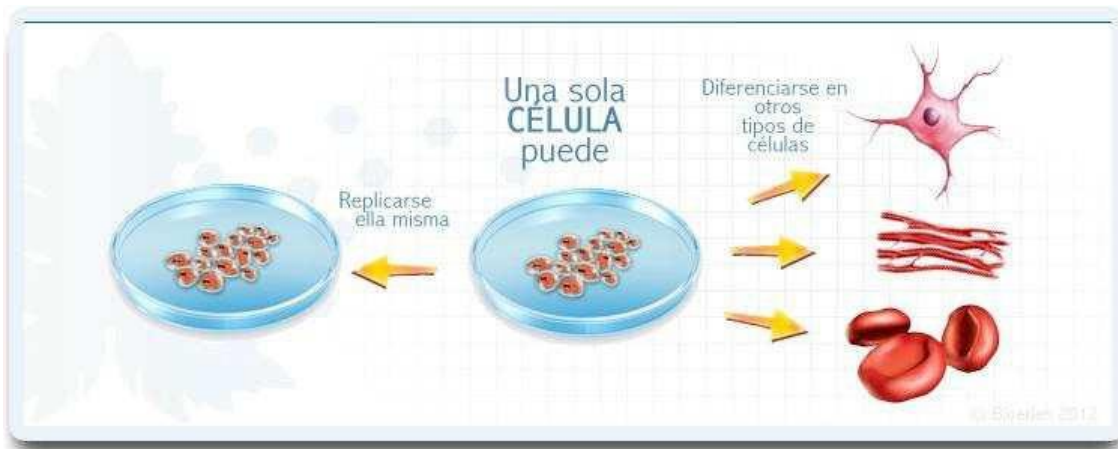
CAPITULO II. FUNDAMENTOS TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 CONCEPTO DE CELULAS MADRE

Las células madre son las células que forman los tejidos y órganos del cuerpo tales como el corazón, hígado, cerebro y la piel.¹⁹

Las células madre pueden diferenciarse y transformarse en tipos de células particulares que, en condiciones controladas, pueden crecer y desarrollarse en tejidos y órganos. Además, estas células pueden reparar el sistema inmunológico.²⁷



2.1.2. APLICACIÓN DE CELULAS MADRE

Los dientes de leche contienen generalmente células madre que se multiplican rápidamente y pueden diferenciarse en varios tipos de células.¹⁴

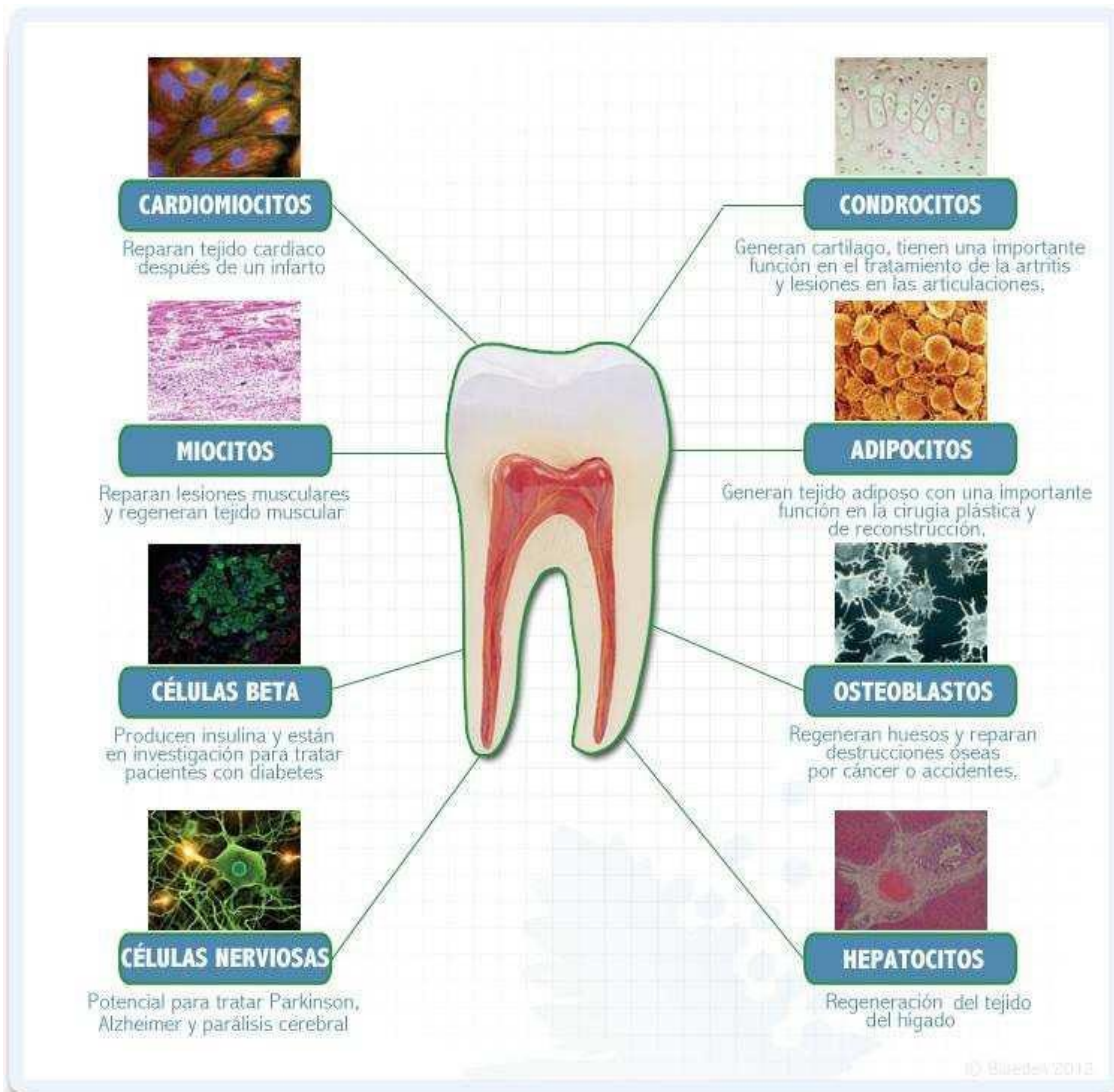
Dentro de los dientes de leche hay cuatro tipos de células:

Condrocitos: Son células que tienen la habilidad de generar cartílago, tienen una importante función en el tratamiento de la artritis y lesiones en las articulaciones.

Osteoblastos: Son células que tienen la habilidad de generar hueso y reparar destrucciones óseas por cáncer o accidentes.

Adipocitos: Tienen la habilidad de reparar tejido dañado después de un ataque cardíaco o infarto.

Mesenguimatosas: Son las células más potentes de todas las células dentales ya que poseen la habilidad de desarrollarse y transformarse en un gran rango de células reparativas.⁴³



Los tratamientos con células madre consisten en reemplazar las células enfermas y disfuncionales por células saludables y funcionales. Estos son actualmente investigados por las mejores instituciones alrededor del mundo, por lo que los tratamientos personalizados apuntan hacia un futuro promisorio.¹⁹

Durante la formación dentaria, existen interacciones entre el epitelio y las células de la papila dental, que promueven la morfogénesis dental por la estimulación de una subpoblación de células mesenquimales, para diferenciarse en odontoblastos, que forman dentina primaria. Después de la erupción, los odontoblastos forman dentina secundaria en respuesta a estímulos como erosión, abrasión, traumatismos y/o patologías pulpares. Estos odontoblastos se forman a través de la proliferación y diferenciación de una población de células, precursora que existe en el tejido pulpar, las células madre.⁵¹

A pesar del conocimiento extenso de la formación de los dientes durante las etapas tempranas del desarrollo humano y de los diferentes tipos de células especializadas que contienen, es poco lo que se sabe acerca de sus características y propiedades en el organismo post-natal.⁴⁶

Las células madre son generalmente, células clorogénicas capaces de auto renovarse y diferenciarse en distintos tipos de células. Las células madre post-natales han sido aisladas de varios tejidos, por ejemplo, de médula ósea, tejido neural, piel, retina y epitelio dental. Recientemente, se ha identificado una fuente importante y accesible de células madre, los dientes deciduos o de la primera dentición.²⁸

Algunos autores han sugerido que las células madre provenientes de pulpas dentales de la primera dentición, podrán ser manipuladas para reparar dientes dañados, inducir regeneración de hueso, tratar lesiones neuronales, incluso en el empleo de implantes y de regeneración tisular guiada, en cirugías de paladar hendido y una lista interminable de posibilidades.³⁴



Todos los dientes de leche son fuente abundante de **Células Madre**, solo se requiere de un diente sano para el cultivo de las células.

2.1.3 DIFERENCIAS ENTRE CELULAS MADRE DE DIENTES PRIMARIOS Y

PERMANENTES:

Las células madre humanas de dientes deciduos exfoliados (conocidas como SHED) se comportan de manera diferente que las encontradas en la pulpa de dientes permanentes, son de vida larga, crecen rápidamente en cultivos, y con cuidados propios *in vitro* llegan a tener valor potencial para inducir la formación de dentina especializada, hueso y hasta células neuronales.³⁰

Los componentes celulares de la pulpa dental son los odontoblastos, condrocitos, adipositos, células madre de la médula ósea y células madre de la pulpa dental.^{1,2}

Diversos autores coinciden con que la población de células madre indiferenciadas en la pulpa dental tiene la capacidad para diferenciarse terminalmente a fibroblastos, adipositos, osteocitos, condrocitos y odontoblastos.²⁸

El estudio de células madre pluripotenciales comenzó hace 40 años. En el adulto, las células madre de un tejido específico son responsables del reemplazo de células ya diferenciadas en el tejido, por lo que se regeneran continuamente.²⁶

SHED: Célula Madre Humana de dientes deciduos exfoliados.

2.1.4 CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS MADRE

Las células madre tienen dos características importantes que las distinguen de otros tipos de células. Primero, son células no especializadas que se renuevan ellas mismas por periodos largos por división celular. La segunda, es que, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, pueden inducirse a diferenciar células con función específica como las células de defensa del músculo cardiaco o las células productoras de insulina en el páncreas. ⁵

Sin importar su origen, las células madre, tienen tres propiedades generales: son capaces de dividirse y regenerarse por periodos de tiempo largos; pueden proliferar; y, además, una población de células madre que logra proliferar en laboratorio, puede producir millones de células. ⁴²

Por su división asimétrica normal, las células madre no están limitadas a cierto número de divisiones; parecen estar bajo un control negativo por medio de inhibición por contacto con otras células o suprimidas por reguladores de control negativo de su progenie diferenciada. La progenie de células madre es afectada por un número de factores intrínsecos y extrínsecos que interaccionan para poder completar la vía de desarrollo del tejido en formación. ⁴⁷

Un equipo de científicos de Estados Unidos descubrió una fuente de células madre en el cuerpo humano: la pulpa de dientes de la primera dentición, que podrían ser utilizadas para reemplazar tejidos vitales, para tratar una amplia gama de afecciones que incluyen anemias, trastornos inmunitarios, leucemias, varias enfermedades malignas, linfomas y trastornos genéticos. ⁵⁴

Existen células madre pueden dividirse en células madre embrionarias y las células madre adultas. Las de origen embrionario, son pluripotenciales, mientras que las adultas pueden diferenciarse en células del tejido del cual se derivan. Estas últimas, son indiferenciadas, pueden renovarse y pueden diferenciarse para producir tipos diferentes de células especializadas para mantener el tejido de donde fueron encontradas. ⁵⁸

Las células madre embrionarias y adultas tienen diferencias en su uso potencial de terapias regenerativas; así mismo, difieren en el número y tipo de células en las que pueden diferenciarse. ^{7,10}

Gearhart y Pittenger, en la Universidad John Hopkins en Baltimore, Maryland, aisló células germinales embrionarias de las células reproductivas primordiales del feto en desarrollo. Esto ha permitido que otros investigadores demostraran el potencial terapéutico de las células madre embrionarias. ¹³

En el 2003, Gronthos, del National Institute of Dental and Craneofacial Research, reportó por primera vez, que los dientes de la primera dentición contienen suministros ricos en células madre en su pulpa dental.

Este descubrimiento, demostró, además, que las células madre permanecen vivas dentro del diente por un tiempo corto después de su exfoliación. ⁴

Las células madre crecen rápido en cultivos y, con cuidados especiales en el laboratorio, tienen el potencial de inducir a la formación de dentina especializada, hueso y células neuronales.¹⁶

En el año 2003, descubrió células madre en los dientes primarios., Utilizando los dientes de leche de su hija de seis años de edad, llamaron a las células madre encontradas en pulpa dental como SHED (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth), pudo aislar y reproducir estas poderosas células y preservarlas para que en un futuro se pueda utilizar su potencial regenerativo.³⁹

“Con las investigaciones de células madre recientes, se demuestra que las células postnatales de niños pueden actuar totalmente diferente a las células madre adultas y se debe enfatizar la inherente diferencia⁵³

Se encontró que las SHED se comportan diferente a las células madre de dientes permanentes; exhiben una habilidad para desarrollarse mucho más rápido y en poblaciones que doblan en número a los cultivos de células de dientes de la segunda dentición, por lo que se ha sugerido que las SHED pueden encontrarse en estadios más inmaduros que las células madre adultas¹⁶.

Tsukamoto y Robey, científicos de la Academia Nacional de Ciencias^{17,18} han determinado que es posible encontrar células madre en 12 de cada 20 dientes deciduos de un mismo infante.



Las implicaciones del rechazo de tejidos trasplantados son menores, cuando las líneas de células son trasplantadas de células cultivadas del mismo individuo, debido a que los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) han sido desarrollados para el receptor específico del tejido, haciendo que el MHC coincida y así, se puede evitar que el tejido sea rechazado. De esta manera, puede llegar a desarrollarse líneas de células universales mediante la alteración de los genes de MHC.⁴⁶

Se afirma que podrían llegar a lograrse las metas clínicas para la reparación de sangre, hueso, y otros tejidos incluyendo la repoblación hematopoyética, osteoartritis, enfermedad de Parkinson, diabetes mellitus, lesiones de médula espinal, quemaduras, fracturas e incluso riesgo de infarto al miocardio, mediante el desarrollo en la obtención de células madre.^{13,20,21}

Duailibi realizó un estudio para perfeccionar los métodos para aprovechar las células del periodo de yema del desarrollo dentario y fomentar la definición de las poblaciones de células progenitoras que dan lugar a estructuras dentarias.⁵⁷

Ohazama en su investigación establece que las propiedades de las células ectomesenquimatosas de responder a las señales epiteliales orales y las de células de la cresta neural que no contienen una pre-especificación odontogénica inherente, así como su multipotencialidad, estimulan a investigar la capacidad de células no dentales cultivadas de reemplazar células ectomesenquimatosas y contribuir a la formación dentaria.²³

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

2.1.4 CARACTERIZACION DE CELULAS MADRE EN LA PULPA DENTAL

Utilizamos 2 genes en el presente estudio., Gen TPD52 (Gene Bank BE974098) y WNT16(Gene Bank AF169963), se caracterizaron en esta investigación con resultados muy favorables, ya que los genes se expresaron.

2.1.4.1 PAPEL DE CELULAS MADRE EN EL TEJIDO PULPAR

Durante la formación de los dientes, existen interacciones entre el epitelio y la papila dental que promueven la morfogénesis por la estimulación de células mesenquimales para diferenciarse en odontoblastos, los cuales forman dentina primaria. Después de que erupcionan los dientes, la dentina de reparación se forma en respuesta a múltiples causas, traumatismos, abrasión, oclusión, caries, etc.²⁴

Las células madre post-natales han sido aisladas de diferentes tejidos, como la médula ósea, tejido nervioso, piel, retina y epitelio dental. Se han identificado poblaciones de células madre post-natales en la pulpa humana dental de adultos que son denominadas por Gronthos como DPSCs. La característica más notable de las DPSCs es su habilidad para regenerar un complejo pulpa-dentina que es compuesto de matriz mineralizada con túbulos en cuyo interior poseen odontoblastos, y tejido fibroso con vasos sanguíneos en una disposición similar al complejo pulpa-dentina encontrada en dientes humanos.³⁵

DPSCs: Células madre postnatales en pulpa humana dental de adultos.

Las DPSCs no han sido estudiadas extensamente en términos de sus propiedades. Gronthos, Brahim et al.,¹⁸ demostraron que las DPSCs, representan una población de células madre adultas originales, que poseen las propiedades de un alto potencial de diferenciación, capacidad de auto-renovación y de diferenciación multi-linaje, después de un trasplante *in vivo*.

Teóricamente, las DPSCs son capaces de responder a señales ambientales específicas y también para generar nuevas células madre o para seleccionar un programa de diferenciación en particular. Las observaciones de estos autores, sugiere que las DPSCs trasplantadas no sólo compromete al linaje odontoblástico sino también reside en el tejido conectivo pulpar como células fibroblásticas hasta 5 meses después del trasplante.²⁷

2.1.4.2 DIFERENTES USOS DE CELULAS MADRE

Ya se creó tejido óseo con células madre dentales y por otra parte el implante de células madre en el corazón mejora el estado de pacientes infartados: Las células mesenquimales (las mismas que las células dentales) se obtienen de la médula ósea del enfermo y del hospital se envían a la sala blanca del Instituto de Biología y Genética Molecular. Es en esta sala donde permanecen tres o cuatro semanas para la producción celular.²⁵

Tras la fase de multiplicación, las células mesenquimales se mandan de nuevo al clínico para ser administradas al paciente.

En primer lugar, se desarrolla un proceso electromecánico que sirve para conocer las zonas que están vivas, pero no se mueven, lo que permite identificar la zona concreta donde finalmente se administrarán las células mesenquimales multiplicadas.

Un estudio publicado por la revista Journal of the American Medical Association señala que un grupo de voluntarios con diabetes tipo 1 se sometió a un trasplante de células madre y sobrevivió sin necesidad de insulina durante más de tres años.

Al mismo tiempo, todos esos pacientes mantuvieron niveles saludables de glicemia y péptidos C, indicó el análisis realizado en la Escuela de Medicina de la Universidad Northwestern de Chicago.

Según el informe sobre el estudio realizado en la Escuela de Medicina de la Universidad Northwestern, de los 23 pacientes de entre 13 y 31 años que participaron en el estudio, 20 no necesitaron insulina durante una media de 31 meses.

Cuba se incluye entre los primeros países en aplicar las células madre en pacientes con enfermedades periodontales (de las encías) con resultados favorables.

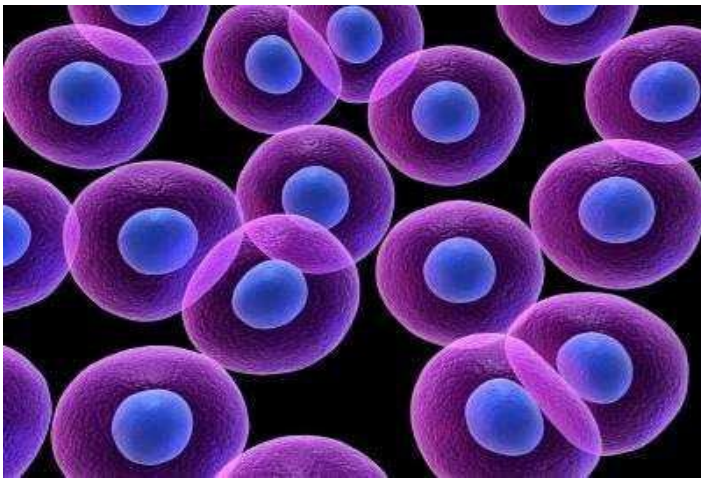
Hasta el momento la inyección de células madre a nivel de la encía, se ejecuta mediante un tratamiento estomatológico, en el cual se prepara la zona y aplican las células madre, previamente obtenidas del paciente, que por ser del propio organismo no conlleva a riesgos adicionales y en ninguno de los casos se han presentado manifestaciones secundarias.

Además de tratar y mejorar el mal de Parkinson, la diabetes y algunos tipos de artritis, en el último año ha demostrado su efectividad en el tratamiento de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como el mal de Alzheimer.⁴⁸

El médico Golding, ha desarrollado la terapia de células madre medulares. Asegura que en 90% de pacientes afectados con Alzheimer, que se someten a la terapia de células madre de origen medular, logran revertir algunos efectos de esta enfermedad, como la

desmemoria y la pérdida de la noción de tiempo, espacio y personas.

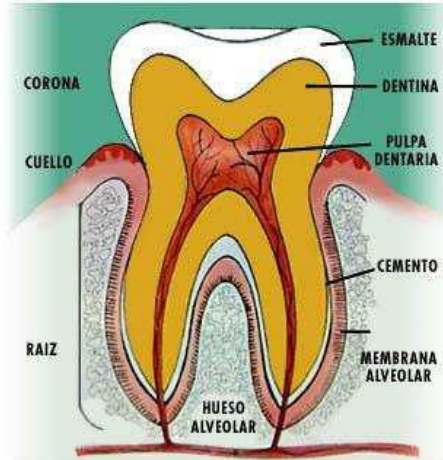
Sánchez Golding asegura que “no existen efectos secundarios por que las células madre provienen del mismo paciente”. Añade, además, que los efectos de la nueva terapia celular duran entre uno y dos años, pero que “solo en ocasiones” es necesario aplicarse de nuevo el tratamiento celular.¹⁰



Células madre, conocidas como Stem Cells.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica de obtención de células madre, se logra desarrollar, partir de tejido pulpar de dientes primarios en los niños que acudieron al Posgrado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L, además que se aisló pulpa de dientes primarios en forma ascéptica.



3.1 Universo de Estudio

3.1.1 Población

Se revisaron 84 pulpas de dientes infantiles, de niños de ambos géneros que acudieron al Posgrado de Infantil de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L.

3. 1.2 Criterios de Inclusión

Los criterios de inclusión fueron dientes primarios de niños que asistieron al Posgrado de Odontopediatría de la U.A.N.L., dientes primarios anteriores y posteriores en los que estuvo indicada pulpotomía., tejido pulpar obtenido de dientes deciduos próximos a exfoliarse con extracción indicada y tejido pulpar que hayan cumplido con los lineamientos de obtención de la muestra.

3.1.3 Criterios de Exclusión

Se excluyeron de este estudio los tejidos pulpares contaminados o que no cumplieron con los criterios de manejo y almacenaje.

Los tejidos pulpares cuyo periodo de almacenaje se extienda más de 2 días y

Los tejidos pulpares que no cumplan con la cantidad mínima requerida de 1mm cúbico.

Muestras en proceso de identificación contaminadas.

3.2 VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

3.2.1 Variables Dependientes:

Odontoblastos

Fibroblastos

Células madre

Células de defensa (macrófagos, mastocitos, plasmocitos)

Vasos sanguíneos y elementos celulares (neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, basófilos, monocitos).

3.2.2 Variables Independientes:

Edad del paciente

Tejido pulpar de dientes permanentes

Tejido pulpar necrótico

Tipo de obtención de muestra

3.3 RECOLECCION Y PROCESAMIENTO DE LAS PULPAS

Presencia y ausencia de microorganismos con turbidez del medio e indicadores químicos propios del medio.

Con la extracción de RNA, retrotranscripción y una PCR (reacción en cadena de polimerasa se establecieron las temperaturas de alineación óptima para los primers con la muestra para los genes TPD52 (Gene Bank BE974098) y WNT16 (Gene Bank AF169963)

(Gene Bank AF169963) y se esperó observar bandas que confirmaran, gracias al gel de agarosa al 1% , la presencia de células madre en la pulpa de dientes primarios, dando como resultado la presencia de células madre.

3.4. TAMAÑO DE MUESTRA

Se determinó el tamaño de la muestra usando el programa STATS v.1.1 calculando un universo por año de 84 dientes, con una probabilidad de aislamiento de 60%, error máximo aceptable del 10% y un nivel de confianza del 95%

Tamaño muestral: 84 tejidos pulpares.

3.5. ÉTICA DEL ESTUDIO

El presente estudio, toma en cuenta los requisitos citados en el Código de Helsinki establecido durante la Asamblea de la Asociación Médica Mundial aprobado en 1964 en Helsinki, Finlandia y los de la Norma Oficial Mexicana.

3.6. Norma 013

NOM-013-SSA2-1994 Enfermedades Bucales

NORMA Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-1994, Para la prevención y control de enfermedades bucales.

Las actividades de este trabajo incluyen el trabajo clínico y el de laboratorio:

3.7. Actividades Clínicas:

Todos los pacientes seleccionados de acuerdo a las variables y criterios pre-establecidos inicialmente, fueron evaluados con un examen radiográfico del diente del cual se obtuvo tejido pulpar y se procedió a hacer la pulpotomía o exodoncia, cuidando los siguientes parámetros clínicos:

- + Previa esterilización del instrumental.

- + Se obtuvo la muestra a través de pulpotomía:

- + Se realizó aislamiento absoluto del diente a tratar con dique de goma, retirar con fresa de bola #6 la caries sin llegar a comunicar con la cámara pulpar.

- + Se Irrigó con solución salina estéril el diente y la cavidad y realizó aspiración; colocó clorhexidina al 0.2% en las paredes de la cavidad y alrededor de la pieza dental, se cambió la fresa estéril a una de bola #2 estéril y realizó la comunicación con la pulpa, irrigando únicamente con solución salina estéril.

- + Con cucharilla de dentina Hu Friedy estéril se procedió a la extracción de la pulpa cameral evitando contaminar la muestra y depositarla en el medio MEA Eagle para su transporte al laboratorio en un vial para células, de vidrio tipo PCR con una proporción de

1:40 del medio DMEM o PERCOLL y llevadas el laboratorio de Microbiología de la U.A.N.L en el momento de la obtención.

+ Para dientes deciduos en que estuvo indicada la extracción:

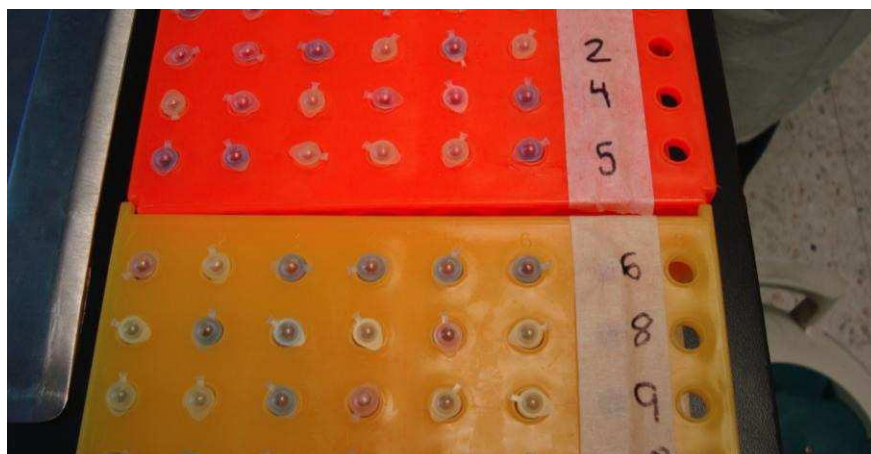
Se preparó el paciente, con su respectiva esterilización del instrumental, en una autoclave a una temperatura de 160 grados durante 45 minutos y en bolsas para instrumental estéril a vapor por presión (calor húmedo).

Se retiró la pulpa dental remanente, una vez extraído el diente, con una cucharilla de dentina Hu Friedy estéril evitando su contaminación con el medio bucal.

Se colocó la muestra en un vial con medio MEA Eagle para su transporte al laboratorio.

3.8. ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Diseño de Primers para los genes TPD52 (Gene Bank BE974098) y WNT16 (Gene Bank AF169963).



Nombre Primer	Secuencia 5'-3'	No. Bases
9963L	5' GCTCCTGTGCTGTGAAAACA 3'	20
9963R	5'TGCATTCTCTGCCTTGTGTC 3'	20
TPD52L	5' GCTGAGAACAGACCCAGTCC 3'	20
TPD52R	5' TCACAGGCTCTCCTGTGTCTT 3'	21

- 1.- Se colocó 175 µl de RNA Lysis Buffer (+ BEM) en un tubo esterilizado
- 2.- Se extrajo la muestra del buffer y se colocó dentro del búfer de lisis.
- 3.- Se mezcló por inversión, así mismo, se utilizó un pistilo automático previamente esterilizado para asegurar una lisis completa de la muestra.
- 4.- Se agregó 350 µl de RNA Dilution Buffer (RDA) y se mezcló por inversión de 3 a 4 veces.
- 5.- Los tubos fueron centrifugados por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo.
- 6.- 200 µl de etanol 95% fueron agregados al sobrenadante y se mezcló por pipeteo.
- 7.- La mezcla fue transferida a una canastilla de centrifugación y se ensambló en un tubo nuevo. Se centrifugó por 1 minuto. El eluido fue

descartado.

8.– Se agregó 600 µl de RNA Wash Solution (+ etanol) y fue centrifugada nuevamente por 1 minuto. El eluído fue descartado.

9.–Se preparo una mezcla de incubación de DNAsa utilizando la siguiente tabla:

Solución	Volumen	Número de muestras	Total
Yellow Core Buffer	40 µl	10	400 µl
MnCl ₂ 0.09M	5 µl	10	50 µl
DNase I	5 µl	10	50µl

(Se mezcló de manera gentil (pipeta), no se utilizó vortex)

10.– Se agregó 50 µl de la mezcla a la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.

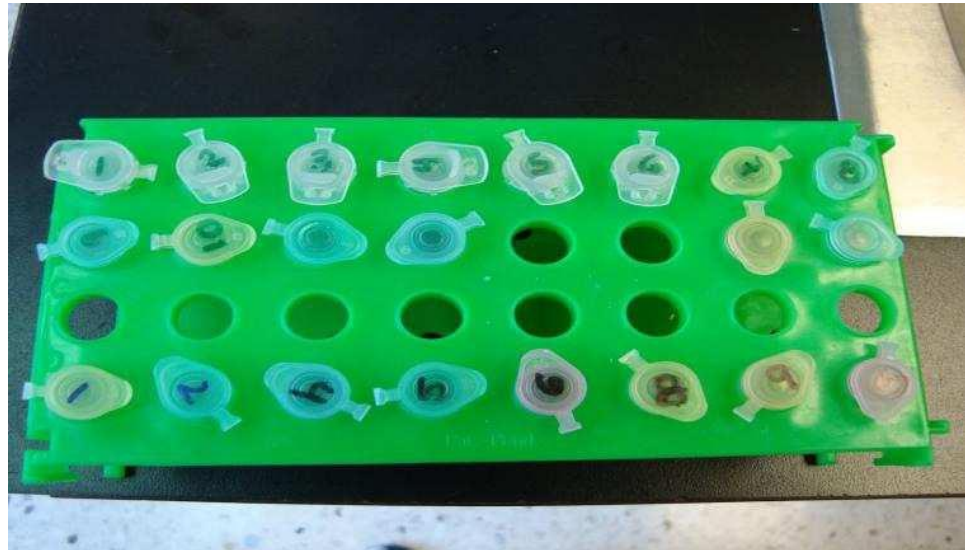
11.– Se agregó 200 µl de DNasa Stop Solution (+ etanol) y fue centrifugado por 1 minuto. 12.– Se agregó 600 µl de RNA Wash Solution, se centrifugó por 1 minuto y se descartó el eluído.

13.– Se agregaron 250 µl de RNA Wash Solution, se centrifugó por 2 minutos y la canastilla fue transferida a un nuevo tubo (tubo de elusión)

14.– Se agregaron 100 µl de agua libre de nucleasas a la membrana; se centrifugó por 1 minuto para eluir el RNA y se guardaron a una temperatura

de -20°C .

*Centrifugación: 12,000 \approx 14,000 * g (a temperatura ambiente)



3.9.2 Retrotranscripción

Para llevar a cabo la retrotranscripción se utilizó el kit AccessQuick™ RT-PCR System de PROMEGA, utilizando para esto el protocolo provisto dentro del kit; se realizó de la siguiente manera:

1. Para cada muestra en un tubo estéril libre de nucleasas se agregó lo siguiente:

Componente	Volumen final	Concentración final
AccessQuick™ Master Mix, 2X	25 μ l	1X
Upstream Primer, 50 μ M	1 μ l	1 μ M
Downstream Primer, 50 μ M	1 μ l	1 μ M
RNA molde	5 μ l	-
Agua libre de nucleasas	18 μ l	-

Se mezcló gentilmente con vortex y posteriormente se agregó 1 μ l SW AMV RW Reverse Transcriptase, se mezcló nuevamente y se procedió a la retrotranscripción.

	RT-PCR	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Terminación
Tiempo	40min	45s	45s	30s	5min
Temperatura	40°	94°	58°	72°	72°
		□-----30x-----□			

Para esto se utilizó un termociclador Eppendorf Epgradient 8691 con el siguiente programa:

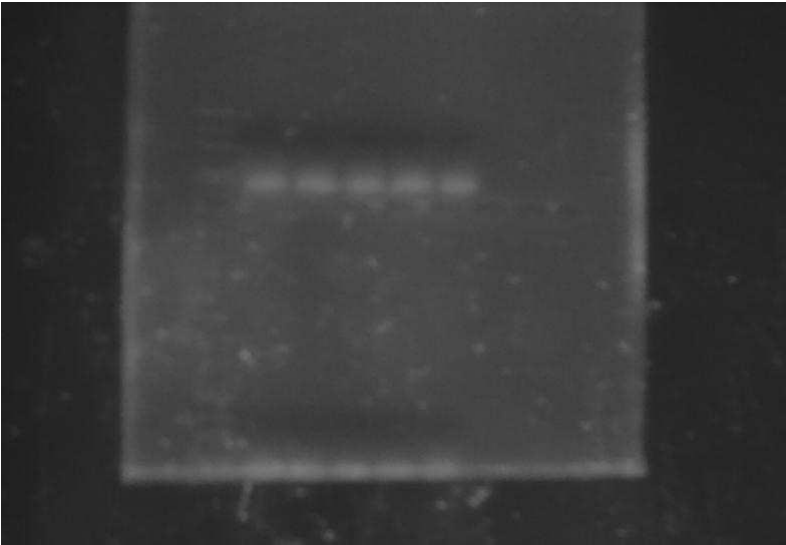


Al término de la retro transcripción se corrió un gel de agarosa 1% para la visualización de las bandas, juntamente con las muestras, un marcador de peso molecular fue añadido al gel.

El resultado fueron bandas un poco difusas, por lo que se procedió a realizar una PCR tomando como molde las cadenas resultantes de la retro transcripción.

3.9.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Se realizó primero una PCR con una sola de las muestras para establecer la temperatura de alineación óptima para los primers con la muestra, utilizando un gradiente de temperatura desde 52°C hasta 64°C con variación de 1°C entre cada tubo (12 tubos).



La PCR se realizó de la siguiente manera:

En un tubo estéril libre de nucleasas se agregó lo siguiente para cada muestra:

Componente	Volumen final	Concentración final
5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	5 μ l	1X
MgCl ₂ Solution, 25mM	2.5 μ l	2.5mM
Upstream Primer, 50 μ M	0.5 μ l	1 μ M
Downstream Primer, 50 μ M	0.5 μ l	1 μ M
GoTaq® DNAPolymerase (5u/ μ l)	0.25 μ l	
DNA molde	2 μ l	-
Agua libre de nucleasas	14.25 μ l	-

Se mezcló gentilmente en vortex y se procedió a utilizar el siguiente programa en el termociclador:

	Hot start	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Terminación
Tiempo	2min	45s	45s	30s	5min
Temperatura	94°	94°	52° – 64°	72°	72°
		30x			

Al término del programa se corrieron las muestras en un gel de agarosa 1% durante 45 minutos y se observó la intensidad de las bandas.

Se estableció que la temperatura óptima de alineación para los primers es de 58°C

Se realizó una PCR con todas las muestras utilizando las mismas condiciones y con temperatura de alineación de 58°C. Al término se transfirieron alícuotas de 2 µl a un gel de agarosa 1% y se corrió durante 45 minutos en la cámara de electroforesis.

CAPITULO IV: RESULTADOS

En el presente trabajo se demostró la presencia de células madre, a partir de pulpas de dientes deciduos.

Lo cual confirma que los dientes primarios son ricos en células altamente capaces de regenerar sus propios tejidos ante una agresión física, siempre y cuando ésta no esté relacionada con aspectos infecciosos.

Se observaron las bandas revelando en un trans iluminador con lámpara de UV. El buffer de carga de las muestras contiene el revelador SYBR.

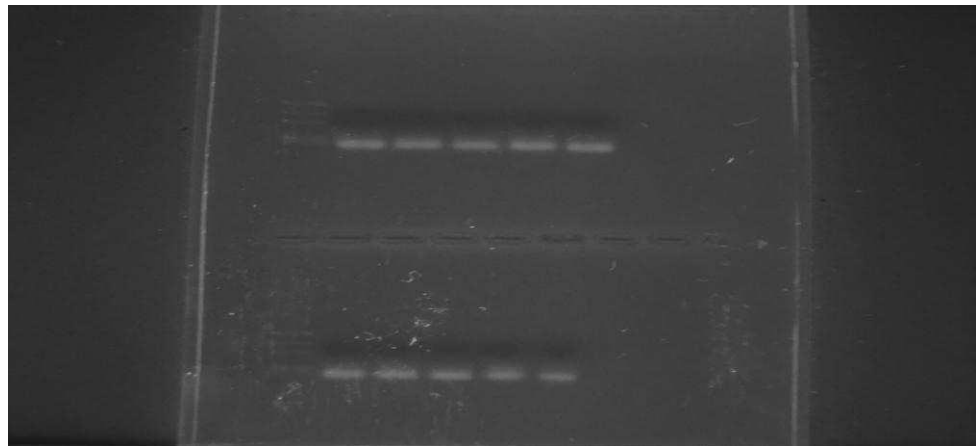
En los primers diseñados para los genes TPD52 (Gene Bank BE974098) y WNT16 (Gene Bank AF169963), se observaron las bandas que confirmaban la presencia de células madre en la pulpa de dientes primarios., Validando esta investigación como un éxito.

En los carriles 1 muestra el marcador de talla molecular (abierto). Y en los carriles 2,3,4,5 y 6 muestran una banda que identifican los genes TPD52 y WNT16 que corresponden a células mesenquimales.

En carril 7 corresponde a una señal de control negativo.

Se muestran los marcadores con sus tallas moleculares

1 2 3 4 5 6 7



CAPITULO V: DISCUSIÓN

En nuestros resultados se pudo apreciar la presencia de los genes TPD52 (tamaño) y WNT16 (No amplifica), bajo las condiciones del experimento de PCR, al igual que se pudo demostrar en el trabajo realizado por Takeda y colaboradores en el año 2006 donde utilizando una técnica similar a la nuestra identificaron los mismos genes de TPD52 y WNT16, que a diferencia de nuestro estudio, ellos realizaron sus experimentos a partir de células de pulpa *que fueron cultivadas y luego purificadas* para probar identificar con PCR

En nuestro estudio, logramos identificar los mismos genes evitando el paso del cultivo celular, lo cual hace más rápida la identificación de los genes sin realizar otro experimento.

Otra diferencia del estudio es que nosotros identificamos estos genes de pulpas de niños de 3 a 7 años, ellos aplicaron este mismo sistema con dientes de ratón.

Además, el cultivo celular puede en un determinado momento modificar la expresión de ciertos genes sobre todo el WNT16 ya que éste responde a moléculas de señales que corresponden a diferentes grados de desarrollo (Nusse and Van der Walle 1982, Wodarznuse 1998) y que también fue demostrado por otros reportes como los de Jarvinen (jarinen et al, 2006).

En contraste al igual que en el estudio de Lewis en el 2007, la expresión del gen TPD52 disminuyó a medida que las células envejecieron debido a que en RNAm deja de recibir señales del DNA de las células, ya que, en nuestro estudio, no se cultivaron las células, éste no se manifiesta en nuestros resultados. (Lewis et al. 2007) ya que estas moléculas se suprimen al no necesitar diferenciarse y/o proliferarse.

A diferencia de M. Atari., J. Caballé-Serrano, Que, en el 2012, publicaron la separación e identificación de células mesenquimales para cultivo de hueso, nosotros hemos podido aislar e identificar células madre de manera inmediata y no después de hacer cultivos celulares a partir de pulpas con fines de regeneración de hueso, en las cuales, directamente realizamos la identificación utilizando la primera generación de mesenquimales.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

En relación con las observaciones realizadas concluimos que:

1. Se acepta la hipótesis planteada, que sugiere que es posible obtener Células Madre a partir de Tejido pulpar de dientes primarios, con toda una serie de pasos minuciosos y estrictos.
2. Existe una cercana asociación entre primers para los genes TPD52 (Gene Bank BE974098) y WNT16 (Gene Bank AF169963), Gracias la ayuda de geles de agarosa, a una temperatura ideal de 58 grados centígrados y a la cámara de electroforesis que codificaron las células mesenquimales.
3. Se encontró mayor marcador de talla molecular en el carril 1 (abierto). A diferencia de carriles 2,3,4,5 y 6 que mostraron bandas que identificaron los genes TPD52 y WNT16.
4. Las células mesenquimales, no fueron presentes en el carril 7, mostrando una señal de control negativo.

5. Al extraer RNA de cada muestra se concluye el material genético de las células mesenquimales que fueron específicos logrando así una señal positiva para los iniciadores. (primers).
6. Las Células Madre pueden ser detectadas de manera sensible a través de PCR tiempo real, con indicadores y temperatura ideal a 58 grados centígrados., Para los genes TPD52 (Gene Bank BE974098) y WNT16 (Gene Bank AF169963).
7. Utilizando este método, es posible obtener información sobre la cantidad y calidad de la presencia de Células Madre, lo cual confirma que los dientes primarios son ricos en células altamente capaces de regenerar sus propios tejidos ante una agresión física, siempre y cuando, ésta no esté relacionada con aspectos infecciosos.
8. Se observaron las bandas que confirmaban la presencia de células madre en la pulpa de dientes primarios., Validando esta investigación como un éxito.

Las células de estos dientes pueden ser preservadas para un futuro uso médico actuando como un seguro biológico para su familia.
9. Con los avances tecnológicos podemos concluir que el aislamiento de una célula mesenquimal resulta ser más complicado cuando se encuentra con otras células que cuando se encuentra de manera aislada, ya que se ha comprobado que es difícil conservar las características originales.

VII. LITERATURA CITADA

1. A. Arthur, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S,2008., Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues.
2. Ballini A, De Frenza G, Cantore S, Papa F, Grano M, Mastrangelo F, Tetè S, Grassi FR,2007., In vitro stem cell cultures from human dental pulp and periodontal ligament: new prospects in dentistry.
3. Carinci F, Papaccio G, Laino G, Palmieri A, Brunelli G, D'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F,2008., Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells.
4. Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG,2008., Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells.
5. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE,2008., Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth.

6. Chachques JC, Salanson-Lajos C, Lajos P, Shafy A, Alshamry A, Carpentier A,2005., Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration.

- 7.Cheng PH, Snyder B, Fillos D, Ibegbu CC, Huang AH, Chan AW,2008., Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee.

8. Degistirici O, Jaquier C, Schönebeck B, Siemonsmeier J, Götz W, Martin I, Thie M,2008., Defining properties of neural crest-derived progenitor cells from the apex of human developing tooth.

9. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, Sanchez-Torrijos J, Payá R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepúlveda P,2008., Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction.

10. Gotlieb EL, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F,2008., An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth.

- 11.Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, Denbesten P, Veis A, Poliard A,2008., Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair.

12. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G,2008., Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration.

- 13.Galler KM, Cavender A, Yuwono V, Dong H, Shi S, Schmalz G, Hartgerink JD, D'Souza RN,2008., Self-assembling peptide amphiphile nanofibers as a scaffold for dental stem cells.

14. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW,2008., Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth.

15. He F, Yang Z, Tan Y,2007., Odontogenesis of Delta1 gene transfected human dental pulp stem cells.
16. Honda MJ, Fong H, Iwatsuki S, Sumita Y, Sarikaya M,2008., Tooth-forming potential in embryonic and postnatal tooth bud cells.
17. Huang GT,2008., A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration.
- 18.Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S,2008., The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering.
19. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW,2006., Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro.
20. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M,2008., A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp.
21. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH,2007., Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues.
- 22.Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, Cabral RM, Maranduba CM, Gaiad TP, Morini AC, Vieira NM, Brolio MP, Sant'Anna OA, Miglino MA, Zatz M,2008., Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic?
23. Kumabe S, Nakatsuka M, Kim GS, Jue SS, Aikawa F, Shin JW, Iwai Y,2006., Human dental pulp cell culture and cell transplantation with an alginate scaffold.
24. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF,2006., Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers.

25. Liu SH, Wei FC, Sun SZ, Zhang CY, Liu YS, 2004., The characteristics of cultured dental pulp cells and the localization of dental pulp stem cells.
26. Liu HS, Bai XW, Yang Y, Ge LH, 2007., Multilineage potential of pulp stem cells from human young permanent teeth in vitro.
27. Lovschall H, Mitsiadis TA, Poulsen K, Jensen KH, Kjeldsen AL, 2007., Coexpression of Notch3 and Rgs5 in the pericyte-vascular smooth muscle cell axis in response to pulp injury.
28. Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S, 2008., Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa.
29. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, Matsuo O, 2007., Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice.
30. Mao JJ, 2008., Stem cells and the future of dental care.
31. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O, 2008., Somatic stem cells for regenerative dentistry.
32. Morsczeck C, Reichert TE, Völlner F, Gerlach T, Driemel O, 2007., Somatic stem cells for regenerative dentistry.
33. Morsczeck C, Ernst W, Florian C, Reichert TE, Proff P, Bauer R, Müller-Richter U, Driemel O, 2008., Gene expression of nestin, collagen type I and type III in human dental follicle cells after cultivation in serum-free medium.
34. Murray PE, Garcia-Godoy F, 2004., Stem cell responses in tooth regeneration.
35. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH, 2005., Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth.

36. Morsczeck C, 2006., Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro.
37. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S, 2006., Craniofacial tissue engineering by stem cells.
38. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM, 2007., Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action.
39. Nakahara T, Ide Y, 2007., Tooth regeneration: implications for the use of bioengineered organs in first-wave organ replacement.
40. Nakashima M, Akamine A, 2005., The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics.
41. Nakahara T., 2006., A review of new developments in tissue engineering therapy for periodontitis.
42. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I, 2006., Stem cell properties of human periodontal ligament cells.
43. 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, 2005., Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp.
44. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G, 2006., Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair.
45. Renard E, Lopez-Cazaux S, Guicheux J, Weiss P, Laboux O, Alliot-Licht B, 2007., Stem cells of dental pulp.

46. Reed JA, Patarca R, 2006., Regenerative dental medicine: stem cells and tissue engineering in dentistry.
47. Snead ML, 2008., Whole-tooth regeneration: it takes a village of scientists, clinicians, and patients.
48. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, Formstecher P, Bailliez Y, Polakowska RR, 2008., Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities.
49. Sloan AJ, Smith AJ, 2007., Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair.
50. Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, Kucerová L, 2007., Human dental pulp stem cells— isolation and long term cultivation.
51. Trubiani O, Orsini G, Zini N, Di Iorio D, Piccirilli M, Piattelli A, Caputi S, 2008., Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: a morphological report.
52. Tetè S, Mastrangelo F, Carone L, Nargi E, Costanzo G, Vinci R, Burruano F, Tortorici S, Dadorante V, Caciagli F, Traini T, Gherlone E, Caraffa A, Salini V, Conti P, Ciccarelli R, 2007., Morphostructural analysis of human follicular stem cells on highly porous bone hydroxyapatite scaffold.
53. Trubiani O, D'Arcangelo C, Di Iorio D, Di Nardo Di Maio F, Caputi S, 2007., Dental pulp stem cells bioadhesivity: evaluation on mineral-trioxide-aggregate.
54. Thesleff I, Tummers M, 2003., Stem cells and tissue engineering: prospects for regenerating tissues in dental practice.
55. Thesleff I, 2003., Developmental biology and building a tooth.
56. Yang XC, Fan MW, 2005., Identification and isolation of human dental pulp stem cells.

57. Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R, Ueda M,2006., Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system–based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy.

58. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA,2007., Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation.