



**PROTOCOLO DE OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE
LA PULPA DENTAL DE PERSONAS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO
AUTISTA**

Trabajo de investigación
Requisito para optar al título
de Cirujano Dentista

Alumnas: Javiera Ruiz Huerta
 Priscilla Saavedra Chandía

Docente guía: Dra. Angelina Palacios

DEDICATORIA

Con mucho cariño a mi mejor amiga y compañera Javiera Ruiz quien siempre ha estado a mi lado dándome su cariño y apoyo, a su madre Jazmina Huerta y su padre Luis J. Ruiz quienes me han ayudado a la distancia, sin ellos el camino hubiese sido mucho más difícil y por su ayuda les estaré eternamente agradecida.

Priscilla Saavedra Chandía

A mis papás Jazmina y Luis Javier, hermanos Carola, Gonzalo y Jazmín, para mi niña Maura y tía Julia, que siempre se han hecho presentes a pesar de la distancia que nos separa ya sea con una visita o una llamada, nunca han dejado de recordarme que no estoy sola y que siempre están conmigo. A Dinger y Astoria, mis bebés que me recuerdan con una mirada o un maullido que me aman y me dan ánimo para continuar con lo que queda. A mis amigas, especialmente a Priscilla y Solange, que sin sus risas, abrazos y palabras de apoyo cuando más lo necesitaba no estaría donde estoy ahora.

Javiera Ruiz Huerta

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos profundamente a nuestra docente guía, la doctora Angelina Palacios, quien nos ha guiado a lo largo de este importante proceso, entregándonos sus valiosos conocimientos, sus puntos de vista y acotaciones que han enriquecido de gran manera nuestro trabajo, nos ha alentado y motivado a seguir adelante.

A nuestro amigo Álvaro Monsalve, quien se interesó en nuestro trabajo y compartió su visión para el desarrollo de este, dedicando parte de su tiempo para ayudarnos de manera desinteresada.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	3
Trastorno del espectro autista	3
Células madre.....	4
Células madre de la pulpa dental	4
Aplicaciones de células madre de la pulpa dental en estudios del TEA	5
Métodos de obtención y procesamiento	6
Métodos de cultivo.....	6
Criopreservación.....	7
Descongelamiento	8
OBJETIVOS	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
RESULTADOS.....	14
Proceso en dientes temporales	19
Obtención de la muestra	19
Procesamiento y almacenamiento de la muestra.....	20
Proceso en dientes definitivos	26
Obtención de las muestras.....	26
Procesamiento de las muestras	27
Almacenamiento de las muestras	27

DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES.....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	54
Anexo 1: Consentimiento informado.....	54
Anexo 2: Protocolo de obtención y almacenamiento	54

RESUMEN

Los trastornos del espectro autista (TEA) son un grupo heterogéneo de trastornos del neurodesarrollo, que se diagnostican sobre la base de aspectos conductuales tales como: déficit en la comunicación social, intereses restringidos y conductas repetitivas y estereotipadas. A la fecha, se desconoce su etiología, aunque factores genéticos y ambientales han sido identificados como factores de riesgo. Diversos estudios han utilizado las células madre de los pacientes para entender los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a esta condición y para mejorar la calidad de vida de las personas con TEA. Para esto es necesario estandarizar los procesos a los que se someten las muestras de células madre que se van a investigar en cada paciente, por lo que a través de esta revisión sistemática de la literatura se evaluaron diferentes procesos tanto de obtención, procesamiento y almacenamiento de células madre de la pulpa dental, donde el objetivo general será generar un protocolo clínico de obtención y almacenamiento de muestras de células madre de la pulpa dental para el estudio del TEA. Dentro de los resultados obtenidos se encuentra que las muestras deben ser dientes sanos de preferencia, la pulpa será extraída mediante el uso de limas endodónticas, el procesamiento más recomendado es mediante la digestión enzimática y la criopreservación debería ser a tasa controlada. Es posible la generación de un protocolo de manejo de muestras para la Universidad de Valparaíso, debido a que cada institución tiene diferentes realidades, logrando la estandarización de los investigadores y así brindarles las herramientas necesarias para realizarlo.

INTRODUCCIÓN

Las células madre han sido estudiadas a partir de los años 1900 aproximadamente, cuando aún no había una certeza de su existencia como tal, así como tampoco se conocían sus características específicas ni su modo de funcionamiento (1). Desde ahí se comenzaron a realizar diferentes ensayos experimentales tales como trasplante de tejido, realizado por el cirujano Alexis Carrel, que en 1912 logra generar nuevos antecedentes para la medicina regenerativa, y como consecuencia logra despertar el interés de los investigadores hacia esta nueva rama de la medicina (1).

Gracias a esto se han generado múltiples avances, se han logrado descubrir nuevos usos de las células madre dentro de la medicina regenerativa como vehículo terapéutico de genes, aplicaciones en tecnología farmacéutica y, además, un medio de estudio de diferentes condiciones y enfermedades (2, 3).

Las células madre pueden estar presentes en diversos tejidos del cuerpo humano y las más estudiadas se encuentran en la médula ósea, cordón umbilical y torrente sanguíneo (4, 5, 6). Sin embargo, a través de múltiples estudios se ha descubierto que dentro de los tejidos orales existen zonas ricas en dichas células, como por ejemplo, en la **pulpa dental** (4, 7). Estas células son fáciles de adquirir debido a su accesibilidad; a través de dientes temporales o dientes extraídos en la adultez, los que muchas veces terminan siendo residuos biológicos y por ende perdiéndose su potencial aplicación en la investigación de diversas patologías que aún requieren ser estudiadas en profundidad.

Durante el último tiempo las células madre se han empleado para diversos estudios genéticos, entre ellos, para el estudio de los trastornos del espectro autista (TEA), una condición heterogénea del neurodesarrollo que puede variar significativamente de un individuo a otro. Debido a esto, muchas veces las personas son tardíamente diagnosticadas, así como otras que nunca lo son (8).

Al ser una condición heterogénea, las necesidades de cada individuo son muy variables. Si bien hay algunas personas que son más independientes, existen otras

que necesitan atención y cuidados durante toda su vida (8). Las personas con TEA suelen tener dificultades al momento de acceder a educación y a trabajos en una etapa de vida más adulta, además, el apoyo impone exigencias a las familias que prestan atención y apoyo. El apoyo que presta el estado es un factor determinante en la calidad de vida de las personas (8).

La variabilidad del TEA genera dificultades para investigadores que buscan una respuesta etiológica de este trastorno, así como también, para aquellos que buscan una solución terapéutica para disminuir la sintomatología y mejorar la calidad de vida de las personas con TEA (8).

El uso de células madre promete grandes avances en la ciencia; sin embargo, existen muchos protocolos diferentes para su obtención, cultivo y almacenamiento (8), que difieren en varios aspectos unos de otros lo que provoca que no exista un protocolo estandarizado para la utilización de células madre en el ámbito de la investigación (9).

La generación de un protocolo con pasos estándar para el manejo de células madre, desde su obtención hasta su posterior almacenamiento, puede optimizar en gran medida el trabajo de investigadores y por ende asegurar el manejo correcto de la información obtenida, resguardando siempre la confidencialidad de los datos (9). En Chile, no existe un protocolo estándar para el manejo de células madre, lo que genera menor participación en el uso de estas células en el ámbito investigativo público, además de la poca regulación que tiene el ámbito de células madre en el país (10).

Un protocolo establecido además es capaz de estandarizar los procesos, disminuir la variabilidad y mejorar la calidad de los servicios otorgados (9). Es por esto que, tras una búsqueda exhaustiva en la literatura, se buscarán las mejores técnicas y alternativas para el manejo de muestras de células madre tanto de dientes temporales (SHED) como definitivos (DPSC) para su obtención y almacenamiento en el laboratorio de genética y conducta de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, Chile.

MARCO TEÓRICO

Trastorno del espectro autista

Los trastornos del espectro autista (TEA) son un grupo heterogéneo de trastornos del neurodesarrollo, que se diagnostican únicamente sobre la base de aspectos conductuales tales como: déficit en la comunicación social, intereses restringidos y conductas repetitivas y estereotipadas. La evidencia indica que el TEA puede ser causado por múltiples factores, donde dentro de ellos encontramos factores genéticos y ambientales. (11).

Las personas con TEA suelen presentar comorbilidades como epilepsia, depresión, ansiedad, trastorno de déficit de atención e hiperactividad, que pueden llevar a presentar dificultades para dormir y autolesiones (8, 12). El nivel intelectual varía mucho de un caso a otro, y va desde un deterioro profundo hasta casos con aptitudes cognitivas altas (8).

La OMS calcula que en el mundo 1 de cada 160 niños (0,625%) es parte del espectro, teniendo una prevalencia más alta en niños que en niñas. Según los datos entregados por National Health Statistic Reports, la mayoría de los niños con TEA (58,3%) lo presenta a un nivel leve, mientras el 34,8% a nivel moderado y un 6,9% severo (13). En Chile, un estudio actualizado realizado el 2021, indica que habría una prevalencia de 1,95% niños con TEA, con una distribución de 4 niños por una niña (14).

Las características del TEA pueden detectarse en la primera infancia, aunque también se diagnostica en etapas mucho más tardías en la vida del individuo a través de exámenes físicos y conductuales por parte de un equipo multidisciplinario (15, 16, 17). Es de vital importancia el realizar diagnósticos correctos y tempranos, ya que es fundamental realizar intervenciones durante la primera infancia, para así lograr optimizar el desarrollo y bienestar de las personas (8, 11, 12).

Células madre

Las células madre son células que tienen la capacidad de generar uno o más tipos de células especializadas y de autorrenovarse. En la actualidad son la base de numerosas investigaciones en las áreas de terapia celular y medicina regenerativa (18).

Existen múltiples maneras para clasificar a estas células, esto se puede realizar según su origen o según el potencial de diferenciación (1, 3). Según el origen, se clasifican en células madre de origen embrionario y de origen adulto, donde las embrionarias tienen como característica que son células totipotentes, mientras que las adultas son multipotentes. Al hablar del potencial de diferenciación, se encuentran diferentes clasificaciones, entre ellas están las células madre totipotentes, pluripotentes, multipotentes, y unipotentes (1, 3).

Células madre de la pulpa dental

Al hablar de células madre de la pulpa dental, se puede referir a dos tipos, aquellas provenientes de dientes temporales (SHED) o de dientes definitivos (DPSC) (7, 16, 19).

Según la morfología dentaria, los dientes de ambas denticiones se caracterizan por presentar esmalte, dentina y cámara pulpar, donde dentro de ésta encontramos a la pulpa (20), un tejido conectivo especializado que se encuentra en el interior de los dientes, que se compone de agua y matriz orgánica donde se encuentran diferentes tipos de células tales como macrófagos, células dendríticas, odontoblastos y células madre. Estas últimas tienen como característica que su morfología es fibroblastoide y son células adherentes en cultivo (18, 20, 21).

La pulpa puede extraerse de la cámara pulpar para luego criopreservarse y ser estudiada, lo que garantiza investigaciones y terapias futuras (18).

Los dientes son considerados desechos biológicos, por lo que es viable el aprovechamiento de estos para la obtención de SHED y DPSC, las que se consideran útiles para el desarrollo de terapias, tanto en medicina regenerativa, como en otros procedimientos, sin tener problemas éticos mayores respecto a su obtención (18).

Las SHED deben considerarse para el estudio y generación de terapias futuras, ya que estos dientes se exfolian de manera natural y esto genera una ventaja al momento de obtener las muestras (22). La pulpa de estos dientes está presente desde antes del nacimiento y se mantienen vigentes hasta antes de la erupción de los dientes permanentes, esto genera un amplio periodo donde se puede encontrar un nicho activo rico en células madre (22).

Debe tenerse en cuenta que dentro de la dentición permanente se encuentran dientes que erupcionan durante la vida adulta del individuo, como lo son los terceros molares. Estos dientes mantienen este nicho activo rico en células madre, y que por lo general son extraídos debido a problemas generados durante su erupción o posterior a ella (18).

Aplicaciones de células madre de la pulpa dental en estudios del TEA

En este ámbito se encuentra la investigación genómica, donde el estudio de Griesi-Oliveira analiza un transcriptoma (6), revelando mutaciones en genes en personas con TEA. Estas alteraciones se relacionan con anomalías morfológicas neuronales. En las neuronas se encontraron genes desregulados con expresión significativa, de los cuales 3 de ellos ya se encontraban asociados al TEA (KCNB1, SLC12A5, CHMP1A). Las mutaciones en genes específicos o de riesgo de TEA no siempre son iguales en todos los pacientes con TEA, ya que difieren entre ellos mismos, generando una expresión del TEA heterogénea; esto conlleva a que se necesiten mayor cantidad de muestras para continuar con la investigación genética del TEA (6).

Durante los últimos años se han llevado a cabo estudios que emplean el uso de DPSC, uno de ellos es el estudio de las células madre como fuente de mini cerebros “in a dish” de Esther Martín Vidal (2). En dicho estudio se generaron organoides a través de células madre provenientes de la pulpa dental, que fueron reprogramadas para generar modelos in vitro que modelan la condición de TEA, lo que contribuye al conocimiento de la etiología de la condición. Según esta revisión *“utilizando iPSCs (células madre pluripotentes inducidas) derivadas de pacientes con TEA se pueden*

generar progenitores neuronales que después pueden dar lugar a subtipos neuronales relevantes para el estudio del trastorno y compararlos con un modelo control” (2).

Métodos de obtención y procesamiento

Para la obtención de muestras de dientes temporales, estos pueden ser dientes que hayan sido exfoliados o utilizar dientes post extracción (7, 19). Se puede realizar durante el período de recambio de los dientes. Las extracciones se realizan bajo las condiciones estándar establecidas, para posteriormente ser desinfectados (19).

En relación a dientes permanentes, estos pueden ser dientes que tengan indicación de exodoncia por diferentes tratamientos que el paciente se tenga que realizar, o también se pueden utilizar terceros molares en diferentes estados de desarrollo (7, 23, 24).

Luego de obtener el diente, hay que extraer la pulpa que se encuentra dentro de la cámara pulpar, para esto existen diferentes métodos tales como la apertura del diente con instrumental rotatorio con refrigeración, obtención mediante limas endodónticas, entre otros (7, 23, 25).

Luego de este paso, la pulpa dental obtenida debe ser procesada para aislar las células de interés. Se mencionan dos métodos que son los más destacados, el método enzimático y el método del explante (7, 16, 26, 27).

El método enzimático consiste en digerir fragmentos de tejido pulpar en una solución de enzimas colagenasa tipo I y dispasa, o enzima tripsina para de esta manera obtener una suspensión de células individuales para su posterior cultivo (28).

El método del explante se caracteriza por un crecimiento excesivo y espontáneo de células madre a partir de trozos de tejido pulpar (en especies de bloques) (28).

Métodos de cultivo

Existen diferentes medios de cultivo, cada uno tiene sus características y beneficios diferentes. Los medios de cultivo más destacados son los siguientes:

1. Modificación del “medio esencial mínimo” (15).
2. Medio de Eagle modificado por Dulbecco (15).
3. Suero humano autólogo o alogénico (5).

Es posible generar suero perteneciente al donante de las células madre. Este procedimiento se realiza obteniendo la sangre del paciente, se recoge una cantidad de 80 ml de sangre 5 días antes del procedimiento de extracción dental, esta sangre pasa por un proceso de centrifugado y posterior filtrado, y finalmente se refrigera a una temperatura de -4°C hasta ser preparado el medio (5).

Criopreservación

Existen varios métodos que pueden mantener a las células almacenadas sin generar daño celular. Previo a la criopreservación, la muestra de células madre debe ser protegida con un agente criopreservante. Estos agentes son sustancias de bajo peso molecular que pueden pasar a través de la membrana celular, reemplazando el volumen de agua intracelular y, evitando así, los daños producidos por la producción de cristales de hielo, y a su vez impidiendo el colapso celular por excesiva deshidratación (38). El agente criopreservante más utilizado es el dimetil-sulfóxido (DMSO), que se utiliza en las concentraciones del 5% y del 10% (28).

Luego del tratamiento de las células madre con el agente criopreservante se realiza la criopreservación propiamente tal, la cual puede ser a través de diferentes métodos (28):

1. Crioconservación a tasa no controlada

Dentro de la literatura se describe que, en primer lugar, las células deben ser preenfriadas a una temperatura de 4°C, para luego ser depositadas directamente en un incubador a -80°C, o bien se depositan en nitrógeno líquido de manera directa. Esta técnica no requiere de una capacitación previa para su ejecución y puede ser realizada sin una tecnología específica (28).

2. Crioconservación a tasa controlada

Dentro de este tipo de criopreservación existen 2 tipos, dependiendo de la velocidad de la congelación puede ser con una velocidad de congelación lenta que consiste en disminuir la temperatura de 1 a 2°C por minuto, o también se describe la tasa de congelación ultra lenta, la cual es altamente controlada, este método consiste en disminuir la temperatura de 0,3 a 0,6°C por minuto (hasta llegar finalmente a los -80°C) (7, 28).

3. Crioconservación a través de congelación magnética

Se realiza a través de congeladores magnéticos, los cuales generan un campo magnético estático y ondas eléctricas que tienen una dirección definida, ambas generan un ordenamiento molecular, así se genera un congelamiento uniforme intra y extracelular, evitando de esta manera la generación de cristales de hielo (28).

En cuanto a la temperatura óptima de almacenamiento en la literatura se menciona entre -85°C a -196°C independiente del tiempo de almacenamiento presentan una viabilidad mayor a un 90% (28).

Descongelamiento

Este procedimiento, al contrario que el congelamiento se debe realizar de la manera más rápida posible, debido a que durante el descongelamiento las células se van rehidratando a medida que el hielo se funde; cuando las células presentan cristales de hielo en su interior se genera una recristalización, provocando un daño celular irreversible producto de un descongelamiento lento (29).

1. Descongelamiento rápido a través de baño de agua a 37°C

Consiste en la aplicación de un baño de agua con temperatura de 37°C por aproximadamente 20 minutos es por esta razón que es llamado descongelamiento rápido (7, 16, 19).

2. Descongelamiento a través de aplicación de calor seco

Es un procedimiento de aproximadamente 20 minutos de duración, a través de la utilización de maquinaria específica (descongeladores a vapor seco) se realiza el descongelamiento a diferentes temperaturas, utilizando 0°, 20° hasta finalizar en 37°C (28).

Luego de tener las células descongeladas se debe realizar una eliminación del CPA debido a que presenta un efecto citotóxico, la eliminación del agente criopreservante debe realizarse de manera escalonada con la utilización de soluciones isotónicas graduadas (28).

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Generar un protocolo clínico de obtención y almacenamiento de muestras de células madre de la pulpa dental para el estudio del TEA.

Objetivos específicos

1. Identificar procesos de obtención y almacenamiento de muestras de células madre de la pulpa dental de dientes temporales.
2. Identificar el método de obtención y almacenamiento de las muestras de las células madre de la pulpa dental de dientes definitivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar la búsqueda se utilizaron los metabuscadores Pubmed, Scielo, Lilacs y Scopus. Las llaves de búsqueda utilizadas fueron las siguientes: “células madre AND pulpa dental”, “células madre pulpa dental AND almacenamiento”, “células madre pulpa dental AND obtención” “células madre pulpa dental dientes temporales” “células madre pulpa dental extracción”, “stem cells AND dental pulp AND autism”, "stem cells AND dental pulp AND autism AND storage" "stem cells AND dental pulp AND autism AND extraction", donde los resultados están expuestos en la tabla 1.

Luego, se subieron los resultados de las búsquedas realizadas al programa Rayyan, que es una herramienta que permite seleccionar artículos para revisiones sistemáticas mediante la lectura de resúmenes y títulos. Aquí se pudo observar que en total se obtuvieron 1.223 artículos, de los que 99 eran duplicados por lo que se eliminaron, quedando un total de 1.124 artículos a revisión.

Luego, mediante la lectura de los títulos y abstract de los artículos, estos fueron sometidos a evaluación de criterios de inclusión y exclusión, donde se eliminaron 1.098 artículos. Se revisó por ambas investigadoras cada uno de los documentos incluyendo o excluyendo según los criterios que se mencionan a continuación sin que la otra investigadora pudiera ver los documentos seleccionados por la otra parte, y de esta manera evitar sesgos.

Los criterios de inclusión utilizados fueron:

1. Estudios que detallen el proceso con el que se realiza la obtención de las muestras.
2. Estudios publicados en revistas científicas de Q1 o Q2 que reporten la obtención y mantención de las muestras donadas.
3. Tipos de estudio realizados sean metaanálisis, revisiones sistemáticas, estudios observacionales o experimentales.

Y los criterios de exclusión fueron los siguientes:

1. Estudios en los que no esté correctamente detallado el proceso de la muestra.
2. Estudios donde no se trabaja con células madre provenientes de un órgano dentario (ya que presentan diferentes comportamientos dependiendo de su origen).

Tabla 1: Estrategias de búsqueda utilizadas

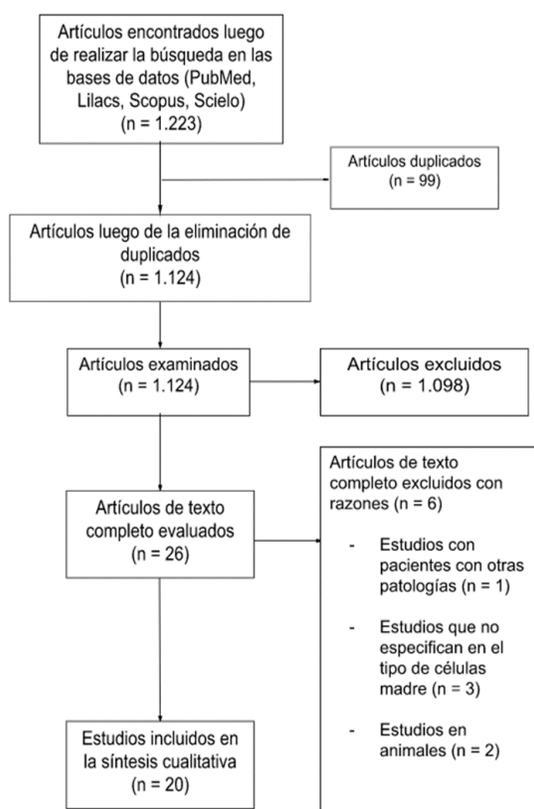
Buscador	Palabras clave	Cantidad resultados
Pubmed	autism AND dental pulp AND stem cells	10
Lilacs	células madre pulpa dental	82
Lilacs	células madre pulpa dental + obtención	2
Lilacs	células madre pulpa dental + dientes temporales	2
Lilacs	células madre pulpa dental + extracción	1
Scopus	stem cells AND dental pulp AND autism	175

Scopus	stem cells AND dental pulp AND autism AND storage	16
Scopus	stem cells AND dental pulp AND autism AND extraction	16
Scielo	almacenamiento células madre	1
Scielo	obtención células madre + pulpa dental	1

RESULTADOS

De los 1.223 artículos iniciales, luego de la eliminación de duplicados, y selección mediante criterios de inclusión y exclusión, quedaron finalmente 26 artículos para la revisión, donde se excluyeron 6 artículos debido a que 2 eran estudios en animales, 1 estudio incluía pacientes con otras patologías, y 3 estudios no especificaron en el tipo de células madre. Por lo que, finalmente, se incluyeron 20 artículos en la investigación, como se muestra en la figura 1.

Figura 1: Diagrama de flujo PRISMA que muestra el proceso de selección de los artículos



De: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(6): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

En estos artículos, a pesar de la búsqueda realizada, no se encuentran protocolos específicos para pacientes con TEA, pero sí se mencionan los métodos de extracción dental, obtención de la pulpa, preservación y almacenamiento de las células madre de la pulpa dental tanto para dientes temporales como para dientes definitivos en población general. El tipo de muestra estudiada de cada artículo se especifica en la tabla 2.

Tabla 2: Tipo de muestra estudiada por autor

Autor y año	Tipo de estudio	Artículo	Tipo de muestra
Gotta S. et al. (2021)	Estudio experimental	Obtención y caracterización de células madre mesenquimales adultas de la pulpa dental humana	Dientes definitivos
Francia A. et al. (2021)	Estudio experimental	Establecimiento e implementación de un protocolo simplificado de expansión y cultivo de células madre de la pulpa dental humana	Dientes definitivos
Pierre-Yves F. et al. (2015)	Revisión de la literatura	Allogenic banking of dental pulp stem cells for innovative therapeutics	Dientes definitivos
Brizuela C. et al. (2013)	Estudio experimental	Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano	Dientes definitivos

Suárez C. et al. (2013)	Estudio experimental	Aislamiento y caracterización de las células madre mesenquimales de la pulpa dental humana	Dientes definitivos
Cea-Sanhueza M. et al. (2016)	Revisión de la literatura	Células madre mesenquimales orales. Estado del arte en odontología	Dientes temporales Dientes definitivos
Pilbauerová N. et al. (2018)	Revisión de la literatura	Cryopreservation of dental stem cells	Dientes temporales Dientes definitivos
Perelló C. et al. (2017)	Revisión de alcance	How has dental pulp stem cells isolation has been conducted? A scoping review	Dientes temporales Dientes definitivos
Boon Chin H. et al. (2015)	Revisión crítica de la literatura	An overview of protocols for the neural induction of dental and oral stem cells in vitro	Dientes temporales Dientes definitivos

Ducret M. et al. (2015)	Revisión de la literatura	Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: current strategies and future investigations	Dientes definitivos
Shagufta N. et al. (2019)	Estudio experimental	Isolation and culture of dental pulp stem cells from permanent and deciduous teeth	Dientes temporales Dientes definitivos
Guirado E. et al. (2019)	Estudio experimental	Establishment of stable cell lines from primary human dental pulp stem cells	Dientes definitivos
Karamzadeh R. et al. (2012)	Estudio de caso y control	Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using 2 different methods	Dientes definitivos
Pisciolaro R. et al. (2015)	Estudio experimental	Tooth tissue engineering: the importance of blood products as a supplement in tissue culture medium for human pulp dental stem cells	Dientes definitivos

Muniz M. et al. (2016)	Revisión sistemática	Does cryopreservation affect the biological properties of stem cells from dental tissues? A systematic review	Dientes definitivos
Young-Jin H. et al. (2017)	Estudio experimental	Stem cells from cryopreserved human dental pulp tissues sequentially differentiate into definitive endoderm and hepatocyte-like cells in vitro	Dientes definitivos
Zeitlin B. (2020)	Revisión de la literatura	Banking on teeth, stem cells and the dental office	Dientes temporales Dientes definitivos
Beatriz A. et al. (2017)	Artículo de revisión	Dental pulp stem cells: current advances in isolation, expansion and preservation	Dientes definitivos
I Tsai A. et al. (2017)	Estudio de caso y control	Isolation of mesenchymal stem cells from human deciduous teeth pulp	Dientes temporales
Martínez D. et al. (2016)	Revisión de la literatura	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth: a growing literature	Dientes temporales

Proceso en dientes temporales

Obtención de la muestra

Del total de 20 artículos seleccionados, en un 40% de ellos se hablan de las células madre de la pulpa dental de dientes temporales (SHED), donde se mencionan técnicas de obtención de muestras tanto como en los momentos en que el diente es exfoliado de manera natural, como cuando hay que realizar una exodoncia.

Del total de artículos que mencionan el uso de células madre de dientes temporales, se menciona en todos ellos que pueden ser tanto dientes exfoliados naturalmente como dientes cercanos a la exfoliación.

Dentro de los criterios para seleccionar los dientes para la obtención de las células madre, se menciona en un 75% de los artículos que deben ser dientes con reabsorción radicular visible, ya que esto permite que haya una manera de ingreso tanto para la extracción de la pulpa como para un posible agente crioprotector.

De estos artículos, en solo un 50% se menciona la longitud ideal de la raíz, donde en un 75% de ellos se menciona que la reabsorción no debe ser mayor a $\frac{1}{3}$ de la longitud inicial de la raíz.

También en los criterios de inclusión para este tipo de muestra se menciona que los dientes seleccionados deben ser dientes que no hayan tenido exposición a lesiones cariosas extensas, ya que esto genera traumas pulpares, lo que altera la capacidad de diferenciación celular.

En el total de artículos se menciona que luego de la extracción/exfoliación del diente, existe un periodo de tiempo máximo de 120 horas para aislar las células madre, ya que luego pierden la capacidad de diferenciación. Para esto, en un 50% de los artículos se menciona que para mantener la capacidad de las células es necesario sumergir el diente en una solución salina estéril isotónica con buffer fosfato o bien utilizar clorhexidina para su desinfección, y así evitar la deshidratación del diente. En el otro 50% de los artículos no se especifica un medio para mantener el diente.

Para la extracción de la pulpa se mencionan tres opciones, la más utilizada se menciona en un 100% de los artículos, y es la extirpación pulpar completa mediante el uso de limas endodónticas estériles H, ingresando a través del ápice radicular. Luego se menciona en un 50% la perforación del diente a nivel del cuello en la unión amelocementaria. Esto se puede realizar de dos maneras, utilizando un láser Nd Yag, lo que minimiza los daños pero aumenta el costo, o también se menciona que es posible realizar estos cortes con fresas de diamante a alta velocidad y abundante agua para evitar un sobrecalentamiento de la pulpa. Esto permite que se expongan los túbulos dentinarios y así poder generar entradas para el agente crioprotector, sin necesidad de extraer la pulpa de manera completa.

Procesamiento y almacenamiento de la muestra

De los artículos encontrados, en ninguno se especifica alguna diferencia entre las medidas utilizadas para el procesamiento y almacenamiento de las muestras entre dientes temporales y dientes definitivos. Ambos procedimientos se especifican en la tabla 3.

Tabla 3: Procedimientos realizados en dientes temporales por artículo seleccionado

Autores	Procedimientos utilizados en muestras de dientes temporales
Cea-Sanhueza M. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Se utilizan dientes exfoliados. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: Se separa el tejido pulpar de los dientes y en otros se mantiene la pulpa dentro del diente. Previamente se realiza perforación con láser Nd:YAG. 5. Procesamiento celular: Método explante y método enzimático.

	<ol style="list-style-type: none"> 6. Medio de cultivo: Se propone el reemplazo del suero fetal bovino: uso de 15% de suero fetal bovino y α-MEM; otra alternativa es, con un 15% de suero humano y α-MEM, una con 15% de suero humano y α-MEM y además un recubrimiento del matraz de fibronectina. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: Con nitrógeno líquido de células aisladas y de dientes completos con aplicación de medio DMSO. 9. Descongelamiento: Utilizan la descongelación rápida a través de un baño a 37°C.
<p>Pilbauerová N. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción dental o exfoliación. 2. Desinfección: Deben lavarse en soluciones bactericidas como clorhexidina. 3. Transporte: En solución estéril isotónica tamponada con fosfato para evitar necrosis pulpar en condiciones de hipotermia a 4°C. 4. Obtención de tejido pulpar: Separación suave de corona dental de las raíces, abriendo la cámara pulpar y recolectando el tejido pulpar. Se menciona también que se debe abrir a través de foramen apical con fresas de diamante. 5. Procesamiento celular: Método enzimático y método explante. 6. Medio de cultivo: No aplica. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: Con ayuda de agente crioconservante DMSO usado comúnmente. Puede ser a tasa controlada, tasa controlada a baja velocidad, congelación a tasa no

	<p>controlada, congelación rápida o vitrificación y congelación magnética. Se indica que existe el método de criopreservación del diente completo.</p> <p>9. Descongelamiento: Baño con agua a 37°, o aplicación de calor seco.</p>
Perelló C. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Dientes extraídos por motivos de ortodoncia, enfermedad periodontal o caries. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: No aplica. 5. Procesamiento celular: Método enzimático o método combinado enzimático-mecánico se mencionan como los más utilizados, seguidos después de método explante y finalmente el método mecánico. 6. Medio de cultivo: Los medios de cultivo más utilizados fueron α-MEM, seguido de DMEM. Los sueros más utilizados fueron el suero fetal bovino (FBS), seguido de suero fetal de ternero (FCS), suero humano y FCS en asociación con FBS. A esto se agregan antibióticos como penicilina y estreptomina. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
Boon Chin H. et al.	<p>Se explican los criterios mínimos para definir la células madre mesenquimales multipotentes establecidas por la Sociedad Internacional de Celulares Terapia en 2006, que incluyen:</p>

	<p>(i) La capacidad de adherirse rápidamente a la superficie plástica bajo condiciones de cultivo estándar.</p> <p>(ii) La capacidad de diferenciarse en adipogénico, osteogénico e ingeniería de tejidos.</p> <p>(iii) La expresión de marcadores comunes asociados a células madre mesenquimales y moléculas de superficie HLA-DR. Además, la clonogenicidad.</p>
Shagufta N. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Uso de dientes temporales cercanos a exfoliación cuya pulpa se encontrara sana, debido a que se indica que los resultados de cultivo celular son más eficaces en dientes temporales que definitivos. 2. Desinfección: Se desinfectó la pieza dental con hipoclorito de sodio al 3% durante 2 minutos, se realizó enjuague con solución salina (PBS) y secado con algodón. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: Se cortó alrededor de la unión cemento-esmalte con fresas estériles a alta velocidad con abundante agua. 5. Procesamiento celular: Se utilizó técnica de explante. 6. Medio de cultivo: No aplica. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
Zeitlin B.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Utilización de dientes exfoliados o extracción por profesional, se recomienda uso de dientes sanos. 2. Desinfección: No aplica.

	<ol style="list-style-type: none"> 3. Transporte: En frasco con solución salina (PBS) o (HBSS), en caso de avulsión accidental se utiliza leche pasteurizada. 4. Obtención de tejido pulpar: Se realiza extracción de pulpa dental pero no se indica metodología. 5. Procesamiento celular: Método enzimático y método de explante. 6. Evaluación de viabilidad: Se utiliza citometría de flujo. 7. Criopreservación: Técnica gradual con nitrógeno líquido con previa aplicación de DMSO y se aconseja uso de campos magnéticos. Se indica como alternativa el uso de campos magnéticos para reducir concentración de agente crioprotector para evitar citotoxicidad y mejorar la recuperación celular. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
I Tsai A. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción convencional de dientes temporales sanos. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: En solución salina tamponada con agregados de antibióticos. 4. Obtención de tejido pulpar: A través de la separación de la corona a través de fresas dentales estériles y uso de cucharitas para caries pequeñas. 5. Procesamiento celular: Método de explante. 6. Medio de cultivo: Se cultivó al 5% de CO₂ en el ambiente bajo 37°C en un disco de cultivo de 35 mm que contiene medio de paso con medio de Eagle modificado (Hyclone, Logan, UT, EE. UU.), suero bovino fetal al 10 %

	<p>(Hyclone), 300 unidades/mL de penicilina y 300 g/ml de estreptomicina (Gibco).</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. Evaluación de viabilidad: Citometría de flujo. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
Martínez D. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción quirúrgica de dientes temporales en condiciones estándar con anestesia local. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: Con solución salina isotónica tamponada con fosfato para evitar que se sequen, este contenedor se coloca dentro de otro contenedor metálico y debe llegar al banco de dientes en 40 h. 4. Obtención de tejido pulpar: Se realiza una amplia apertura de acceso y se saca la pulpa con una cuchareta para caries. 5. Procesamiento celular: Método enzimático con colagenasa tipo I (3 mg/ml) y dispasa (4 mg/ml) durante 1 hora a 37°C. 6. Medio de cultivo: En placas petri en medio de cultivo basal (modificación de medio de cultivo basal alfa y medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco). 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: Primeramente se almacena en FBS con suplemento de DMSO durante 1 hora, se transfiere a un recipiente y se realiza congelamiento controlado 1°C/min hasta -80°C, para luego sumergirlo en nitrógeno líquido a -196°C.

	9. Descongelamiento: Se indica un baño de agua a 37°C durante 2 minutos para el cultivo primario.
--	---

Proceso en dientes definitivos

Obtención de las muestras

De los artículos elegidos, en un 90% de ellos se habla respecto al proceso y posibles usos al obtener muestras de células madre de la pulpa dental de dientes definitivos (DPSC), donde siempre se sugiere que sean extracciones realizadas por un odontólogo capacitado para realizarlo, idealmente terceros molares, lo que se menciona en un 70% de los resultados. También, en un 15% de los artículos se menciona que pueden ser premolares, cuando se indica su extracción por tratamiento de ortodoncia. El 15% restante de artículos no menciona un tipo de diente específico, solo se menciona que la extracción debe ser realizada por un profesional pertinente.

Dentro de los artículos que mencionan la obtención de muestras de terceros molares, en un 33,3% de artículos se indica que deben ser terceros molares sanos, en un 16,6% mencionan que deben ser terceros molares impactados, mientras que en otro 5,5% dicen que debe estar el diente en estado de germen y retenido. En el otro 61,1% no mencionan el estado en el que debe estar el diente para poder extraer la muestra de células madre de la pulpa.

Se menciona que el rostro del paciente debe desinfectarse con una solución de clorhexidina al 0,2%. Una vez extraídos los dientes, estos deben limpiarse con una solución de suero fisiológico o solución isotónica para posteriormente ser transportados al laboratorio.

La técnica de obtención del tejido pulpar más utilizada es la fractura dental con posterior obtención a través de diferentes instrumentos (bisturí, cuchareta, curetas) realizado en un 50% de los estudios, seguido por un 18,2% de los estudios que menciona el uso de limas de endodoncia para la extracción del tejido pulpar a través

del foramen apical o a través de una pequeña apertura cameral. Y finalmente los métodos menos utilizados son el uso de cuchareta a través de raíces con reabsorción radicular en un 9,1%. Además, existe un método de almacenamiento que no requiere la extracción de la pulpa dental, este fue utilizado en un 4,5% y los restantes 18,2% de los artículos no menciona el método de obtención del tejido pulpar desde la pieza dentaria.

Procesamiento de las muestras

Para ambos tipos de dientes, tanto temporales como definitivos, encontramos mencionadas distintas técnicas para el procesamiento de las muestras. Dentro de ellas tenemos la técnica de procesamiento enzimático, procesamiento por explantes, procesamientos con método mixto (enzimático y mecánico).

Se utilizó la técnica de digestión enzimática por sí sola en un 12,2% de los artículos, técnica por explantes en un 27,3%, ambas juntas en un 36,4%, método combinado 4,5%. Sin embargo en un 13,6% de los artículos no se mencionaba la técnica debido al abordaje de la investigación, entonces como resultado el método más utilizado con éxito es la técnica de explante seguida de la técnica enzimática, de las que, al compararlas no existe evidencia significativa que un método sea mejor que otro. El uso de una u otra técnica dependerá de la experiencia del operador y los recursos que disponga el investigador, además del tiempo implicado para cada una de las técnicas.

El método más rápido para procesamiento celular es el método enzimático (24-48 horas) en contraste con el método de explante que puede demorar aproximadamente 1 semana o más, pero es menos costoso que el método enzimático.

Almacenamiento de las muestras

Dentro de los estudios que mencionan la criopreservación (54,5%), se menciona como uso tradicional la criopreservación a tasa controlada con posterior uso de nitrógeno líquido, esto se nombra en un 63,6% de ellos. De acuerdo con lo señalado en los documentos es la técnica más recomendada, debido a que la temperatura baja lentamente entre 0,5°C-1°C por minuto hasta llegar a -80°C, donde posteriormente se

sumerge en nitrógeno líquido para ser refrigerado a -196°C , con una previa aplicación de agente crioprotector. De esta manera se protege a la célula de daños irreversibles por una posible formación de cristales.

Un 9,1% de los estudios nombra el uso de congelación a tasa no controlada, y otro 9,1% la aplicación directa de nitrógeno líquido sin especificación de pasos. Dentro de los procedimientos que se recomiendan se encuentra la congelación magnética en un 18,2%, se explica como un procedimiento que podría ayudar a reducir la citotoxicidad que puede producir el agente criopreservante, pero no se aplica comúnmente debido a su alto costo y su maquinaria especializada. No se incluyeron aquellas técnicas de crioconservación que dentro de los documentos se indica posibilidad de daño celular alto.

Tabla 4: Procedimientos realizados en dientes definitivos por artículo seleccionado

Autor	Procedimientos realizados en muestras de dientes definitivos
Gotta S. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción de terceros molares de manera convencional en pacientes voluntarios. 2. Desinfección: Lavados con una solución fisiológica. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: Dividiendo longitudinalmente las piezas dentales a través de instrumental rotatorio, se realizó la extracción de la pulpa utilizando curetas pequeñas en ámbito aséptico. 5. Procesamiento celular: Técnica de explante. 6. Medio de cultivo: DMEM con antibióticos y suero fetal bovino, recambio cada 48 hrs.

	<ol style="list-style-type: none"> 7. Evaluación de viabilidad: A través de tinciones para evaluar morfología. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
Francia A. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Utilización de terceros molares sanos, exclusión de dientes con lesiones. 2. Desinfección: Eliminación de tejido periodontal con cureta gracey 14-15. 3. Transporte: En frasco estéril a 4°C con medio de transporte α-MEM suplementado con carga antibiótica, penicilina/estreptomicina 100 U/ ml, manteniendo la cadena de frío. 4. Obtención de tejido pulpar: Se realizó una línea de fractura con pieza de mano eléctrica y disco de carborundum sobre el límite amelocementario evitando el sobrecalentamiento manteniendo irrigación durante el proceso, terminando en la fractura de la pieza con fórceps para la obtención del tejido pulpar a través de limas de endodoncia y cucharitas para caries. 5. Procesamiento celular: Método de explante. 6. Medio de cultivo: Se colocaron 3 ml de medio de cultivo clonogénico con la siguiente composición: α-MEM (Capricorn Scientific, Alemania), Penicilina/Estreptomicina 1%, Suero Fetal Bovino 20% (cambio de medio de cultivo cada 3 días). 7. Evaluación de viabilidad: Indicador de viabilidad fluorescente (método cualitativo), citometría de flujo y corroboración con inmunohistoquímica.

	<ol style="list-style-type: none"> 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
Pierre-Yves F. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción de terceros molares de manera aséptica. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: En tubo de transporte estéril. 4. Obtención de tejido pulpar: Se rompe el diente (no se indican técnicas) y se extrae la pulpa, esta se rompe mecánicamente en un triturador u homogeneizador de tejidos. 5. Procesamiento celular: Método de explante. 6. Medio de cultivo: No aplica. 7. Evaluación de viabilidad: Citometría de flujo. 8. Criopreservación: Conservación en nitrógeno líquido. 9. Descongelamiento: No aplica.
Brizuela C. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Terceros molares impactados sin caries de pacientes sanos sistémicamente. Desinfección de rostro de paciente con clorhexidina al 0.2%, y extracción convencional con anestesia local. 2. Desinfección: Limpieza con solución de suero fisiológico. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: Se extrajo la pulpa a través del ápice con extractor pulpar.

	<ol style="list-style-type: none"> 5. Procesamiento celular: Método explante utilizando un bisturí N°15. 6. Medio de cultivo: Medio completo compuesto por α-MEM, 20% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina). 7. Evaluación de viabilidad: Citometría de flujo. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
Suárez C. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Terceros molares retenidos. 2. Desinfección: Luego del transporte se hace un lavado con solución buffer de fosfato (PBS), eliminación de tejido periodontal con cureta y nuevamente enjuague con PBS. Seguidamente, se realizó la desinfección de la superficie con una gasa estéril impregnada con solución desinfectante, etanol al 70%. 3. Transporte: En frascos estériles con medio de transporte para muestras humanas, constituido por medio F12 (GIBCO™) con doble dosis de antibióticos y antimicóticos (GIBCO®) para conservar las condiciones de asepsia. Se mantuvieron a 4°C para conservar la viabilidad de las células y las condiciones fisiológicas. 4. Obtención de tejido pulpar: Se realizó un surco de 0,5 a 1 mm de profundidad a 1 mm por debajo de la unión cemento-esmalte. Luego, los dientes se colocaron en un frasco estéril con medio F12 frío y se fracturaron con un cincel, en dientes con menor

	<p>formación radicular la pulpa fue extraída por la raíz con limas de endodoncia.</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. Procesamiento celular: Técnica de disgregación enzimática. 6. Medio de cultivo: Medio DMEM-F12, suplementado con 15% de SFB, 100 μM L-ácido ascórbico 2-fosfato, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomina y 2 μg/mL de anfotericina B. 7. Evaluación de viabilidad: Análisis inmunocitoquímico con marcadores para células madre. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
<p>Cea-Sanhueza M. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Terceros molares. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: Almacenamiento en solución salina estéril y otras en alfa minimum essential medium (α-MEM). 4. Obtención de tejido pulpar: No aplica. 5. Procesamiento celular: No se indica en dientes permanentes. 6. Medio de cultivo: 1) 15% de suero fetal bovino + α-MEM 2) 15% de suero humano + α-MEM, 3) 15% de suero humano + α-MEM y un recubrimiento del matraz de fibronectina. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: Criopreservante, disminución de temperatura controlada y nitrógeno líquido.

	<p>9. Descongelamiento: No aplica.</p>
<p>Pilbauerová N. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción dental convencional de terceros molares, primeros premolares por motivo de ortodoncia, dientes inmaduros sin raíces completamente desarrolladas. 2. Desinfección: Lavado con soluciones bactericidas como clorhexidina. 3. Transporte: En solución salina tamponada con fosfato estéril a una temperatura de 4°C. 4. Obtención de tejido pulpar: Se realiza un acceso a la cámara pulpar separando la corona de las raíces del diente, si no se encuentra desarrollada la raíz se obtiene el tejido pulpar a través del ápice abierto. 5. Procesamiento celular: Método de digestión enzimática y método explante. 6. Medio de cultivo: Se busca eliminación de suero bovino, pero no se indica un reemplazo. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: Con agente crioprotector DMSO - congelación a tasa controlada - congelación a tasa no controlada - congelación rápida (vitricación no recomendada) - congelación magnética, temperaturas de congelamiento óptimas -85°C a -196°C. 9. Descongelamiento: Baño de agua a 37°C - aplicación de calor seco a temperaturas de descongelación (0, 20 y 37 °C durante 20 min).

<p>Perelló C. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: No aplica. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: No aplica. 5. Procesamiento celular: Método enzimático y método explante. 6. Medio de cultivo: El suero más utilizado fue el suero bovino fetal (FBS), seguido del suero bovino fetal (FCS), el suero humano y el FCS en asociación con FBS. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
<p>Boon Chin H. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: No aplica. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: No aplica. 5. Procesamiento celular: No aplica. 6. Medio de cultivo: poli-L-ornitina con laminina, colágeno tipo IV, colágeno tipo I poli-D - lisina, poli-L- lisina, quitosano, e hidroxapatita (elección de estos sustratos para la inducción neural). Se propone la eliminación de suero animal. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.

<p>Ducret M. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Se propone el uso de terceros molares impactados con un estadío de Nolla 5 de manera atraumática. 2. Desinfección: No se aplica debido a extracción atraumática. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: No aplica. 5. Procesamiento celular: Método enzimático y método de explante. 6. Medio de cultivo: Se recomienda el uso de materiales libres de xeno y reactivos para prevenir el riesgo de contaminación de virus. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
<p>Shagufta N. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción de terceros molares sanos y premolares con indicación de ortodoncia sanos bajo anestesia local. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: Uso de instrumental rotatorio con abundante irrigación para corte alrededor de unión cemento-esmalte, se extirpó la pulpa a través de limas de endodoncia. 5. Procesamiento celular: Método explante. 6. Medio de cultivo: Medio esencial modificado por Dulbecco F12 (DMEM-F12) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 20 % y penicilina

	<p>500U/ml, estreptomicina 500 µg/ml, anfotericina B 1,25 µg/ mL).</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. Evaluación de viabilidad: Método de conteo celular a través de tinciones azul tripán, previamente tratadas con tripsina. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
<p>Guirado E. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Terceros molares de adultos. 2. Desinfección: Uso de povidona yodada. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: Fisura dental a través de fresas estériles. 5. Procesamiento celular: Método enzimático. 6. Medio de cultivo: Suero fetal bovino definido (HyClone), Medio Eagle modificado por Dulbecco: 4 g/L de D-glucosa, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, rojo de fenol, antibiótico - antimicótico 100x: 10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de Gibco Anfotericina B. 7. Evaluación de viabilidad: Fluorescencia con GFP y observación en microscopio (cualitativo). 8. Criopreservación: Se utiliza un recipiente de congelación para congelar células a una velocidad de -1 °C/minuto en el congelador de -80 °C. Después de 24 horas, las células se pueden transferir a un tanque de nitrógeno líquido. 9. Descongelamiento: Baño de agua a 37°C.

<p>Karamzadeh R. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Terceros molares humanos de adultos sin lesiones ni alteraciones de erupción. 2. Desinfección: Las superficies de los dientes se limpiaron con etanol al 70%. 3. Transporte: Los dientes se colocaron en el medio básico (α-MEM complementado con FBS al 10%) y se transfirieron al laboratorio a 4 °C. 4. Obtención de tejido pulpar: Corte dental con disco estéril para exponer cámara pulpar, separando corona de raíz sacando tejido pulpar y cortándolo en trozos. 5. Procesamiento celular: Método enzimático y método explante. 6. Medio de cultivo: Modificación alfa del medio de Eagle (α-MEM) suplementado con FBS al 10 % y 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina. 7. Evaluación de viabilidad: Inmunofenotipificación con marcadores de células madre mesenquimales, marcadores de superficie. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
<p>Pisciolaro R. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción diente tercer molar impactado - germen de tercer molar. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: Las muestras se colocaron inmediatamente en solución salina balanceada de Hank (HBSS; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EE. UU.) a 37 °C y se transportaron al laboratorio.

	<ol style="list-style-type: none"> 4. Obtención de tejido pulpar: Extracción de pulpa se pesó y se partió en trozos. 5. Procesamiento celular: Método enzimático. 6. Medio de cultivo: Suero humano del mismo paciente al que pertenece el diente. (extracción sanguínea previa a la extracción), 50% (DMEM; Gibco BRL) que contenía un 10% de suero humano autólogo (AuHS) del donante de germen dental. 7. Evaluación de viabilidad: Citometría de flujo. 8. Criopreservación: No aplica. 9. Descongelamiento: No aplica.
Muñiz M. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: No aplica. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: No aplica. 4. Obtención de tejido pulpar: No se saca del diente. 5. Procesamiento celular: No aplica. 6. Medio de cultivo: No aplica. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: Técnica de congelación rápida (-80°C) / técnica de congelación en máquina de campos magnéticos (todas con agente crioprotector DMSO en concentraciones entre 3 y 20%) en dientes completos. 9. Descongelamiento: No aplica.
Young-Jin H. et al.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Extracción de terceros molares. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: No aplica.

	<ol style="list-style-type: none"> 4. Obtención de tejido pulpar: Separación de la cámara pulpar con bisturí estéril. 5. Procesamiento celular: Técnica enzimática, técnica explante, pulpa completa dentro del diente sin procesamiento. 6. Medio de cultivo: Medio de Eagle modificado por Dulbecco avanzado (α-DMEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS). 7. Evaluación de viabilidad: Microscopía fluorescente. 8. Criopreservación: Enfriamiento a velocidad controlada, y posteriormente fueron introducidos en nitrógeno líquido. 9. Descongelamiento: Baño de agua caliente a 37°C.
Zeitlin B.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Se sugiere extracción por un profesional. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: Se conservan en un medio de transporte (soluciones salidas balanceadas) como PBS o HBSS con nutrientes definidos y consistentes para ser llevados al banco dental. 4. Obtención de tejido pulpar: No aplica. 5. Procesamiento celular: Método enzimático y método explante. 6. Medio de cultivo: No aplica. 7. Evaluación de viabilidad: Citometría de flujo, marcadores específicos de células madre. 8. Criopreservación: Almacenamiento en nitrógeno líquido -195°C/-320.5F con previa crioconservación gradual a -1°C por minuto (previa aplicación de

	<p>factores de crecimiento y crioprotector DMSO). También se utilizó aplicación de campos magnéticos.</p> <p>9. Descongelamiento: No aplica.</p>
<p>Beatriz A. et al.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención dental: Premolares, terceros molares, dientes supernumerarios, permanentes y temporales. 2. Desinfección: No aplica. 3. Transporte: Almacenamiento del diente a 4°C en solución salina tamponada con fosfato (PBS). 4. Obtención de tejido pulpar: No aplica. 5. Procesamiento celular: Digestión enzimática y método de explante. 6. Medio de cultivo: Medio esencial mínimo alfa (α-MEM), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio nutritivo DMEM/Ham's F12 (F12) (DMEM/ F12), medio bajo en glucosa DMEM (DMEM-LG) y medio DMEM Knock Out (DMEM-KO). En cuanto a la comparación entre los medios basales se demostró que α-MEM y DMEM-KO fueron los medios de cultivo óptimos. Se busca el reemplazo de suero bovino por suero humano. 7. Evaluación de viabilidad: No aplica. 8. Criopreservación: Método tradicional (refrigeración controlada) y de congelación magnética también llamada Cell Alive System (CAS). 9. Descongelamiento: No aplica.

DISCUSIÓN

Dentro de los criterios de inclusión mencionados en los artículos para la selección de los dientes, ya sean definitivos o temporales, se menciona que estos deben ser dientes sin lesiones de caries profundas que hayan provocado reacciones a la pulpa (16, 17, 27), ya que disminuyen el potencial de diferenciación de las células al aumentar la expresión de citocinas proinflamatorias y la respuesta inmune innata, como menciona en su estudio I Tsai et al. Sin embargo, existen otros estudios que indican que los dientes con caries sí pueden ser utilizados, como menciona Zeitlin B. en su estudio, ya que no existiría una diferencia significativa en la diferenciación celular entre los dientes que tuvieron lesión y los que no.

También se menciona que en dientes que presentaban pulpitis las células expresaron un tiempo de duplicación más largo que aquellas sin pulpitis, lo que estaba relacionado además, con la gravedad de la lesión de caries en el diente (36). No obstante, esto es refutado por autores como Pereira o Malekfar (37, 38), que en sus investigaciones hablan de que en relación a la proliferación celular y la morfología de estas, al hacer una comparación entre células madre de pulpa dental sana y pulpa con pulpitis irreversible no hay diferencias significativas, pero sí existe una diferencia respecto al aislamiento de las células, donde en una pulpa normal se encuentra un éxito del 100%, mientras que en pulpas con pulpitis irreversible de dientes extraídos era de un 70%, y de muestras obtenidas de pulpectomías se alcanzaba un éxito de solo un 50%. Aun así, es posible realizar investigaciones, por lo que no deberían descartarse estos dientes si no es posible obtener otras muestras (38).

Con relación a SHED, autores como Cea-Sanhueza et al., mencionan que idealmente deben ser dientes que ya estén exfoliados, mientras que otros autores prefieren realizar extracciones a dientes que estén cercanos a exfoliarse, como indica Shagufta et al., o Martínez et al., esto puede deberse a las diferentes opiniones respecto al estado de la reabsorción radicular de estos dientes. En los mencionados inicialmente, indican que es ideal que los dientes estén con la mayor reabsorción radicular posible para evitar traumas a la pulpa, ya que las células madre se encuentran en su mayoría en la cámara pulpar de la corona, por lo que no existiría una pérdida de células madre

que fuera perjudicial (7, 28); mientras que los otros autores mencionan que la reabsorción radicular no debe ser mayor a $\frac{1}{3}$ de la longitud original de la raíz, ya que las células pierden capacidad de diferenciación (5, 31).

También se menciona en relación a estas muestras que sería necesario separar la pulpa del diente, y en algunos artículos, como indica I Tsai et al., se menciona que para obtener el tejido pulpar es necesario fracturar el diente bajo ciertos estándares como lo son el utilizar material estéril, utilizar abundante agua para evitar traumas a la pulpa, e idealmente hacerlo en espacios adecuados para esto y no en zonas donde pueda existir una posible contaminación de la muestra; en otros estudios se menciona que para extraer la pulpa no es necesario perforar ni fracturar debido a que el foramen apical suele ser de un diámetro mayor a 2 mm, considerando que este autor indica que idealmente las raíces de estos dientes deben tener reabsorción, por lo que se puede extraer el tejido pulpar fácilmente utilizando limas endodónticas o sondas. Además se indica que, al exponer el diente a fracturas, se genera trauma en el tejido pulpar, lo que podría perjudicar la cantidad y calidad de las células madre que se puedan extraer. Sin embargo, existe evidencia, de que no es necesario separar por completo el tejido pulpar del diente, según plantea Cea-Sanhueza et al., ya que a través de los microtúbulos dentinarios es posible aplicar el criopreservante, lo que expondría menos al tejido pulpar al trauma que podría generar su manipulación, pero existe la idea contraria según el estudio de Pilbaurová et al., donde se expone que, si bien esta consiste en una técnica de menor costo y posee una menor probabilidad de contaminación debido a que los procedimientos de laboratorio solo se realizan al momento de requerir las células madre y no antes, esta técnica podría generar una baja tasa de proliferación celular. Esto, debido a que el agente criopreservante no logra penetrar hasta el centro de la pulpa dental, por lo que la protección del CPA sería insuficiente en contra de la formación de cristales de hielo que se producen al momento de la congelación de la muestra, provocando daño celular irreversible.

Con relación a DPSC, para la obtención de las muestras los autores indican que idealmente se deben utilizar terceros molares, en algunos autores mencionan que el estado de Nolla de los dientes no debe ser mayor a 5 (31), en cambio Pisciolaro et al.

en su estudio indica que debe ser incluso menor, idealmente el germen debe estar en un estado de nolla 2. Otros autores dicen que pueden utilizarse terceros molares que tengan un desarrollo radicular hasta Nolla 8 (30, 34). Esto puede deberse, tanto a la capacidad del operador de manejar muestras extraídas de dientes con distintos estados de Nolla, como el instrumental necesario para extraerlas.

Al realizar la desinfección de las muestras, el método más utilizado para hacerlo es el suero fisiológico o una solución buffer. Si bien se mencionan otros métodos como lo hacen Suárez et al. y Karamzadeh et al., que indica desinfección de los dientes con etanol, o Guirado et al. que mencionan el uso de povidona yodada; otros autores indican que estos métodos no serían los más recomendados debido a que al utilizar este tipo de soluciones se corre el riesgo de afectar la integridad celular (16, 17, 30, 42).

Para el almacenamiento de las muestras se menciona en múltiples estudios que como medio de cultivo es recomendable el suero fetal bovino (7, 15, 19), mientras que otros mencionan que utilizar este suero trae más desventajas que beneficios. Según Perelló C. et al., el suero de origen animal puede presentar desventajas tales como reacciones inmunológicas desfavorables, ya que las células madre estudiadas in vitro expresan el xenoantígeno del ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) que normalmente no es sintetizado por las células madre, por consiguiente, al encontrarse este compuesto en el medio de cultivo, estas células lo adquieren a través del medio de cultivo de origen animal. Esto puede suponer un problema al momento de cambiar el medio de cultivo a un suero humano, ya que este presenta anticuerpos naturales, estos al unirse podrían desencadenar una respuesta inmune por mecanismos de citotoxicidad mediada por células autoinmunes del suero humano generando fagocitosis de las células madre mesenquimales cultivadas en suero animal; influyendo directamente en la supervivencia y eficacia de células trasplantadas en pacientes para posibles futuras aplicaciones clínicas.

En cuanto al procesamiento de muestras existen diferentes técnicas que se pueden emplear, por lo que hay opiniones divididas al momento de la utilización de alguna de ellas. Dentro de las diferentes técnicas todas difieren en cuanto al costo de la operación

(dependiendo de la maquinaria necesaria para su realización), dificultad de la técnica a utilizar, tiempo empleado, y efectividad. Es por esto, que existen técnicas que son más utilizadas dentro del proceso de cultivo de células, dentro de ellas se encuentra la técnica de digestión enzimática, la que consiste en el uso de enzimas específicas (pudiendo ser colagenasa, dispasa, tripsina, termolisina y ADNasa), y de esta manera obtener una suspensión celular. Sin embargo, este es un procedimiento delicado que depende del operador; si este proceso no se realiza de la manera correcta puede causar daño e inducir a la muerte celular (15), por lo tanto para utilizarla debe realizarse una estandarización entre los operadores. En cuanto a costo, la técnica de explante resulta ser más rentable que la técnica enzimática, pero esta no es muy utilizada debido al tiempo que emplea realizar esta metodología (1 a 2 semanas en migración celular desde el tejido hacia el medio de cultivo en comparación de 24 a 48 horas que demora la técnica enzimática) (34). Además, en la técnica de explante se tienen dudas con respecto al tamaño adecuado de los explantes para generar un cultivo eficiente, debido a que el tamaño de los fragmentos no se encuentra estandarizado (15). Dentro de la literatura se menciona que los fragmentos deben ser pequeños, y muy pocos autores especifican el tamaño exacto de los explantes que utilizaron. Es necesario destacar que, si bien el explante debe ser pequeño, este no debe ser excesivamente pequeño ya que puede influir directamente en la fijación de las células al fondo de la placa de cultivo, afectando el crecimiento celular; y si el explante es demasiado grande podría comprometer la difusión de metabolitos y nutrientes que deben absorber desde el medio de cultivo (15).

Otro paso importante dentro de un protocolo de almacenamiento de células madre es la criopreservación. Existen diferentes métodos y cada uno de ellos tiene sus beneficios y limitaciones. El método de criopreservación más utilizado es el que se produce a tasa controlada, se indica que va disminuyendo la temperatura paulatinamente hasta llegar a -80°C para posteriormente realizar el almacenamiento de la muestra en nitrógeno líquido, y finalmente congelarlas a una temperatura de -195°C para su mantención a largo plazo (34). Existen opiniones divididas con respecto al uso de la tasa de congelación rápida, que es también un método de crioconservación. A diferencia del anterior este se realiza congelando directamente las

muestras a -80°C o directamente en nitrógeno líquido, pero según Huynh et al., el protocolo de congelación a tasa controlada daría como resultado mayor número de células viables. Sin embargo, en el estudio de Naaldijk et al., observaron que el protocolo de congelación rápida no es menos efectivo que el de congelación controlada a pesar de que en diferentes referencias se explica que durante una congelación muy acelerada no hay tiempo para que el agua salga del interior de la célula por lo que rápidamente se forman cristales de hielo intracelulares causando daños mecánicos y estructurales a las células (28). Si bien los métodos anteriores son protocolos con congelaciones controladas, existen los mismos riesgos cuando se enfrían las células lentamente ya que se produce la formación de cristales de hielo extracelular, lo que provoca una salida osmótica de agua de la célula, esto produce un aumento de soluto intracelular produciendo toxicidad y generando daño osmótico (28). Debido a esto las técnicas van a depender, además, de un agente crioprotector para evitar la formación de estos cristales.

En relación al descongelamiento de muestras, se suele realizar con diferentes técnicas que han sido mencionadas anteriormente, donde se incluyen la aplicación de agua a 37°C subiendo gradualmente la temperatura, y la aplicación de calor seco. Se menciona que la mejor técnica es la de aplicación de calor seco, ya que se puede controlar de mejor manera el agua en las células. Pero, si esta no se usa correctamente, puede llevar a una lisis celular, sin embargo el método de aplicación de calor seco requiere de maquinaria específica (baños secos), los que pueden ser digitales y logran controlar parámetros de temperatura y tiempo de manera mecánica y estandarizada, el uso de esta técnica podría representar un aumento de costos durante el procedimiento a diferencia del baño de agua a 37°C .

En cuanto a las limitaciones de este estudio se incluye que, al hacer la búsqueda se encontró escasa literatura respecto a protocolos clínicos para obtención de células madre de la pulpa dental, por ello se realizó una ampliación de filtro de años de antigüedad en la búsqueda. Inicialmente se hizo una búsqueda limitada a 5 años de antigüedad, pero finalmente el límite de tiempo de la búsqueda fue de 10 años. Considerando que el fin de esta investigación es crear un protocolo para el estudio del

TEA, se buscó literatura que avalara la importancia de realizar esto, como el estudio de Griesi-Oliveira et al. (6), donde a partir de células madre SHED se descubrieron genes involucrados en el TEA, y además se indica que no existe mayor diferencia en el manejo de muestras de pacientes con TEA y pacientes sin esta condición.

Además, al no existir estandarización de protocolos para este tipo de estudios, los artículos incluían información incompleta respecto al manejo de las muestras, y en consecuencia, no estaba correctamente detallado el proceso. Por esto se incluyeron artículos que describen el proceso de manera parcial para lograr complementar la información recolectada.

En las fortalezas de esta investigación se puede destacar que la búsqueda y selección de los estudios realizada fue sistemática, incluyendo los estudios más recientes con respecto al tema abordado permitiendo la elaboración del protocolo en sus diferentes etapas, considerando que durante el último tiempo se han realizado más investigaciones y experimentos con las células madre, por lo que se está generando un mayor avance respecto al uso de ellas, tanto para usarlas a modo investigativo como terapéutico.

Se recomienda que se realicen investigaciones con el proceso completo del manejo de muestras de las células madre que sean específicas para pacientes con TEA, y de esta manera aportar en el conocimiento que existe respecto a este, para así colaborar en la creación de diversas técnicas para lograr diagnósticos tempranos. Por esto mismo, se propone un protocolo de obtención y almacenamiento de las muestras obtenidas de pacientes, que se sugiere poner a prueba en la facultad para evaluar así su eficacia y continuar con futuras investigaciones.

El protocolo generado a partir de este documento aborda hasta el congelamiento de muestras, debido a que el descongelamiento de estas células dependerá de la realidad de cada establecimiento, maquinaria disponible, así como también la aplicación clínica que se desee dar a las células madre previamente congeladas, dentro de esta investigación se sugieren algunos métodos, pero la aplicación de estos dependerá finalmente del investigador.

CONCLUSIONES

El TEA es una condición del neurodesarrollo que, si bien genera ciertas diferencias en algunas áreas como la intelectual y social, esta no debe ser vista como una enfermedad. Es necesario que sea diagnosticada para lograr ayudar a las personas a conocer sus propias características y brindarles el apoyo necesario para poder desarrollarse durante sus vidas. Para lograr ser diagnosticada correctamente y a tiempo, es necesario seguir investigando las causas de este, y conocer los genes involucrados en el TEA es crucial para esto, por lo que trabajar con muestras que son de fácil acceso como lo son las muestras de pulpa dental es un avance y apoyo importante en la investigación.

Dentro de las diferencias que existen entre el manejo de muestras SHED y DPSC, se menciona la obtención de estas; dentro de las SHED lo más importante es que sean dientes sanos, con reabsorción radicular y, en caso de que el diente ya haya sido exfoliado, mantenerlo en una solución isotónica para evitar la deshidratación y así poder llevarlo para su correcto estudio. Para la obtención de muestras DPSC es necesaria la extracción dental por parte de un profesional capacitado para esto, se mencionan de preferencia dientes sanos con indicación de extracción por ortodoncia (premolares y terceros molares), idealmente con desarrollo radicular incompleto, existiendo el mismo manejo post extracción que existe con los dientes temporales.

El procesamiento de las células puede ser tanto con el método del explante como con la técnica de digestión enzimática. Esto depende de las maquinarias disponibles y la experticia del operador, considerando que no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de las colonias celulares luego de utilizar un método u otro.

El medio de cultivo utilizado generalmente es el suero fetal bovino, este tiene múltiples beneficios para la nutrición celular, pero también limita las posibles investigaciones en seres humanos al tratar de hacer terapias con estas muestras debido al rechazo que generan diferentes componentes de este suero en el cuerpo humano. Por ello, es un suero que es altamente recomendado netamente para la investigación, pero en caso de querer investigar posibles tratamientos y terapias en seres humanos, es necesario

cambiar este suero por el suero humano proveniente idealmente de la misma persona a la que se le realiza la extracción del diente.

En relación a la criopreservación, es importante destacar que esta debe ser lo más controlada posible, para así evitar la formación de cristales en conjunto con la utilización del criopreservante destinado a ello. En cambio, el descongelamiento de las muestras previamente criopreservadas debe ser más rápido, mediante el uso de calor seco para así evitar una lisis celular, también puede ser utilizada la aplicación de agua a 37°C, pero esta debe ser manejada por alguien capacitado para hacerlo para evitar un daño en las células, sin embargo, la utilización de una técnica u otra dependerá de la futura aplicación que el investigador desee realizar a las células.

El tener un protocolo establecido para la obtención y almacenamiento de estas muestras permitirá darles uso a las muestras que anteriormente eran desechadas, permitiendo de esta manera contribuir a la investigación del TEA y así lograr conocer la etiología de este cada vez mejor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mata-Miranda M., Vázquez-Zapién G. J., Sánchez-Monroy V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*. 2013; 27(3): 194-199
2. Martín Vidal, E. Células de la pulpa dental como fuente de mini-cerebros in a" dish". 2019.
3. Flores-Figueroa E., Montesinos J., Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de investigación clínica*. 2006; 58(5), 498-511.
4. Heng B. C., Lim L. W., Wu W., Zhang, C. An overview of protocols for the neural induction of dental and oral stem cells in vitro. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2016; 22(3), 220-250.
5. Pisciolaro R. L., Duailibi M. T., Novo N. F., Juliano Y., Pallos D., et al. Tooth Tissue Engineering: The Importance of Blood Products as a Supplement in Tissue Culture Medium for Human Pulp Dental Stem Cells. *Tissue engineering. Part A*. 2015; 21(21-22), 2639–2648.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0617>
6. Griesi-Oliveira K., Fogo M.S., Pinto B.G.G. et al. Transcriptome of iPSC-derived neuronal cells reveals a module of co-expressed genes consistently associated with autism spectrum disorder. 2021; *Mol Psychiatry* 26, 1589–1605.
<https://doi.org/10.1038/s41380-020-0669-9>
7. Cea-Sanhueza M., Sánchez-Sanhueza G.. Células madre mesenquimales orales: estado del arte en Odontología. *Av Odontoestomatol*. 2016; 32(2): 97-105.
8. Autismo. [Internet] Who.int. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
9. Superintendencia de salud. Elaboración y gestión de documentos para el proceso de acreditación en salud: Recomendaciones para prestadores institucionales. Valdéz J., Jiménez L., Álvarez M. E. 2013.
10. Cámara de Diputados. Chile. Modifica el Código Sanitario en el sentido de establecer un marco legal para fomentar la investigación científica en materia

de células madre y terapia celular. Valparaíso. 2017. Disponible en <https://www.camara.cl/verDoc.aspx?prmTipo=SIAL&prmID=33984&formato=pdf>

11. Lampert-Grassi, M. P. Trastorno del Espectro Autista. Epidemiología, aspectos psicosociales, y políticas de apoyo en Chile, España y Reino Unido. Biblioteca Nacional del Congreso de Chile/Asesoría técnica parlamentaria. 2018; 11.
12. Ruggieri V. Autismo, depresión y riesgo de suicidio. Medicina (B. Aires). 2020; 80: 12-16.
13. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Autism: Recognition, Referral and Diagnosis of Children and Young People on the Autism Spectrum. 2011
14. Yañez C., Maira P., Elgueta C., Crito M., Crockett M. A. et al. Prevalence estimation of Autism Spectrum disorders in Chilean urban population. Andes pediátrica: Revista chilena de pediatría. 2021; 92(4): 519-525.
15. Ferrúa C. P., Centeno E., Rosa L., Amaral C., Severo R. F., et al. How has dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review. Brazilian oral research. 2017; 31, e87. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0087>
16. Guirado E., Zhang Y., George, A. Establishment of Stable Cell Lines from Primary Human Dental Pulp Stem Cells. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2019; 1922, 21–27. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_3
17. Karamzadeh R., Eslaminejad M. B., Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. Journal of visualized experiments: JoVE. 2019; (69), 4372. <https://doi.org/10.3791/4372>
18. García-Torres, L. V., Flores-Hernández, F. Y., Santibáñez-Escobar, L. P. Células madre de la pulpa dental (DPSC): perspectivas terapéuticas en enfermedades crónicas degenerativas. Salud Jalisco. 2018; 4(3), 168-177.
19. Saez D. M., Sasaki R. T., da Costa Neves A., da Silva M. C. P. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth: a growing literature. Cells Tissues Organs. 2016; 202(5-6), 269-280.

20. Ocampo, Á. M., Sánchez, J. D., Martínez, C., Moreno, F. Correlación de diez rasgos morfológicos dentales coronales entre molares deciduos y permanentes en tres grupos étnicos colombianos. 2009.
21. Castillo D. Astudillo E. Pulpa dental. Universidad de Cuenca, Facultad de Odontología; 2015
22. Terreros C, M., Huanca L, W., Arriaga C, I., Ampuero B, A. Effect of three cryoprotectants on the cryopreservation of epididymal alpaca spermatozoa. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*. 2015; 26(3), 420-426.
23. Gotta S. L., Carpignano R., Ugartemendia L., Asta D., Blasco F. C. Obtención y caracterización de células madre mesenquimales adultas de la pulpa dental humana. *Rev. Fac. Odontol. (B. Aires)*. 2021; 67-74.
24. Francia A., Grazioli G., Echarte L., Maglia Á., Touriño C., et al. Establecimiento e implementación de un protocolo simplificado de expansión y cultivo de Células Madre de Pulpa Dental Humana (DPSC_h). *Odontoestomatología*. 2021. <http://dx.doi.org/10.22592/ode2021n37e207>.
25. Collart-Dutilleul, P. Y., Chaubron, F., De Vos, J., Cuisinier, F. J. Allogenic banking of dental pulp stem cells for innovative therapeutics. *World journal of stem cells*. 2015; 7(7): 1010–1021. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i7.1010>
26. Brizuela C., Galleguillos G., Carrión A., Cabrera P., Luz C., et al. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *Int. J. Morphol.* 2013. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200063>.
27. Naz S., Khan F. R., Zohra R. R., Lakhundi S. S., Khan M. S., et al. Isolation and culture of dental pulp stem cells from permanent and deciduous teeth. *Pakistan journal of medical sciences*. 2019; 35(4), 997–1002. <https://doi.org/10.12669/pjms.35.4.540>
28. Pilbauerová N., Suchánek J. Cryopreservation of Dental Stem Cells. *Acta médica (Hradec Kralove)*. 2018; 61(1), 1–7. <https://doi.org/10.14712/18059694.2018.16>

29. Berca, C. Criopreservación de células madre neurales embrionarias (CMNEs) mediante la metodología de enfriamiento lento [tesis de pregrado]. Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas; 2018
30. Suárez C., Merentes E., Márquez M., González O. Aislamiento y caracterización de las células madre mesenquimales de la pulpa dentaria humana. *Acta odontol. venez.* 2013.
31. Ducret M., Fabre H., Degoul O., Atzeni G., McGuckin C., et al. Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: current strategies and future investigations. *Frontiers in Physiology.* 2015; 6, 213.
32. Conde M. C., Chisini L. A., Grazioli G., Francia A., Carvalho R. V., et al. Does Cryopreservation Affect the Biological Properties of Stem Cells from Dental Tissues? A Systematic Review. *Brazilian dental journal.* 2016; 27(6), 633–640. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600980>
33. Han Y. J., Kang Y. H., Shivakumar S. B., Bharti D., So, Y. B., et al. Stem Cells from Cryopreserved Human Dental Pulp Tissues Sequentially Differentiate into Definitive Endoderm and Hepatocyte-Like Cells in vitro. *International journal of medical sciences.* 2017; 14(13), 1418–1429. <https://doi.org/10.7150/ijms.22152>
34. Zeitlin B. D. Banking on teeth - Stem cells and the dental office. *Biomedical journal.* 2020; 43(2), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.02.003>
35. Rodas-Junco B. A., Villicaña C. Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. *Tissue engineering and regenerative medicine.* 2017; 14(4), 333–347. <https://doi.org/10.1007/s13770-017-0036-3>
36. Tsai A. I., Hong H. H., Lin W. R., Fu J. F., Chang C. C., et al. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp. *BioMed research international.* 2017; 2851906. <https://doi.org/10.1155/2017/2851906>
37. Pereira L. O., Rubini M. R., Silva J. R., Oliveira D. M., Silva I. C. R., et al. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *International endodontic journal.* 2012; 45(12), 1080-1090.
38. Malekfar A., Valli K. S., Kanafi M. M., Bhonde R. R. Isolation and characterization of human dental pulp stem cells from cryopreserved pulp

- tissues obtained from teeth with irreversible pulpitis. *Journal of Endodontics*. 2016; 42(1), 76-81.
39. Huynh NC-N, Le SH, Doan VN, Ngo LTQ, Tran HLB. Condiciones simplificadas para el almacenamiento y crioconservación de células madre de pulpa dental. *Archivos de Biología Oral*. 2013; 84: 74–81
40. Stolzing A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation - Mecanismos, beneficios y problemas - revisión. *Ciencia de transfusión y aféresis*. 2012; 46: 137–47
41. Zeidan J, Fombonne E., Scolah J., Ibrahim A., Durkin M. S. et al. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research*, 2022.
42. Martín Piedra, M. Á., Garzón Bello, I. J., Sánchez-Quevedo, M. C., Alaminos Mingorance, M. Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana. 2012.

ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado

Anexo 2: Protocolo de obtención y almacenamiento