

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Aislamiento y cultivo de células madre obtenidas de la pulpa de dientes molares de caballo (*Equus ferus caballus*)

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Roy Anderson Oropeza Clavo

Asesor: Mag. Mauricio Gonzales Molfino

Lima, Perú

2019

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Aislamiento y cultivo de células madre obtenidas de la pulpa de dientes molares de caballo (*Equus ferus caballus*)

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Roy Anderson Oropeza Clavo

Asesor: Mag. Mauricio Gonzales Molfino

Lima, Perú

2019

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Aislamiento y cultivo de células madre obtenidas de la pulpa de dientes molares de caballo (*Equus ferus caballus*)

Roy Anderson Oropeza Clavo

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y ASESOR

PRESIDENTE: Blgo. Roberto Pineda Chavarría

SECRETARIO: Blgo. Miguel Dávila Robles

VOCAL: Mag. Wilmer Jara Galarreta

ASESOR: Mag. Mauricio Gonzales Molfino

“Si no puedes ganar el juego, si no puedes resolver el rompecabezas, no eres más que otro perdedor”

“Resuelvo casos difíciles porque es mi pasatiempo...”

“No soy solitario ni antisocial, es que conozco la estupidez humana y no me quiero contagiar”

Tsugumi Ōba, Death Note

A aquellas personas que para bien
o para mal,
creen en mí...

यदि आप इसे पढ़ रहे हैं
तो ऐसा इसलिए है क्योंकि आपके
पास करने के लिए और कुछ नहीं है

ÍNDICE

Resumen.....	9
Abstract	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. OBJETIVOS.....	15
III. MARCO TEÓRICO.....	16
3.1. CULTIVO CELULAR.....	16
3.2. CÉLULAS MADRE.....	16
3.2.1. Tipos de células madre según su origen	17
3.2.2. Células madre mesenquimales.....	17
3.2.3. Células madre de la pulpa dental	19
3.2.4. Criterios de la isct	20
3.2.5. Células madre mesenquimales equinas	21
IV. ANTECEDENTES	22
V. HIPOTESIS	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	25
6.2. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	25
6.3. VARIABLES.....	25
6.4. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	26
6.5. MUESTREO	27
6.6. PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	27
6.6.1. Extracción de la pulpa dental	27
6.6.2. Aislamiento de células madre de pulpa dental equina	27
6.6.3. Cultivo	27
6.6.4. Tiempo mínimo requerido para el aislamiento de CMPD	28
6.6.5. Análisis de datos	28
VII. RESULTADOS.....	29
7.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL EQUINA	29
7.2. TIEMPO MÍNIMO REQUERIDO PARA EL AISLAMIENTO DE CMPD	29
7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29

VIII. DISCUSIÓN	31
IX. CONCLUSIONES	35
X. RECOMENDACIONES	36
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	43
I	44
II	45
III	46

Resumen

La terapia regenerativa en equinos ha mostrado resultados prometedores en el campo de la medicina veterinaria con el uso de nuevas células madre, los resultados de estos tratamientos dependen en gran medida del manejo correcto de la muestra, aislamiento y cultivo. El objetivo de la presente tesis fue aislar y cultivar células madre de la pulpa (CMPD) de dientes molares de *Equus ferus caballus* (caballo). La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Ricardo Palma entre enero y diciembre del 2018, y se emplearon dientes molares de caballos. Se realizó la extracción, aislamiento y cultivo de la pulpa dental y se calculó el tiempo mínimo para el aislamiento de las CMPD y los datos se analizaron con el test de Friedman; además se utilizó el test de Wilcoxon con ajuste de Benferroni con un 95% de confiabilidad mediante el paquete estadístico SPSS v.23.

Se aislaron las CMPD equinas que expresaron una morfología fibroblastoide típica. El tiempo de aislamiento fue en 10.8 días, cuantitativamente menor que investigaciones anteriores, en comparación al tiempo de confluencia al 70% del tercer subcultivo, el cual fue de 3.77 días. Los resultados indican que a medida que progresa el cultivo, el tiempo de duplicación celular disminuye, mientras que el número de duplicación poblacional aumenta. Se puede aislar y cultivar *in vitro* CMPD equina mediante el método de explante, las cuales manifestaron una morfología tipo fibroblasto.

Palabras clave: Células madre, pulpa dental, cultivo *in vitro*, caballo.

Abstract

Regenerative therapy in horses has shown promising results in the field of veterinary medicine with the use of new stem cells, the results of these treatments depend largely on the correct handling of the sample, isolation and culture. The objective of this thesis was to isolate and grow pulp stem cells from molar teeth (SCMT) of *Equus ferus caballus* (horse). The research was conducted in the Animal Biotechnology Laboratory of the Ricardo Palma University between January and December 2018, and molar teeth of horses were used. The extraction, isolation and culture of the dental pulp was performed and the minimum time for the isolation of the SCMT was calculated and the data was analyzed with the Friedman test; In addition, the Wilcoxon test with Benferroni adjustment was used with 95% reliability using the statistical package SPSS v.23.

Equine SCMTs that expressed a typical fibroblastoid morphology were isolated. The isolation time was 10.8 days, quantitatively less than previous research, compared to the 70% confluence time of the third subculture, which was 3.77 days. The results indicate that as the culture progresses, the cell doubling time decreases, while the population doubling number increases. Equine SCMT can be isolated and cultured in vitro using the explant method, which showed a fibroblast type morphology.

Keywords: Stem cells, dental pulp, in vitro culture, horse.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con una raza de caballos reconocida a nivel mundial, el Caballo de Paso Peruano. Estos animales sobresalen por su adiestramiento especializado y su gran belleza haciéndolos un patrimonio importante de la nación. Estos ejemplares son usados en ocasiones especiales como ceremonias protocolares, bailes típicos como la marinera e inclusive mucho de ellos forman parte de escolta presidencial, además de participar a nivel internacional en competencias ecuestres. Los deportes ecuestres y la actividad de alta intensidad suelen exigir de una manera superlativa a los animales generando como consecuencia un desgaste tremendo a nivel de los ligamentos, tendones e inclusive cartílagos. Este tipo de problemas pueden presentarse recurrentemente en este tipo de caballos teniendo como foco a los tendones flexores digitales superficiales y lesiones asociadas a osteoartritis.

Los tratamientos están basados en el uso de corticoides y cirugía para este tipo de lesiones las cuales suelen llevar demasiado tiempo de recuperación y lastimosamente tiene un éxito sub óptimo conllevando a una alta tasa de recurrencia de las lesiones. Este daño puede comprometer seriamente la movilidad del animal no teniendo más opción que el beneficio y generando de esa manera una gran pérdida para el criador.

Otro tipo de tecnología está abriéndose paso en el mundo veterinario, la terapia celular basada en células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales están definidas como células de origen mesodermal que presentan una característica en especial, su gran capacidad pluripotencial, el hecho poder diferenciarse en un gran número de linajes celulares confiere a las células madre una gran relevancia en el uso de terapias regenerativas.

Durante la etapa del desarrollo embrionario, interacciones epitelio–mesénquima determinan la formación de todos los componentes dentales incluyendo la pulpa. La compleja estructura dental provee dureza y protección, pero a su vez es vulnerable a lesiones causadas por agentes microbianos, trauma mecánico y/o químico, defectos congénitos, entre otros. Infortunadamente los componentes dentales no poseen la capacidad para regenerarse después que una lesión genera daños estructurales, pero se ha observado que pueden presentar procesos reparativos limitados como la formación de dentina terciaria, la cual es una matriz mineralizada que sirve como barrera protectora de la pulpa dental cuando las lesiones no han generado daño irreversible en dicho tejido.

Uno de los elementos claves para la ingeniería de tejidos son las células madre o stem cell (SC), definidas como células con la capacidad de dividirse continuamente para auto-replicarse o producir células especializadas que pueden diferenciarse en otros tipos de células o tejidos (diferenciación multilínea). Basadas en su origen, pueden categorizarse en dos tipos: células

madre embrionarias (ESCs) y células madre postnatales, adultas o somáticas (ASCs). Las ASCs a su vez se clasifican según su origen en células madre hematopoyéticas (HSCs) obtenidas del cordón umbilical o de la sangre periférica y en células madre mesenquimales (MSCs) que residen en una variedad de tejidos como la médula ósea, dermis, hígado, pulpa dental, mucosa bucal, entre otras.

Actualmente se contempla la aplicación de terapias que promuevan la regeneración y mejoren la reparación de los tejidos dentales, a partir de la identificación y aislamiento de células progenitoras odontogénicas de la pulpa de dientes.

Al determinar el tipo de célula madre a usar, las células madre de la pulpa dental tienen ventajas sobre otro tipo de MSCs o HSCs (derivadas de médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica o sangre de cordón umbilical), ya que su fuente son los dientes extraídos por indicación terapéutica (generalmente dientes permanentes como terceros molares incluidos o premolares por indicación ortodóntica), lo cual involucra muy baja morbilidad y pocas implicaciones éticas.

Para la medicina veterinaria moderna es importante optimizar la metodología disponible para la obtención de muestra, cultivo y caracterización de MSCs provenientes de la pulpa de dientes pre-molares permanentes, debiendo establecerse las principales características de las etapas y métodos empleados ya que los estudios presentan discrepancias que pueden deberse al año de realización, la disponibilidad de insumos, reactivos y equipos en los laboratorios donde se generaron, y la experiencia de las personas a cargo e incluso el presupuesto con el que se contaba para la realización de cada estudio.

Así pues, en los últimos años han sido múltiples los trabajos publicados en los que se ha estudiado el comportamiento en diferentes entornos biológicos de las células madre presentes en los diferentes tejidos y su capacidad para regenerar los tejidos dañados, así como distintas vías de aislamiento, a fin de inducir su diferenciación y estimular su actividad secretora.

El uso de esta terapia genera mucho interés en el ámbito científico por sus grandes ventajas demostradas, lamentablemente a nivel local no se ha logrado difundir ampliamente, por lo que el uso de estas terapias amerita ser investigadas.

Poder entender los mecanismos celulares implicados en los procesos de regeneración tisular del organismo es crucial para desarrollar alternativas terapéuticas seguras, predecibles y efectivas que nos permitan mejorar las empleadas actualmente en las diversas patologías que afectan al individuo, por lo que es de capital importancia optimizar la metodología de aislamiento de estas células.

Para entender mejor el ámbito de la presente investigación, debemos tener en cuenta que las células madre mesenquimales (CMM) o (MSCs por sus siglas en inglés), son células adultas

pluripotentes con morfología fibroblastoide, con la capacidad para diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos, adipocitos, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Varios estudios han asignado a este grupo celular diversos nombres como: células de estroma medular, unidades formadoras de colonias fibroblastoides, precursores estromales o células adultas progenitoras multipotentes o MAPCs (Multi-Potent Adult Progenitor Cells).

La información obtenida hasta la fecha indica que las células madre mesenquimales pueden aislarse de muchos tejidos animales incluyendo tejido adiposo, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, líquido sinovial, músculo esquelético, dermis, pericitos, hueso trabecular, cordón umbilical humano, pulmón, pulpa dental, e incluso de sangre periférica, sugiriendo que las células madre mesenquimales están ampliamente distribuidas *in vivo*.

Uno de las mayores dificultades para el uso de las células madre mesenquimales, es la concepción de que estas células solo funcionan a un nivel autólogo, generando que se tengan que realizar un almacenamiento muchas veces a largo plazo hasta el momento de su aplicación, logística que encarece el tratamiento. Otro detalle que se suma a este escenario es la dificultad de su obtención; usualmente, las células suelen obtenerse a través de una punción en la médula ósea o mediante incisiones subcutáneas en búsqueda de grasa, lo cual requiere tener al paciente bajo anestesia general y conlleva un cierto nivel de riesgo.

La terapia regenerativa en equinos ha mostrado resultados prometedores en el campo de la medicina veterinaria, y los resultados de estos tratamientos dependen en gran medida del manejo correcto de la muestra, aislamiento y cultivo. Los protocolos clásicos del cultivo de células están basados ampliamente en la suplementación de suero fetal bovino (SFB) al medio ya que este posee en gran cantidad citoquinas y factores de crecimiento; otro factor que favorece su utilización es la facilidad de su obtención ya que la mayoría de casas comerciales cuentan con el producto. Sin embargo, el uso de este compuesto ha presentado una alta variabilidad entre los lotes de producción generando muchas veces resultados muy poco reproducibles y otro detalle relacionado al uso del SVF es el riesgo inmune ya que al provenir de otra especie se podría generar algunos anticuerpos en las células cultivadas y comprometer seriamente el tratamiento, pudiendo causar algún tipo de alergia y rechazo.

Estas características convierten a las células madre mesenquimales en un potencial beneficioso para la terapia celular, la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa para un diverso rango de enfermedades, lesiones de médula ósea, quemaduras, osteoartritis, entre otras.

Ahora bien, debemos considerar que la importancia de la especie equina radica en que constituye el motor animal por excelencia utilizado en todos los países del mundo, constituyó

una notable fuente alimentaria para el hombre, era uno de los animales que con más frecuencia cazaba el hombre primitivo. A partir de su domesticación se inicia una estrecha relación del animal con el hombre, que más tarde lo utilizó como transporte, para la tracción, la guerra y en deportes ecuestres.

De los deportes ecuestres, la hípica crea un escenario donde los animales que participan en ella elevan su valor a partir del número de sus victorias, lamentablemente el tiempo de vida deportiva de estos animales es sumamente corta debido al desgaste físico que se da en cada carrera. Considerados únicos en su género por su conformación anatómica y peculiares formas exteriores, el Caballo de Paso Peruano forma parte del rico acervo cultural nacional, reconocido en todos los rincones del mundo y es requerido para competencias muy exigentes que evidentemente producen desgaste físico. Esto mismo se repite en caballos usados para actividades relacionadas con la seguridad pública por el ejército y la policía peruana.

Los estudios *in vitro* son ideales para la observación y el análisis de una determinada línea celular bajo condiciones específicas ya que los cultivos celulares no cuentan con el gran número de variables presentes en un estudio *in vivo*.

El trasplante de células madre adultas se emplea en distintos campos de la medicina veterinaria como en la regeneración cardíaca, cirugía ortopédica y traumatología. La terapia celular tiene como objetivo impulsar la capacidad regenerativa del propio organismo disminuyendo el uso de materiales artificiales.

El uso clínico de las células madre mesenquimales o de sus factores solubles es muy prometedor en los campos de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

El objetivo de la presente investigación es aislar y cultivar células madre obtenidas de dientes molares de equino, evaluando en está el tiempo de aislamiento, así como la morfología que expresan estas células a nivel *in vitro*, estos indicadores serán claves para entender los mecanismos celulares que se utilizarán en la terapia celular. Así mismo nos ayudará, con el tratamiento de enfermedades osteo-articulares en diferentes modelos de animales.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar y cultivar células madre de la pulpa de dientes molares de *Equus ferus caballus* (caballo)

Objetivos específicos

- Obtención de la pulpa de dientes molares extraídos de cabezas de caballos.
- Aislar y cultivar *in vitro* las células madre de pulpa de dientes molares equinos (CMPDE), utilizando el método de explante.
- Evaluar el tiempo de aislamiento y la morfología las células madre de la pulpa de dientes molares equinos (CMPDE)

III. MARCO TEÓRICO

3.1. CULTIVO CELULAR

Desde hace años se demostró que las células podían extraerse de los tejidos y proliferar *in vitro* en condiciones de esterilidad rigurosa. Para ello había que reproducir en laboratorio las condiciones físicas (pH, osmolaridad), necesidades nutritivas (aminoácidos, purinas y pirimidinas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, coenzimas y sales) factores de crecimiento y medios de defensa contra las infecciones. Era importantísimo reproducir y mantener los valores exactos de estos requerimientos, pero no se conocían. Por eso, el primer medio de cultivo fue el suero salino u otros líquidos biológicos, pero hacían fallar el cultivo porque los nutrientes que había en ellos eran muy difíciles de controlar. De ahí que se empezaran a comercializar medios de cultivo definidos químicamente. Una evolución más en el cultivo celular es la de introducir en los medios de cultivo factores de crecimiento. Sin embargo, estos factores son difíciles de aislar, actúan normalmente en colaboración con otros factores e interaccionan con otros nutrientes.

Los cultivos celulares han permitido un estudio minucioso de los fenómenos celulares. Permiten obtener cantidades suficientes de poblaciones de células homogéneas de manera reproducible, por lo que se pueden utilizar como modelos en el estudio de los mecanismos celulares. Pueden realizarse estudios sobre metabolismo celular, control de crecimiento, mecanismos moleculares de diferenciación, requerimientos nutritivos, análisis clonal de los descendientes individuales de cada célula.

Las diferencias de comportamiento que puede exhibir un mismo tipo celular *in vivo* e *in vitro* hacen que no puedan extrapolarse sin más los resultados obtenidos *in vitro* a la situación real *in vivo*.

Los principales tipos de técnicas para cultivos animales son tres: en medios semisólidos, en monocapa y en suspensión.

3.2. CÉLULAS MADRE

Las células madre poseen capacidad clonogénica y autorenovadora y pueden diferenciarse en múltiples linajes celulares (Weissman IL, 2000). Las propiedades clonogénica y autorenovadora denotan la capacidad de reproducirse siendo las células hijas una réplica exacta precisa de las anteriores. Estas células pueden replicarse muchas generaciones sin perder sus características originales (Caplan AI 1991). Las células madre mantienen la integridad estructural y funcional de los tejidos reemplazando las células dañadas.

Las células madre se pueden clasificar según su potencialidad y según su origen.

3.2.1. Tipos de células madre según su origen

Por otro lado, según su origen, pueden ser células madres embrionarias o adultas. La fuente de células madre embrionarias son los embriones. Estos se pueden obtener a partir de los sobrantes de fecundación *in vitro* o generados por transferencia nuclear somática. Las células madres adultas se pueden obtener de diferentes tejidos adultos, del cordón umbilical, de la placenta, de teratocarcinomas o carcinomas, especialmente los testiculares.

Las células madre embrionarias derivan del blastocisto y son pluripotentes, ya que pueden dar lugar a todos los linajes celulares del cuerpo (endodermo, mesodermo y ectodermo). Sin embargo, dados los problemas éticos y legales que plantean la utilización de este tipo de células, nos centramos en las células madre adultas, que son multipotentes, y por tanto capaces de diferenciarse en al menos dos tipos de células diferentes de un mismo tejido. Dentro de las células madre adultas encontramos las células madre mesenquimales (CMM).

Por lo que podemos resumir en:

- **Totipotentes:** capaces de formar células de todos los linajes del organismo. En los mamíferos solamente son el cigoto y las obtenidas a partir de los primeros blastómeros.
- **Pluripotentes:** aquellas de las que pueden derivar células de todos los linajes del cuerpo, pero no de los tejidos necesarios para el desarrollo del trofoblasto. Son las del embrión de más de 16 células hasta las de la masa granulosa del blastocisto. A estas células, se les denomina células madre embrionarias.
- **Multipotentes:** son aquellas capaces de generar células de distintos tipos de un mismo tejido, como especialmente son las hematopoyéticas.
- **Unipotentes:** son las células madre adultas que producen células de un solo linaje, como las espermatogonias.

3.2.2. Células madre mesenquimales

Como se ha descrito anteriormente, uno de los objetivos para el tratamiento óptimo con células madre es de promover la regeneración de las estructuras afectadas, entre las que se encuentran el cartílago, músculo esquelético, tejido uterino, piel, etc., obteniendo un tejido que no sea de tipo cicatricial sino que tenga las propiedades del tejido original. Aunque, como se ha comentado, existen distintos productos biológicos considerados con potencial regenerativo, son las células madre mesenquimales (MSCs) las que más interés despiertan por sus múltiples propiedades. Las MSCs fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1970, siendo originalmente denominadas como unidades formadoras de colonias con morfología fibroblástica (CFU-F) por sus propiedades observadas *in vitro* (Friedenstein *et al.*, 1970). Desde entonces, su estudio ha ido en aumento y se han observado en ellas distintas propiedades capaces de conferirles

potencial terapéutico y regenerativo. Aunque en la presente Tesis el estudio de las MSCs se centra en la búsqueda de un tratamiento alternativo para las patologías articulares en el caballo, como paciente y como modelo animal, pues son muchas las enfermedades en las que se estudia su uso a día de hoy. Como ejemplo, existen en la actualidad 688 ensayos clínicos en distintas fases de ejecución que utilizan MSCs aplicadas a diversas patologías.

Las MSCs pueden encontrarse en una gran variedad de tejidos del individuo, como médula ósea, tejido adiposo, músculo, periostio, sangre periférica, corazón (Zhang *et al.*, 2015b), pulmón, riñón, cerebro, timo, páncreas, piel, tejidos dentales como la pulpa (Mensing *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2011), tendón (Rui *et al.*, 2010), membrana sinovial y líquido sinovial (de Sousa *et al.*, 2014), entre otros. De hecho, y por su gran capacidad de migración, se considera que las MSCs están presentes en prácticamente todo el organismo, encontrándose en los nichos perivasculares, listas para salir al torrente sanguíneo y desplazarse a donde sean necesarias (da Silva Meirelles *et al.*, 2006). Además, también pueden encontrarse MSCs en algunos tejidos neonatales y asociados al nacimiento, como las anteriormente mencionadas sangre y gelatina de Wharton del cordón umbilical, el líquido amniótico o la placenta.

Aunque las MSCs estén presentes en una gran variedad de tejidos, no todos ellos son apropiados para su aislamiento con fines terapéuticos, teniendo que seleccionarse los menos invasivos. En la actualidad, las MSCs más frecuentemente estudiadas por su fácil acceso son las derivadas de médula ósea (BM-MSCs) y grasa (AT-MSCs), con un creciente interés en las derivadas de tejidos neonatales por su obtención no invasiva, su mayor potencial de proliferación y su baja inmunogenicidad, lo que las hace atractivas sobre todo de cara a su uso alogénico (De Schauwer *et al.*). Las BM-MSCs han sido las mayoritariamente empleadas para su estudio aplicativo a patologías músculo-esqueléticas tanto en medicina humana (Mafi *et al.*, 2011) como equina, mostrando en esta especie un mayor potencial terapéutico que las AT-MSCs (Schnabel *et al.*, 2013). El incremento cada vez mayor en el número de fuentes alternativas de MSCs, como las de tejidos neonatales, y el mayor conocimiento sobre los potenciales mecanismos de acción terapéuticos de las MSCs podrían cambiar esta tendencia hacia el uso de otros orígenes.

3.2.2.1. Fuentes de obtención de MSCs

Las primeras células madre mesenquimales se aislaron de la médula ósea (BM) y aunque es la mayor fuente de células madre, hay otras fuentes de donde pueden obtenerse como tejido adiposo, placenta, páncreas, cerebro, hueso trabecular, pulpa dental, membrana sinovial, sangre periférica, folículo piloso, ligamento periodontal, endometrio, cordón umbilical y sangre del cordón umbilical. (Arévalo *et al.* 2007, Lv F *et al.* 2014 y Potdar *et al.* 2015).

Esta amplia distribución de MSCs puede ser explicada por la teoría de que estas células provienen de vasos sanguíneos, por eso están presentes en todos los tejidos del organismo. De esta manera el número de células madre en cada tejido es limitado, no se dividen en

circunstancias normales porque están inactivas pero cuando hay una lesión tisular, se dividen y diferencian siendo su principal función la reparación (Agha-Hosseini *et al.* 2010).

La obtención de MSCs de la BM presenta limitaciones como es el riesgo en la toma de la muestra así como la capacidad de proliferación y diferenciación de las células según la edad del donante. Por esta razón la obtención de MSCs de fuentes menos invasivas y con mayor capacidad de proliferación como es la pulpa dental, es muy atractiva.

Dependiendo de la fuente de la que se obtenga la célula madre su morfología será más fibroblastoide (como la gran mayoría de las células madre aisladas de médula ósea) o más ovoide. Esto demostraría que el fenotipo de las células depende de su origen. Según Chang YJ *et al.* en el 2010, las células madre derivadas de cordón umbilical no presentan el marcador de superficie CD90 mientras que en las de médula ósea está presente en todas aunque esto no es concluyente.

Según los estudios pueden nombrarse como células de estroma medular, Unidades Formadoras de colonias Fibroblastoides, Precusores Estromales o células adultas progenitoras multipotentes.

3.2.3. Células madre de la pulpa dental

Tenemos que aclarar que este tipo de estudio no se ha realizado anteriormente en el modelo equino, a continuación, procederemos a describir el comportamiento de las células madre de pulpa dental humana,

El primer tipo de células madre dentales fueron aisladas de la pulpa por Gronthos *et al.* (2000). Fueron extraídas de terceros molares humanos y además de demostrar capacidad clonogénica, fueron capaces de diferenciarlas hacia odontoblastos, y de formar el complejo dentinopulpar cuando fueron implantadas subcutáneamente en ratas inmunocomprometidas. Se observó que estas células presentaban un mayor porcentaje de proliferación que las células madre mesenquimales de médula ósea (Shi S *et al.* 2001). También se han aislado células madre de pulpa dental (CMPD) de ratones (Mina M y Braut A 2004), ratas (Zhang W *et al.* 2005) o perros (Iohara K *et al.* 2004). Las células madre de pulpa dental no solo se pueden obtener de dientes sanos, sino también de dientes con pulpitis irreversible (Wang Z *et al.* 2010). Estas células de pulpas con patología muestran menor formación de colonias y proliferación, pero similar expresión del marcador STRO-1 e inducción odontogénica *ex vivo*. Los autores concluyeron que las pulpas dentales clínicamente comprometidas deben contener células putativas con propiedades de células madre. Alongi *et al.* en el 20010 también estudiaron células madre procedentes de pulpas inflamadas. Éstas expresaron mayores niveles de los marcadores STRO-1, CD-90, CD-105 y CD-146 que las células de pulpas normales. Las células de ambos tipos de pulpas fueron positivas para CD-146, antígeno específico embrionario fase 4

(SSEA-4) y CD-166. La capacidad de duplicación y la capacidad osteo/dentinogénica fueron mayores en las células de las pulpas normales. Sin embargo las células de ambos tipos de pulpa fueron capaces de formar el complejo dentino-pulpar de forma similar *in vivo*.

Las células madre de pulpa dental, además de hacia odontoblastos (Gronthos S *et al.* 2000; Zhang W *et al.* 2006), se han podido diferenciar hacia adipocitos (Zhang W *et al.* 2006, Gronthos S *et al.* 2002), neuronas (Zhang W *et al.* 2006, Gronthos S *et al.* 2002), hueso (Laino G *et al.* 2006, Zhang W *et al.* 2006), músculo (Laino G *et al.*; Papaccio G *et al.*; Zhang W *et al.* 2006) o condrocitos (Zhang W *et al.* 2006, Yu *et al.*; Yu J *et al.* 2010) observaron que las células madre de pulpa dental que son positivas a STRO-1 se diferenciaron hacia odontoblastos, osteoblastos y adipocitos, pero las mismas células después de 9 pases solo pudieron hacerlo hacia osteoblastos. Recientemente se ha demostrado que la presencia de osteoblastos, diferencia estas células hacia linaje osteogénico. Además, las células madre de pulpa dental al ser cultivadas con osteoblastos, presentaban una proliferación mayor que las cultivadas en ausencia de estos.

También se han realizado estudios para evaluar la influencia de la presión de O₂ en la proliferación del cultivo de células madre de pulpa dental. Sakdee *et al.* en el 2009, compararon la proliferación de células pulpares a distintas presiones de O₂. Demostraron que las células proliferaban más al 3% que al 20%. El marcador CD133 decrecía al 3% de O₂ mientras que el STRO-1 aumentaba.

3.2.4. Criterios de la isct

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios para determinar una célula madre mesenquimal:

- I. Adherencia al plástico *in vitro*. Capacidad que no presentan las células madre hematopoyéticas.
- II. Inmunofenotipo: expresan los siguientes marcadores de la superficie celular como el CD73, CD90, y CD105 y la ausencia de los marcadores hematopoyéticos como el CD45 (proteína tirosina fosfato receptor tipo C, es un marcador de leucocitos), y CD 34 (marcador celular de progenitores hematopoyéticos y endoteliales), CD14 y CD11b (marcadores de monocitos y macrófagos), CD79a y CD19 (marcadores de células B) y expresión de HLADR (complejo de histocompatibilidad).
- III. Limitada Plasticidad: Capacidad de diferenciación a tres linajes celulares como son osteoblastos, condroblastos y adipocitos *in vitro* bajo condiciones estándar de cultivo (Otsuru *et al.* 2013, Cortes *et al.* 2013 y Dominici *et al.* 2006).

Además de lo propuesto por la ISCT, también se debe tener en cuenta dos aspectos adicionales para clasificarlas como células madre: que las MSCs realicen procesos de autorenovación, es

decir, durante la división celular solo una de las células hijas debe iniciar programas de diferenciación celular y que sean capaces de desarrollar «plasticidad clonogénica» o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo (neuronas) y endodermo (hepatocitos).

La capacidad de diferenciación y proliferación decrece a medida que aumenta la edad del donante, así como el tiempo en que permanecen las células en cultivo.

Las células madre mesenquimales tienen la capacidad de “Homing” o anidamiento. Esto consiste en que migran y se acumulan en las zonas del cuerpo donde existe una lesión y por tanto mayor concentración de quimioquinas dado que tienen receptores para éstas.

En el año 2012, Shinya Yamanaka y John Gurdon han realizado un excelente trabajo sobre iPSs (induced pluripotent stem cells) derivadas de células somáticas adultas. Se propusieron que las células madre de la pulpa dental (DPSCs) pueden desarrollar iPSCs que pueden ser utilizados para las terapias de diversas enfermedades (Potdar *et al.* 2015).

3.2.5. Células madre mesenquimales equinas

La terapia celular es de suma importancia para el tratamiento de lesiones en caballos que de otra manera tienen un mal pronóstico de recuperación. En los últimos años debido al creciente interés por su utilización en terapia celular para el tratamiento de lesiones, el número de publicaciones orientadas hacia el análisis de las propiedades *in vitro* de las MSCs equinas ha aumentado aportando información sobre sus características. Las MSCs equinas, de igual forma que las humanas, pueden obtenerse de diferentes tejidos, siendo los principales la médula ósea (Vidal *et al.*, 2006) y el tejido adiposo (Vidal *et al.*, 2007). En todos estos casos la selección de las células se ha realizado por medio de la capacidad de adherencia al plástico que poseen. Una vez en cultivo la morfología que adquieren las MSCs equinas es la típica de forma de huso extendiendo procesos y mostrando un crecimiento en monocapa.

IV. ANTECEDENTES

En estos últimos años se han visto avances excepcionales alrededor de la medicina regenerativa viéndose a esta como una potencial solución a muchos de los problemas que se presentan en la especie equina, que giran alrededor de lesiones que comprometen la locomoción de los ejemplares y conducen a un término prematuro de labor e inclusive comprometen la vida del animal generando costos altos a los criadores.

Normalmente en caballos de carrera la estadística nos indica que un existe un riesgo de incidencia de una lesión musculo esquelética catastrófica de 0.83-18/ 1000 partidas y estas probabilidades varían dependiendo de la raza, siendo los más frecuentes las lesiones en los miembros de la extremidad anterior derecha con un 56%, articulación metacarpofalangeal de 34%, vertebral de 10% y el número no reportado de lesiones catastróficas que se producen solo en los entrenamientos (Sarrafian *et al.*, 2012 y Beisser *et al.*, 2014).

En los caballos de salto el panorama no varía demasiado, teniendo como problema principal las lesiones en los tendones flexores y articulaciones debido a la excesiva carga repetitiva en ellos sobretodo en el momento de descenso de los obstáculos (Meershoek *et al.*, 2001).

Otro factor que influye en la aparición de estos problemas locomotores son la misma predisposición genética de los caballos a lesiones de este tipo, se ha observado que existe una prevalencia alta en los caballos de paso a presentar una desmitis degenerativa en los ligamentos suspensorios (Xie *et al.* 2011), una osteocondriosis en la zona plantar y palmar en caballos de raza sueca (Jönsson *et al.* 2011) y alta heredabilidad en las lesiones del tendón flexor digital superficial en los caballos ingleses de carrera (Welsh *et al.* 2014). Inclusive se debería incluir en estos datos las lesiones causadas por patadas y por mordidas por la misma interacción entre los caballos que dependiendo de la zona del contacto pueden resultar muy peligrosas como son los radios medios, la tibia, los huesos metacarpales y metatarsales, zonas caracterizadas por estar recubiertas por tejido suave y poco musculo, generando fracturas y fisuras con una prevalencia de más de 21% (Knubben *et al.* 2008 y Schroeder *et al.* 2013).

Otro detalle a prestar atención es la misma geografía de las zonas afectadas, ya que al estar en lugares muy poco vascularizados presentan un potencial regenerativo reducido que complica la recuperación motriz y que en zonas como los cartílagos articulares son coadyudados por una mala lubricación del líquido sinovial, que se ve alterado en lesiones de alto impacto, resultando pobre en hialurano y derivando en problemas osteoartóricos (Antonacci *et al.*, 2013) y en caso de los tendones, este impacto produce un cambio en la composición de la matriz extracelular que impide una correcta recuperación y generando un pronóstico de alta recurrencia a la lesión (Birch *et al.* 1998).

Ante este bajo pronóstico de recuperación, el uso de los beneficios de la terapia de células mesenquimales que mejoren la funcionalidad del tejido dañado aparece como una alternativa adecuada. Desde el trabajo pionero de Smith *et al.*, 2003 el cual logro aislar, expandir y luego administrar células madres autólogas equinas de medula ósea en problemas del tendón flexor superficial revoluciono el panorama . Las células madre procedentes del aspirado de medula ósea presentan una gran capacidad de condrogénesis que favorecen a terapias enfocadas a patologías en tendones y ligamentos, su eficacia ha sido demostrada en más de 100 casos con un porcentaje de retorno de actividades mayor al 85% de los casos administrados (Herthel, 2001) (Kisiday *et al.* 2013). Otra ventaja que presentan estas células son la baja o nula actividad de expresión del factor de histocompatibilidad tipo 2 posibilitando su uso en terapias alógenas (Barberini *et al.*, 2014). Lamentablemente la colección de estas células conlleva a una intervención invasiva en el animal, que compromete la facilidad de la aplicación de la terapia , ante esta situación diferentes tejidos han sido analizados como fuentes de células pluripotenciales dentro los que han destacado las provenientes de tejido adipocitario, ya que han expresado el típico crecimiento *in vitro* y una serie de marcadores de totipotencialidad como Oct4 y Nanog (Raabe *et al.*, 2011). Típicamente estas células expresan CD29 (receptor de integrinas), CD 44 (receptor de hialuronato) , CD90 y la falta de expresión de MHC tipo 2, dejando en claro su naturaleza de células útiles en terapia (Alipour *et al.* 2015). Estas células han mostrado un potencial de diferenciación en los 3 típicos linajes (osteogénico, condrogénico y adipogénico) e inclusive han demostrado tener una capacidad de proliferación superior a las obtenidas de medula, con menores tasas de apoptosis (B. Ranera *et al.*, 2012). Una característica de relevancia ha sido su capacidad de adecuarse a diferentes sustratos y estructuras tridimensionales diferenciándose a un linaje celular requerido (Kisiday *et al.*, 2008)

Para favorecer su capacidad de proliferación *in vitro*, estas células han sido probadas en presencia de diferentes moléculas que han estimulado su potencial de diferenciación. El ácido ascórbico en combinación con plasma rico en plaquetas estimulan una marcada diferenciación en linajes condrogénicos y osteogénicos, probablemente regulados por el factor TGFB1 presente en el PRP que aumenta la expresión del gen RUNX2 relacionado con procesos de mineralización y SOX9 relacionados con factores condrogénicos (Castro *et al.*, 2014).

El plasma rico en plaquetas es un conglomerado de proteínas derivadas de la lisis plaquetaria que contiene una serie de factores de crecimiento presentes en la reparación de todo tipo de tejido, dentro de las que destacan un gran coctel de citoquinas moduladoras de inflamación, TGB, TNFA y EGF. Este conglomerado ha sido usado también como una nueva estrategia de terapia regenerativa teniendo resultados alentadores de 47% de beneficio en problemas musculoesqueléticos (Brossi *et al.*, 2015). En combinación con las células madre estas han generado una respuesta complementaria aumentando sus niveles de expresión de genes pluripotenciales y

aumentando su tasa de proliferación y al ser administrados en caballos con problemas de tendón lograron un recuperación del 90% de los caballos después de 8 semana de tratamiento (Del Bue *et al.*, 2008).

Con todo lo anterior citado aparece bastante probable la aplicación de esta tecnología en caballos con problemas locomotrices generando un conocimiento importante a nivel local.

V. HIPOTESIS

Si las pulpas dentales de dientes molares equinos se procesan con el método por explante, se logrará el aislamiento de células madre equinas con morfología fibroblastoide.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

6.2. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El tipo y diseño de la presente tesis es experimental y se estructura en función a nuestros objetivos:

Objetivos específicos	Variable	Dimensión	Indicador
Evaluar el método de aislamiento de las células madre de pulpa dental equina	Morfología	Fenotípica	-Morfología fibroblastoide
Comparar la influencia del método de aislamiento de células madre de pulpa dental equina	Proliferación celular	Ensayo de Doblaje celular	-Cuantificación del doblaje celular acumulativo de las dos poblaciones

El presente estudio es prospectivo, *in vitro*, no controlado. Los dientes fueron obtenidos de muestras de cabezas de caballos del Camal de Equinos “Casa Blanca” de Pachacamac.

6.3. VARIABLES

Variable Independiente	Variable Dependientes
Método de aislamiento (método por explante y control negativo)	<ul style="list-style-type: none"> • Cantidad de células con morfología fibroblastoide • Número de colonias • Tasa de proliferación celular

6.4. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tipo de variable	Variable	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Categoría
Independiente	Método de aislamiento	Método de aislamiento de las CMPDE, control negativo y explante	Cualitativa	Nominal	1= Control negativo 2= Método por explante
Dependiente	Porcentaje (%) de CMPDE aisladas en función de sus características fenotípicas	Cantidad de células que expresen una morfología fibroblastoide, en función del total de células, expresado en porcentajes	Cuantitativa	Razón	Abierta
	Porcentaje (%) de colonias de CMPDE formadas	Cantidad de colonias formadas por las CMPDE luego del aislamiento con los métodos utilizados, en función al número total de células, expresado en porcentaje.	Cuantitativa	Razón	Abierta
	Tasa de proliferación celular	Ensayo de doblaje celular, que mide la proliferación celular de las CMPDE en función del número de células por día.	Cuantitativa	Razón	Abierta

6.5. MUESTREO

a) Tipo de muestreo: Aleatorio

b) Número de muestra: Se trabajaron con 60 dientes molares de equino.

Las muestras serán colectadas del Camal de Equinos “Casa Blanca” en Pachacamac.

Las muestras serán obtenidas a partir de 60 cabezas de caballo, las que fueron aisladas de la región mandibular.

6.6. PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

6.6.1. Extracción de la pulpa dental

Se realizó la extracción de la pulpa dental mediante fractura con martillo, a continuación, se aislará la pulpa de la cámara pulpar y de los conductos radiculares con una sonda. Una vez despegada, se extraerá la pulpa con unas pinzas y será procesada mecánicamente, cortada con bisturí, hasta que la muestra pulpar pueda ser tamizada por filtros de 70 μ m y luego sembrada mediante explantes.

Entre la exodoncia y la extracción de la pulpa dental deberá haber un rango de tiempo de hasta 12 horas. Durante este tiempo el diente se deberá ser conservado en un tubo con medio de cultivo y antibióticos a 4°C.

6.6.2. Aislamiento de células madre de pulpa dental equina

Las muestras serán diluidas en 0.5mL de medio DMEM y concentradas mediante centrifugación a 1000 rpm y luego fueron sembradas en botellas flask de 15mL en medio DMEM, suplementado con 10% de SFB, 100 μ M L-ácido ascórbico 2-fosfato, 2 mM L-glutamina y 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 2 μ g/mL anfotericina B (antibiótico/antimicótico). La viabilidad celular fue medida a partir de la tinción de exclusión Azul de Tripán al 0.04 % y contada en cámara de Neubauer.

6.6.3. Cultivo

El cultivo se realizó en el medio DMEM, suplementado con 10% de SFB, 100 μ M L-ácido ascórbico 2-fosfato, 2 mM L-glutamina y 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 2 μ g/mL anfotericina B (antibióticoantimicótico), a una concentración de 1000 cel/cm² en un flask de 25 cm² en la incubadora a condiciones de 37°, 5% CO₂ y 3% O₂; a los 3 días se retirará el medio, descartando el sobrenadante y eliminando así a las células no adherentes. Los cambios de medio se realizaron cada 3 días hasta alcanzar un 70% de confluencia de crecimiento, realizándose como máximo 3 pasajes por muestra. Las células fueron sometidas a TrypLE de laboratorios GIBCO.

6.6.4. Tiempo mínimo requerido para el aislamiento de CMPD

Se calculó el tiempo mínimo requerido para el aislamiento de CMPD observando los cultivos celulares y se consideraron que existen células aisladas cuando de un fragmento pulpar adherido a la placa, se desprendan células con morfología de fibroblasto, considerándose unidades formadoras de colonias (UFC-PD). Se consideró tiempo “0” una vez finalizada la disgregación de la pulpa. Desde ese momento se registraron todos los días para determinar el tiempo exacto de aislamiento de las CMPD.

6.6.5. Análisis de datos

Debido a la no normalidad de los datos, estos fueron analizados con el test de Friedman para detectar cambios significativos en el “Tiempo de confluencia al 70%” y el “Número de células cosechadas” por cada pasaje. Las comparaciones post-hoc se realizaron con el test de Wilcoxon con ajuste de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico SPSS v.23 con un 95% de confiabilidad.

VII. RESULTADOS

7.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL EQUINA

Bajo las condiciones de aislamiento (disgregación mecánica) y cultivo llevadas a cabo en la presente investigación se establecieron células viables de la pulpa dentaria equina, evidenciado a través del conteo celular y la observación regular de los cultivos, con un microscopio invertido de contraste de fase. Las células madre de la pulpa dental equina, de molares, mostraron un óptimo crecimiento, cultivadas en medio DMEM, suplementado con 10% de SFB, 100 μ M L-ácido ascórbico 2-fosfato, 2 mM L-glutamina y 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 2 μ g/mL anfotericina B (antibiótico/antimicótico), condiciones de cultivo descritas previamente como óptimas, para este tipo de células.

Las células aisladas en el cultivo primario formaron colonias adherentes a partir de los 3 a 5 días, la mayoría de las células presentaron una morfología fusiforme típica de células semejantes a fibroblastos (ANEXO I). El cultivo primario logró la confluencia a los 5 a 7 días, los subsecuentes subcultivos tendían a tener un acelerado crecimiento, el cual fue en promedio 4 días. A partir del *tercer subcultivo*, se obtuvo una población más homogénea, basado en la morfología de las células, características de células semejantes a fibroblastos con extensiones citoplasmáticas, núcleo ovalado, central con varios nucléolos, que permanecieron hasta el décimo octavo pasaje, los cuales no forman parte de esta investigación, pero que sirvieron para verificar la estabilidad celular de la línea. A partir de *sexto al octavo subcultivo* se pudo observar una mayor proliferación celular y la presencia de algunos agregados celulares.

7.2. TIEMPO MÍNIMO REQUERIDO PARA EL AISLAMIENTO DE CMPD

En los cultivos en monocapa de las células mesenquimales de la pulpa dental equina aisladas, las células fueron capaces de formar colonias a baja densidad. Las colonias estaban formadas por numerosas células adherentes, con morfología típica de fibroblastos, fusiformes, alargadas, con un citoplasma claro y un núcleo ovalado central con varios nucléolos, que identificamos como UFC-PD, demostrando su capacidad de renovación y eficiencia de formación de colonias. Sin embargo, la eficiencia de formación de colonias expresada en porcentaje en función al número de explantes adheridos, en los cuales se evidenció que varió el número de UFC-PD entre los diferentes individuos. Además, se observó una gran influencia entre el número de células explantes y el número de colonias formadas.

7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Existió una diferencia altamente significativa en el tiempo de confluencia al 70% ($X^2(3) = 152.78, p < 0.001$) y el número de células cosechadas ($X^2(3) = 144.90, p < 0.001$) dependiendo el tipo de pasaje. El ajuste de Bonferroni determinó un valor de significancia de $p < 0.008$. La

mediana (rango intercuartílico) del tiempo de confluencia al 70% para los pasajes 0, 1, 2 y 3 fueron 11(10-11), 5(5-5), 5(4-5), 3(3-5), respectivamente. Los valores para cada pasaje fueron altamente significativos ($p < 0.001$), y tendieron a reducirse a medida que aumentaba el número de los mismos (Tabla 1 y Figura 1). La mediana (rango intercuartílico) del número de células cosechadas para los pasajes 0, 1, 2 y 3 fueron 3.66 (3.26-3.92), 3 (3-3.13), 5.14 (5-6.12) y 7.55 (5.20-15.65) $\times 10^5$ células, respectivamente. Los valores para cada pasaje fueron altamente significativos ($p < 0.001$), y tendieron a aumentar a medida que aumentaba el número de los mismos (Tabla 2 y Figura 2).

Tabla 1. Análisis post-hoc del tiempo de confluencia al 70% basado en el test de Wilcoxon. El ajuste de Bonferroni determinó un valor de significancia de $p < 0.008$

Estadísticos	Pasaje 1 – Pasaje 0	Pasaje 2 – Pasaje 0	Pasaje 3 – Pasaje 0	Pasaje 2 – Pasaje 1	Pasaje 3 – Pasaje 1	Pasaje 3 – Pasaje 2
Z	-6.886	-6.837	-6.810	-4.640	-6.220	-3.846
Sig. asintótica (bilateral)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Tabla 2. Análisis post-hoc del número de células cosechadas ($\times 10^5$) basado en el test de Wilcoxon. El ajuste de Bonferroni determinó un valor de significancia de $p < 0.008$

Estadísticos	Pasaje 1 – Pasaje 0	Pasaje 2 – Pasaje 0	Pasaje 3 – Pasaje 0	Pasaje 2 – Pasaje 1	Pasaje 3 – Pasaje 1	Pasaje 3 – Pasaje 2
Z	-5.017	-6.077	-6.677	-6.743	-6.736	-4.697
Sig. asintótica (bilateral)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

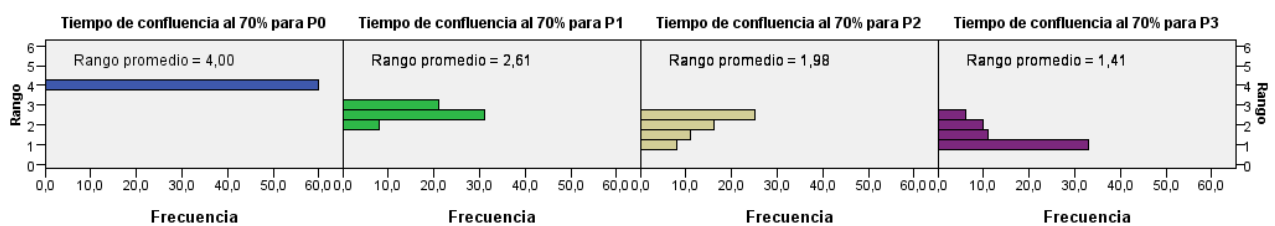


Figura 1. Rangos para los valores de Tiempo de confluencia al 70% por cada pasaje. P0 = Pasaje 0, P1= Pasaje 1, P2 = Pasaje 2 y P3 = Pasaje 3.

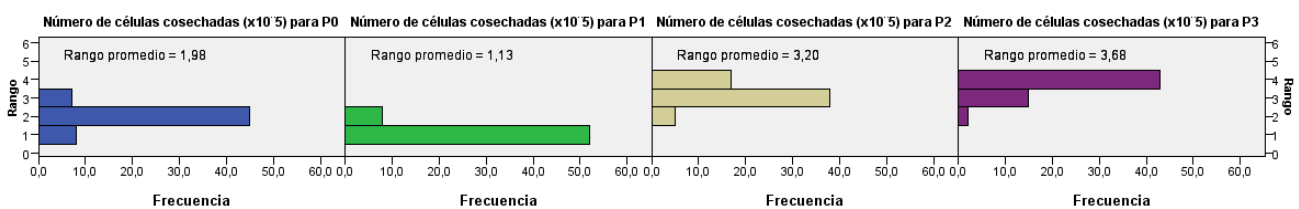


Figura 2. Rangos para los valores de Número de células cosechadas ($\times 10^5$) por cada pasaje. P0 = Pasaje 0, P1= Pasaje 1, P2 = Pasaje 2 y P3 = Pasaje 3.

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo de investigación fue establecer el cultivo de células madre de la pulpa dentaria equina, identificar las células madre en las poblaciones de células aisladas a través del análisis morfológico y analizar la cinética de crecimiento de estas células madre.

Para el aislamiento de las células madre de la pulpa dentaria, la mayoría de los investigadores (Gronthos *et al.* 2000, Baghaban *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2005, Wei *et al.* 2007, Huang *et al.* 2008, Sonoyama *et al.* 2007, Mohd *et al.* 2008, Cheng *et al.* 2008, D'Áquino *et al.* 2007, Sonoyama *et al.* 2008, Miura *et al.* 2003 y Laino *et al.* 2006) utilizan el método de disgregación enzimática, descrito por Gronthos *et al.* (2000), pero en el presente estudio no se seleccionó este método, debido a que se quería evaluar la efectividad del aislamiento de células madre de pulpa dental equina mediante el método de explantes, así como el tiempo de aislamiento de estas, ya que no existe literatura que registre este tipo de aislamiento específico para este tipo de células en esta especie (Takeyasu *et al.* 2004 y Alliot-Licht *et al.* 2001), debido a que se tiene como protocolo estándar el uso de enzimas como disgregador tisular para asegurar un gran número de células aisladas en corto tiempo. Las células madre de pulpa dentaria equina aisladas, de terceros molares, mostraron un óptimo crecimiento, cultivadas en medio DMEM-F12, suplementado con 15% de SFB, 100 μ M L-ácido ascórbico 2-fosfato, 2 mM L-glutamina y 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin y 2 μ g/mL anfotericina B (antibiótico-antimicótico), condiciones de cultivo descritas previamente como óptimas. Las células madre de la pulpa dentaria equina aisladas, mostraron la morfológica fibroblastoide típica, células fusiformes con finas extensiones citoplasmáticas, lo que coincide con numerosas investigaciones (Gronthos *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2005, Mauth *et al.* 2007, Miura *et al.* 2003 y Takeyasu *et al.* 2004) y es análoga a la progenie de la médula ósea humana (Gronthos *et al.* 2000) (ANEXO III), esta morfología se mantuvo durante los sucesivos pasajes (ANEXO II). Sin embargo, en algunas líneas celulares que se sometieron a más de 7 subcultivos (que no forman parte del presente estudio), además de la gran proliferación celular se observó la presencia de algunos agregados celulares en el sexto, 10 y 11 subcultivo. Las células cercanas al agregado mostraron algunos cambios morfológicos sugerentes a una posible diferenciación espontánea. Mientras, que en el resto del cultivo las células conservaban su morfología fusiforme semejante a fibroblastos. (ANEXO II y III)

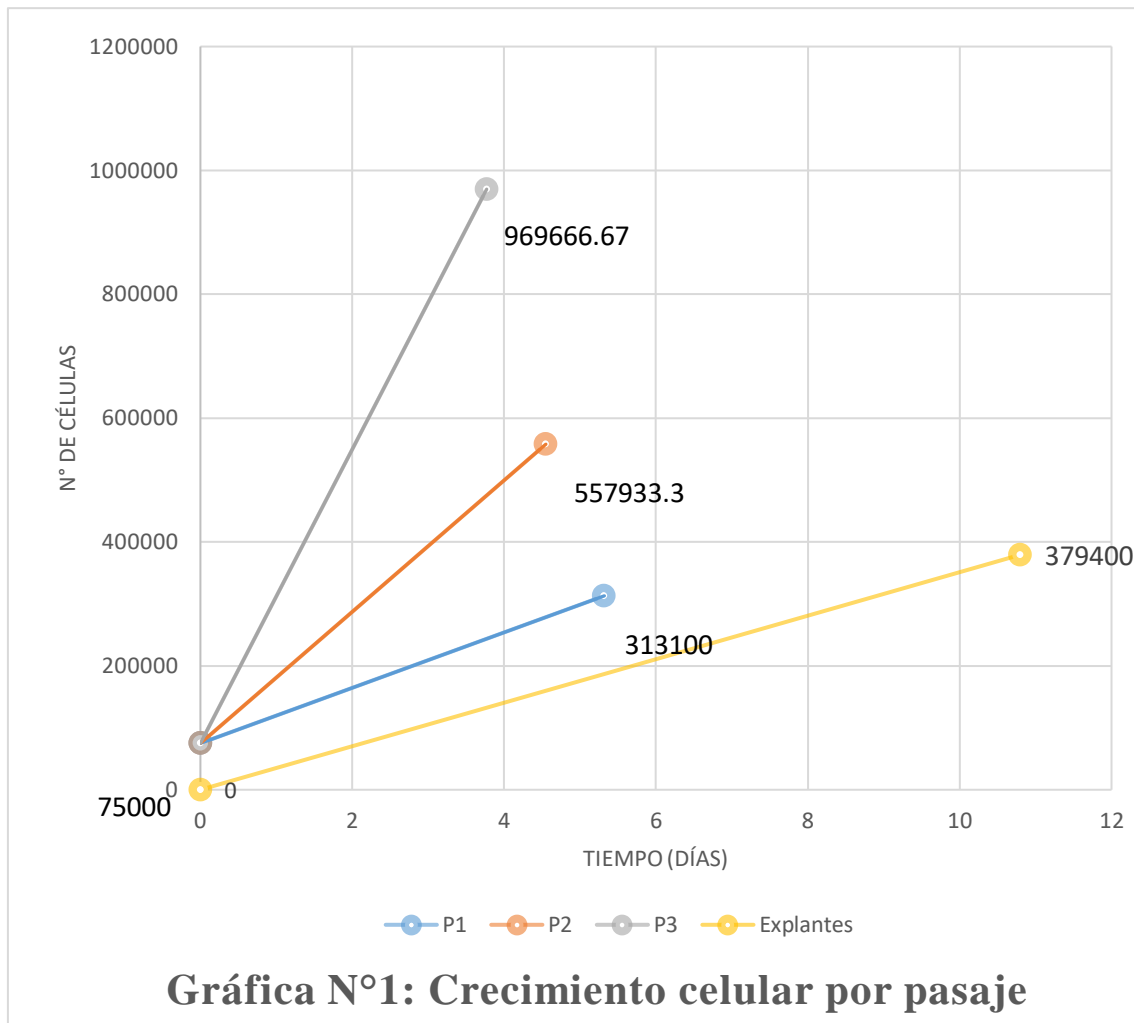
La diferenciación espontánea de las células madre de pulpa dentaria sin añadir un medio inductor fue descrita por Alliot-Licht *et al.* (2005) los autores refieren que la transformación espontánea del fenotipo celular puede ocurrir durante el cultivo. El proceso de mineralización ocurrió en ausencia de *dexametasona* y β -GP. Los nódulos mineralizados fueron observados en cultivos primarios con largo tiempo de cultivo y en subcultivos del quinto pasaje, a diferencia

nuestra que recién evidenciamos este tipo de comportamiento recién al séptimo subcultivo. Además, Tsukamoto *et al.* (1992) observaron que las células de la pulpa de dientes temporales humanos, formaron nódulos mineralizados cuando crecieron en medio de cultivo en ausencia de medios inductores y nuestros resultados indican que dicho fenómeno también se evidencia en la especie equina. Los autores observaron que la formación de nódulos mineralizados depende de la capacidad de las células para formar multicapas, *in vitro*. La ausencia del contacto inhibitorio parece esencial para proveer la estructura tridimensional que es necesaria para obtener un tejido mineralizado.

Se observó también, que las células madre de la pulpa dental aisladas, de algunas líneas celulares, mostraron un gran potencial de autorrenovación, pero éste fue variable lo que coincide con las observaciones realizadas en células madre de médula ósea y se puede explicar, debido a la presencia subpoblaciones en diferentes estados de diferenciación (Baksh *et al.* 2004).

Gronthos *et al.* (2000) observaron que las células madre aisladas de pulpa dentaria de terceros molares exhiben una alta tasa de proliferación, comparada con las células madre de médula ósea cultivadas *in vitro*. Esto puede ser atribuido al estado de desarrollo del tejido respectivo, los terceros molares son los últimos dientes permanentes en completar su desarrollo y hacer erupción y están en un temprano estado de desarrollo comparado con la médula ósea adulta. En la presente investigación se observó que las células de la pulpa dentaria de terceros molares, cultivadas bajo específicas condiciones son altamente proliferativas, sin embargo, mostraron diferencias en la proliferación celular entre las distintas líneas de células madre de pulpa dentaria evaluadas.

Para realizar el análisis de la cinética de crecimiento celular en función al tiempo de cultivo, determino el tiempo de doblaje celular y la tasa de proliferación celular. Se observó que las líneas celulares tuvieron un aumento en la eficiencia de proliferación a medida que se progresaba en el cultivo y en los diferentes pasajes, observando el mayor valor de proliferación celular (2.97) en el pasaje 3 (P3). Igualmente se evidencia como coinciden los datos obtenidos al calcular el número de duplicación de la población con las curvas de crecimiento trazadas, se evidencia también que el cultivo primario por Explantes fue el que demoró más en llegar a una confluencia del 70% (el cual es el porcentaje óptimo de confluencia para que el cultivo sea cosechado), el cual se evidencia en la gráfica N°1 como la que más se extiende más en el tiempo pero cuya pendiente es menor que la de los demás pasajes.



En cuanto al tiempo de duplicación de la población de células madre de pulpa dentaria aisladas, los resultados en la presente tesis demuestran que fue de 1,51 días (P2) a 2.13 días (P1) y el valor del número de duplicación de la población fue de 2.6 (P1) a 26.7 veces en células del tercer pasaje. Nakashima *et al.* (1991) describe un crecimiento rápido entre el 5,5 y 9 día, el cual es entre el doble y el cuádruple del tiempo que pudimos registrar, el cual evidencia una diferencia amplia referente a la eficiencia del cultivo a favor del que escribe la presente tesis. Baghaban *et al.* (2009) describe un número de duplicación de la población de 10,96 veces a los 10 días de cultivo, mientras que nosotros registramos 26.7 veces a los 3.77 días, con lo cual confirmamos la tendencia que se expresó en los datos anteriormente citados. Por lo que los valores obtenidos en la presente investigación superan a los descritos en otras investigaciones. Para la reconstrucción de tejidos se necesitan grandes cantidades de células ser trasplantadas en el lugar de la lesión. La obtención de líneas celulares altamente proliferativas permitirá su uso en investigaciones en la medicina regeneración. Bagheban y col.3 realizaron estudios e humanos para determinar las condiciones óptimas de cultivo para una mejor proliferación de las células madre de pulpa dentaria humana, consideradas como candidatas promisorias para la regeneración dentaria así como también la reparación de tejido óseo. Estos autores demostraron

una adecuada proliferación con la utilización de 15% y 20% pero fue mayor con 20% de SFB y la densidad inicial de células sembradas, obtuvieron un máximo incremento en el número de células cuando las células se sembraban a baja densidad 100 cel/cm². En el presente estudio se utilizó 15% SFB y se sembraron a una densidad de 1000 cel/cm², por tal motivo al tener un buen recubrimiento de la superficie de los frascos de cultivo, se obtuvo una muy buena tasa de proliferación celular, superando a los investigadores precedentes en este aspecto y se podría afirmar que las células que cultivamos y cosechamos están listas para ser trasplantadas y proceder con terapias celulares locales, además de sugerir que a medida que se progresa en los pasajes de la línea celular, esta se estabiliza y reduce los tiempos de duplicación y de confluencia al 70%, mientras que el número de duplicación de la población aumenta, dándonos mejores tasas de crecimiento. Pero, se requiere de más investigaciones para conocer mejor el comportamiento *in vitro* de estas células, para su posible utilización en el futuro.

IX. CONCLUSIONES

- Es posible aislar la pulpa dental de cabezas de caballos beneficiados.
- Se logró aislar y cultivar *in vitro* las células madre de pulpa de dientes molares equinos (CMPDE), utilizando el método de explante.
- Las células madre aisladas de la pulpa dental equina expresaron una morfología fibroblastoide típica de las células madre mesenquimales.
- El tiempo de aislamiento promedio en cultivo primario por explante fue de 10.8 días, mientras que la comparativa para los subcultivos siguientes arrojó que los mejores datos se obtuvieron del tercer pasaje, para los parámetros tiempo de confluencia al 70%, número de duplicación de la población y tiempo de duplicación, los cuales fueron 3.77 días, 26.16 veces y 1.5 días respectivamente.

X. RECOMENDACIONES

El presente trabajo tuvo limitaciones respecto al análisis molecular de las células, motivo por el cual recomienda a posteriores investigadores, considerar un análisis de marcadores moleculares como CD73, CD90, CD105 y CD142.

Además recomendamos continuar las investigaciones utilizando el modelo equino como modelo translacional al humano para la evaluación de diferentes terapias celulares con el objetivo de buscar soluciones a diferentes enfermedades osteor-articulares y demás.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agha-Hosseini F, Jahani M, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant* 2010 03/20;24 (2):E23-E28.
2. Alipour, F., Parham, A., Kazemi Mehrjerdi, H., & Dehghani, H. (2015). Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. *Cell Journal*, 16(4), 456–65.
3. Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M. (2001). Characterization of α -smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Archs Oral Biol*; 46: 221-228
4. Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* 2009 02;15(2):59-68.
5. Antonacci, J. M., Ph, D., Schmidt, T. a, Serventi, L. a, Matthew, Z., Shu, Y. L., ... Dvm, B. (2013). Articular Cartilage by Synovial Fluid : Role of Hyaluronan. *Arthritis Rheum*, 64(9), 2917–2926. <http://doi.org/10.1002/art.34520>.Effects
6. Arévalo Romero J, Páez Guerrero D, Rogriguez Pardo V. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. NOVA. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS JULIO- DICIEMBRE DE 2007; VOL.5 No. 8:101-212.
7. Baghaban MR, Nazarian H, Shariati M, Vahabi S. (2009). Human dental pulp stem cells: the culture optimization for increased growth. *IJHOSCR*; 3(4): 5- 13
8. Baksh D, Song L, Tuan RS. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*; 8(3): 301-316
9. Barberini, D. J., Freitas, N. P. P., Magnoni, M. S., Maia, L., Listoni, A. J., Heckler, M. C., Amorim, R. M. (2014). Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(1), 25. <http://doi.org/10.1186/scrt414>
10. Beisser, a, McClure, S., Rezabek, G., Soring, K. H., & Wang, C. (2014). Frequency of and risk factors associated with catastrophic musculoskeletal injuries in Quarter Horses at two Midwestern racetracks: 67 cases (2000-2011). *J Am Vet Med Assoc*, 245(10), 1160–1168. <http://doi.org/10.2460/javma.245.10.1160>
11. Birch, H. L., Bailey, a J., & Goodship, a E. (1998). Macroscopic “degeneration” of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Veterinary Journal*, 30, 534–539. <http://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1998.tb04530.x>

12. Brossi, P. M., Moreira, J. J., Machado, T. S. L., & Baccarin, R. Y. A. (2015). Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Veterinary Research*, 11, 98. <http://doi.org/10.1186/s12917-015-0403-z>
13. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991 09;9(5):641-650.
14. Castro, F. O., Torres, a, Cabezas, J., & Rodríguez-Alvarez, L. (2014). Combined use of platelet rich plasma and vitamin C positively affects differentiation in vitro to mesodermal lineage of adult adipose equine mesenchymal stem cells. *Research in Veterinary Science*, 96(1), 95–101. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.12.005>
15. Cheng PH, Snyder B, Fillos D, Ibegbu CC, Hung A, Chan A. (2008). Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. *BMC Cell Biology*; 9(20):1-11
16. Cortes Y, Ojeda M, Araya D, Dueñas F, Fernández M,S., Peralta OA. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res* 2013 07/05;9:133-133.
17. Del Bue, M., Ricc??, S., Ramoni, R., Conti, V., Gnudi, G., & Grolli, S. (2008). Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: Their association in vitro and in vivo. *Veterinary Research Communications*, 32. <http://doi.org/10.1007/s11259-008-9093-3>
18. Gronthos, S., J. Brahim, W. Li, L. W. Fisher, N. Cherman, A. Boyde, P. DenBesten, P. G. Robey and S. Shi (2002). "Stem cell properties of human dental pulp stem cells." *J Dent Res* 81(8): 531-5.
19. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron P, Shi S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(25):13625-13630
20. Herthel, D. J. (2001). Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. *Proc Am Assoc of Eq Pract*, 47, 319–321.
21. Huang AHC, Chen YK, Chan AWS, Shieb TY, Lin LM, Shieh TY, Cha AWS. (2008). Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med*; 37: 571- 574. 149
22. Jönsson, L., Dalin, G., Egenvall, a., Näsholm, a., Roepstorff, L., & Philipsson, J. (2011). Equine hospital data as a source for study of prevalence and heritability of osteochondrosis and palmar/plantar osseous fragments of Swedish Warmblood horses. *Equine Veterinary Journal*, 43, 695–700. <http://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00354.x>

23. Kisiday, J. D., Goodrich, L. R., Wayne McIlwraith, C., & Frisbie, D. D. (2013). Effects of equine bone marrow aspirate volume on isolation, proliferation, and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 74(5), 801–807. <http://doi.org/10.2460/ajvr.74.5.801>
24. Kisiday, J. D., Kopesky, P. W., Evans, C. H., Grodzinsky, A. J., McIlwraith, C. W., & Frisbie, D. D. (2008). Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(3), 322–331. <http://doi.org/10.1002/jor.20508>
25. Knubben, J. M., Furst, a, Gygax, L., & Stauffacher, M. (2008). Bite and kick injuries in horses: prevalence, risk factors and prevention. *Equine Veterinary Journal*, 40, 219–223. <http://doi.org/10.2746/042516408X253118>
26. Laino G, d' Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G Papaccio G. (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*; 20: 1454-1402
27. Laino, G., A. Graziano, R. d'Aquino, G. Pirozzi, V. Lanza, S. Valiante, A. De Rosa, F. Naro, E. Vivarelli and G. Papaccio (2006). "An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering." *J Cell Physiol* 206(3): 693-701.
28. Lv F, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2014 06;32(6):1408-1419.
29. Mauth C, Huwig A, Graf-Hausner U, Roulet J-H. (2007). Restorative applications for dental pulp therapy. *Topics in Tissue Engineering*; 3. Eds Ashammakhi N, Reis R, Chiellini E©
30. Meershoek, L. S., Roepstorff, L., Schamhardt, H. C., Johnston, C., & Bobbert, M. F. (2001). Joint moments in the distal forelimbs of jumping horses during landing. *Equine Veterinary Journal*, 33, 410–415.
31. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Robey LW, Shi S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* May 13; 100(10): 5807-5812
32. Mohd AB, Fazliah SN, Fadilah A, Asma H, Siti AR, Shaharum S, Jaafar S, Asiah AB, Shamsuria O. (2008). Stem cells from childrens´teeth. *Archs Oral Sciences*: 3(1); 29- 31
33. Perry, B. C., D. Zhou, X. Wu, F. C. Yang, M. A. Byers, T. M. Chu, J. J. Hockema, E. J. Woods and W. S. Goebel (2008). "Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use." *Tissue Eng Part C Methods* 14(2): 149-56.
34. Pierdomenico, L., L. Bonsi, M. Calvitti, D. Rondelli, M. Arpinati, G. Chirumbolo, E. Becchetti, C. Marchionni, F. Alviano, V. Fossati, N. Staffolani, M. Franchina, A. Grossi and G. P. Bagnara (2005). "Multipotent mesenchymal stem cells with

- immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp." Transplantation* 80(6): 836-42.
35. Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells* 2015 06/26;7(5):839-851.
 36. Raabe, O., Shell, K., Würtz, A., Reich, C. M., Wenisch, S., & Arnhold, S. (2011). Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Veterinary Research Communications*, 35(6), 355–65. <http://doi.org/10.1007/s11259-011-9480-z>
 37. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell* 2007 06/07;1(1):35-38.
 38. Ranera, B., Ordov?s, L., Lyahyai, J., Bernal, M. L., Fernandes, F., Remacha, A. R., ... Rodellar, C. (2012). Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Veterinary Journal*, 44(1), 33–42. <http://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00353.x>
 39. Rodríguez-Lozano F, Insausti C, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez M, Meseguer L, *et al.* Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Nov;1(17 (6e):1062-7.
 40. Ranera, B., Remacha, A. R., Álvarez-arguedas, S., Romero, A., Vázquez, F. J., Zaragoza, P., ... Rodellar, C. (2012). Effect of hypoxia on equine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *BMC Veterinary Research*, 8(142), 2–13.
 41. Sarrafian, T. L., Case, J. T., Kinde, H., Daft, B. M., Read, D. H., Moore, J. D., ... Stover, S. M. (2012). Fatal musculoskeletal injuries of Quarter Horse racehorses: 314 cases (1990–2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241, 935–942. <http://doi.org/10.2460/javma.241.7.935>
 42. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015 02/07;385(9967):509-516.
 43. Schroeder, O. E., Aceto, H. W., & Boyle, A. G. (2013). A field study of kick injuries to the radius and tibia in 51 horses (2000-2010). *Canadian Veterinary Journal*, 54(5), 271–275.
 44. Shi, S. and S. Gronthos (2003). "*Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp.*" *J Bone Miner Res* 18(4): 696-704.
 45. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005 08;8(3):191-199.

46. Smith, R. K. W., Korda, M., Blunn, G. W., & Goodship, a E. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal*, 35, 99–102. <http://doi.org/10.2746/042516403775467388>
47. Song, L. and R. S. Tuan (2004). "Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow." *FASEB J* 18(9): 980-2.
48. Sonoyama W, Yamaza T, Gronthos S, Shi S. (2007). Multipotent stem cells in dental pulp. En Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM editors. *Culture of human stem cells*. Wiley, New Jersey:187-206
49. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GTJ. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*; 34(2): 166- 171
50. Takeda, T., Y. Tezuka, M. Horiuchi, K. Hosono, K. Iida, D. Hatakeyama, S. Miyaki, T. Kunisada, T. Shibata and K. Tezuka (2008). "Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs." *J Dent Res* 87(7): 676-81.
51. Takeyasu M, Nozaki T, Watanabe M, Shinohara M, Morita J, Hidaka A, Iwamoto K, Takahashi T, Nagata S, Daito M, Ohura K. (2004). In vitro osteogenic differentiation potential of dental pulp stem cells. *J Oral Tissue Eng*;2(1): 25-30
52. Tecles, O., P. Laurent, S. Zygouritsas, A. S. Burger, J. Camps, J. Dejou and I. About (2005). "Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury." *Arch Oral Biol* 50(2): 103-8.
53. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, Mori M. (1992). Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Archs Oral Biol*; 37(12): 1045-1055
54. Waddington, R. J., S. J. Youde, C. P. Lee and A. J. Sloan (2009). "Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp." *Cells Tissues Organs* 189(1-4): 268-74.
55. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. (2007). Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*; 33(6): 703- 708
56. Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." *Cell* 100(1): 157-68.
57. Welsh, C. E., Lewis, T. W., Blott, S. C., Mellor, D. J., Stirk, A. J., & Parkin, T. D. H. (2014). Estimates of genetic parameters of distal limb fracture and superficial digital flexor tendon injury in UK Thoroughbred racehorses. *Veterinary Journal*, 200(2), 253–256. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.005>

58. Xie, L., Spencer, N. D., Beadle, R. E., Gaschen, L., Buchert, M. R., & Lopez, M. J. (2011). Effects of athletic conditioning on horses with degenerative suspensory ligament desmitis: A preliminary report. *Veterinary Journal*, 189(1), 49–57. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.010>
59. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, *et al.* Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol* 2010 05/08;11:32-32.
60. Zhang W, Walboomers XF, Wolke JGC, Bian Z, Fan MW, Jansen JA. (2005). Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro. *Tissue Eng*; 11(3/4): 357- 368
61. Zhang, W., X. F. Walboomers, T. H. Van Kuppevelt, W. F. Daamen, P. A. Van Damme, Z. Bian and J. A. Jansen (2008). "*In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages.*" *J Tissue Eng Regen Med* 2(2-3): 117-25.

ANEXOS

I



Figura 1. Explantes de pulpa dental equina. Se pueden observar las colonias adherentes que se desprenden del tejido y migran al plástico pre-tratado.

II

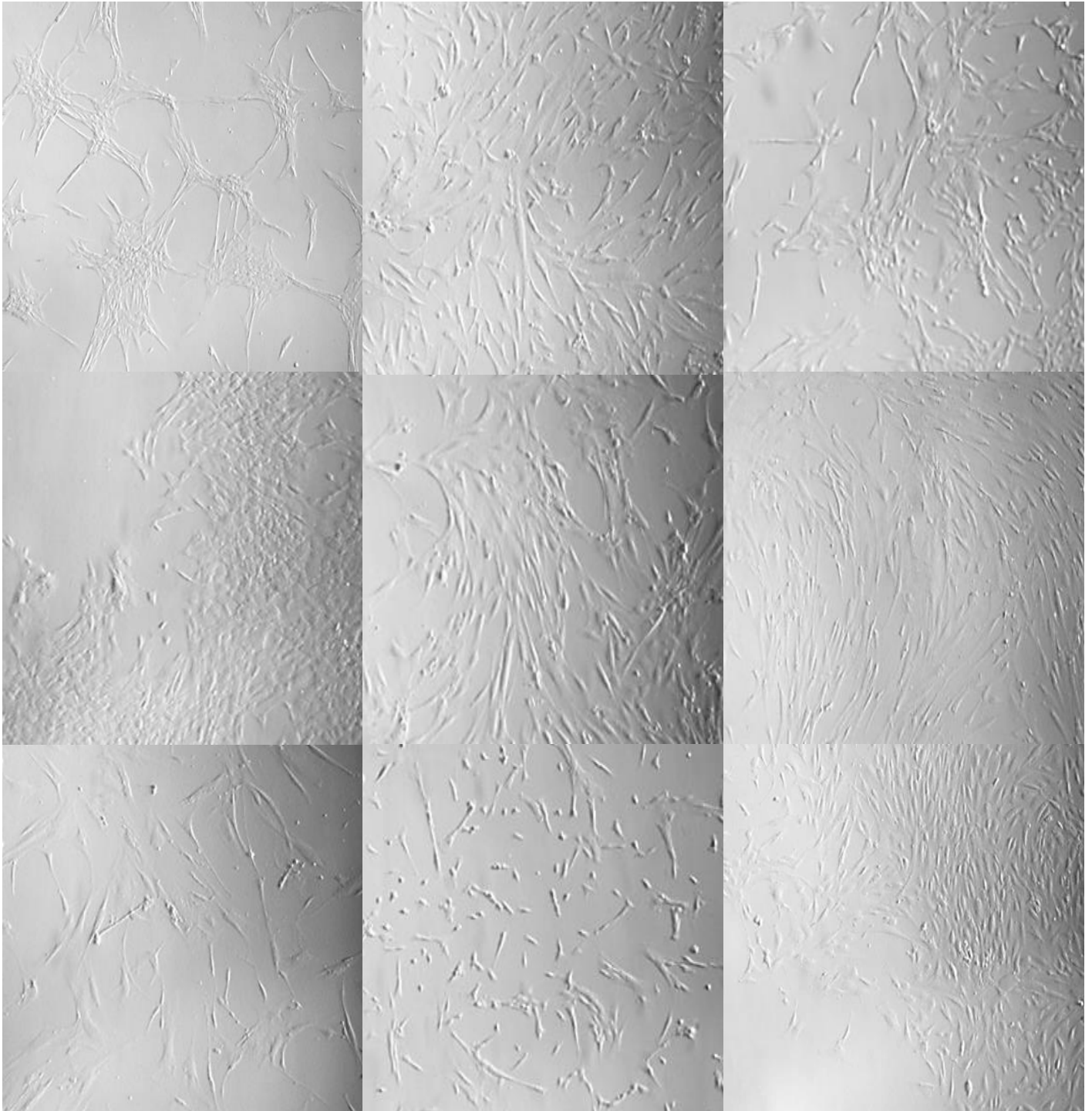


Figura 2. Células madre de pulpa dental equina en diferentes pasajes. Se observan células madre derivadas de la pulpa dental de un equina, que expresan una morfología de tipo fibroblastoide (fusiforme), en diferentes subcultivos.

III

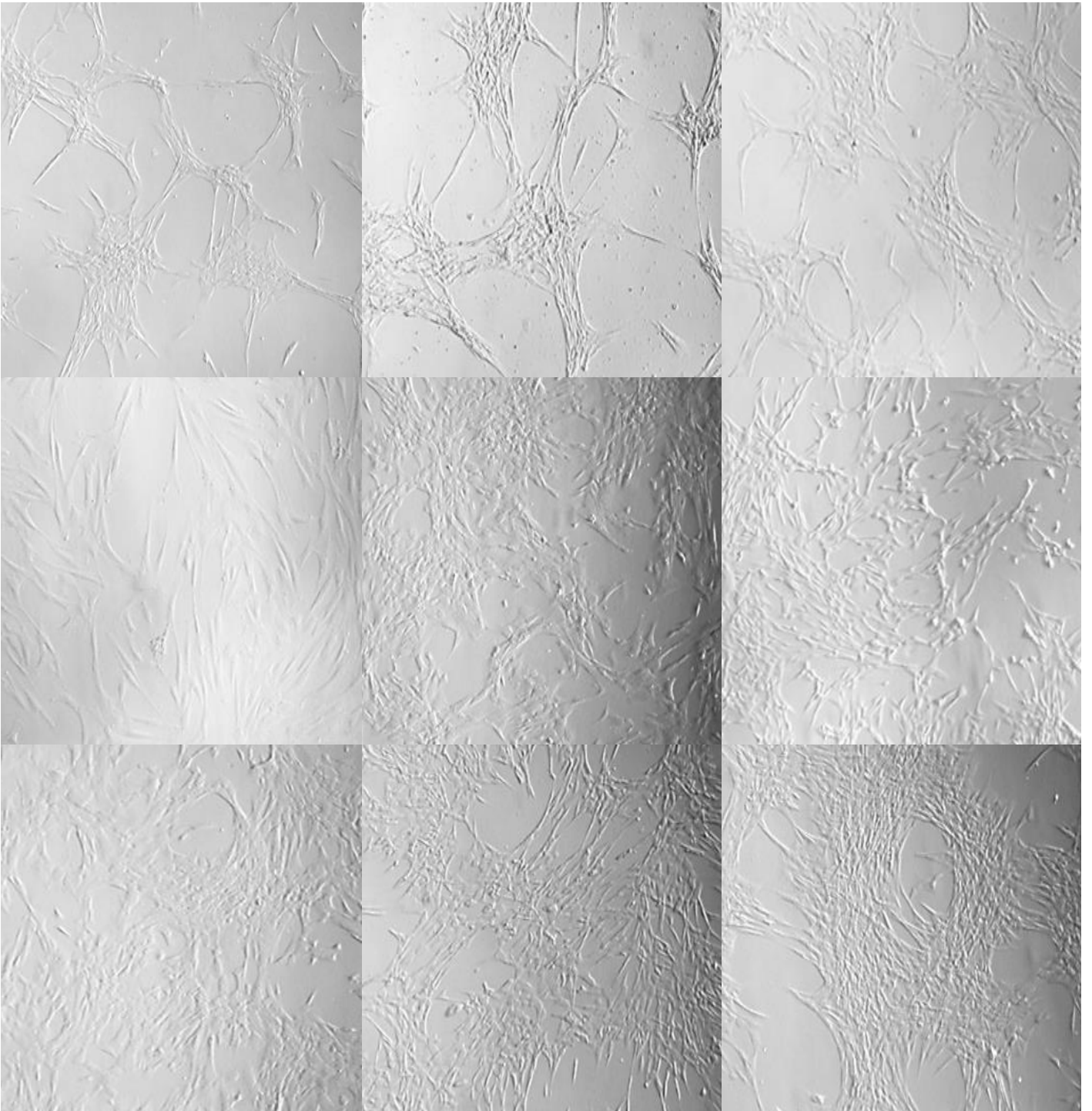


Figure 3. Células madre de médula ósea humana. Se observan células madre derivadas de la médula ósea humana, las cuales expresan una morfología fibroblastoide típica de células madre de tipo mesenquimal.