



## LIOFILIZACION Y ESTERILIZACIÓN DE LA DENTINA DE DIENTES HUMANOS

Díaz D, Fontalvo M, Gómez Y, Latorre L, Martínez H, Ramos J, Rodríguez D.\*

Alarcón M.\*\*  
Sánchez F.\*\*\*

### RESUMEN

Debido a que la dentina ocupa la mayor parte del diente y a que es un tejido compatible con el complejo dentino pulpar y forma parte de él, se pensó en la necesidad de utilizarla para realizarle el mismo procedimiento que se le realiza al hueso liofilizado de banco y más adelante utilizarla como material alternativo en recubrimientos pulpares directos. Por lo anterior, en el presente trabajo de investigación se propuso realizar un protocolo para pulverizar, liofilizar la dentina de dientes humanos, identificar la presencia de ADN y posteriormente esterilizarla con rayos gamma. Para llevar adelante este propósito se recogieron 16 dientes, de ocho pacientes sistémicamente sanos de acuerdo con la anamnesis realizada a los pacientes y consignada en la historia clínica. A los pacientes se les iba a realizar exodoncia indicada por ser dientes incluidos o que se requerían por tratamiento de ortodoncia. Se realizó la exodoncia por método abierto o método cerrado. Los dientes obtenidos fueron distribuidos de la siguiente forma: Dos caninos superiores, seis premolares superiores (cuatro primeros premolares y dos segundos premolares derechos), un molar superior derecho, un molar inferior izquierdo, y seis premolares inferiores (cuatro primeros premolares y dos segundos premolares derechos). Se procedió a realizar un protocolo para pulverizar la dentina, liofilizarla, identificar la presencia de ADN, promediar el tamaño de las partículas de la dentina pulverizada con microscopio electrónico de barrido y posteriormente a esterilizarla con rayos gamma con Cobalto 60 a una dosis de 24.78 kilograys. Para de esta manera, obtener 5.82818 gramos de dentina liofilizada y esterilizada. **Palabras Claves:** Dentina, pulverización, liofilización, sublimación, ADN, esterilización, rayos gamma.

### ABSTRACT

Because the dentine occupies most of the tooth and to that is a compatible weave with the dentin complex to pulpar and comprises of him, thought about the necessity to use it to make the same procedure to him that is made to him to the lyophilized bone of bank and more a head to use it like alternative material in direct coverings pulp. By the previous thing, in the present work of investigation one seted out to make a protocol to pulverize, to lyophilize the dentine of human teeth, to identify the DNA presence and later to sterilize it with gamma rays. In order to take ahead this intention 16 teeth took shelter, of eight systémicament healthy patients in agreement with the anamnesis made to the patients and briefed in clinical history. To the patients one was going away to them to make extraction indicated being teeth including or that were required by orthodontic treatment. The extraction by open method or closed method was made. The obtained teeth were distributed of the following form: Two canine superior, six premolars superior (four first premolars and two seconds premolars right), molar straight superior, molar inferior left, and six premolars inferior (four first premolars and two seconds premolars right). It was come to make a protocol to pulverize the dentine, to lyophilize it to identify the DNA presence, to divide equally the size of particles of the dentine pulverized with electron microscope of sweeping and later to sterilize it with gamma rays with Cobalt 60 to a 24,78 dose of kilograys. For this way, to obtain 5,82818 grams of lyophilized and sterilized dentine. **Key words:** Dentine, pulverization, lyophilization, subliming, DNA, sterilization, gamma rays.

## INTRODUCCIÓN

Llamada sustancia ebúrnea o marfil, es el eje estructural del diente y constituye el tejido más abundante de este, en su parte coronal esta recubierta por esmalte, y en la raíz por cemento. Las células formadoras de la dentina son los odontoblastos los cuales se localizan en la periferia de la pulpa dental y las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos se alojan dentro de los túbulos dentinales. El espesor de la dentina varía según el diente de 1.5 a 3 mm, siendo mayor en caninos y molares y su espesor es mayor hacia incisal y rebordes cúspideos, en zonas

oclusales va disminuyendo de la cúspide hacia el surco. Se encuentra más abundante en diente permanentes adultos que en dientes recién erupcionado Su color característico es blanco amarillento y presenta una gamma de matices entre los diferentes individuos, la translucidez de la dentina es menor que la del esmalte, la dureza de la dentina es menor que la del esmalte y mayor que la del cemento y hueso, mientras que su elasticidad es mayor que la del esmalte y semejante a las del cemento y hueso (Kinney y col. 1999)

\* Estudiantes X Semestre. Colegio Odontológico Colombiano.

\*\* Asesor Científico. Odont. Especialista en Cirugía, Implantología y Patología Oral.

\*\*\* Asesor Metodológico. Odont. Especialista en Educación Universitaria.

Esta es más mineralizada pero muchos elementos la atraviesan con facilidad por la presencia de conductillos dentinales. (Thomas H.F 1985, Abramovich A, 1999, Seltzer y Bender 2002). La **composición química** consta de un 67% de fracción inorgánica, 20% fracción orgánica y 13% de agua. Su **componente inorgánico** esta compuesta por: cristales de hidroxiapatita, similares químicamente a los del esmalte, cemento y hueso. Por su tamaño se diferencian de los grandes cristales del esmalte, ya que los cristales de la dentina son pequeños y delgados, mas parecidos a los que se encuentran en el tejido óseo. Los cristales se orientan en forma paralela a las fibras de colágeno de la matriz dentinaria, disponiéndose entre las fibras y también dentro de las mismas, ya que ocupan los espacios entre las moléculas de colágeno que las forman. Además se encuentra fosfato de calcio amorfo y otras sales minerales como carbonatos, sulfatos e indicios de flúor, cobre, hierro, magnesio, zinc etc.

La **matriz orgánica** esta constituida por varios componentes entre los que se destaca el colágeno tipo I que es sintetizado por el odontoblasto y representa el 90% de dicha matriz. Una vez segregado en la región de la predentina las moléculas del colágeno configuran extracelularmente las fibras. Los colágenos tipo III, IV, V y VI se han descrito en pequeñas proporciones y en diferentes circunstancias. El tipo III se segrega en casos de dentina opalescente y esta ocasionalmente presente en la denominada dentina peritubular; el tipo IV, en los momentos iniciales de la dentinogénesis, cuando existe una membrana basal que separa la dentina no mineralizada de los ameloblastos secretores, finalmente los tipos V y VI se han descrito en las distintas regiones de la predentina. En la matriz orgánica de la dentina se han detectado así mismo, proteínas semejantes a las existentes en la matriz ósea tales como osteonectina, osteopontina y la proteína Gla de la dentina (similar a la osteocalcina) que contienen ácido (y-carboxiglutámico). Además contiene tres proteínas que se localizan en la dentina: son la fosforina dentinaria (DPP) que tras el colágeno es el componente más

abundante de la dentina, la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) y la sialoproteína dentinaria (DSP). Las dos primeras segregadas por los odontoblastos participarían en el proceso de mineralización y la última, segregada por los odontoblastos jóvenes y también por preameloblastos, participarían de algún modo en el proceso de interrelación epitelio-mesénquima, que acompaña al desarrollo de las piezas dentarias. Los proteoglicanos están presentes también en la matriz dentinaria. El condroitín 4-sulfato y condroitín 6-sulfato son los GAG más frecuentes, predominando el segundo de ellos en la predentina. Se han encontrado en mayor proporción los GAG sulfatados en premolares que en molares.

Proteínas del suero, como la albúmina, fosfolípidos y factores de crecimiento posiblemente inmovilizados durante la dentinogénesis se han identificado también en la matriz orgánica de la dentina. (Gómez de Ferraris 2002).

#### **LA LIOFILIZACIÓN .**

La **liofilización** (en inglés "**freeze-drying**"), consiste en introducir el producto a tratar en una cámara, y realizarle vacío rápidamente. Este proceso consiste en desecar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Es por lo tanto el paso directo del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. Se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, mejorando su estabilidad y siendo fácilmente redisuelta en agua. Debido a la disminución de presión, el agua contenida en el material se congela; a continuación se comienza a calentar, manteniendo el vacío, para aumentar la velocidad de sublimación del hielo. Los niveles de vacío y de temperatura de calentamiento varían según el producto a tratar. La deshidratación por congelación es el proceso de extraer el agua u otro solvente de un producto congelado por sublimación. La sublimación ocurre cuando una muestra congelada pasa directamente a la fase gaseosa sin pasar por la fase líquida. Cuando el hielo se sublima, deja huecos o vacíos en el

material residual seco lo que facilita su rehidratación. Gracias a que el material liofilizado se rehidrata tan fácilmente, se dice que es "liofílico", de dos palabras griegas que significan "amante del solvente" El producto deshidratado por congelación se dice que está liofilizado y el proceso se conoce como liofilización. (Navarro Marisell 1998).

#### **Beneficios de la Liofilización:**

El secado convencional hace que el material se encoja o contraiga, dañando las células. Sin embargo, en el proceso de liofilización, los componentes sólidos son retenidos en su lugar por el hielo rígido. La sublimación del hielo deja vacíos, preservando así la integridad de las actividades y estructura biológica y química del producto. Debido a sus cualidades preservantes, la liofilización tiene muchos y variados usos en el laboratorio. Se ha convertido en un medio indispensable en muchas aplicaciones bioquímicas y farmacéuticas.

La liofilización es un proceso que se aplica en tres grandes categorías de productos biológicos:

1. Materiales no vivientes tales como el plasma sanguíneo, suero, soluciones de hormonas, productos farmacéuticos y alimenticios.
2. Transplantes quirúrgicos de especies tales como arterias, piel y huesos.
3. Células vivas destinadas a permanecer en ese estado por largos períodos de tiempo.

Además, la liofilización tiene aplicaciones en el análisis químico donde es muy conveniente tener la muestra en forma seca o donde la concentración de la muestra aumenta la sensibilidad del análisis. La liofilización es ideal en estas instancias porque los componentes de la muestra permanecen estables y no cambian su composición química. ( lañez Enrique 1998, Labconco corporation. 2003 [www.labconco.com/pdf/freezone.pdf](http://www.labconco.com/pdf/freezone.pdf) )

#### **RAYOS GAMMA**

La radiación, es la emisión y propagación de energía a través del espacio o una sustancia, de ondas o partículas.

#### **Radiación Por Partículas**

Este tipo de radiación se define como la propagación de energía en forma de onda (sin masa) a través del espacio o materia. La energía que se propaga esta acompañada por campos eléctricos y magnéticos oscilatorios colocados en ángulos rectos uno en el otro, por esta razón el término de partículas. Las radiaciones por partículas pueden ser provocadas o naturales; ejemplo son los rayos cósmicos, rayos gamma, rayos X, ultravioleta, y microondas Las radiaciones electromagnéticas están ordenadas de acuerdo con sus energías en lo que se denomina un espectro electromagnético.

Todas las energías del espectro comparten características comunes. Según sus niveles de energía, se clasifican como ionizantes y no ionizantes. En el espectro electromagnético solo las radiaciones de alta energía (rayos cósmicos, rayos gamma y rayos X) son capaces de ionización. (Haring - Lind 2000)

La energía promedio necesaria para producir ionización en un elemento depende de su número atómico. Conviene separar los tipos de radiación en cuatro grupos según su interacción con la materia: 1) las partículas pesadas cargadas positivamente, que incluyen partículas alfa, protones e iones pesados energéticos; 2) las partículas ligeras cargadas, como electrones, betas y positrones; 3) las radiaciones por partículas incluyendo rayos X y gamma; 4) los neutrones.

Los rayos X y gamma, al no tener carga, no pueden ser frenados lentamente por ionización al atravesar un material. Sufren otros mecanismos que al final los hacen desaparecer, transfiriendo su energía, pueden atravesar varios centímetros de un sólido, o cientos de metros de aire, sin sufrir ningún proceso ni afectar la materia que cruzan.

La radiación gamma es energía en forma de tal como lo es la luz, las microondas y las ondas de radio.

Estas formas de energía pueden ser controladas y usadas para cubrir importantes necesidades de los seres humanos, y son de hecho utilizadas cotidianamente en un amplio espectro de aplicaciones, tales como

telecomunicaciones, hornos de microondas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Rayos X y G), O para el procesamiento de productos y sustancias que requieren un medio ambiente libre de microorganismos (Rayos Gamma).

El Cobalto 60 es un metal que se caracteriza por emitir energía en forma de rayos llamados Gamma, el cual se obtiene a partir del Cobalto en su estado natural, llamado Cobalto 59 cuando es expuesto a un flujo de alta velocidad de partículas muy pequeñas llamadas neutrones. Estos neutrones son parte constitutiva de los átomos que componen la materia.

### **Guías para la esterilización industrial de productos médicos con Radiación Gamma y Cobalto 60.**

El papel importante de la esterilización por radiación y los bancos de tejidos están recibiendo mayor reconocimiento entre los practicantes médicos. Los esfuerzos ahora se están intensificando para expandir el conocimiento de los beneficios y de las oportunidades para la capacitación en este campo.

Se han abierto en la década pasada bancos de tejidos que apoyan los cuidados médicos y tratamiento de pacientes afectados seriamente. La International Atomic Energy Agency (IAEA), ha sido un catalizador para introducir este importante desarrollo, por el avance de la tecnología de esterilización con radiación de tejidos y la promoción de estándares que permiten especificaciones médicas estrictas. Los beneficios duraderos yacen en las muchas vidas que se han salvado o mejorado, incluyendo víctimas quemadas y pacientes que han requerido trasplantes y cirugía reconstructiva. Entre estos pacientes hay quienes han recibido millones de injertos de tejidos suministrados desde que el programa de la IAEA en radiación y banco de tejidos, comenzó hace 30 años. Una mirada generalmente acompaña la asociación de la IAEA y la tecnología de la radiación con bancos de tejidos. Aun a través de esta vía la ciencia y los canales de cooperación tecnológica, la IAEA está contribuyendo al avance del conocimiento

de la aplicación de la radiación ionizante a tejidos estériles, tales como cartílago, tendones, corneas, válvulas cardíacas, hueso y piel.

En Agosto del 2002 en el tercer congreso mundial realizado en Boston USA, el papel catalizador de la IAEA fue escogido, para que los bancos de tejidos regulen la esterilización con radiación de los injertos. Ahora se está preparando una completa capacitación interactiva para los bancos de tejidos los cuáles se activarán en el 2003. Otras iniciativas en esta área incluyen la preparación de documentos y directrices que incluyen una serie de estándares internacionales para los bancos de tejidos, y un código internacional de práctica para la esterilización con radiación de tejidos biológicos y protocolos que sean de conocimiento público.

### **Tecnología de la radiación.**

Otros métodos de esterilización han usado calor y químicos por un largo periodo de tiempo, pero ninguno es tan preciso como la irradiación. El uso de la radiación permite que el tejido sea esterilizado en su empaque final, lo cual dramáticamente baja los riesgos de la contaminación. Además el calor y los químicos pueden dañar potencialmente la composición biológica de los tejidos, mientras que la irradiación no afecta las propiedades de los tejidos.

### **PROTOCOLO DE UN BANCO DE TEJIDOS**

La Asociación Americana de Bancos de Tejidos y la Asociación Europea de Bancos de Tejidos siguen unas directrices, además de investigar en detalle la historia médica y la examinación clínica de todos los donantes se investiga por: SIDA, Hepatitis B, Hepatitis C, Sífilis, Cultivo de tejidos para organismos aerobios y anaerobios.

### **Procesamiento de los tejidos**

**Irradiación Gamma de Hueso Liofilizado**  
Como una protección adicional de esterilización segura, todos los huesos son irradiados con una dosis de Rayos Gamma de 25 Kilograys y el Instituto de Tecnología Nuclear de Malasia usa cobalto 60 y está en colaboración bajo los auspicios de la IAEA. El requerimiento para la esterilización es que el hueso sea liofilizado. ( Medical Tissue Banks and

Radiation. Technology 2002)

Debido a que la dentina ocupa la mayor parte del diente y a que es un tejido compatible con el complejo dentino pulpar y forma parte de él, se pensó en la necesidad de utilizarla para realizarle el mismo procedimiento que se le realiza al hueso liofilizado de banco y más adelante utilizarla como material alternativo en recubrimientos pulpares directos.

Por lo anterior, en el presente trabajo de investigación se propuso realizar un protocolo para pulverizar, liofilizar la dentina de dientes humanos, identificar la presencia de ADN y posteriormente esterilizarla con rayos gamma.

### MATERIALES Y METODOS

Para llevar adelante este propósito se recogieron dientes, a los cuales se les iba a realizar exodoncia indicada por ser dientes incluidos o que se requerían por tratamiento de ortodoncia. Se realizó la exodoncia por método abierto o método cerrado. (Anexo 1). Los dientes fueron recolectados de cuatro instituciones: Centro Médico San Roque Centro, Centro Médico San Roque Sur, Centro Médico Décima Avenida y el Sindicato de Trabajadores de Icollantas.

De los cuales se obtuvieron 16 dientes, de ocho pacientes sistémicamente sanos de acuerdo con la anamnesis realizada a los pacientes y consignada en la historia clínica. Los dientes obtenidos fueron distribuidos de la siguiente forma: Dos caninos superiores, seis premolares superiores (cuatro primeros premolares y dos segundos premolares derechos), un molar superior derecho, un molar inferior izquierdo, y seis premolares inferiores (cuatro primeros premolares y dos segundos premolares derechos).



FIG. 1. 16 Dientes de la muestra

El motivo de la exodoncia del total de dientes extraídos fue el siguiente:

Por Ortodoncia : 11 dientes.

Por malposición dental: 2 dientes.

Por falta de antagonista: 2 dientes.

Incluido: 1 diente.

Se recolectaron bajo el criterio que todos los dientes debían estar completamente sanos, sin problemas periodontales, vitales al momento de la exodoncia, sin caries, sin fracturas, en su composición estructural, sin importar si estaban erupcionados o no.

Al retirarlos de cavidad oral fueron lavados con agua estéril y luego fueron colocados en una caja de petric de 9 por 9 centímetros de diámetro con formol al 10% y luego fueron almacenados en nevera a 4 grados centígrados, durante un mes mientras se continuaba con el aislamiento y obtención de la dentina.

### RESULTADOS

#### PROTOCOLO PARA PULVERIZAR LA DENTINA

##### PRUEBA PILOTO

Asepsia y antisepsia del área de trabajo.

Con pinzas estériles se tomó un premolar inferior derecho de la caja de petric con formol.

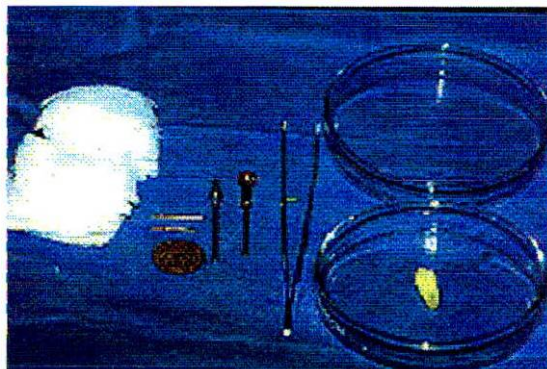


FIG. 2. Canino superior en la caja de petric

Lavado a presión del diente para retirar la solución, con una jeringa desechable de 10mm con agua estéril.

Secado del diente con aire a presión.

Se tomó radiografía periapical del diente previo a la realización de las cavidades estandarizadas para el desgaste del cemento y el esmalte dental.



FIG. 3 Radiografía previa

Con fresa redonda número 2, con 2 milímetros de diámetro se realizaron pequeñas cavidades con un profundidad de 2 milímetros en esmalte y cemento a 5 milímetros de distancia cada una, por todas las caras, mesial, distal, vestibular, palatino o lingual para un total de 5 perforaciones.

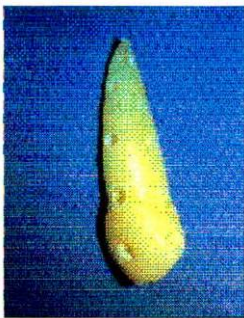


FIG. 4. Canino con las perforaciones

Con una fresa troncocónica de punta plana número 2 montada en una pieza de alta velocidad, se procede a desgastar el esmalte y el cemento hasta el nivel de profundización de las perforaciones realizadas, cerciorándose del retiro de los dos milímetros de esmalte y de cemento en la corona y raíz respectivamente.



FIG. 5 Fresa troncocónica punta plana

Toma de radiografía periapical de control para verificar que se haya retirado el esmalte y cemento totalmente, si hizo falta retirar tejido se vuelve a desgastar hasta cerciorarse del retiro completo del esmalte que tiene mayor espesor en las cúspides.

Lavado con jeringa de 10 mm y agua estéril.

Secado a presión.

Con un disco de seguridad montado en micromotor, se realiza un corte transversal a nivel del cuello del diente dividiendo el diente en dos partes.

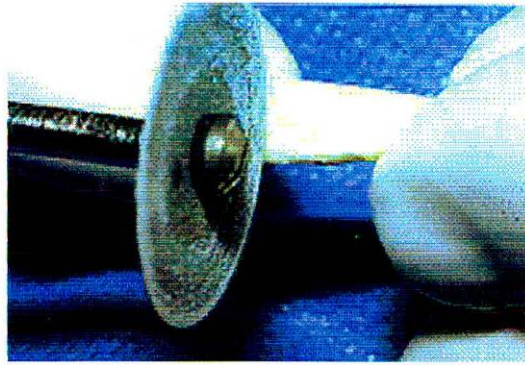


FIG. 6 Disco de seguridad

Con una sonda barbada número 15 se retiraron los restos de pulpa dental para dejar previamente dentina.

Lavado con jeringa de 10mm y agua previamente. Secado a presión.

Se lava los conductos y cuernos pulpares con agua previamente.

Se seca a presión.

Se coloca el diente previamente desgastado en el mortero.

Se coloca la dentina dentro del mortero y se aplica el Nitrógeno líquido que se encuentra a  $-160^{\circ}\text{C}$ .

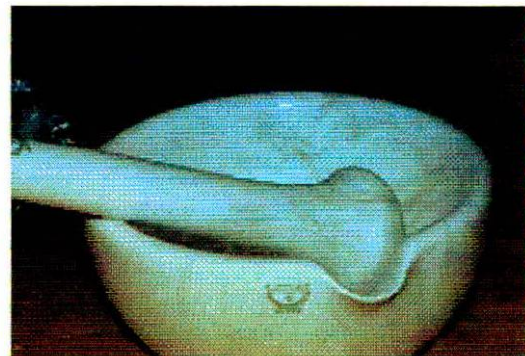


FIG. 7 Mortero cerámico con nitrógeno líquido

Se volatiliza el Nitrógeno líquido quedando la dentina congelada y con el pistilo se empieza a macerar la dentina, dejándola en pequeñas partículas en forma de eppendorff.

Se le aplica eppendorff el Nitrógeno líquido y se vuelve a macerar la dentina hasta dejarlo pulverizada.

La dentina pulverizada se coloca en tubos de eppendorff y se lleva al congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

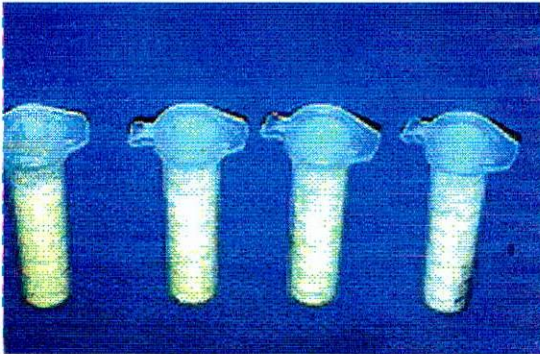


FIG. 8 Tubos de eppendorff

El mortero se lava con detergente, luego se coloca en Decol, agua estéril y una mezcla sulfocrómica durante 24 horas.

### ESTUDIO DEFINITIVO

El mismo protocolo con los mismos pasos se realizó con los 16 dientes restantes, los cuales fueron almacenados en 6 tubos eppendorff. La dentina pulverizada se pesó en una balanza analítica Chyo Júpiter C3-200MDM, la cual tuvo un peso de 5.82818 gramos. La dentina obtenida se colocó en un congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas.

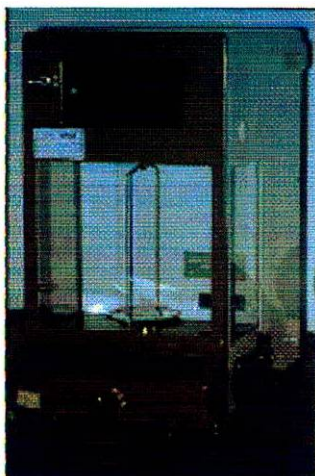


FIG. 9 Balanza analítica

### ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LA PARTÍCULA DE DENTINA PULVERIZADA VISTA AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.

Para establecer el tamaño de la partícula de la dentina pulverizada, se observó con el microscopio electrónico de barrido marca Phillips serie XI, XL 30 ESEM. Se tomaron varias magnificaciones y con algunas de ellas se tomaron varias mediciones, encontrando que el tamaño de la partícula fue muy heterogéneo. Se tomaron varias magnificaciones, de 21 X, 100 X, 300 X, 600 X, 780 X, 1200 X, y 1440 X. Con una magnificación de 40 X la partícula midió, 905 micras de largo y 340 micras de ancho. Con una magnificación de 68 X la partícula midió, 826 micras de largo y 579 micras de ancho y 142 micras de alto. Con una magnificación de 70X se midió una partícula de forma triangular, que midió 522 micras de largo y 103 micras de ancho. 180 X la partícula midió 351 micras de longitud y 251 micras de ancho y 76.8 micras de alto.

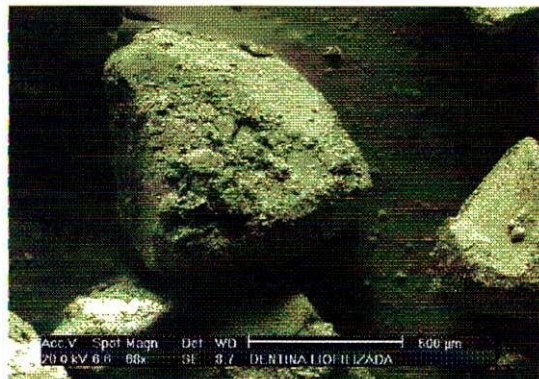


FIG. 10 68x



FIG. 11 70X

## **PROTOCOLO PARA LA LIOFILIZACIÓN DE LA DENTINA**

La dentina pulverizada almacenada en 6 tubos ependorff se sacó del congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se sacaron los tubos ependorff con la dentina pulverizada y congelada y se llevó a la liofilizadora marca Labconco durante 48 horas, después de las cuales se obtuvo la dentina liofilizada, la cual fue almacenada en un tubo Facol.

## **PROTOCOLO PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE ADN EN LA DENTINA LIOFILIZADA.**

### **ASLAMIENTO DE ADN A PARTIR DE LA PIEZA DENTARIA.**

**ADAPTADA DE CORACH D, SALA A, PENACINO G, 1999.**

Seleccionar la pieza dentaria a analizar, de preferencia utilizar los dientes del maxilar superior que son los que mejor se conservan.

Lavar la pieza seleccionada con un cepillo y abundante agua, secar a  $37^{\circ}\text{C}$  en estufa.

Disgregar el diente con el equipo Freezer Mill 6750 (Glen Creston Ltda, England), en presencia de nitrógeno líquido mediante un fuerte impacto mecánico también se puede pulverizar el diente en un mortero de acero o utilizar un motor con una fresa delgada de dentista, para obtener polvo dental. (En este paso ya se había obtenido la dentina pulverizada separada del esmalte, cemento y pulpa dental creado por los autores del estudio).

## **DE AQUÍ EN ADELANTE SE UTILIZÓ EL PROTOCOLO DE ADN CON TEJIDO OSEO TOTALMENTE REDUCIDO.**

**ADAPTADO DE CORACH D, SALA A, PENACINO G, 1999**

### **Primer día:**

Se tomaron dos premolares, dos de hombre y dos de mujeres para realizárseles

un corte transversal nivel del cuello del diente.

Se extrajeron los restos de la pulpa seca con una sonda barbada y se depositaron estos en un tubo de ependorff.

Se preparó 1ml de solución de EDTA  $10\text{m}\mu$  :  $250\text{m}\mu$ , TRIS  $10\text{m}\mu$  :  $50\text{m}\mu$ , NaCl  $100\text{m}\mu$  :  $2500\text{m}\mu$ ., para identificar el ADN de la pulpa dental y de la dentina.

SDS 1% - 20%                      20 ml proteinasa K.

Para realizar la prueba de ADN en la pulpa se utilizó :

**EDTA** : Se utiliza 0.5 ml con un ph de 8, agregando 90 ml de agua estéril, realizando un pinen con marca registrada Sandryx Ga, la que se realiza para bajar la solución que queda en las paredes.

**NaCl** : Se utilizó una solución de 10 ml de Cloruro de Sodio y se mezcló con 90 ml de agua estéril.

Para realizar la prueba de ADN en la dentina :

**EDTA** : En un tubo ependorff se colocaron 10 microlitros de esta solución.

**TRIS** : Se utilizó 0.1 molar y se convierte a 50 micro litros.

**NaCl** : Se utilizó 100 micro litros.

**SDS** : Se utilizó esta solución en una concentración del 20%, y se tomaron 25 microlitros, mezclándose con 315 ml de agua estéril agregándosele 20 ml de proteinasa K para degradar todas las proteínas en especial el colágeno. Luego se le agregó el vortex, con papel parafinado se realizó el sellado periférico.

Después se colocó en una microcentrífuga marca HETTICH a 14000 r.p.m durante 1 minuto. Procediendo a dejar incubándose durante toda la noche a  $60^{\circ}\text{C}$ .

### **Segundo día:**

Se sacó la muestra de la incubadora después de estar 24 horas, se le agregó un

diluido en Buffer, Proteinasa K.

Se agitan las dos muestras de dentina y pulpa para verificar que si se disolvió.

Al observar que se diluyó la pulpa y la dentina se le agrega a cada muestra 1 ml de fenol.

Se centrifugaron las dos muestras por 5 minutos a 5000 r.p.m.



FIG. 12 Centrifuga

Después de centrifugar se observan dos fases:

La acuosa: Se encuentra todo el material genético.

La fenólica: Quedan los residuos del material.

Se tomaron 200 microlitros de la fase acuosa y se vertieron en un tubo de ependorff cilíndrico de 2ml.

Se agregó 1 ml a cada muestra de cloroformo.

Se centrifugó durante 5 minutos a 5000 r.p.m.

Después de centrifugar se observaron dos fases: la acuosa y la clorofórmica.



FIG. 13 Fase acuosa y fenolica

Se traspasó la fase acuosa a un tubo de ependorff cónico de 1.5 ml.

Se colocó la base para tubos ependorff y se ubicaron de la siguiente manera de izquierda a derecha:

Muestra control. (La suministró el laboratorio de genética).

Muestra de la pulpa.

Muestra de la dentina.

Se preparó Agarosa al 1%. Por el tamaño de la muestra solo se tomaron 0,3 gr.

Se vertió en el aparato de electroforesis la Agarosa para que polimerice.

Antes que gelifique se colocó una peinilla que va a dejar unos bolsillos.

Ya polimerizado el gel se retiró la peinilla.

Se agregó un buffer de corrida hasta que quede sumergido el gel de la Agarosa.

En un pedazo de papel de aluminio se colocó del mismo orden de izquierda a derecha 2 microlitros de ADN control, pulpa y dentina.

Sobre cada muestra se colocó 3 microlitros de buffer de carga.

Con una micropipeta y una punta de 5 microlitros se siembra en los bolsillos que dejó la peinilla en el gel de Agarosa en su mismo orden.

Se tapó el aparato de electroforesis y se prende el equipo a un voltaje constante con carga positiva y negativa a 100 voltios durante 40 minutos.

La carga positiva y negativa hace que las muestras se dividan y se van hacia los polos.

Después de los 40 minutos se sacó la tableta del gel Agarosa con las tres muestras impresas.

Se sumergió el gel de Agarosa en una solución de Bromuro de Etidío, que actúa como activador del ADN de las tres muestras.

Se observó el gel de Agarosa por medio de un transiluminador.



FIG. 14 Transiluminador

No se observaron líneas blancas por que no hay presencia de ADN.

Se observó la muestra control y la pulpa y presentaron líneas blancas lo cual concluye que poseen ADN.

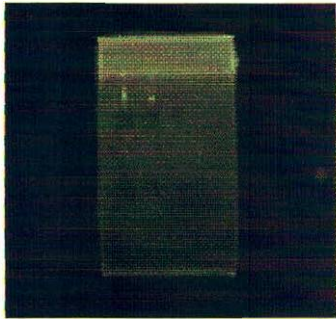


FIG. 15 Bandas de ADN

### PROTOCOLO PARA ESTERILIZAR LA DENTINA CON RAYOS GAMMA

La dentina liofilizada y almacenada en un tubo Facol se llevó a la sala de exposición con Rayos Gamma, y se expuso a una fuente de radiación con cobalto 60 durante 5 horas con una dosis de 24.78 Kilograys.

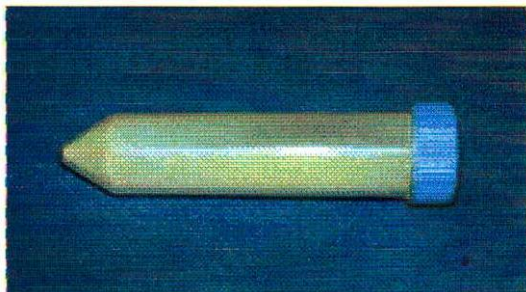


FIG. 16 Tubo de facol

### DISCUSIÓN

El hecho de que la dentina humana liofilizada y esterilizada sirva para mantener vital un diente, solo se conocerá en estudios posteriores In- Vivo en animales

de laboratorio cuya investigación se concentrará en saber si existe la posibilidad de generar la formación de dentina en dientes que puedan haber sufrido una exposición pulpar.

De igual forma se comprobó que si es factible el aislamiento y pulverización de la dentina de un diente para posteriormente liofilizarla, aunque no existen protocolos previos para este tipo de estudio.

En la dentina liofilizada no se encontró ADN, debido a que la dentina extraída de un diente no vital y que esta fuera de la cavidad oral no presenta odontoblastos ni tampoco prolongaciones citoplasmáticas dentro de los túbulos dentinales, lo cual la revisión de la literatura lo reporta. Lo anterior se comprobó con el proceso de aislamiento del ADN con el protocolo de ADN con tejido óseo totalmente reducido, adaptado de Corach D, Sala A, Penacino G, 1999, donde se realizó la técnica de fenol- cloroformo.

### CONCLUSIONES

En relación con la liofilización y esterilización de la dentina de dientes humanos se puede concluir lo siguiente:

Se realizó el protocolo para la pulverización de la dentina en dientes humanos.

La dentina de dientes humanos se liofilizó. No se encontró ADN en la dentina liofilizada de dientes humanos.

La dentina de dientes humanos se esterilizó con rayos gamma a una dosis 24.78 kilograys.

### RECOMENDACIONES

Realizar cultivos para determinar la existencia o no de microorganismos dentro de la muestra de dentina liofilizada y esterilizada.

Colocar la muestra de dentina liofilizada y esterilizada en varios tubos de ependorff dentro de una cámara de flujo laminar para poder manipular la dentina y evitar la contaminación.

Aplicar la dentina liofilizada y esterilizada clínicamente in vivo en animales de laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABRAHAMOVIC**, Abraham, Histología y embriología dentaria. Edt. Panamericana, Ed. 4. 1999 Pág. 44 – 55.
- AVERY**, James, Repair potential of the pulp. Journal of endodontics. Vol 7 N° 5, May, 1981.
- BERNAT**, Maria, Urbina Patricia, Pinzón Maria, Pacheco Mario, Orjuela Marlen, Senejoa Shirley. Obtención de dentina liofilizada humana para el manejo de dientes con exposición pulpar. Colegio Universitario Colombiano. COLOMBIA 2001.
- GARBEROCLIO**, R. and Brannstrom. M. Scanning Electron Microscopie investigation of human dentinal tubules. Arch oral biology, 21. 1976. Pág. 355-362.
- GOMEZ**, Claudia, Prueba de ADN en el derecho penal. COLOMBIA. 1999. Pág. 8 – 21.
- GOMEZ**, Ferraris de Campos Muñoz, Histología y Embriología bucodental. Ed Panamericana. Segunda edición. 2002. Pág. 240 -269
- HARING J**, Lind. Radiología dental. Principios y técnicas. 3ª ed. México, McGraw Hill Interamericana, 2000; p 13 - 19.
- H. F**, Thomas. Session v: dentin- predentin complex and its permeability. Anatomical overview. J. Dent rest 64; 607- B12 April. 1985
- [HTPP://invap.bariloche.com.ar/Indus/lial/de scrip.htm](http://invap.bariloche.com.ar/Indus/lial/de scrip.htm). [Hptt:atenea.udistritaledu.co](http://atenea.udistritaledu.co). Radiación y radioprotección Interacción de la radiación con la materia. Bogotá.
- INGLE**, Jhon y Bakland Leif. Vias dela pulpa. Cuarta edición Mcgraw Hill interamericana. CAN. 1996. Pág. 358-359.
- IAÑEZ**, Enrique. Efecto de los factores ambientales sobre las bacterias. ESP. 1998.
- KAYE**, H and Herold R.C: Structure of Human dentine. Arch oral biology ,11. 1960. Pág. 355-368.
- KINNEY J**. Balooch M, Marshall G, Marshall S. A micromechanics model of the elastic properties of human dentine. Archives of oral Biology. 44 .1999 813-822.
- LOPEZ**, Palafox., Juan. Maxilares, Guia practica de odontología forense. Mayo. Universidad Alfonso X de Madrid. ESP. 2001.
- IAEA** International Atomic Energy Agency Vienna.1973. Manual on Radiation Sterilization of Medical and Biological Materials.
- MJÖR**, I. A. Dentin and pulp. In histology of the human tooth GER. 1979. . Pag 43-73.
- MJÖR**, I. A. And I. Nordahl, the density and branshing of dentinal tubules in human teeth. Arc oral biology. Vol 41 N° 5. 1996. Pag 401-412.
- NAVARRO**, Maricell. La liofilizacion de productos farmaceuticos. Sin tefarma. Enero- julio. MEX. 1998.
- ORCHARDSON R.**, Gangarosa L, Holland G, Pashley D, Trwbridge H, Ashley P, Kleinberg I y Zappa U. Dentine Hypersensitivity into the 21<sup>ST</sup> Century. Archs Oral Biolo. Vol.39.Suppl.pp.113S-119S 1994.
- RUCH**, J.V. Seccion I. Development from and function of odontoblast. C.O. Torneck Chairman. Odontobast differentiation and deformation of the odontoblast layer. J. dent. Rest 64: April, 1996, Pág 498.
- SIGAL**, Michael and Robert Cher Nekqy. Terminal end of the odontoblast process. J. Of Endodontic. Vol 14 N° 11. November. 1986
- SLOAN**, A. J. Smith A, J. Stimulation Of the Dentine- Pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- B isoforms 1- 3 in vitro. Archives of Oral Biology, 44. 1999. Pág. 149-156.
- WEBER**, D. F: and improved technique for producing casts of the internal structure of hard tissues. Including some doserrations on human dentine. Arch Oral Biology. 1983. Pag 28, 885, 891.
- W**, L, Davis. Histología y embriología bucal. Interamericana Mc graw Hill. 1986. Pag 117-141
- Colegio Oficial de Físicos de España Subvencion del Consejo de Seguridad Nuclear. Marzo 2002. [www.físicaysociedades.es](http://www.físicaysociedades.es).
- Electroscopia 1996. Bern Eggen. [www.slb.com/es](http://www.slb.com/es).
- Guidelines for Industrial Radiation Sterilization of Disposable Medical Products (Cobalt -60 Gamma Irradiation). November 2002. <http://iaea.or.at/worldatom/press/News/2002/11-5-859279.htm>
- Labconco Corporation. Kansas City, Missouri 2003. [www.labconco.com/pdf/freezone.pdf](http://www.labconco.com/pdf/freezone.pdf).
- Radiaciones ionizantes y cáncer. Radiación y efectos biológicos. Diciembre 2002.

[www.tuotromedico.com/temas/radiaciones\\_ionizantes.htm](http://www.tuotromedico.com/temas/radiaciones_ionizantes.htm)

[www.cne.gov.ar/tecno/co60/folletos/cobalt1.htm#co#co](http://www.cne.gov.ar/tecno/co60/folletos/cobalt1.htm#co#co)

**Correo Electrónico:**

**[dent\\_liof\\_est@hotmail.com](mailto:dent_liof_est@hotmail.com)**

Díaz D, Fontalvo M, Gómez Y, Latorre L,  
Martínez H, Ramos J, Rodríguez D. Liofilización  
Y esterilización de la dentina de dientes  
humanos. Colegio Odontológico Colombiano.  
Colombia. 2003.