

T.O.  
377  
T.2

# OBTENCION DE DENTINA LIOFILIZADA HUMANA PARA EL MANEJO DE DIENTES CON EXPOSICION PULPAR

COLEGIO UNIVERSITARIO COLOMBIANO  
COLEGIO ODONTOLOGICO COLOMBIANO

BERNAT A.\* , ORJUELA S.\* ,PACHECO M.\* ,  
PINZON E.\* , SENEJOA S.\* , URBINA C.\*  
OSSA H.\*\*  
REVELO A.\*\*\*

## RESUMEN

*La posibilidad de obtener dentina liofilizada humana para el tratamiento de dientes con exposición pulpar no había sido antes objeto de estudio, pero la similitud existente entre la dentina y otros tejidos como el hueso, nos llevó a pensar en ésta como un tratamiento eficaz para mantener vital el diente. Se partió de la idea que la dentina es un tejido que tiene sustancia orgánica y posee una matriz con prolongaciones citoplasmáticas del cuerpo del odontoblasto.*

*En ésta investigación se tomó 9 estructuras dentarias de pacientes sistémicamente sanos y 3 estructuras de una paciente con epilepsia y controlada médicamente (ácido valproico). De éstas estructuras dentarias se obtuvieron 3 gramos y 0.8 gramos de dentina pura respectivamente en los cuales se analizó la presencia de DNA.*

*Los resultados de la investigación en el laboratorio demuestran que la dentina es un tejido que puede ser liofilizado, que la tetraciclina se fijó en ella facilitando la identificación para su obtención. Que al identificar la presencia de DNA mediante el sistema de protocolo para aislamiento de DNA Genomic, DNA purificación, kit promega y electroforesis reportaron una dentina libre de DNA.*

*Se concluye entonces en ésta investigación que el procedimiento puede ser efectivo si más adelante se comprueba una posible dentinogénesis que evitará un tratamiento de conductos que seguramente dejará un diente deshidratado y susceptible a fracturas.*

¿Es factible aislar de manera correcta la dentina de un diente para liofilizarla?

## INTRODUCCION

La dentina se asemeja al hueso, ambos se diferencian fundamentalmente en que el hueso presenta células incluidas en su matriz y la dentina solo contiene prolongaciones citoplasmáticas, este tipo de similitud crea la iniciativa de realizar una dentina que siendo deshidratada mediante temperaturas muy bajas entre  $-40^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  para asegurar su conservación (liofilizada) pueda ser utilizada luego de realizarle este proceso haciendo que la pulpa acepte esta dentina y continúe con la función de mantener vital el diente.

Por esta razón cabe preguntarse:

¿Será que la similitud del hueso con la dentina permite obtener dentina liofilizada?

Esta investigación sobre la obtención de dentina liofilizada para aplicarla en dientes con exposición pulpar, es de gran importancia para el profesional en salud oral debido a qué complicaciones presentadas durante la realización de cavidades que afectan en mínima proporción el órgano pulpar puedan ser solucionadas mediante la aplicación de dentina liofilizada procesada capaz de continuar la funcionalidad del diente, desencadenando una posible dentinogénesis. Se viene utilizando cuando hay exposición pulpar un medicamento como el hidróxido de calcio que no garantiza la continuidad de vida de la estructura dentaria, es por ello que creando esta dentina

\* Estudiantes X semestre del Colegio Odontológico Colombiano  
\*\* Asesor Científico- Médico, Especialista., Genética Humana  
\*\*\* Asesor Metodológico – Odontóloga, Magister en Administración de Salud

liofilizada se podrá minimizar procedimientos incómodos para el paciente; evitándole una endodoncia que va acabar con la deshidratación total del diente haciéndole susceptible a posibles fracturas.

La investigación pretende obtener dentina liofilizada humana para el manejo de dientes con exposición pulpar.

La dentina en sus propiedades químicas esta constituida en un 30% de sustancias orgánicas y agua y un 70% de sustancias inorgánica siendo esta formada por cristales de hidroxiapatita más pequeños que los del esmalte y las sustancias orgánicas constituidas por fibras colágenas, sustancia intercelular amorfa fundamentalmente, de este 30%, 18% de materia o sustancia orgánica (principalmente fibras colágenas) y 12% de agua. Aunque se asume esta composición química general para la dentina. Existen variaciones entre las distintas regiones de la misma así como entre la dentina de la corona y la raíz. (M.E Gómez de Ferraris A. Campos Muñoz, 1999).

La matriz orgánica de la dentina del manto está formada por fibras de colágeno (fibras de Von Korff) muy gruesas que se disponen de forma ordenada y regular. En la corona se orientan paralelas a los túbulos dentinarios, siendo perpendiculares a la conexión amelodentinaria, pero en la raíz son paralelas a la interfaz cementodentinaria, o sea perpendiculares a los túbulos dentinarios. Existen otras fibras de menor grosor y de disposición irregular. La dentina del manto posee abundante sustancia fundamental, rica en GAS sulfatados pero carece de DPP (fosforina dentinaria). (M E. Gómez de Ferraris A. Campos Muñoz, 1999).

La Liofilización es un proceso que consiste en la deshidratación de una sustancia por sublimación al vacío y consta de 3 fases: Sobrecongelación, desecación primaria y desecación secundaria. Es decir que liofilizar es deshidratar mediante temperaturas muy bajas productos o elementos orgánicos para

asegurar su conservación, separando el agua de una sustancia. La conservación de bacterias, virus y otros microorganismos fue su primera aplicación pero en la actualidad se usa para la conservación de suero, plasma, hueso y otros productos Biológicos. Este proceso de desecación por congelación brusca se hace entre  $-40^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  y luego se realiza sublimación al vacío productos o elementos orgánicos a fin de conservarlos pasando directamente este cuerpo del estado sólido al gaseoso. En el artículo "los efectos de congelación y congelación seco en adenosine triphosphasa y acetyl chalinesterasa en celdas de sangre roja humana". (Anderson, Nei, 1973) habla de la acción de la congelación de la liofilización de las actividades enzimáticas de hematies humanos.

El procedimiento más sofisticado para comercializar en polvo un liquido orgánico es la llamada liofilización. Este es un sistema que comprobadamente, en una larga serie de medicamentos y otros productos naturales líquidos o en material vegetal fresco, permite una deshidratación completa sin el aumento de temperatura que pueda hacer variar la composición química y la actividad curativa del producto final.

Se usa generalmente en la preparación comercial de antibióticos, de algunas vacunas y de muchos productos vegetales alimenticios y saborizantes.

El resultado de la liofilización lo conocemos por una serie de alimentos y algunas medicinas de consumo masivo, cebollas y ajos, sopas, ciertos cafés importados, productos medicinales (vacunas, antibióticos, uña de gato). Estos productos como en el caso de los alimentos, tiene la virtud de recuperar, en un alto porcentaje, su sabor y textura originales. La diferencia con el producto original ésta en el trozado ya que se trata de congelar y sublimar rápidamente el agua; en otras palabras, tienen que ser pequeños, ya que, cuanto menor el tamaño mayor la superficie con relación al volumen.

Es por eso que en las sopas liofilizadas, la cebolla, el ajo y otros productos de sabores complejos y delicados vienen en polvo o en trozos pequeños. A cambio de eso son mantenidos en estantes por largo tiempo conservando intactas sus características. Esto es de suma importancia para la comida que, deben conservar su sabor, cualidades alimenticias y para las plantas medicinales que deben conservar sus principios activos. El doctor Fernando Cubieses afirma: " este es el procedimiento ideal para comercializar en gran escala una planta medicinal. Cualquiera de ellas".  
([www.manaxx.com/liofili.htm](http://www.manaxx.com/liofili.htm))

La dentinogénesis es el conjunto de mecanismos mediante los cuales la papila dental elabora por medio de sus células especializadas, los odontoblastos, una matriz orgánica que más tarde se calcifica para formar la dentina. Ocurre primero donde se formarán puntas de cúspides o bordes incisales. En esta región los odontoblastos maduran plenamente convirtiéndose en células altas cilíndricas hasta de 50  $\mu\text{m}$ . El ancho de los Odontoblastos permanece constante, la papila dental se convierte en pulpa dental. Los odontoblastos se retiran hacia el centro de la pulpa produciendo una matriz de dentina de 4 a 8  $\mu\text{m}$  por día. (Cortes Torres J, 1995).

En la dentinogénesis se pueden considerar tres etapas:

- a) Elaboración de la matriz orgánica, compuesta por una trama fibrilar y un componente fundamental amorfo.
- b) Maduración de la matriz.
- c) Precipitación de sales minerales (calcificación o mineralización).

Los cambios en el espesor del tejido dentinario pueden controlarse mediante radiografías. El Odontólogo debe tenerlo en cuenta no sólo para el tallado de cavidades (operatoria dental), sino también en el tallado de una prótesis coronaria. En efecto, en un individuo joven el procedimiento odontológico puede interesar algún cuerno pulpar y hacer una exposición pulpar accidental. En cambio

en un diente adulto, que ha sufrido reducción del volumen pulpar, se puede trabajar con mayor grado de seguridad.

Esta dentina es conocida por los anatomosatólogos como dentina reparativa, reaccional, irregular o patológica. Es la dentina que se forma más internamente, deformando la cámara, pero sólo en los sitios donde existe una noxa o estímulo localizado. Es decir que esta dentina es producida por odontoblastos directamente implicados por el estímulo nocivo de manera que sea posible aislar la pulpa de la zona afectada.

Los patólogos consideran a la dentina reparativa dentro de la categoría de la dentina de neoformación, en la cual también estaría incluida la dentina cicatrizal o puente de dentina que se forma bajo la acción de protectores pulpares como el hidróxido de calcio u óxido de zinc. El Odontólogo utiliza tales sustancias para estimular la formación de dentina, cuando ha habido extirpación casi total de la dentina (por ejemplo, en el caso de una caries muy profunda), e incluso exposición pulpar o pulpectomía parcial. Los protectores pulpares inducen a la diferenciación de las células mesenquimáticas pulpares cercanas a la zona afectada, las cuales se transforman en odontoblastos y elaboran dentina de cicatrización; la respuesta depende, obviamente, de la vitalidad de la pieza dentaria.

La actividad funcional más significativa, sin embargo, del tejido dentinario consiste en actuar como soporte mecánico en la normal actividad masticatoria de las piezas dentarias y en participar también, por sus caracteres estructurales y biológicos, en la defensa y en la sensibilidad del complejo dentino-pulpar. A continuación se describen más pormenorizadamente algunas de estas actividades funcionales.

Como consecuencia de su composición química y de su estructura histológica la dentina posee dos propiedades físicas

esenciales, la dureza y la elasticidad, que resultan imprescindibles para ejercer su función mecánica en la fisiología de las piezas dentales. La dentina constituye, en este sentido, el eje estructural del diente sobre el que se articula el resto de los tejidos duros del mismo, el esmalte y el cemento. La dentina, además, facilita con su grado de elasticidad que el esmalte, duro y rígido, pero quebradizo, quede protegido de los distintos impactos masticatorios. Ello se debe a la pequeña depresiabilidad que le otorgan la existencia en su seno de fibras colágenas aun cuando la dentina sea un tejido también mineralizado.

También se debe poner especial cuidado en la elección de los materiales dentales restauradores, ya que, por ejemplo, las resinas acrílicas son dañinas para la pulpa así, como los silicatos, por su contenido ácido. Al emplearlos se debe proteger previamente el piso de la cavidad con una sustancia inocua como el hidróxido de calcio o barnices protectores. Hay que destacar y recordar que los materiales dentales si bien se colocan en dentina, biológicamente estamos trabajando en el complejo dentino pulpar, de ahí surge el cuidado en la elección y preparación de los mismos.

Existen investigaciones que demuestran que el "Smear layer" (o capa estirada) que es una micropelícula que queda adherida a las paredes cavitarias después de su preparación mecánica, es la encargada de proteger a la pulpa, y químicamente tiene una composición a la dentina. (M. E. Gómez de Ferraris A. Campos Muñoz, 1999)

Se ha observado que los daños en el tejido pulpar atribuibles exclusivamente a la acidez o toxicidad de los materiales no son tales, sino que se debería a varios factores que actúan a la vez. Entre ellos se menciona la irritación mecánica, presiones excesivas, microfiltraciones, defectos en el sellado y microfracturas o microdefectos en el tejido dental. También influye el mayor diámetro de los túbulos, el aumento de presión del fluido dentinario y la menor cantidad de dentina

intertubular. Aspectos histológicos que por su heterogeneidad inciden en los sistemas de adhesión (mecánica o química) de los diferentes materiales restauradores utilizados en la operatoria dental. La adhesión depende de la permeabilidad dentinaria, cuando es mayor es difícil conseguir una adhesión estable y duradera entre el material y la pared cavitaria. (M. E. Gómez de Ferraris A. Campos Muñoz, 1999)

En la relación con la terapéutica dentinaria comentaremos por último que las nuevas técnicas de Ingeniería tisular están desarrollando protocolos de regeneración de dentina, induciendo el desarrollo de la misma, a partir de la acción sobre la pulpa de distintas sustancias inductoras (preferentemente una combinación de BMP-2, BMP-4 y bmp-7 o proteína osteogénica 1 OP1) que unidas a diferentes vehículos o vectores (matrices colágenas, polímeros sintéticos, etc.). Se colocan en la proximidad de la superficie pulpar (en el fondo de la cavidad labrada en la dentina) para producir, de forma programada, dentina terciaria. (Gómez de Ferrari, 1999).

Los objetivos planteados fueron los siguientes:

El *General*, aislar dentina humana para realizar el proceso de liofilización y los *Específicos* Realizar el proceso de liofilización de la dentina e Identificar la presencia de DNA en dentina liofilizada humana.

## METODO

El estudio fue descriptivo tipo exploratorio cuyo objeto de estudio fue la dentina liofilizada humana.

El procedimiento fue el siguiente:

**Fase 1. Selección de los dientes aptos para obtener la dentina:**

Se tomó previamente los datos personales de cada uno de los pacientes, a los cuales les fue realizada la cirugía a método abierto En el Colegio Odontológico Colombiano. Donde se obtuvo dose estructuras dentarias de terceros molares incluidos desprovistos de algún microorganismo, se siguió un correcto proceso de bioseguridad, durante el procedimiento quirúrgico los dientes fueron colocados en cajas de Petri de 100x15 mm previamente estériles las cuales contenían una dilusión de 800 mg de tetraciclina en 100 ml de solución salina. Antibiótico de amplio espectro que evitó la destrucción de las fibras colágenas y produjo mayor fijación a las estructuras del diente. Esta dilusión nos garantizó la conservación, hidratación y asepsia de las estructuras dentaria obtenidas (figura 1).



Figura 1

Las estructuras dentarias se conservaron selladas y marcadas en nevera a una temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  durante 20 días mientras se continuaba con el aislamiento y obtención de la dentina.

### Fase 2. Obtención de dentina liofilizada.

Consistió en el diseño de una caja de vidrio con medidas de 20x25x20 cm la cual tenía dos orificios laterales para permitir el acceso del micromotor Dremel libre de contaminación y poder realizar dentro de ella el aislamiento de dentina y los cortes sagitales y verticales a las estructuras dentarias obtenidas, con la ayuda de un disco de diamante fijado en un mandril. (Figura 2)



Figura 2.

Al retirar los dientes de la dilusión de tetraciclina con agua destilada se observó que al hacer los cortes anteriormente mencionados se diferenció la dentina de otros componentes dentales como cemento, esmalte y restos pulpares; y se procedió a separar con fresas de diamante estériles obteniendo dentina pulverizada libre de líquidos (liofilizada) para un total de 3.8 gr que luego se almaceno en un frasco de vidrio con tapa de vidrio estéril a temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  (figura 3, 4 y 5).



Figura 3.

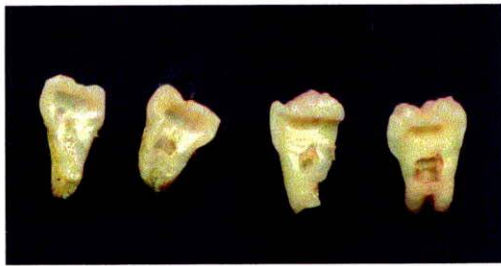


Figura 4.



Figura 5.

Para la obtención de dentina liofilizada en pacientes con problemas sistémicos se realizó el mismo procedimiento anterior y se almacenó en un frasco de las mismas características marcado como B (figura 6).

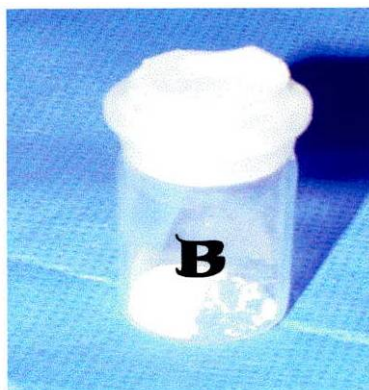


Figura 6.

### Fase 3. Identificación de DNA en dentina liofilizada humana.

Se realizó por medio del protocolo para aislamiento de DNA Genomic, DNA purificación, Kit promega y electroforesis: en una cámara de flujo laminar con mechero se esterilizo los bordes del frasco que contenía la dentina liofilizada, se pesó en una balanza analítica 0.05 gr de dentina que se diluyó en 300  $\mu$ l de agua pentadestilada estéril para PCR y se selló la solución con parafina donde se puso a 56°C durante 1 hora a baño María para que se precipitara la dentina. (Figura 7. y 8.)



Figura 7.

Figura 8.

La dentina precipitada se hidrató por 15 min. Para lisar las prolongaciones citoplasmáticas y se centrifugó a 14.000 RPM durante 20 segundos, al cabo de este tiempo se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregó 300  $\mu$ l de solución de lisis nuclear para romper y liberar el DNA; se volvió a centrifugar a 14.000 RPM durante 15 segundos y se eliminó el sobrenadante a éste pellet se le

agregó 100 µl de solución de precipitación de proteínas y se centrifugó a 14.000 RPM durante 3 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo de 15 ml al **NO** obtener bandas de DNA igualmente **NO** se encontró DNA para la dentina liofilizada.

## RESULTADOS

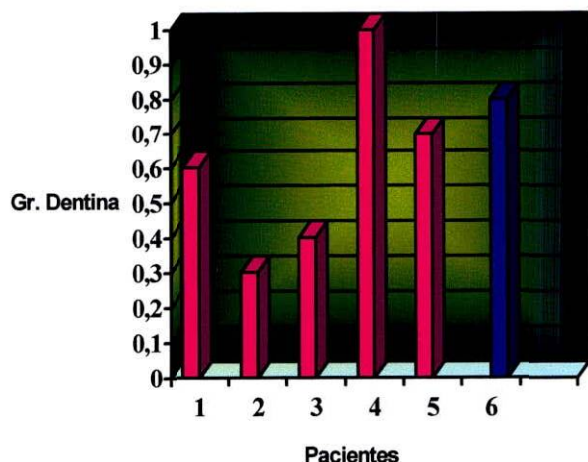
Los resultados obtenidos fueron:

Obtención de dentina liofilizada humana. Para un total de 3.8 gramos así:

En pacientes sistémicamente sanos se obtuvieron 9 estructuras dentarias para un parcial de 3.0 gramos de dentina liofilizada. En pacientes sistémicamente comprometidos se obtuvieron 3 estructuras dentarias para un parcial de 0.8 gramos de dentina liofilizada. (Tablas 1 y 2) (Gráficas 1 y 2).

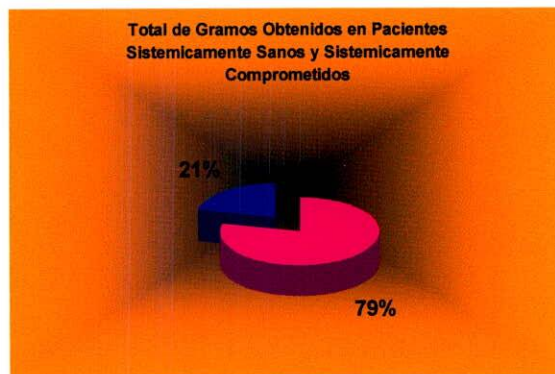
Gramos Obtenidos/Pacientes/Estructuras Dentarias

PACIENTE	ESTRUCTURAS DENTARIAS	Gr DENTINA LIOFILIZADA
<b>SANO</b>		
1	2	0.6
2	1	0.3
3	1	0.4
4	3	1.0
5	2	0.7
<b>NO SANO</b>		
6	3	0.8
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>3.8</b>



PACIENTES NO SANOS    PACIENTES SANOS

PACIENTES SISTEMICAMENTE SANOS		PACIENTES SISTEMICAMENTE COMPROMETIDOS	
Nº	%	Nº	%
5	79	1	21



## DISCUSION

El hecho de que la dentina liofilizada sirva para mantener vital un diente solo se conocerá con estudios posteriores cuya investigación se concentrará en saber si existe posibilidad de generar una dentinogénesis en dientes que puedan haber sufrido una exposición pulpar.

El complejo de tetraciclina con agua destilada permitió identificar fácilmente la dentina de las demás estructuras dentaria debido a la fijación que produjo en éste tejido.

Así mismo se comprobó que si es factible el aislamiento de dentina de un diente para liofilizarla.

No fue necesaria la deshidratación en la dentina porque durante el proceso de obtención ya se encontraba en un 95% libre de agua.

En la dentina liofilizada no se encontró por que eran muy pocos gramos los analizados y

no se precipitó o el método para aislar el DNA no fue el adecuado.

La liofilización a  $-40^{\circ}\text{C}$  es necesaria para mantener y conservar las propiedades de las proteínas y características de la dentina.

### CONCLUSIONES

Partiendo de la similitud entre el hueso y la dentina se comprobó que si es viable obtener dentina liofilizada.

Si fue factible aislar de manera correcta la dentina con ayuda de la fijación que produjo la tetraciclina en el tejido dentinal.

La dentina liofilizada no posee DNA, confirmando por el método de electroforesis y protocolo para aislamiento de DNA Genomic, DNA purificación, Kit Promega.

### RECOMENDACIONES

Los investigadores recomiendan:

Realizar investigaciones tendientes a verificar si existen diferencias genéticas entre la dentina humana y animal.

Realizar estudios posteriores tendientes a verificar si es posible que la pulpa acepte dentina previamente manipulada (liofilizada) y continúe la vitalidad del diente induciendo la dentinogénesis.

Realizar estudios comparativos con otros métodos que inducen la dentinogénesis.

### BIBLIOGRAFIA

BABBUSH. Implantes Dentales, Edit Interamericana. Mc Graw – Hill, 1995, Pgs. 236 – 37.

CABRERA, Manuel, Histoembriología Bucodentaria, Edit. Pueblo y Educación, Cuba, Pags, 105 – 115- 141- 150.

DICCIONARIO Enciclopédico Terranova, Editores Terranova LTDA, Santafé de Bogotá. 1996.

ENCICLOPEDIA Microsoft R En Carta R 98, Detectores de Partículas. Microsoft Corporation (e), 1993 – 1997.

GOLDMAN, Henry Maurice. Periodoncia Paradontológica, 1960, Pags. 323 – 328.

GOMEZ DE FERRARIS. CAMPOS MUNOZ. Histología y Embriología Bucodental, Edit Médica Panamericana, 1999, Pags, 197 - 225

JO, Anderson. T, Nei. Acción de la Congelación en la Liofilización de las Actividades Enzimáticas de Hematias Humanos, Universidad de Hokkaido, Sapporo, Japón, 1973.

[WWW.MANAXX.COM/LIOFILI.HTM](http://WWW.MANAXX.COM/LIOFILI.HTM)

CORTES TORRES, Jorge Orlando. Fundamentos en Endodoncia, 1995, Págs, 34-35-36-37.

### CORREO ELECTRONICO

[abernat@uole.com](mailto:abernat@uole.com)

[claurgu@uole.com](mailto:claurgu@uole.com)

[elisamariapinzon@latinmail.com](mailto:elisamariapinzon@latinmail.com)

[mjpachec@colomsat.net.com](mailto:mjpachec@colomsat.net.com)

[sairam@uole.com](mailto:sairam@uole.com)

[shi\\_sen@uole.com](mailto:shi_sen@uole.com)