CRIOPRESERVACIÓN DENTAL Y SUS EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL (PDLC)

Carlos Andrés Fernández Herrera

Director

Yesid Montoya Goez

Codirectores

David Arboleda Toro

Grupo de Investigación

GIBEC

Maestría en Ciencias odontológicas

UNIVERSIDAD CES

Medellín 2021

Contenido

1. Preliminares 4
1.1 Planteamiento del problema 4
1.2 Justificación 5
1.3 Pregunta de Investigación 5
1.4 Objetivos del proyecto 6
1.4.1 Objetivo General 6
1.4.2 Objetivos Específicos 6
2. MARCO TEÓRICO 6
2.1 Introducción 6
2.2 Estructura y características de los tejidos dentales 7
2.3 Criopreservación 14
2.4 Criogeles 15
2.5 Criogeles de alcohol polivinílico (PVA) 16
2.6 Aplicaciones en medicina regenerativa 18
3. METODOLOGÍA DEL PROYECTO 18
3.1 Preparación de soluciones de trabajo 19
3.2 Obtención y almacenamiento de piezas dentales 21
3.2.1 Proceso de obtención de las muestras 21
3.2.2 Técnica de anestesia y exodoncia 20
3.2.3 Transporte 20
3.3 Criterios para almacenamiento y evaluación de los agentes criopreservantes 22
3.3.1 Criterios de inclusión de los molares 19
3.3.2 Criterios de exclusión de los molares 20
3.4 Ensayos de caracterización 23
3.4.1 Medidas de las piezas dentales 23
3.4.2 Evaluación mecánica 24
3.4.3 Evaluación topográfica 26
3.4.4 Evaluación del crecimiento celular en cultivo de monocapa 26
3.5 Registro de datos y análisis estadístico 26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 26
4.1 Pruebas de los terceros molares 26
4.2 Medida de los terceros molares y determinación de fisuras 28
4.1.2 Prueba topográfica 31
4.1.3 Evaluación del crecimiento celular en cultivo de monocapa 38
5. CONCLUSIONES 39
6. RECOMENDACIONES 40
7. BIBLIOGRAFÍA 41
8. ANEXOS 45

RESUMEN

Los dientes comienzan a aparecer en el ser humano desde los seis meses de edad y su cambio por piezas permanentes tarda algunos años en generarse, llegando a un total de 32 dientes en la madurez. Cada pieza dental, además de cumplir con una función particular en el proceso de la masticación, es un importante reservorio de células madre autólogas, que cuentan con una alta capacidad de replicación y poseen propiedades potenciales para ser usadas en tratamientos de enfermedades a nivel de la cavidad bucal o en tratamientos sistémicos.

En este trabajo se comparan las propiedades mecánicas y topográficas de terceros molares criopreservados contra muestras control, con el propósito de identificar cómo la técnica de preservación por criogeles de PVA altera la superficie de los molares y su módulo de elasticidad. Además, se realizaron cultivos celulares de las células extraídas de las piezas dentales, para observar su comportamiento replicativo, ajustar parámetros y proponer una técnica de criopreservación viable, reproducible y asequible.

Las piezas dentales que no se congelaron con agentes crioprotectores, presentaron además de las fallas inducidas y mecánicas antiguas, fallas térmicas, debido al efecto que tiene el proceso de criopreservación sobre la estructura mineral de diente y la dentina. Además, se encontró, que los grupos de dientes que se sumergieron en soluciones que contenían DMSO no presentaron deterioro en la superficie de la pieza dental en consecuencia de la baja temperatura del nitrógeno líquido, logrando actuar como agentes que protegían la integridad de la dentina y el esmalte en los terceros molares. los grupos que contenían PVA presentaron un patrón de deterioro (patrón de panal de abeja) causado por el ácido generado en el medio de cultivo, ocasionando desmineralización y grabado ácido, provocando la afectación en la estructura dentaria durante el proceso de criopreservación

Por este motivo, es de gran interés la criopreservación de los tejidos dentales, ya que además de favorecer las terapias regenerativas, da pie en el corto plazo a la creación de un banco de dientes, lo cual es de gran utilidad para el trasplante piezas dentales propias del paciente y la regeneración de tejidos de la boca, mejorando así la calidad de vida de las personas y disminuyendo el rechazo ocasionado por reacciones naturales del sistema inmune frente a cualquier agente externo.

Palabras clave: criopreservación, terceros molares, criogeles de PVA, implantes dentales, pulpa dental.

1. Preliminares

1.1 Planteamiento del problema

Los dientes por la dureza que le confiere su estructura mineralizada y su configuración geométrica, cumplen una función primordial en los procesos de digestión (1), estos trituran los alimentos ingeridos por medio de cargas mecánicas en la masticación, para que sean homogeneizados y lubricados con la saliva y así formar el bolo alimenticio que va al estómago para ser transformado por acción enzimática y digestión ácida en sustancias simples que van a ser absorbidas por el organismo (2). Además de su función anatómica, los dientes tienen gran importancia en la función fonética y estética de una persona. Las cirugías correctivas, los procesos de envejecimiento y principalmente los procesos de tipo infeccioso como la caries dental y la periodontitis, ocasionan el deterioro estructural o la pérdida de los dientes, esto afecta la funcionalidad del sistema masticatorio, fonético y la estética de la persona, generando como consecuencia deficiencias nutricionales, problemas digestivos, que afectan salud y la autoestima del paciente (3).

Además de la importancia de los dientes en la función masticatoria y los aspectos previamente mencionados, estos tienen gran potencial en medicina regenerativa y aplicaciones terapéuticas (4), ya que en su parte blanda se encuentran células madre de origen mesenquimal derivadas de la cresta neural, que poseen la capacidad de reparar el diente cuando ha sido dañado, y que ayudan a formar de nuevo el tejido dental duro y blando (5). Sin embargo, el aprovechamiento de estas células es aún limitado, porque con las opciones terapéuticas actuales, los daños a nivel coronal y radicular, los dientes pueden recuperarse si la extensión del daño no es muy grande (6). Pero, una vez la destrucción de los tejidos dentales es tan avanzada que se decide retirar la pieza dental (exodoncia), estos son desechados sin valorar el potencial regenerativo que pueden tener las células presentes en sus tejidos blandos. Esto evidencia la necesidad que existe en el desarrollo protocolos que permitan la criopreservación de dientes manteniendo la viabilidad celular, pero además trabajar en implementar métodos de extracción y aplicación de estas células en terapias regenerativas.

Aunque es evidente el potencial de la odontología regenerativa, todavía existen grandes retos asociados al logro eficiente de la regeneración tisular dento-buco-maxilar que involucran la intervención de la tecnología de materiales y la bioingeniería (7); principalmente, en la necesidad clara de desarrollar técnicas y materiales biocompatibles que contribuyan a la preservación de los dientes, además de garantizar la aplicación real de las terapias basadas en células madre, que demuestren ser eficaces y de bajo costo en el contexto terapéutico (8). La posibilidad de conservar tanto la estructura mineralizada del diente como las células y proteínas contenidas en el ligamento periodontal y la pulpa dental, es una gran alternativa para la creación de biobancos dentales que dinamicen y potencialicen la práctica odontológica, más allá de la estética (9). En Colombia, el tema de almacenamiento de células se ha centrado principalmente, en la conservación de tejido de cordón umbilical En Colombia, actualmente hay los 2 tipos de bancos privados y públicos (10). No se identificaron publicaciones sobre la regulación de esta actividad (11).

1.2 Justificación

En la actualidad, existe gran cantidad de pacientes vinculados a tratamientos odontológicos que implican la reparación, restauración y reemplazo de una a o varias piezas dentales. Sin embargo, los dientes no se consideran esenciales para la vida y aunque cumplen una función anatómica y funcional, su importancia radica más en la estética. Esto hace que las investigaciones en el campo de la medicina regenerativa no tengan mucho impacto en el área odontológica, aunque, en la odontología se implementan muchos de los principios básicos de la ingeniería tejidos, empleando materiales biocompatibles que sirven de andamio, favorecen la adhesión, migración y proliferación celular, favoreciendo el restablecimiento de tejidos en la boca (12)(5). Además, el hecho de que en la pulpa y el ligamento periodontal se encuentren células ectomesenquimales que proliferan, se diferencian en ameloblastos formando el esmalte y en odontoblastos en la papila dental (13), con alta capacidad proliferativa y de fácil obtención a partir de exodoncias, es una oportunidad para potencializar la odontología regenerativa y generar nuevas alternativas para la aplicación de terapias celulares y la generación de biobancos (14) .

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa aplicada en odontología son de gran interés por ser estrategias novedosas que combinan biomateriales, biomoléculas (factores de crecimiento) y células madre para reparar y restablecer las funciones de órganos y tejidos (8). En la actualidad, las terapias que incluyen células madre tienen un potencial terapéutico importante, ya que estas pueden diferenciarse a múltiples tipos de tejidos, autorregenerarse y ser fuente de biomoléculas (15). Debido a las capacidades de las células madre mencionadas previamente, la demanda de biomateriales relacionados con estas células ha tenido un crecimiento acelerado que ha hecho necesaria la creación de biobancos a nivel mundial, orientados a la recolección, almacenamiento y distribución de células madre, que puedan ser usados tanto para investigación básica como para medicina traslacional (16).

El desarrollo o implementación de un método de criopreservación, como estrategia de conservación de tejidos dentales, favorece las terapias regenerativas, gracias a que esto permitiría en el corto plazo sentar las bases para la creación de un banco de dientes, del cual, a su vez, se puedan obtener células madre viables por más tiempo para crear otras opciones terapéuticas (8)(9). El aporte de esta investigación está encaminado a proveer una matriz de criopreservación de los tejidos dentales, a partir de criogeles de PoliVinil Alcohol(PVA) (17), los cuales ha demostrado tener la capacidad de proporcionar un entorno temporal para el mantenimiento y la interacción celular, que permite a la preservación de la viabilidad de las células en el tiempo.

1.3 Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto del uso de Polivinil Alcohol (PVA) como alternativa al Dimetilsulfóxido (DMSO), como agente criopreservante sobre tejidos dentales para su almacenamiento?

1.4 Objetivos del proyecto

1.4.1 Objetivo General

Comparar el efecto de dos criopreservantes sobre tejidos dentales mediante pruebas mecánicas, biológicas y topográficas.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la inocuidad del proceso de criopreservación sobre el componente biológico a partir de aislamiento de células de ligamento periodontal.

- Evaluar la integridad estructural de los tejidos mineralizados a partir de la respuesta mecánica posterior a la criopreservación.

- Analizar el efecto de dos agentes crioprotectores sobre la integridad de los tejidos mineralizados de exodoncias dentales humanas mediante pruebas de topografía superficial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

La pérdida dental es un problema persistente que se incrementa con el aumento en la edad de la población y otros factores como: procesos infecciosos en los dientes o tejidos periodontales, enfermedad sistémica, iatrogenia, factores genéticos (referencias). En el contexto mundial, las causas más frecuentes en esta problemática son los procesos infecciosos o traumatismos ocasionados por accidentes (18). Para dar solución al problema de la pérdida dental, la alteración de la función masticatoria y el daño estético, se proponen terapias odontológicas que dependen: del grado de la lesión, la edad del paciente y la capacidad adquisitiva ya que estos tratamientos suelen ser costosos (19). Para esto se plantea el uso de prótesis dentales que reemplazan dientes o grupos de estos, soportándose en las piezas dentales remanentes, o el reemplazo, utilizando implantes de titanio; ya sea para recuperar un diente perdido o como soporte de restauraciones protésicas de mayor tamaño (1). Sin embargo, aunque estos tratamientos se aplican con éxito en la actualidad, tienen grandes limitantes como requerir intervenciones quirúrgicas múltiples y tiempos de tratamiento prolongados (20). Además, cuando existe una ausencia marcada de tejido óseo para soportar las prótesis o se requiere mantener la estabilidad de un diente, se busca la regeneración; ya sea de tejido óseo o blando y en muy pocos casos, se promueve un ambiente adecuado para la regeneración del tejido y evitar la progresión de la lesión o reversión del daño que ya se ha generado (2).

Desde la ingeniería de tejidos se ha planteado la opción de emplear las células madre presentes en los tejidos dentales como: ligamento periodontal, el hueso alveolar, la pulpa dental y la región apical del diente (13), razón por la cual la boca es un importante reservorio de células madre, que pueden ser empleada en terapia y reconstrucción de

tejidos para procesos de regeneración, y con gran potencial en uso para terapias autólogas en pacientes, lo que podría disminuir los riesgos de rechazo en los procedimientos actuales. Para lograr este objetivo es necesario mantener la viabilidad de las células por medio de la criopreservación, lograr expandirlas en cultivo *in vitro* y desarrollar protocolos efectivos de aplicación en el paciente. A continuación, se abordan los conceptos claves para el desarrollo del tema propuesto en este trabajo en cuestión (21).

2.2 Estructura y características de los tejidos dentales

El diente y su histología

La función principal de los dientes es la masticatoria, aunque estos pueden tener distintas formas y tamaños, pero una estructura anatómica conformada por una raíz y una corona, con una estructura histológica característica (**Imagen 1**). Dentro de esta está la **dentina** que es un tejido conectivo mineralizado de origen ectomesenquimal derivado de la cresta neural, es un tejido dinámico y metabólicamente activo que puede regenerarse cuando sufre algún daño. Esta se divide en dos zonas una cubierta en la zona coronal por el esmalte que es un tejido duro de origen ectodérmico constituido principalmente por cristales de hidroxiapatita. Y dentina radicular cubierta por un tejido conectivo calcificado de origen ectomesenquimático llamado **cemento**. Dentro de la dentina se encuentra la cámara pulpar, donde está ubicada la **pulpa dental,** es un tejido blando del diente, altamente vascularizado e inervado. En su superficie está cubierta por los **odontoblastos**, que son células secretoras que sintetizan la matriz orgánica de la dentina constituida principalmente por colágeno y sustancia amorfa que

promueven la formación de la dentina primaria y secundaria y de los procesos de reparación en esta (1)(22).

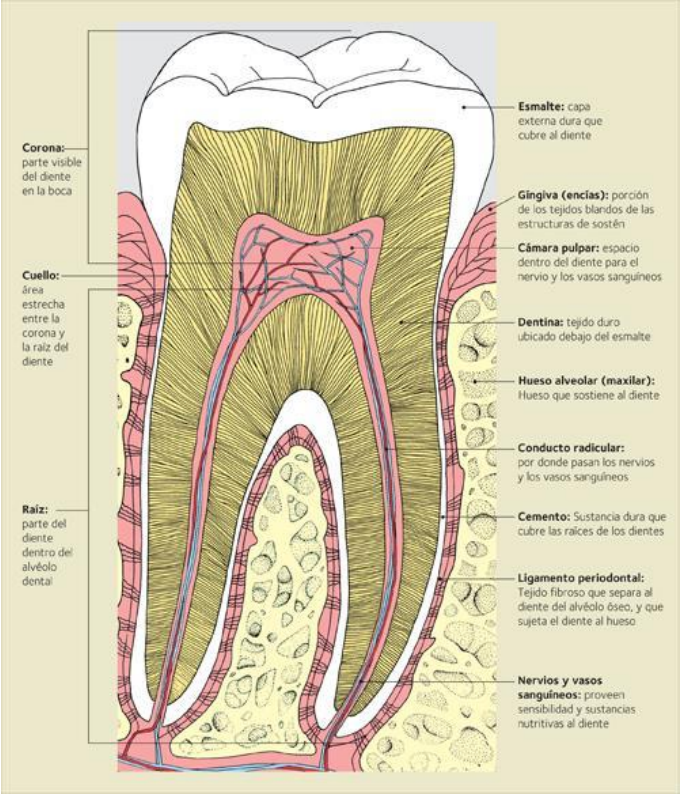

***Imagen 1**. Estructura interna y externa del diente tomada de (20).*

Las piezas dentarias pueden clasificarse de acuerdo con el tiempo de permanencia en la cavidad bucal (**Tabla 1**): en **dientes primario o deciduos**, que hacen la erupción entre los seis meses y se completa su aparición alrededor de los tres años. Son veinte elementos dentarios, diez por cada arcada dentaria. **Dientes permanentes (Imagen 2)**, son los que reemplazan los deciduos a partir de los 6 años y se completa alrededor de los 18 años, son 32 piezas dentales, 16 por cada arcada. Estos no son reemplazados y su perdida es definitiva (22).

Imagen 2. *Micropreparación histológica mostrando un primordio dental: A: órgano del esmalte B: papila dental C: folículo dentario. Tomado de (18)*

Tabla 1.*Cronología del desarrollo de los dientes en humanos. Las siglas empleadas corresponden a: s (semanas), s (meses) y a (años). Modificada de (21).*

	calcificación inicial			**corona desarrollada**		**raíz desarrollada**	
	diente	**dentición decidua**	**dentición permanente**	**dentición decidua**	**dentición permanente**	**dentición decidua**	**dentición permanente**
Dientes maxilares	Incisivo central	14 s	3 - 4 m	1,5 m	4 - 5 a	1,5 a	10 a
	Incisivo lateral	16 s	10 – 12 m	2,5 m	4 -5 a	2 a	11 a
	Canino	17 s	4 – 5 m	9 m	6 – 7 a	3,25 a	13 – 15 a
	Primer premolar	-	1,5 – 1,75 a	-	5 – 6 a	-	12 – 13 a
	Segundo premolar	-	2 – 2,25 a	-	6 – 7 a	-	12 – 14 a
	Primer molar	15,5 s	Al nacer	6 m	2,5 – 3 a	2,5 a	9 – 10 a
	Segundo molar	19 s	2,5 – 3 a	11 m	7 – 8 a	3 a	14 – 16 a
	Tercer molar	-	7 – 9 a	-	12 – 16 a	-	18 – 25 a
Dientes	Incisivo central	14 s	3 – 4 m	2,5 m	4 – 5 a	1,5 a	9 a

man-dibu-lares							
	Incisivo lateral	16 s	3 – 4 m	3 m	4 – 5 a	1,5 a	10 a
	Canino	17 s	4 – 5 m	9m	6 – 7 a	3,25 a	12 -14 a
	Primer pre-molar	-	1,5 – 2 a	-	5 – 6 a	-	12 – 13 a
	Se-gundo pre-molar	-	2.25–2.5 a	-	6–7 a	-	13–14 a
	Pri-mero molar	15,5 s	Al na-cer	5,5 m	2,5 – 3 a	2,5 a	9 – 10 a
	Se-gundo molar	18 s	2,5 – 3 a	10 m	7 – 8 a	3 a	12 – 16 a
	Tercer molar	-	8 – 10 a	-	12 – 16 a	-	18 – 25 a

Periodonto

Conjunto de tejidos que conforman la parte de sostén y protección de elemento dentario encargado de unir el diente al tejido óseo de los maxilares y en mantener la integridad en la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. Está conformado por el cemento que forma parte del periodonto de inserción, el ligamento periodontal, tejido conectivo fibrilar que se fija a la raíz al hueso alveolar y tiene la función de estabilizar la fuerza masticatoria **(Imagen 3**). El hueso alveolar, crece alrededor del diente y luego se une a la porción basal de los maxilares, es una estructura odonto-dependiente, es decir se forma con el diente y muere con él (23)(24).

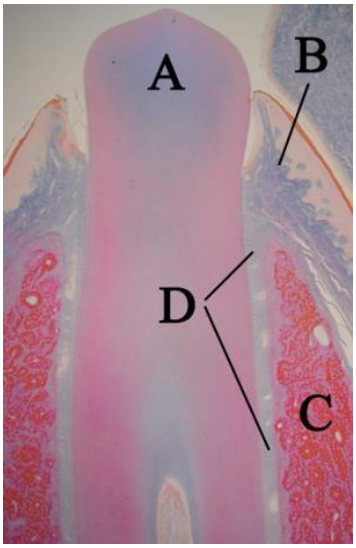

***Imagen 3**. Corte histológico de una erupción dental en la boca. A: Diente, B: Encía, C: Hueso y D: Ligamentos del periodonto. Tomado de (22)*

Células madre Mesenquimales (MSC) por sus siglas en inglés

Las Células Madre Mesenquimales (MSC), son un subconjunto de células estromales multipotenciales que proliferan *in vitro* como células adherentes con una morfología similar a la de los fibroblastos; estas pueden ser aisladas de tejidos humanos como: médula ósea, cordón umbilical, tejido adiposo, pulpa dental, ligamento periodontal entre otros, y tienen la capacidad de diferenciarse a diversos tipos de células, como lo son, los osteoblastos, los condrocitos, los mioblastos, las neuronas y los adipocitos (25) .
La extracción de MSC de diferentes tejidos humanos con el fin de diferenciarlas a los linajes con mayor demanda en ingeniería de tejidos es una práctica que va en aumento en los últimos años. En la literatura se reportan numerosos estudios de aislamiento de células madre cultivadas con el fin de diferenciarlas y usarlas en diferentes aplicaciones médicas (15).

Células madre de la pulpa dental (DPSCs) por sus siglas en inglés

La pulpa dental es un tejido conectivo liso que ocupa la cámara pulpar del diente y se origina en la papila dental embrionaria, posee un tejido ectomesenquimal, es uno de tejidos blandos del diente. La célula principal de la pulpa es el odontoblasto se originan de línea directa de las células de la cresta neural, razón por la cual tienen el potencial de diferenciación en diferentes tipos de células madre funcionales no asociadas con tejidos pulpares dentales (26). Las células de la pulpa dental están cubiertas y protegidas por tejidos dentales, que las aísla de la flora microbiana de la boca y les confiere ciertas características de esterilidad (27), su extracción es relativamente sencilla y no requiere de extracciones quirúrgicamente invasivas (28).

En particular, las células madre de la pulpa dentaria fueron extraídas por primera vez en el año 2000, a partir de terceros molares y sus estudios demostraron que poseen una alta capacidad proliferativa y son capaces de regenerar tejido mineralizado (29).
En estudios recientes llevados a cabo en roedores con defectos inducidos, se ha demostrado que el aislamiento y la caracterización de las células madre del ligamento

periodontal (PDLSCs) y la pulpa dental (DPCs) provenientes de humanos (**Imagen 4)** promete ser una fuente potencial en la regeneración de tejidos en la cavidad oral, ya que se encontraron células progenitoras que expresan marcadores de células madre postnatales, que pueden participar en procesos de reparación periodontal y son capaces de estimular la regeneración de hueso al tener la capacidad de diferenciarse a un fenotipo mineralizante (30); por lo que también tienen aplicación en la regeneración ósea craneofacial (31).

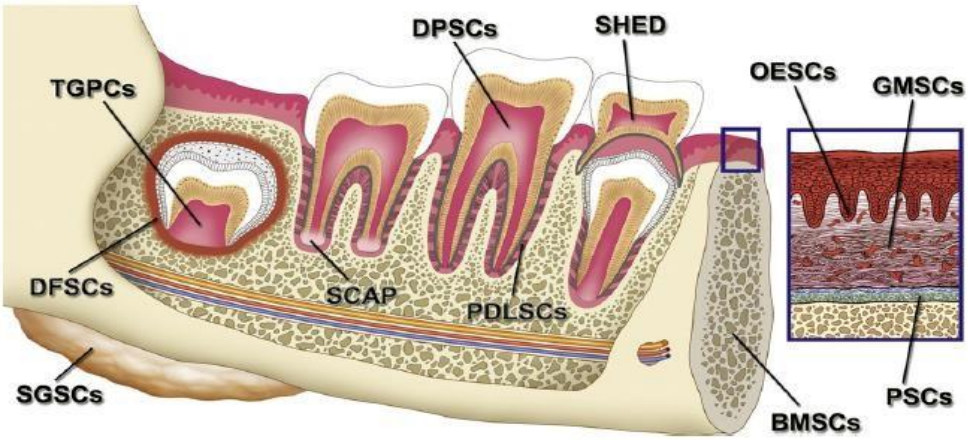

Imagen 4*.Estados de desarrollo del diente y células madre de los tejidos dentales.definición de los tipos de cálulas según sus siglas en inglés: TGPCs (células progenitoras de gérmenes dentales),DFSCs(células madre del folículo dental), SGSCs (células madre de las glándulas salivales) ,SHED (células madre de dientes deciduos exfoliados humanos), DPSCs (Células madre de la pulpa dental posnatal), PDLSCs (células madre del ligamento periodontal), células madre mesenquimales derivadas de hueso (BMSCs), SCAP (células madre de papila apical), GMSCs (células madre mesenquimales gingivales), PSCs (Células madre dentales posnatales). (Tomado de (27).*

Células Madre del ligamento periodontal (PDLSCs) por sus siglas en inglés

Las PDLSCs se pueden obtener del ligamento periodontal después de su separación de la superficie de la raíz. Se encuentran asimétricamente distribuidas y sus propiedades varían según su ubicación. Las células aisladas de la superficie del hueso alveolar tienen una mayor capacidad de proliferación y pueden regenerar mejor el hueso alveolar que las que se obtienen de la superficie de la raíz (31).

Las PDLSCs participaron en la regeneración del hueso alveolar, a partir de la formación de una capa fina muy similar al cemento; además, se encontraron fibras de colágeno que se asociaron al hueso alveolar próximo al periodonto regenerado (32). Adicionalmente, se ha reportado que las células madre provenientes de la pulpa dental tienen capacidad osteogénica y condrogénica, mientras que las del ligamento periodontal se pueden diferenciar en adipocitos, neuronas, músculo, hueso, células formadoras de colágeno y productoras de insulina (33)(30). Estas, también tienen características de célula madre mesenquimales y por eso son de gran interés para la regeneración periodontal (34). En la (**Tabla 2**) se pueden observar las principales características de las células madre provenientes del ligamento periodontal (12)(28).

Tabla 2. *Características de PDLSCs*

Célula madre	Características *in vitro*	Características *in vivo*	Referencias
	Multipotencialidad con capacidad de: Osteo/cementogénica Neuro/ adipogénica Condro/ miogénica Células productoras de insulina	Tejido similar al cemento Células similares a odontoblastos	(35)
	Marcadores de superficie celular Positivos	Marcadores de superficie celular negativos	(36)
PDLSCs	CD9 CD10 CD13 CD26 CD29 CD44 CD59 CD73 CD90 CD105 CD106 CD146 CD166 STRO- Nanog, Oct-4 Sox-2, Rex-1 SSEA-1 SSEA-3 SSEA-4 TRA-1-60 TRA-1-81	CD14, CD34, CD45, HLA-DR	(37)

Entre las características de este tipo de células, se encuentran su baja inmunogenicidad debido a la ausencia de moléculas coestimuladoras de células T y sus efectos inmunosupresores en las células B y T, permitiendo el uso de células madre del ligamento periodontal alogénicas en terapias regenerativas (38). También se ha demostrado que son varios los factores que regulan las propiedades de las PDLSCs, como: la edad del donante, el origen del cultivo, la afección inflamatoria y el método del cultivo (29), como se muestra en la (**Tabla 3**).

Tabla 3. *Factores que influyen en las propiedades de las PDLSCs*

Factor	Propiedad
Método de cultivo	Las PDLSCs cultivadas en α-MEM tienen mayores tasas de proliferación y mayor potencial osteogénico que las cultivadas en DMEM. Ya que el α-MEM es un medio con los componentes básicos, el DMEM, que es un medo mínimo esencial pero suplementado con L-Glutamina que es un aminoácido esencial y vitaminas adicionales que sirven como una fuente de energía importante para la propagación de las células (39)

Edad del donante	La capacidad de proliferación, migración y diferenciación disminuye, mientras avanza la edad del donante
Origen del cultivo	Las PDLSCs provenientes de dientes deciduos tienen mejor proliferación y potencial osteogénico y adipogénico que las provenientes de dientes permanentes.
Afección inflamatoria	PDLSCs provenientes de tejidos periodontales inflamados tienen una mayor proliferación, pero menor capacidad osteogénica y menor potencial de formación de cemento que las que provienen de tejidos sanos

En los últimos años, la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció una serie de criterios mínimos para el cultivo de células mesenquimales estos son: 1) Demostrar el aislamiento de células con morfología fibroblastoide de tipo adherente "*in vitro*" 2) Determinar la expresión de los antigenos CD105, CD73 y CD90, en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR e 3) Inducir la diferenciación "*in vitro*" de las Células Madre Mesenquimales en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos (9-11). Como las PDLSCs cumplen con estos requisitos, se pueden utilizar en terapias regenerativas. En primer lugar, cuentan con la capacidad de adhesión al plástico en condiciones normales de cultivo, expresan los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, y carecen de expresión de las moléculas de superficie CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79alpha o CD19 y HLA-DR y por último se diferencian en osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro* (32).

Con base en la descripción de las PDLSCs se han utilizado estas características en estudios comparativos con células mesenquimales derivadas de la médula ósea, la sangre del cordón umbilical y el tejido adiposo, mostrado similitudes en cuanto a la morfología fibroblastoide, la formación de CFU-F, la multipotencialidad de diferenciación y la expresión de un conjunto de proteínas de superficie típicas de estas células, Se demostró que los tres tipos de MSC inhiben la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en un grado similar, lo que sugiere que plantean un riesgo mínimo de iniciar una respuesta inmune alogénica cuando se administran in vivo. Estas características, la facilidad de colección, y las preocupaciones éticas mínimas con respecto a su uso sugieren que las PDLSCs son fuentes celulares adecuadas para la obtención de MSC (40)(41). En los últimos años, se ha ido avanzando en el trasplante de las PDLSCs y se trabaja en incrementar la proliferación y la capacidad de diferenciación mediante modificaciones a las condiciones de cultivo y la aplicación de factores de crecimiento. Pero a pesar de esto, aún se deben establecer pautas estándar para el cultivo y la identificación de este tipo de células(42) .

2.3 Criopreservación

Técnica empleada para conservar, mantener la viabilidad y la funcionalidad de: especímenes biológicos, células individuales y tejidos, por largos periodos de tiempo. Para esto se emplea nitrógeno líquido (-196 °C), a tan bajas temperaturas no hay reacciones biológicas y el metabolismo celular se encuentra en latencia, ya que el agua está en estado sólido. La criopreservación es una herramienta útil para la creación de bancos de células que pueden ser empleadas con fines investigativos y terapéuticos (43). Sin embargo, existe una necesidad inminente de establecer protocolos de criopresevación

que requieren medio de crecimiento con alto contenido de suero fetal bovino y un agente crioprotector que minimiza el estrés celular ocasionado por los esfuerzos de cizalla y la presión interna que se genera cuando el agua entra a la estructura celular y se solidifica, logrando así que se mantenga la tasa de viabilidad, proliferación, plasticidad celular y no se altere el fenotipo después de descongelar y cultivar las células criopreservadas(44).

Se pueden diferenciar tres tipos de crioprotectores: los azúcares (sacarosa, sucrosa, lactosa, glucosa), los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol) y el dimetil sulfóxido (DMSO) (referencias); este último es ampliamente empleado como agente crioprotector ya que puede penetrar los tejidos sin causar daño, lo cual podría estar relacionado con su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, debido a que su estructura se asocia con el agua, las proteínas, los carbohidratos, los ácidos nucleicos, las sustancias iónicas y otros constituyentes de los sistemas vivos (8).

2.4 Criogeles

Los criogeles son matrices que se forman a partir de soluciones de precursores poliméricos o monoméricos como el quitosano, la gelatina, el Polivinil Alcohol (PVA),Colágeno(45). Estos materiales tienen macroporos conectados entre sí, los cuales permiten el paso de sustancias y partículas a través de ellos y poseen, además, estabilidad química, mecánica y osmótica, haciéndolos materiales propicios para ser portadores de biomoléculas y células (46).La estructura típica del criogel se forma cuando los cristales, generalmente de hielo, son removidos por sublimación y dan lugar a estructuras porosas que reemplazan los lugares donde antes se encontraban los cristales (47). En general, los criogeles poliméricos tienen una superficie porosa y elástica que les permite inmovilizar células y portar enzimas (48). Los primeros reportes de la síntesis de criogeles son de los años 40 y sus estudios iniciales se enfocaron en comprender los mecanismos de síntesis, caracterización y arquitectura de los poros, demostrando que en lugar de agua también podían utilizar diferentes solventes como el formaldehído y el dimetilsulfóxido (46)(49).
Para obtener los criogeles se utiliza un sistema de congelación a una velocidad controlada, con el cual se busca obtener una estructura homogénea de cristales de hielo que se alinean en la dirección del congelado y, si estas muestras se sometieran al proceso de liofilización para secarlas, se obtienen macroporos ordenados. Este proceso de modelado con hielo se conoce como ISISA (ice segregation induced self-assembly) o autoensamblado inducido por segregación de hielo. Este método de síntesis es limpio y sencillo de realizar, además se forman numerosos poros que están conectados entre sí en un área (50).
Una de las principales características de los criogeles poliméricos es que hinchan cuando entran en contacto con un líquido y sirven de matriz, que además de retener el solvente, permite la difusión de algunas partículas del soluto en su interior. A este tipo de materiales se le puede modular sus características, tales como: la capacidad de hinchamiento, el módulo de Young y el grado de heterogeneidad. Es así como se pueden obtener materiales inteligentes que tienen similitud a los sistemas biológicos y, por este motivo, son de gran utilidad para aplicaciones biomédicas y para la ingeniería de tejidos (48). Sin embargo, para que sean útiles en este tipo de aplicaciones, deben ser biocompatibles es decir la interacción entre un dispositivo biomédico y los tejidos del paciente y expuestos al dispositivo y la duración de esa exposición no generará cambios o respuestas biológicas negativas o de rechazo(51) (52).

2.5 Criogeles de alcohol polivinílico (PVA)

Dentro de los criogeles poliméricos, se destacan los obtenidos a partir del alcohol polivinílico (PVA), el cual es un material sintético, biodegradable y con características de biocompatibilidad(53)(54) . Sus propiedades están ligadas a su grado de hidrólisis y peso molecular. Este, se sintetiza a través de la hidrólisis de acetato de polivinilo, por medio de polimerización por radicales libres de acetato de vinilo y se compone de un grupo alcohol secundario unido a una cadena de carbono lineal. El grupo alcohol permite la unión del hidrogeno y al estar en una solución acuosa, es capaz de producir un hidrogel con alto contenido de agua (**Imagen 5**) (55).

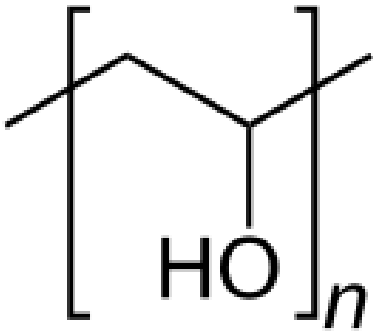

Imagen 5. *Estructura molecular del PVA*

Para lograr la formación de los criogeles de PVA se parte de una solución concentrada del polímero en medio acuoso y se somete a ciclos sucesivos de congelación y descongelación, en los que el agua se cristaliza, mientras el soluto queda en fase líquida. De esta manera, durante cada ciclo se fortalecen los puentes de hidrógeno intra e inter-moleculares de las cadenas del polímero, formándose una red porosa y estable a temperaturas entre 25 ºC y 37 ºC (48). Los ciclos de congelación y descongelación permiten un entrecruzamiento físico de las cadenas de PVA y son determinantes en las propiedades del material. Además, es una metodología que permite obtener materiales con propiedades mecánicas aptas para aplicaciones biomédicas como lentes de contactos, apósitos para heridas, liberación controlada de fármacos, catéteres, también se utilizado como andamio para cultivo celular (56)(46)(57).

Por otra parte, se debe considerar que las propiedades macroscópicas de estos criogeles poliméricos, dependen de parámetros, tales como: la concentración del PVA, el peso molecular del polímero, grado de hidrólisis del polímero y el número de ciclos de congelación/ descongelación (incluyendo su duración y temperaturas de trabajo). En 1975, Peppas describió los hidrogeles de PVA elaborados por el método de congelación y descongelación, al someter las soluciones acuosas de alcohol polivinílico a una temperatura de congelación de -20 ºC y, posterior descongelación a temperatura ambiente y observó que se formaron cristales en su estructura. Igualmente, encontró que la formación de estos cristalitos, dependía de la concentración de PVA y el tiempo de congelación y descongelación de las muestras; además, el tamaño de éstos depende del tiempo de congelación (58).

Partiendo de la variación en los parámetros que se mencionaron anteriormente, se pueden elaborar criogeles para necesidades específicas, que, en todos los casos, serán materiales viscoelásticos que en contacto con el agua se hinchan y están formados

por macro y micro poros, los cuales pueden ser usados para encapsular diferentes sustancias y microorganismos (59). Gracias a sus propiedades mecánicas, biocompatibilidad y su capacidad de imitar algunos tejidos blandos, estos materiales se han usado en la construcción de válvulas cardiacas, vasos sanguíneos y cartílagos, desde finales de los años ochenta (47).

Como se ha mencionado previamente, el control de ciertos parámetros en la formación de los criogeles de PVA permite la modulación de sus características, lo cual ha permitido que tenga ventajas con respecto a otros hidrogeles usados para aplicaciones biomédicas, tales como (58) :

a) Poseen una alta micro y macro porosidad que proporciona condiciones favorables para la transferencia de masa de sustratos y metabolitos.

b) Las características reológicas de las matrices son excelentes y permiten el uso de estos hidrogeles en la mayoría de los reactores en contraste con otros hidrogeles como el alginato, el agar, los carragenatos o la poliacrilamida que son frágiles.

c) Tiene una termo estabilidad mayor que la de otros hidrogeles usados como portadores de sustancias.

d) Son altamente resistentes a la degradación biológica.

Igualmente, para describir mejor el efecto de las diversas variables que se pueden manipular durante la formación de los criogeles de PVA, en Tabla 4 se resumen algunos aspectos que son de interés en la obtención de estos materiales (55):

Tabla 4. *Variables manipulables durante la formación de criogeles de PVA*

Peso molecular	El aumento del peso molecular hace que aumente el número y el tamaño de las regiones cristalinas, ya que la cadena polimérica, incrementa su longitud, por tanto, se obtiene geles más estables y rígidos, debido a que aumentan los grupos OH y se intensifican las interacciones con el agua, formando enlaces de hidrógeno (28).
Solvente	El uso de solventes en el procesamiento del PVA puede alterar las propiedades de los criogeles. Los solventes orgánicos como el DMSO, la glicerina, el etilenglicol, el propilenglicol y el alcohol etílico, proporcionan materiales con buena transmitancia de luz (60). Por su parte, el uso de DMSO proporciona transparencia a los criogeles de PVA, buena elasticidad y mayores tasas de gelificación, debido a que esta se produce sin separación de fases a temperaturas inferiores a los 20 ºC (61). Para aplicaciones biomédicas, es beneficioso que se adicionen sales o solventes en la preparación del criogel, porque finalmente estos se utilizan en un entorno que contiene electrolitos (40).

Concentración de la solución	Una concentración inicial alta produce una estructura con menos poros. Hassan y Peppas demostraron que concentraciones mayores, dan lugar a geles más estables y con un grado de cristalinidad mayor (62). Y por su parte, Lozinsky et al, demostraron que, al aumentar la concentración de PVA, aumenta la rigidez del criogel, debido a que hay más grupos hidroxilo presentes para realizar interacciones con el agua y se restringe el movimiento de las cadenas del polímero (63).
Ciclos de congelación – descongelación	Al aumentarse la velocidad de descongelación, se forman criogeles más rígidos y con mayor resistencia a la tracción, debido a que las cadenas poliméricas tienen más tiempo para agruparse y reorganizarse entre sí (64). Por otra parte, durante el secado se pueden modificar el grado de cristalinidad y el tamaño de los cristalitos. Durante un secado lento a temperatura ambiente, bajo diferentes humedades relativas, se aumenta la cantidad de polímero y se retarda la cristalización (65).

2.6 Aplicaciones en medicina regenerativa

Campo multidisciplinario relacionado con el reemplazo, la reparación o la restauración de órganos o tejidos lesionados. Surge de la necesidad de reconstrucción de tejidos que han sufrido daños por enfermedades, malformaciones, traumas o lesiones (66). La terapia con células madre tiene gran potencial en terapias regenerativas, ya que por sus características intrínsecas reparan y reemplazan las células dañadas en los organismos adultos, debido a esto la investigación con células madre es un campo prometedor con un atractivo potencial para la medicina regenerativa (67).

3. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

Para la ejecución del proyecto, se definieron tres etapas como se muestra en la **(Imagen 6)**. Los métodos empleados se describen en detalle en la siguiente sección.

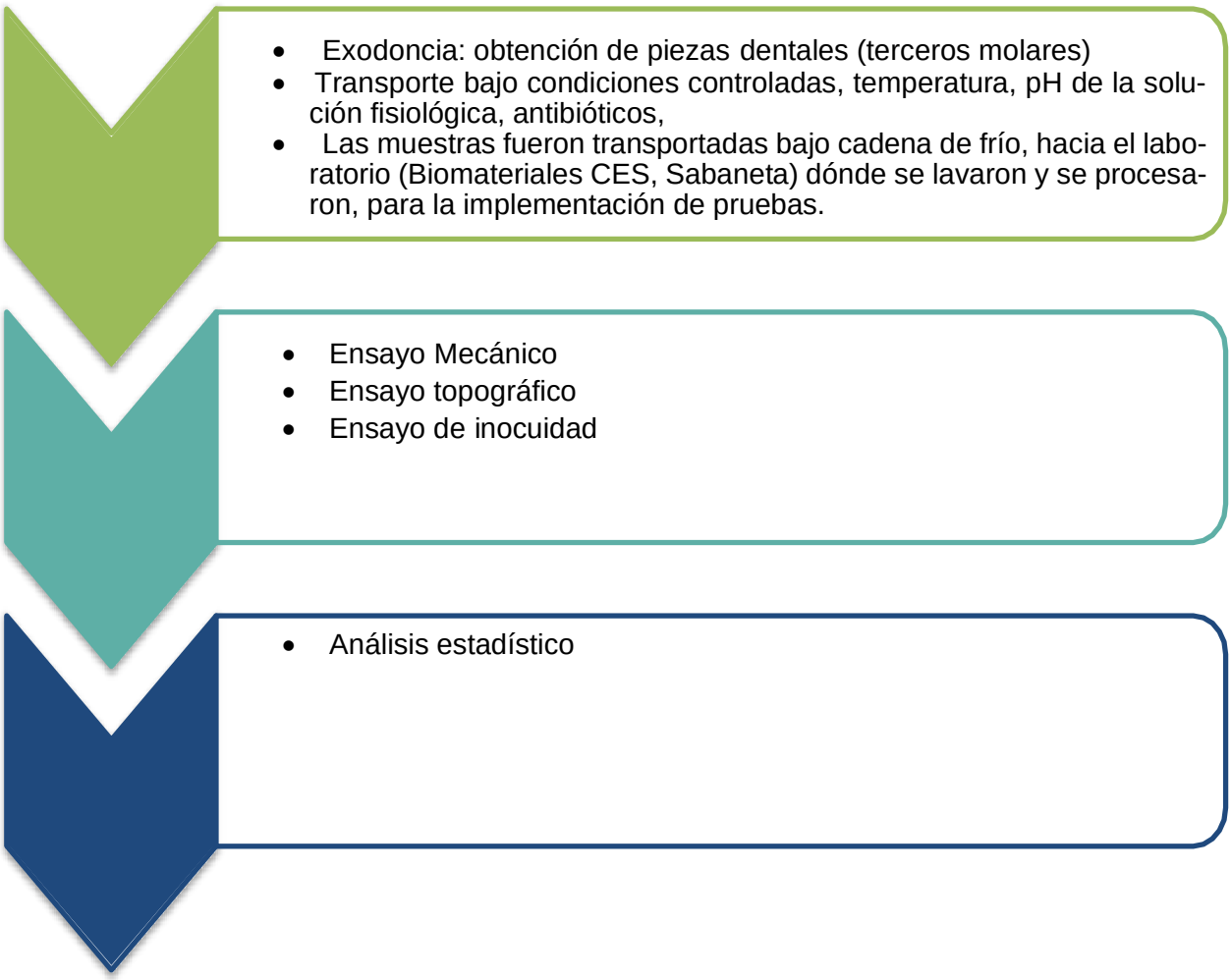

Imagen 6. *Actividades para la criopreservación de los terceros molares*

3.1 Obtención de piezas dentales

Las piezas dentales obtenidas para la realización de este estudio fueron terceros molares extraídos de diferentes personas que requerían de la cirugía de cordales. Este procedimiento se llevó a cabo en la Clínica *Smile*, con sede en los municipios de Caldas y Sabaneta (departamento de Antioquia, Colombia). Para esto, se definieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión de los molares

Piezas dentales terceros molares provenientes de pacientes hombre y mujeres, sin antecedentes de enfermedades sistémicas, con un rango de edad entre 18 – 30 años, morfológicamente normales, sin caries y sin compromiso pulpar o periodontal.

Criterios de exclusión de los molares

Los terceros molares que se fracturaron por la extracción o que presentaron lesiones asociados a la exodoncia.

Después de seleccionar los molares que cumplían con los criterios de inclusión propuestos, se definieron las condiciones de pruebas para el montaje de los ensayos, las variables consideradas fueron: tipo de criopreservante y tiempo de criopreservación (**Tabla 5**), todos los tratamientos fueron almacenados a -195,8 °C.

3.2.2 Técnica de anestesia y exodoncia

El procedimiento se dividió en las siguientes etapas:

- ***Pre-exodoncia:*** se verificaron los estadíos de Nolla que son etapas del desarrollo de diente, se establecieron que, por medio de una radiografía periapical, que emplearían los molares en un desarrollo entre (9 ó 10), ya que en estos estadios el nivel de la formación de la raíz está casi completa o completa.

- ***Exodoncia:*** se realizó una profilaxis dental con bicarbonato de sodio (Prophy- Jet, EEUU) a las piezas seleccionadas para la extracción y se procedió a la aplicación de anestesia infiltrativa superior o troncular inferior utilizando lidocaína (Ropsohn, Colombia) sin epinefrina. Después de la anestesia, se realizó sindesmotomía utilizando explorador #5, para rompimiento de fibras e inserciones ligamentosas entre el tejido blando y el diente y se procedió, con la luxación alvéolo- dental mediante la dilatación del hueso alveolar y el desgarro del ligamento periodontal, con elevador recto delgado y adaptación de los fórceps al diente. Posteriormente, se hicieron movimientos hacia la cortical más delgada con fuerza lenta y firme, sosteniendo por varios segundos y finalmente avulsión o remoción del diente del alvéolo.
- ***Post- exodoncia:*** se realizaron tres lavados del diente por centrifugación durante cinco en solución PBS, para remover detritos, restos de tejidos, glóbulos rojos y demás potenciales contaminantes.

3.2.3 Transporte

Una vez extraídos los terceros molares, se usó un tubo de 50 mL que contenía 5 mL de medio de transporte (sección 3.2.1) y fueron llevados en una nevera portátil con gel refrigerante a 4°C al laboratorio de Biomateriales Universidad CES Sabaneta, en un periodo no mayor a 4 horas, para su criopreservación y ejecución de las pruebas.

3.2 Preparación de soluciones de trabajo

La solución de PBS fue preparada en el laboratorio de Biomateriales de la Universidad CES, Sabaneta y usada para la limpieza de las piezas dentales con la ayuda de centrifugaciones, antes de someterlas a los diferentes ensayos. Esta se preparó según protocolo encontrado en el Anexo 1.

Medio de transporte

Se preparó medio de cultivo α-MEM (Caisson, EEUU) y se suplementó con 10 % de solución de antibióticos10,000 unidades/ mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B) (GMbiolab, Taiwán). El suplemento de antibióticos a este porcentaje, se realizó para minimizar la contaminación durante el transporte de las piezas dentales

Medio de almacenamiento

Para los tratamientos se adicionaron medio de cultivo estéril α-MEM (Caisson, EEUU), con L-glutamina, suplementado con 10 % de Suero Bovino Fetal (FBS) (Caisson, EEUU) y 1 % de solución de antibióticos (10,000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B) (GMbiolab, Taiwán).

Y solo para el caso de los tratamientos que contenían como criopreservante el polímero sintético (alcohol polivinílico), las soluciones fueron preparadas con PVA al 5 %p/v, a partir de la adición de PVA (99 % hidrólisis, PM 130 kDa) (Sigma-Aldrich, EEUU) en agua destilada, en medio de cultivo α-MEM (Caisson, EEUU), suplementado con L-glutamina, 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Caisson, EEUU) y 1 % de solución de antibióticos (10,000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B) (GMbiolab, Taiwán). A la solución final se le ajustó el pH a 7,1, utilizando como soluciones amortiguadoras Hepes y bicarbonato de sodio.

3.3 Obtención y almacenamiento de piezas dentales

3.2.1 Proceso de obtención de las muestras

Con la historia clínica de los pacientes y su respectiva radiografía, se procedió a realizar la selección de las personas que cumplían con los criterios de inclusión, para continuar con el proceso de extracción de las piezas dentales. A dichos pacientes, se les asignó una cita para explicarles el proyecto de investigación y solicitar su participación como donantes del residuo anatomopatológico; además, se les entregó el consentimiento informado para su lectura y si estaba de acuerdo, su posterior firma. Finalmente, se coordinó con el odontólogo Carlos Andrés Fernández la fecha del procedimiento para la exodoncia.

A continuación, se detalla la metodología establecida para la recolección de las muestras.

3.3 Criterios para almacenamiento y evaluación de los agentes criopreservantes

De las muestras transportadas se seleccionaron 51 terceros molares cabe aclarar que según la dificultad para la obtención de las muestras esta se realizó según la disponibilidad de pacientes donantes. Los 36 molares se distribuyeron en 12 grupos con diferentes condiciones de criopreservación (que variaban el tipo de criopreservante y tiempo de congelación) (**tabla 5**) al final el tiempo establecido según cada tratamiento, lo molares se sometieron a las pruebas mecánicas y topográficas y 15 para hacer pruebas piloto de los ensayos biológicos.

Tabla 5. Condiciones de pruebas y variables contempladas para el montaje de ensayos de criopreservación.

Factores	Niveles
Controles	Molar seco
	Molar recién extraído
Agente criopreservante	Sin criopreservante
	Medio de cultivo α-MEM
	DMSO 10% V/V+ medio de cultivo
	PVA 5% P/V+ medio de cultivo
	DMSO10% V/V+PVA5% P/V+ medio de cultivo
Tiempo de criopreservación	15 días
	30 días

La combinación de los factores y niveles definidos condujo a doce tratamientos como se muestra en la (**Imagen 7)** que fueron realizados por triplicado y a los cuales se les adicionó medio de cultivo para mantener la vitalidad de los tejidos. Finalmente, todas las muestras fueron llevadas a crioviales para su criopreservación y almacenamiento en nitrógeno líquido. Transcurridos 15 y 30 días, las muestras se sacaron del nitrógeno, se descongelaron a 37 ºC. Adicionalmente, se definieron dos grupos control constituidos por dientes en seco (sin ningún tratamiento) y tres dientes post - extracción (inmersos en el medio de transporte, sección 3.1) estos no se sometieron a procesos de criopreservación, sino que se contemplaron como dos grupos de partida en tiempo 0 para conocer las condiciones iniciales de los molares. se realizaron las pruebas mecánicas y topográficas por medio de un muestreo destructivo.

Las muestras que contenían PVA, se entrecruzaron por el método de congelación/descongelación de la siguiente manera, se almacenaron durante seis horas a 4ºC, posterior se sometieron a -20 ºC durante seis horas, el proceso se repitió dos veces para completar dos ciclos de congelación/descongelación.Después del entrecruzamiento del PVA, se inició un proceso gradual de criopreservación inicialmente congelando a -20°C durante 2 horas y posterior a esto congelando a -80 °C por otras 2 horas.

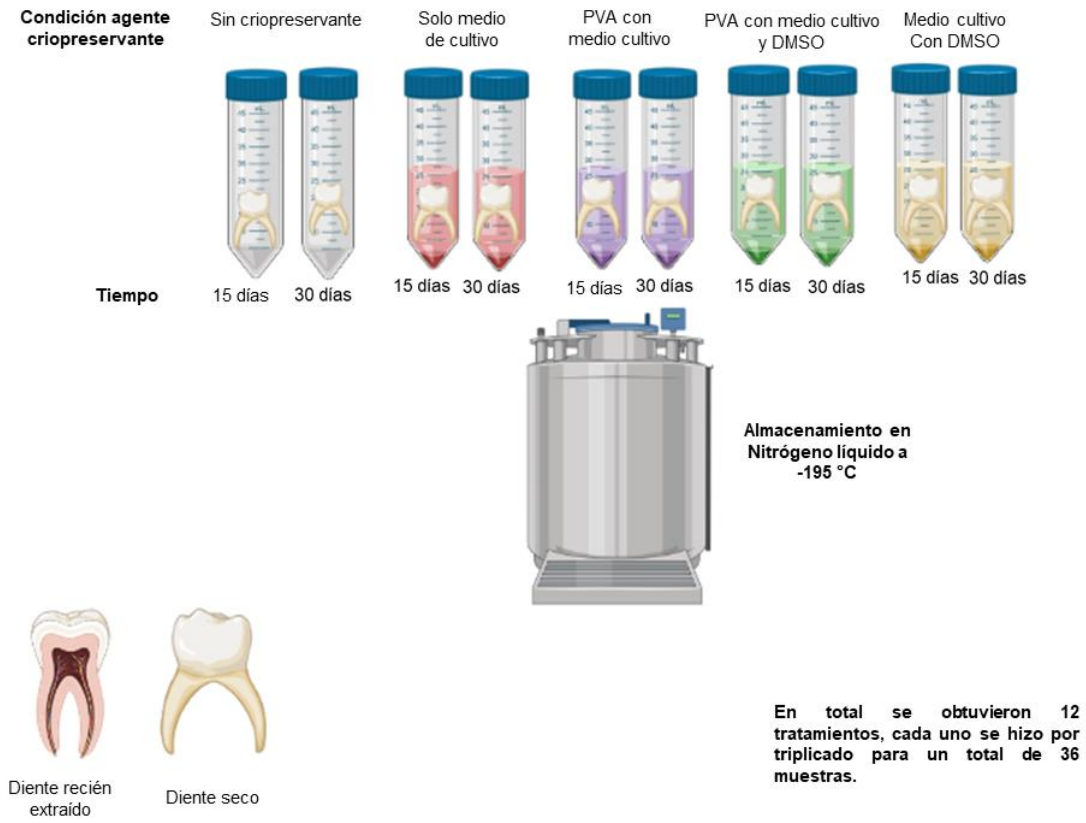

Imagen 7. *Tratamientos y condiciones establecidas para el ensayo*

3.4 Ensayos de caracterización

3.4.1 Medidas de las piezas dentales

A cada pieza dental se le tomaron tres medidas antes para determinar el tamaño de las superficies y poder realizar posteriormente los cálculos en las pruebas mecánicas. Estas medidas estaban comprendidas por la distancia desde la corona hasta la raíz (DCR), la distancia mesiodistal (DMD) y la distancia vestíbulo lingual (DVL) de cada diente y corona, por medio de un calibrador digital, como se muestra en la (**Imagen 8**).

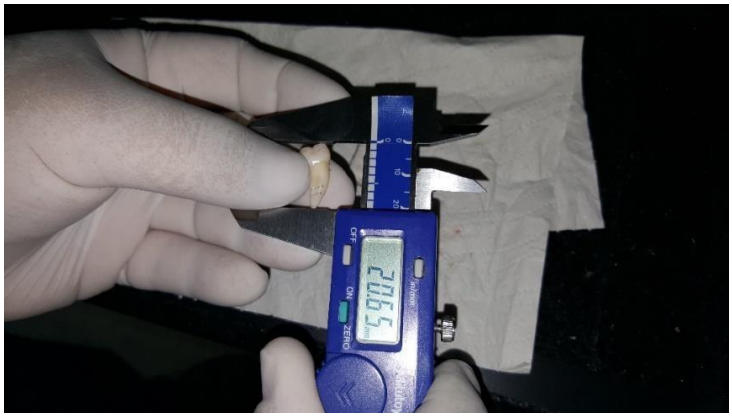

***Imagen 8**. Mediciones de las piezas dentales (fotografía fuente propia.*

Adicionalmente, se evaluó la morfología del diente por medio de estereoscopia óptica, usando un estereoscopio NIKON SMZ1000 (Nikon, Japón). Todo el sistema fue asistido por un software para análisis de imágenes, llamado NIS ELEMENTS 3.1 de NIKON y por un calibrador digital, con el fin de observar parámetros de apariencia de los dientes como: el número de fisuras previas y posteriores a la criopreservación y sus respectivas densidades.

3.4.2 Evaluación mecánica

Se realizaron pruebas de compresión simple, utilizando una máquina universal de ensayos INSTRON 3345 (Instron, EEUU) (imagen 9), con una celda de carga de 5000 N ± 0,025 N, a una velocidad de 0,5 mm/min, siguiendo una metodología realizada por Panighi, et al (57). Con esta prueba se obtuvieron variables como: la resistencia a la compresión y el módulo de elasticidad.

Las pruebas mecánicas del efecto del tratamiento sobre los molares criopreservados a diferentes tiempos, se calcularon según la **ecuación 1.**

$$\sigma = \frac{F}{A_P}$$

Ecuación 1: cálculo de la resistencia a la compresión

Donde, $\boldsymbol{\sigma}$ es la resistencia a la compresión en MPa, $\boldsymbol{F}$ es la carga de falla y $\boldsymbol{A_p}$ el área (proyectada) de falla medida en el diente. La energía de deformación fue hallada directamente por el software Blue Hill (INSTRON 3345, EEUU).

Donde, $\boldsymbol{\sigma}$ es la resistencia a la compresión en MPa, $\boldsymbol{F}$ es la carga de falla y $\boldsymbol{A_p}$ el área (proyectada) de falla medida en el diente. La energía de deformación fue hallada directamente por el software Blue Hill (INSTRON 3345, EEUU).

El módulo de elasticidad se calculó en función de la pendiente de la curva *fuerza vs desplazamiento*, obtenida mediante el software Blue Hill de INSTRON®, así como la longitud original (expuesta) del diente L_O y A_p, a partir de la (**Ecuación 2)**:

$$\boldsymbol{E} = \frac{\boldsymbol{pendiente} \times \boldsymbol{L_O}}{24}$$

$$A_p$$

Ecuación 2. módulo de elasticidad y la resistencia de compresión promedio para los diferentes grupos de dientes.

Imagen 9*. Montaje para la prueba mecánica*

El montaje para la prueba de compresión que se observa en la (**Imagen 10**). constó de un sistema de sujeción, una mordaza y un soporte con fondo. De esta forma, se midió la carga de falla. El área de fractura para el cálculo de la resistencia a la compresión se midió mediante imágenes, usando un estereoscopio NIKON SMZ 1000 (Nikon, Japón), con un software de análisis de imágenes NIS ELEMENTS 3.1 (Nikon, Japón).

Imagen 10*. Montaje para la prueba mecánica*

3.4.3 Evaluación topográfica

Con el fin de evaluar la morfología de la superficie de las piezas dentales sometidas a los diferentes tratamientos y observar el efecto que originaba el proceso de criopreservación en el esmalte y la dentina, se usó un estereoscopio NIKON SMZ1000 (Nikon, Japón) y el software para análisis de imágenes, NIS ELEMENTS 3.1 (Nikon, Japón). Después de obtener las estereoscopías se buscaron tres tipos de fracturas: inducida (generada por la carga de los ensayos mecánicos), térmica (debida al proceso de criopreservación) y mecánica antigua (generada por el proceso de masticación o por la extracción de las piezas), con el fin de identificar las posibles grietas generadas en los terceros molares.

De igual manera, con el propósito de confirmar los hallazgos por estereoscopía, se evaluaron 36 piezas a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) a un voltaje de aceleración de 15 kV, con módulo de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), en un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL JSM-6490LV (JEOL, Japón). Todas las muestras fueron deshidratadas y recubiertas con una fina capa de oro, en una cámara con atmósfera de argón al vacío Desk IV (Denton vacuum, EEUU).

3.4.4 Evaluación del crecimiento celular en cultivo de monocapa

Para verificar la presencia de células que se pudieran extraer después del proceso de conservación en los diferentes medios, se utilizaron 18 piezas dentales con triplicados para cada grupo, para esta prueba no se tuvo en cuenta el grupo “diente seco”, lo demás grupos (**ver tabla 5**) sirvieron como muestras para aplicar un método de extracción y cultivo celular. Se realizaron tres lavados sucesivos con PBS estéril para remover exceso de criopreservante. El cultivo en monocapa se hizo por medio de explantación, en el cual se removió una parte del tejido con un bisturí y se depositó en un plato para cultivo celular T25 que contenía medio de cultivo α-MEM, suplementado con FBS 10% y antibiótico al 1%. Los platos fueron incubados durante ocho días en atmosfera húmeda a 37°C con 5% de CO_2. Transcurridos los ocho días, los platos de cultivo se observaron en el microscopio óptico invertido, se verificó la morfología y adhesión a la superficie del plato.

3.5 Registro de datos y análisis estadístico

Los datos obtenidos se registraron en formularios físicos y posteriormente, se almacenaron en una base de datos y fueron procesados con Microsoft Excel. Para el análisis de los diferentes resultados se analizó en el programa Minitab 19, a partir de ANOVA gráficos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Pruebas de los terceros molares

En la primera etapa del proyecto se recolectaron los terceros molares de donante que firmaron el consentimiento informado (Anexo 2), de acuerdo con la norma 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Algunas piezas dentales se destinaron para pruebas preliminares de extracción de células y validación de procesos, otras 36 se usaron para los ensayos mecánicos y topográficos, y 15 molares para las pruebas biológicas (solo los grupos con criopreservantes, como grupos de interés).
El diente, por su naturaleza mineral, biológica y por función, es un material excesivamente variable que presenta dificultades a la hora de adquirir las muestras suficientes y con una calidad aceptable para realizar experimentos *in vitro*, pues su composición y propiedades fisicoquímicas se adaptan a la función punto por punto y además sus características varían según la historia particular de cada paciente (68). Factores como la edad, la genética, la nutrición, la presencia o ausencia de microelementos, los hábitos alimenticios, patologías, etc., afectan sus propiedades y características (23). Por esta razón al ser los dientes muestras extraídas de pacientes donantes, es difícil contar con muestras homogéneas para los procedimientos aplicados en este trabajo, por lo que la variabilidad y las deviaciones halladas en los resultados pueden ser altas. Las medidas realizadas evidencian que los terceros molares tienen tamaños y formas diversas, todas las pruebas parten de muestras heterogéneas lo que explica la variabilidad de algunos de los datos obtenidos producto de la investigación.

Las muestras fueron almacenadas según cada tratamiento y se suplementaron con medio de cultivo α-MEM, este es un medio esencial mínimo para el cultivo de células adherentes, que contiene rojo fenol como indicador de pH, presentando cambios de colores aparentes según el pH: fucsia pH básico, rojo pH neutro y amarillo cuando el pH está ácido. Este parámetro es de gran importancia para preservar la viabilidad celular, ya que estas son muy sensibles a la variación del pH y para su correcto desarrollo en cultivo *in vitro* el pH óptimo es de 7.0. Al descongelar las muestras de cada tratamiento evaluado en este trabajo, se observó que el indicador de pH del medio de cultivo en las muestras que contenían PVA como agente crioprotector, viró a un color amarillo, indicando acidificación del medio de cultivo, al registrar el pH de estas muestras, se registró en 4.0. A diferencia de los otros tratamientos que presentaban un color rojo y mostraban según el indicador buenas condiciones de pH en promedio 6.9 (**Imagen 11**).

El pH es un aspecto supremamente importante en el ambiente intracelular, cambios en el pH ocasionan efectos en los procesos celulares fundamentales como: el metabolismo, el potencial de membrana, el crecimiento y la proliferación celular. El cambio del pH intracelular, esta mediado como una respuesta a agentes celulares externos como los factores de crecimiento, las hormonas, las sales a través de la acción de intercambios iónicos de H^+ y la acción de bombas de Na^+. Los procesos celulares funcionan de forma óptima en un estrecho rango de pH neutral 7.0, en este pH los iones H^+ están en equilibrio a través de la membrana y en el citoplasma celular. Cuando el pH del medio de cultivo es ácido tiene un efecto citotóxico ya que no existe un equilibrio en la cantidad de H^+ liberados en el citoplasma producto la acidificación producida por los ácidos liberados en los procesos metabólicos de la célula (69), si el medio externo es acido no ayuda a amortiguar el pH citoplasmático a través de la actividad de los transportadores de membrana, de esta forma los procesos celulares se ven impedidos (70). La acidificación del medio de cultivo según el indicador de pH solo se evidenció en las muestras que contenían PVA después del proceso de descongelamiento, lo que puede ser ocasionado por una reacción química entre el PVA y iones contenidos en el medio, además de la ausencia de tampones amortiguadores de pH **(Imagen 11).**

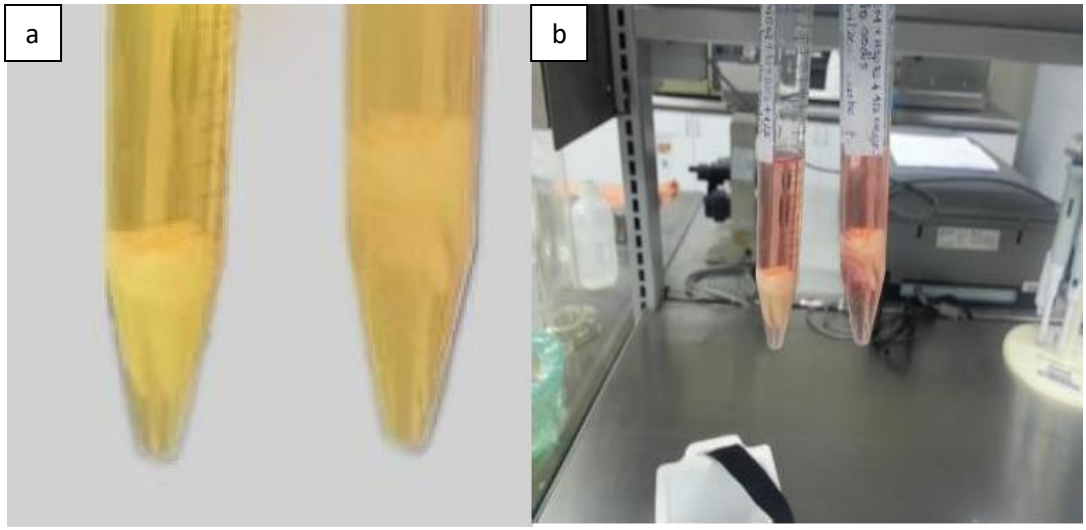

Imagen 11. *Cambio de color dado por el indicador de pH en los medios a. medio que contenía PVA de color amarrillo que indica acidificación. b. medio de cultivo solo color rojo que indica que el pH se conserva.*

4.2 Medida de los terceros molares y determinación de fisuras

Las muestras sometidas a las diferentes pruebas fueron muy variables y heterogéneas en las medidas del área bucal, mesial, lingual y distal, esto debido a los factores como: edad, la genética, la nutrición, los hábitos, consumo de medicamentos o patologías asociadas a los donantes. Además, en un proceso de criopreservación hay unos factores intrínsecos asociados como: el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y/o el tejido, pues este proceso es afectado por diferentes variables como la permeabilidad celular, el volumen osmóticamente inactivo y la relación superficie/área de la célula, la cual es variable de acuerdo a la especie, tipo y estadio de la muestra a congelar (71). Para el análisis de resultados se cambió el nombre de cada tratamiento (variable cualitativa nominal), y se le dio un valor numérico en orden según cada tratamiento como se muestra en la (**Tabla 6).**

Tabla 6. *Denominación numérica de cada tratamiento evaluado*

Denominación	Tratamiento
1	Molar Seco control tiempo 0
2	Molar recién extraído control tiempo 0
3	Sin criopreservante 15 días
4	Sin criopreservante 30 días
5	Medio de cultivo α-MEM 15 días
6	Medio de cultivo α-MEM 30 días
7	DMSO 10% V/V+ medio de cultivo 15 días
8	DMSO 10% V/V+ medio de cultivo 30 días
9	PVA 5% P/V+ medio de cultivo 15 días
10	PVA 5% P/V+ medio de cultivo 30 días
11	DMSO10% V/V+PVA5% P/V+ medio de cultivo 15 días
12	DMSO10% V/V+PVA5% P/V+ medio de cultivo 30 días

La fase mineral del diente contiene varios tipos de minerales fosfato, predominando el fosfato de calcio en forma de hidroxiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$], otros fosfatos de calcio y magnesio fosfatos estos pueden o no estar en asociación con la apatita. En el esmalte y la dentina predominan cristales de hidroxiapatita. El esmalte está conformado por una matriz inorgánica (96 %w/w) y constituyentes orgánicos (proteínas y lípidos) y 4% de agua, en el esmalte la hidroxiapatita tiene una estructura hexagonal (referencias). La dentina madura está compuesta por 70% de minerales, 20 % w/w de matriz inorgánica y 10 % w/w de agua, los cristales de hidroxiapatita en la dentina están dispuestos en forma de placas planas con aproximadamente 60-70 nm de largo, 20-30 nm de ancho y 3-4 nm de grosor. Las temperaturas de ultra congelación con nitrógeno líquido (-195 ºC) empleadas en los procesos de criopreservación, pueden generar fisuras por fatiga térmica y alterar la configuración de la hidroxiapatita en la dentina y el esmalte, por esta razón es importante que el agente criopreservante empleado disminuya los efectos negativos y proteja la pieza dental de fracturas (71)(72). Sin embargo, el proceso de exodoncia puede generar fisuras, por eso determinaron cuántas fisuras tenía el diente antes del proceso y cuántas se generaron únicamente en la criopreservación a partir de ensayos de estereoscopía, para establecer cuán efectivos son los tratamientos evaluados en este trabajo. Los dientes almacenados sin medio sufrieron menor número de fracturas después de 30 días de criopreservación, seguido de los molares con DMSO, DMSO con PVA y PVA, por la distribución de las barras y con una confianza del 95% se puede concluir que las medias del tratamiento (DMSO, DMSO+PVA y PVA) no presentan diferencias estadísticamente significativas (**Figura 1**). Sin embargo, los molares almacenados con PVA, presentan el menor número de fisuras, lo que podría indicar el que PVA está disminuyendo la fatiga térmica en los molares, ya que al congelar el PVA forma un hidrogel alrededor de las piezas dentales, lo que va a proteger la estructura mineral del esmalte y la dentina, y va a disminuir las pérdidas de agua al interior de estas (73).

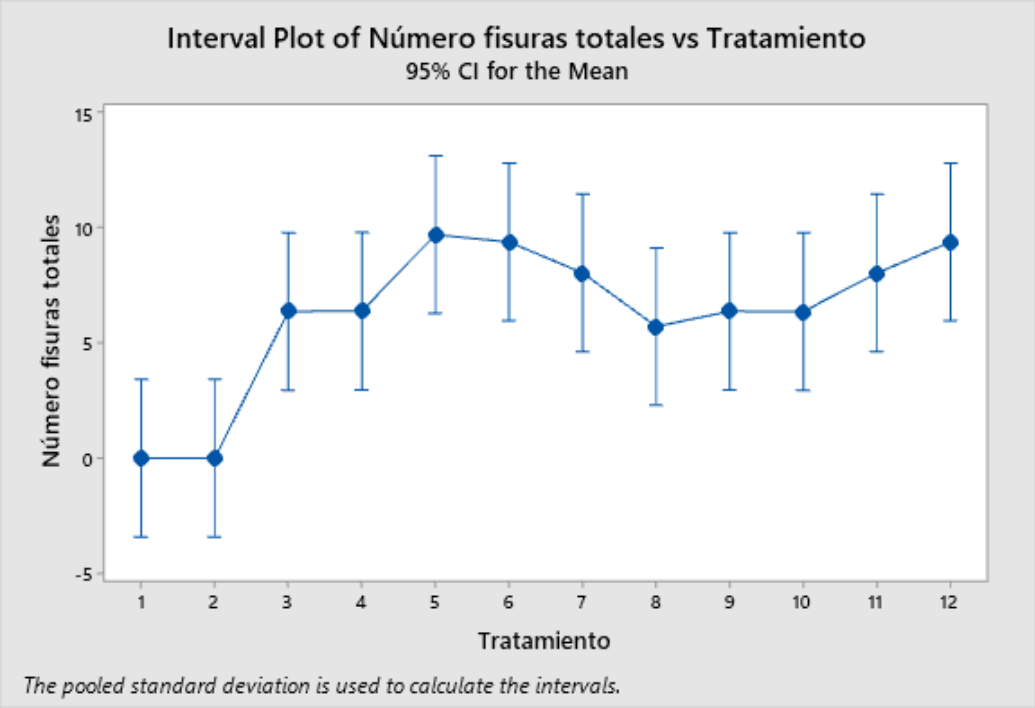

Figura 1. *Numero de fisuras después del proceso de criopreservación con cada tratamiento evaluado*

Las pruebas mecánicas realizadas muestran que a pesar de que las piezas dentales que contenían DMSO por 15 días fueron las que presentaron mayor módulo de elasticidad y soportaron mayores cargas de compresión y deformación entre todos los grupos, fueron las que presentaron la mayor variabilidad de todos los tratamientos, con una desviación estándar más alta comparada con las demás (**Figura 2**). El módulo de Young del PVA fue más bajo respecto al DMSO por el efecto que generó el pH ácido en la estructura del diente, produciendo un grabado ácido que genera desmineralización de la dentina y el esmalte produciendo una estructura porosa o microretenciones, que le quitan resistencia mecánica y hacen que la pieza sea más frágil a la hora de aplicar soportar una fuerza. Adicionalmente, a pesar de que el uso de solventes en el procesamiento del PVA como el DMSO, proporciona buena elasticidad (34), este complejo también se vio afectado de alguna manera por el PVA, aunque presentó mayor rigidez que el tratamiento de medio con PVA a los 15 días.

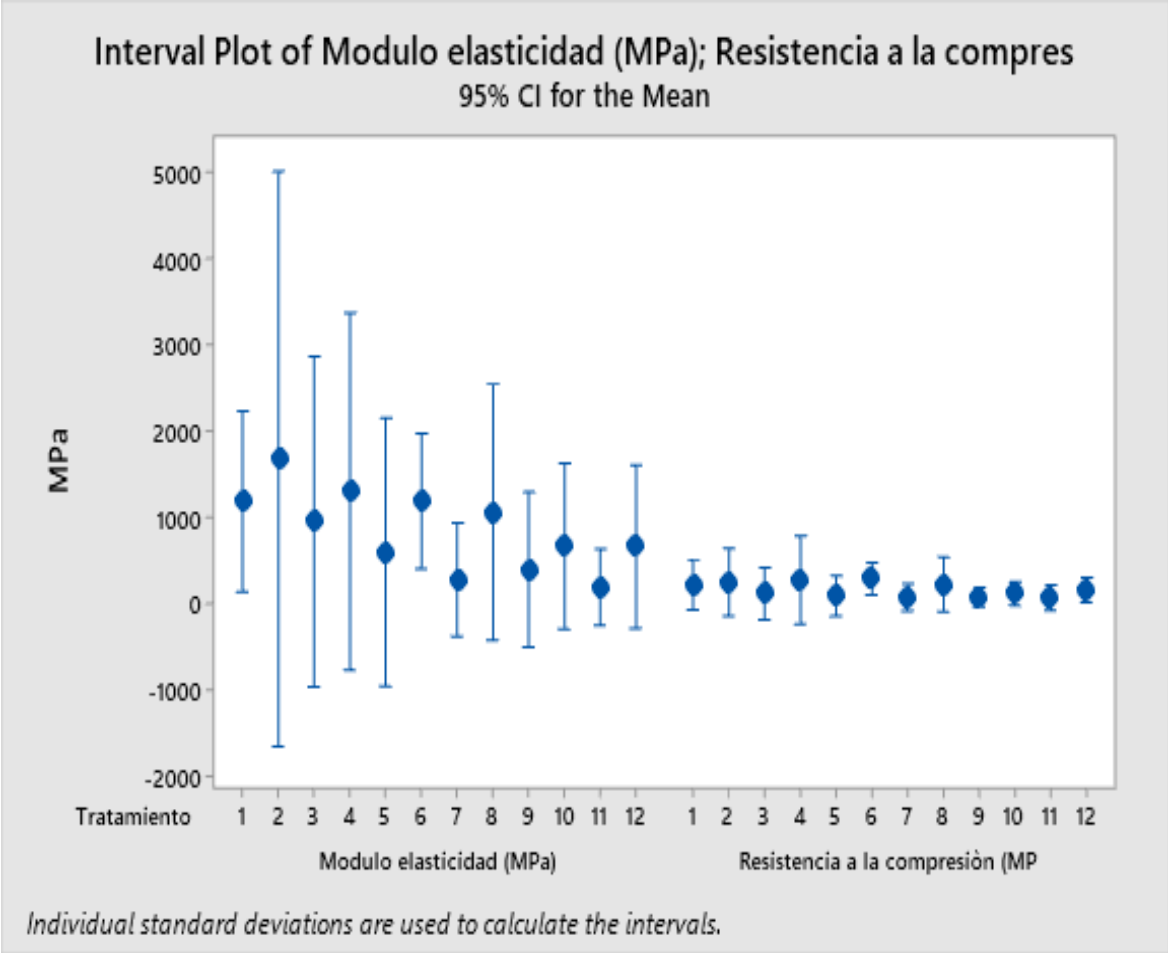

***Figura 2**. Comparación del módulo de elasticidad y Resistencia a la compresión.Las barras representan la media y de dispersión de las tres réplicas de cada tratamiento.*

4.1.2 Prueba topográfica

Los resultados de las pruebas topográficas realizadas a las diferentes piezas dentales se resumen en la (**Tabla 7**). En esta, se encuentran los grupos de dientes en sus diferentes tratamientos y el tipo de falla que se identificó (térmica: debida a efectos de la criopreservación, inducida: generada por la maquina universal de ensayos y mecánica antigua: derivada del proceso de masticación) luego de que se realizaron las pruebas mecánicas. Adicionalmente, se presenta la cantidad de cada tipo de fractura, observada tanto en el esmalte como en la dentina en cada muestra estudiada.

Como los ensayos mecánicos se hicieron sobre la corona y la falla mecánica generada por la maquina universal de ensayos llegaba hasta la dentina, las regiones de interés fueron la dentina y el esmalte, como parte interna y externa de la sección estudiada; además, la información en ambas regiones era importante, porque mostraba cómo se comportaba cada una de estas frente a los ensayos.

***Tabla 7**. Resultados de la prueba topográfica*

Grupo de dientes	***Tipo de fractura en el esmalte***	***N° de fractu-ras en Es-malte***	***Tipo de fractura en la dentina***	***N° de fracturas en den-tina***
Secos	Inducida	1	Inducida	1
Secos	Inducida	1	Inducida	2
Secos	Inducida	4	Inducida	1
	Mecánica antigua	4	Mecánica antigua	2
Recién extraído	Inducida	2	Inducida	3
	Mecánica antigua	10		
Recién extraído	Inducida	1	Inducida	4
		-	Mecánica antigua	2
Recién extraído	Mecánica antigua	1	Inducida	2
	-	-	Mecánica antigua	2
	Inducida	2	Inducida	2
Sin medio de transporte 15 días	-	-	Mecánica antigua	1
Sin medio de transporte 15 días	Mecánica antigua	3	Inducida	1
Sin medio de transporte 15 días	Inducida	4	Inducida	1
	Térmica	1	Térmica	1
Sin medio de transporte 30 días	-	-	Inducida	6
Sin medio de transporte 30 días	Inducida	1	Inducida	4
	Mecánica antigua	1	-	-
Sin medio de transporte 30 días	Térmica	2	Inducida	7
	-	-	Térmica	1
En medio 15 días	Inducida	4	Inducida	7
	Mecánica antigua	1	-	-
En medio 15 días	Mecánica antigua	4	Inducida	1
En medio 15 días	Mecánica antigua	3	Inducida	6
En medio 30 días	Mecánica antigua	1	Inducida	5
	-	-	Térmica	1
En medio 30 días	Mecánica antigua	2	Inducida	1
En medio 30 días	Inducida	11	Inducida	1
	-	-	Térmica	1

Medio + DMSO 15 días	-	-	Inducida	2
Medio +DMSO 15 días	Inducida	8	Inducida	1
Medio +DMSO 15 días	-	-	Inducida	2
Medio + DMSO 30 días	-	-	Inducida	1
Medio +DMSO 30 días	Inducida	6	Inducida	1
Medio + DMSO 30 días	Inducida	1	Inducida	2
Medio + PVA 15 días	Inducida	1	Inducida	2
	Térmica	1	Inducida	1
Medio + PVA 15 días	inducida	7	Inducida	2
	Térmica	1	-	-
Medio + PVA 15 días	Inducida	1	Inducida	1
	Mecánica antigua	3	-	-
Medio + PVA 30 días	Inducida	2	Inducida	3
	Mecánica antigua	1	-	-
Medio + PVA 30 días	-	-	Inducida	1
	-	-	inducida	1
Medio + PVA 30 días	Inducida	2	Inducida	7
Medio + PVA + DMSO 15 días	Inducida	4	Inducida	1
Medio + PVA + DMSO 15 días	Inducida	5	Inducida	1
Medio + PVA + DMSO 15 días	Inducida	1	Inducida	1
Medio + PVA + DMSO 30 días	Inducida	2	Inducida	2
Medio + PVA + DMSO 30 días	Inducida	3	Inducida	1
	Mecánica antigua	6		
Medio + PVA + DMSO 30 días	Inducida	2	Inducida	5

En las imágenes adquiridas por SEM (microscopía electrónica de barrido) se lograron diferenciar cuatro patrones de fallas, que se pueden apreciar en las imágenes mostradas desde la Imagen 12 hasta la Imagen 19.

En la (**Imagen 12**), se muestra una micrografía en la que se observa un patrón continuo de falla, tanto en el esmalte como en la dentina, que se propaga de manera regular a

lo largo de la sección de la muestra. Este tipo de patrones, se asocian con fallas mecánicas inducidas al diente recién extraído, generadas por una carga y se visualizan como fracturas únicas y dominantes (59)

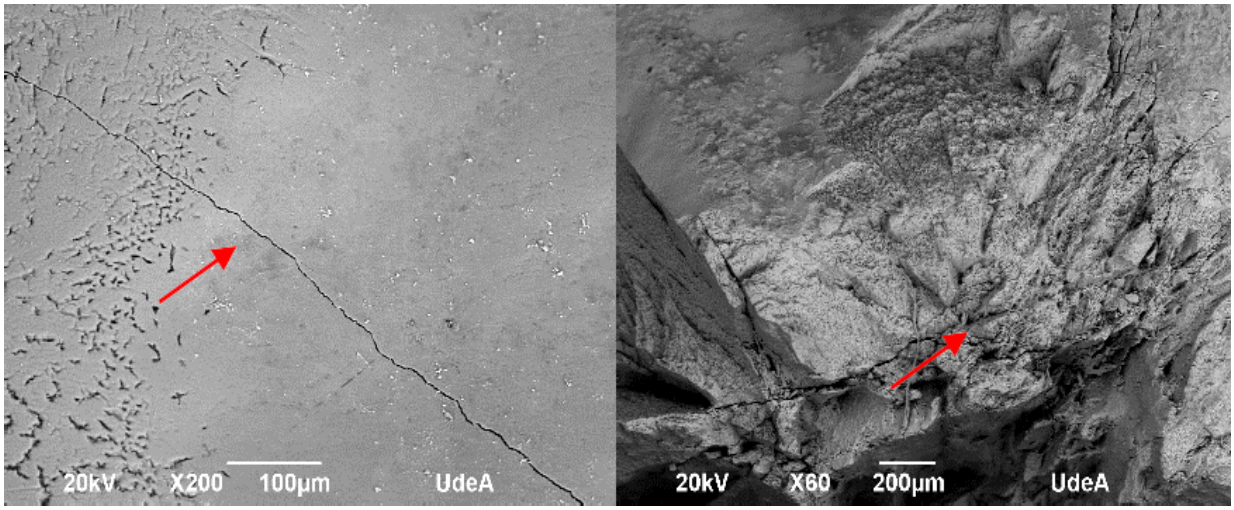

Imagen 12. *Falla inducida en esmalte.* *Falla inducida en dentina*

A diferencia del patrón que se forma en la falla inducida, en la térmica se pueden apreciar variaciones en el nivel del tejido alrededor de una región en los dientes fueron almacenados sin criopreservante, causada por las dilataciones térmicas debidas al ingreso de agua al tejido como lo muestra la (**Imagen 13**).

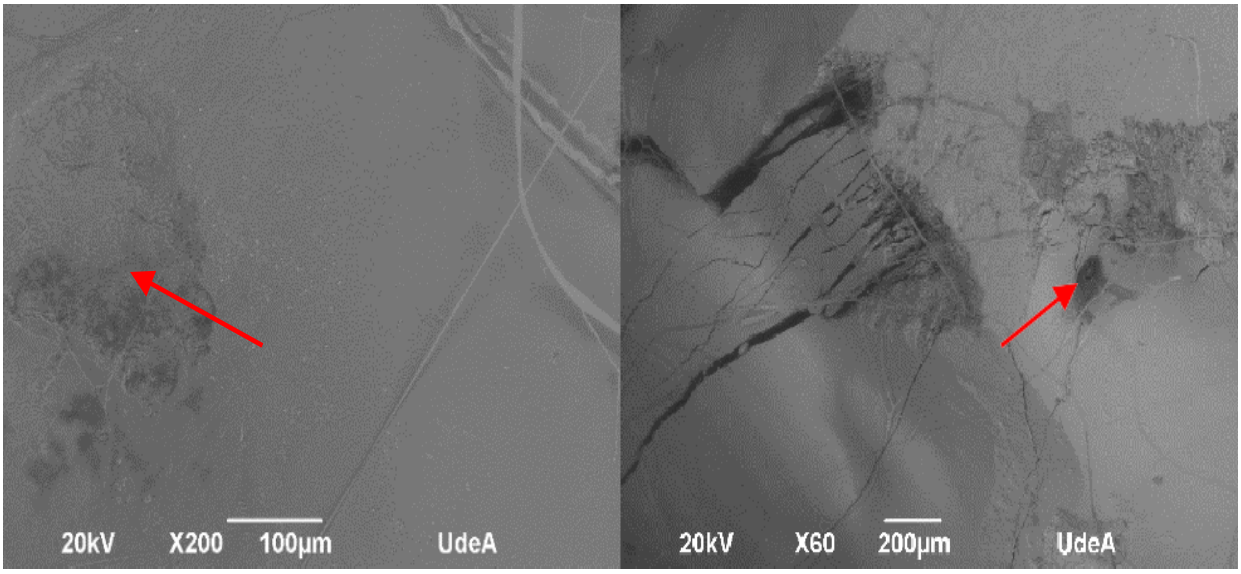

Imagen 13. *Falla térmica en esmalte.* *Falla térmica en dentina (tratamiento diente recién extraído).*

Los grupos que contenían DMSO y su mezcla con PVA, no presentaron fallas de tipo térmico, ya que los agentes protegieron la integridad mineral, demostrando su acción en la criopreservación de las piezas dentales. A pesar de esto, el grupo con PVA sí, presentó fallas térmicas en el esmalte, no logrando proteger completamente todos los molares, debido posiblemente al medio ácido que se observó cuando estos dientes se descongelaron, lo que alteró la estructura del diente y la composición celular. Por otra parte, en otras imágenes **(Imagen 14**) se observaron pequeñas grietas, poco profundas, que estaban en diferentes direcciones y regiones del diente, que no correspondían a los patrones observados en las fallas anteriores, lográndose apreciar una clara diferenciación entre estos perfiles y los otros, por lo que se asocian a fisuras que se generaron por las fuerzas ocasionadas en la masticación y correspondían a fallas mecánicas antiguas, con aspecto de surcos, sin ramificaciones (74).

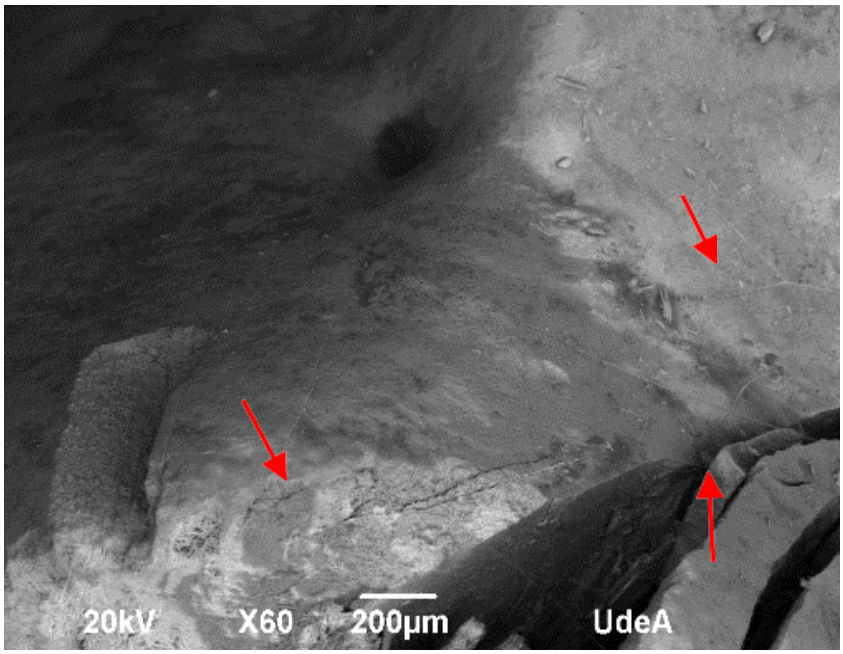

Imagen 14. *Falla mecánica antigua en esmalte (tratamiento diente seco)*

Sin embargo, se logró apreciar un patrón adicional de falla que no se había considerado previamente, en el que se observa un desgaste en la superficie, similar al patrón de “panal de abeja” (diente desmineralizado por abrasión del ácido en las muestras que PVA) reportado en la literatura (62) (**Imagen 15**).

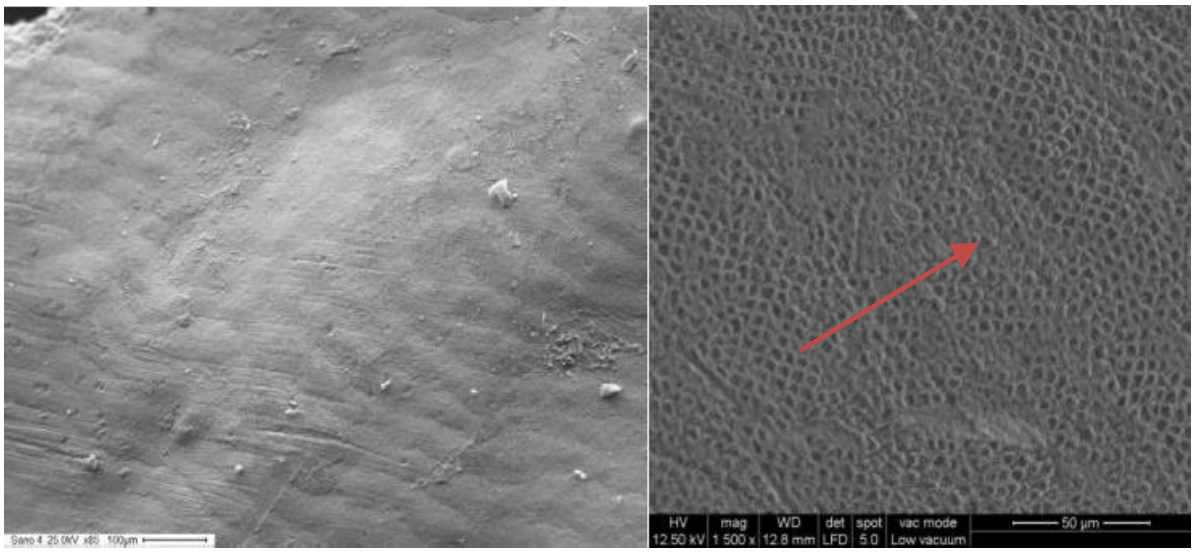

Imagen 15. *Diente sano. Esmalte desmineralizado.Patrón "panal de abeja" (tratamiento medio+ PVA).*

En los resultados de la prueba topográfica los dientes que pertenecían al tratamiento con DMSO, no mostraron daños ni en el esmalte, ni en la dentina, producidos por la desmineralización de la pieza dental a causa de ácidos, como ocurrió con el PVA (**Imagen 16**)

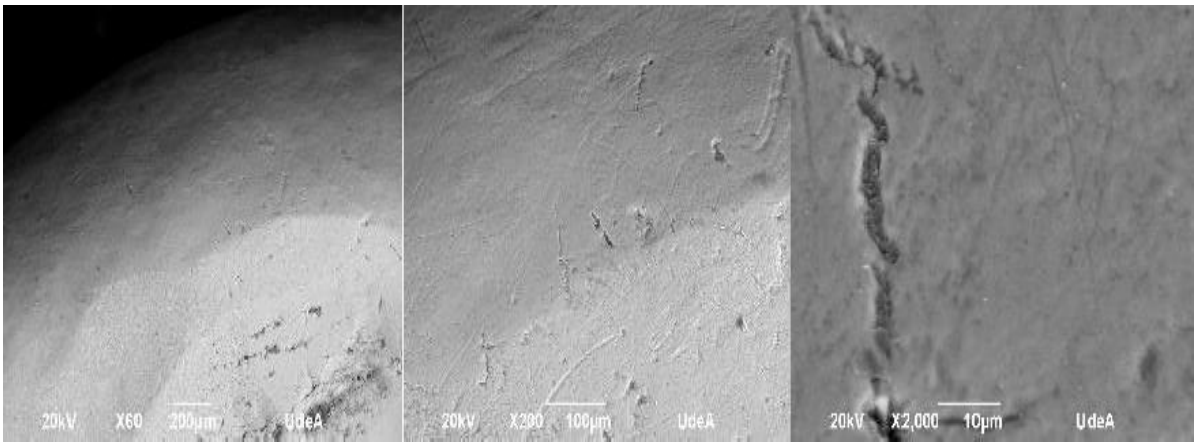

Imagen 16*. Diente sin patrón "panal de abeja" (tratamiento DMSO)*

A pesar de esto, los molares que pertenecían al grupo de tratamiento PVA y PVA+ DMSO **(Imagen 17-19)** si presentaron el patrón de erosión por ácidos, pero al parecer con el paso del tiempo iban mostrando una regeneración de los pequeños agujeros que se habían formado en la lesión superficial.

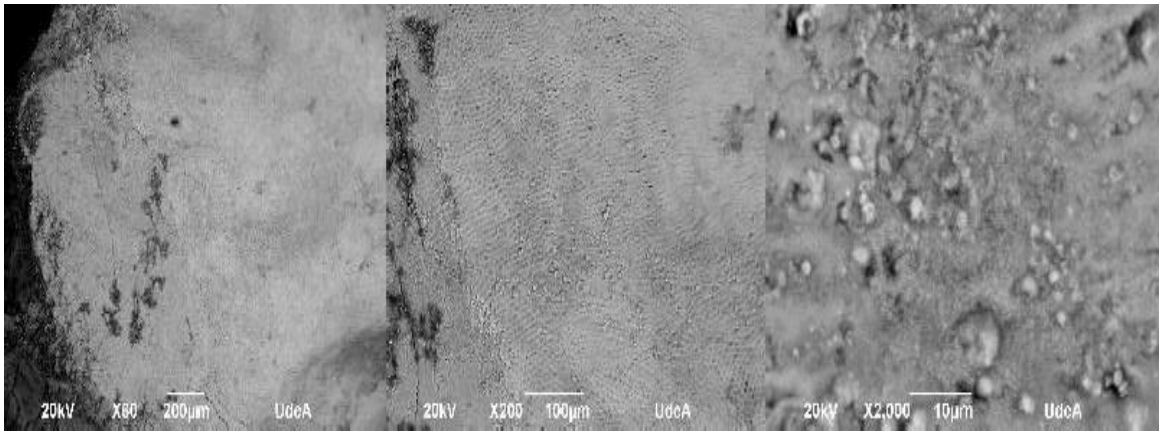

***Imagen 17**. Dientes con tratamiento PVA (15 días)*

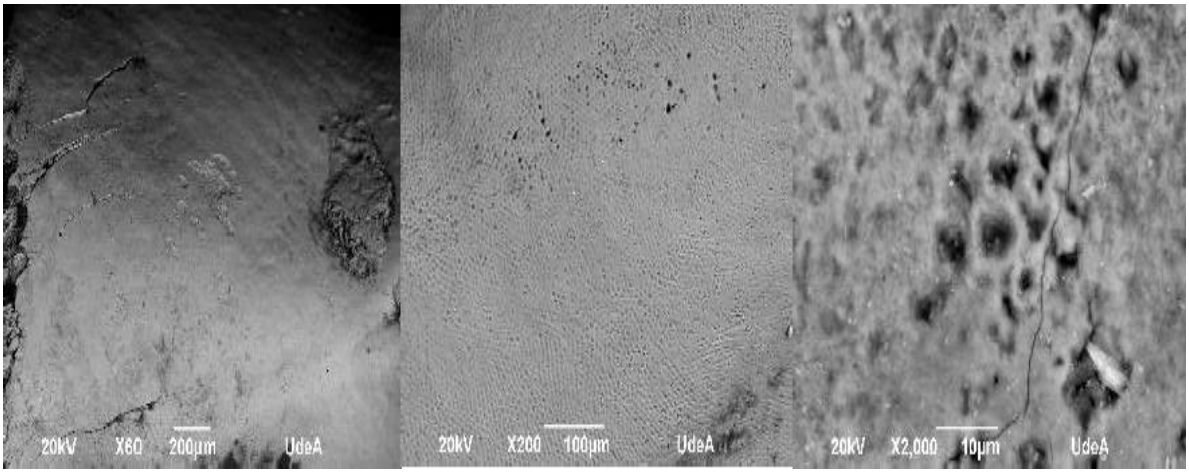

***Imagen 18**. Dientes con tratamiento PVA (30 días)*

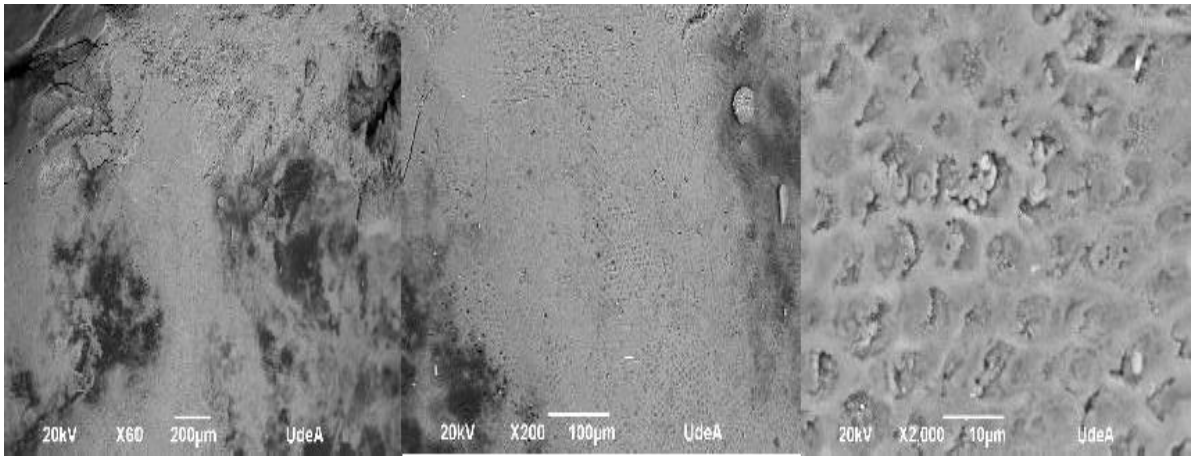

***Imagen 19**.Dientes con tratamiento PVA + DMSO (15 días)*

Los grupos control (secos y recién extraídos) por su parte, solo presentaron fallas mecánicas antiguas, debido a su funcionalidad dentro del proceso de la masticación o por la extracción, y fallas de tipo inducidas, como resultado de la carga generada en los ensayos mecánicos. Además, un estudio realizado con dientes criopreservados en nitrógeno líquido, sin el uso de un agente crioprotector, asoció las grietas encontradas en el esmalte con los fórceps utilizados en su extracción y se identificaron en la dentina y cemento grietas no superiores a los 0,8 µm, lo que determinó que el proceso de criopreservación no genera grietas tan prominentes, en comparación con el efecto que producen los instrumentos utilizados en el proceso de extracción dental (74).

4.1.3 Evaluación del crecimiento celular en cultivo de monocapa

La literatura reporta que el mayor daño cuando una célula se congela es la formación de cristales de hielo dentro de estas, así como los esfuerzos mecánicos por la formación del hielo extracelular. Aunque no se conoce con claridad el mecanismo del daño criogénico, estas lesiones ocurren en parte, por la ruptura osmótica causada por los solutos concentrados dentro o fuera de la célula o por la formación de hielo intracelular (referencias). En este último, un grupo de moléculas de agua crecen dentro de estas y lesionan las membranas celulares, originando patrones conocidos como lesión del hielo, por tal razón se utilizan los crioprotectores para mitigar estos efectos al evitar la formación de hielo intracelular y lisis por estos (75).

Al hacer la prueba de crecimiento celular por el método de explante, no se hayan resultados positivos de crecimiento en las muestras criopreservadas con PVA, este resultado puedo ser causa del cambio de pH en el medio descrito en la **sección 4.1**. Según el reporte de autores, el pH es un aspecto supremamente importante en el ambiente intracelular, cambios en el pH ocasionan efectos en los procesos celulares fundamentales como: el metabolismo, potencial de membrana, crecimiento y proliferación celular. El cambio del pH intracelular, esta mediado como una respuesta a agentes celular externos como los factores de crecimiento, hormonas, sales a través de la acción de intercambios iónicos de H^+ y la acción de bombas de Na^+(69). Los procesos celulares funcionan de forma óptima en un estrecho rango de pH neutral 7.0, en este pH los iones H^+ están en equilibrio a través de la membrana y en el citoplasma celular. Cuando el pH del medio de cultivo es ácido tiene un afecto citotóxico ya que no existe un equilibrio en la cantidad de H^+ liberados en el citoplasma producto la acidificación producida por los ácidos liberados en los procesos metabólicos de la célula, si el medio externo es acido no ayuda a amortiguar el pH citoplasmático a través de la actividad de los transportadores de membrana, de esta forma los procesos celulares se ven impedidos (70). La acidificación del medio de cultivo según el indicador de pH solo se evidenció en las muestras que contenían PVA lo que puede ser ocasionado por una reacción química entre el PVA y iones contenidos en el medio. Por su parte, también se encontró que la capacidad de una solución tampón depende tanto de la concentración como del pH, de modo que la capacidad de esta no se puede predecir fácilmente para una solución compleja que contiene múltiples especies de tampón (65), como era la del caso del medio de cultivo de PVA, que contenía Hepes y Bicarbonato de Sodio. Adicionalmente, se ha estudiado el efecto del Hepes en los cultivos celulares y se ha descubierto que esta solución es fotosensible y puede generar interacciones que resultan en la producción de peróxido de hidrogeno y en componentes citotóxicos (8), siendo esto un posible causal de los efectos adversos en la viabilidad celular (76).

En los medios de cultivo con DMSO con molares criopreservados durante 30 días, se evidenció crecimiento en monocapa de células con morfología de fibroblastos que se observan adheridas a la superficie del plato de cultivo y que presentan crecimiento en el tiempo evidenciándose una confluencia del 90% después de ocho días de cultivo (**imagen 20**), por lo que se establece que el cultivo se adhiere y prolifera de forma *in vitro*. El DMSO es un criopreservante ampliamente empleado para preserva células o tejidos, dado a que es una sustancia de bajo peso molecular que pueden pasar a través de la membrana celular, remplazando el volumen de agua intracelular evitando los daños producidos por la formación de cristales de hielo y, a su vez, manteniendo el volumen celular impidiendo el colapso celular por excesiva deshidratación (77)(67). Además, en los tratamientos con DMSO, no se evidenció cambio del pH del medio de cultivo, lo que permitió conservar la integridad y viabilidad de las células del interior de los molares.

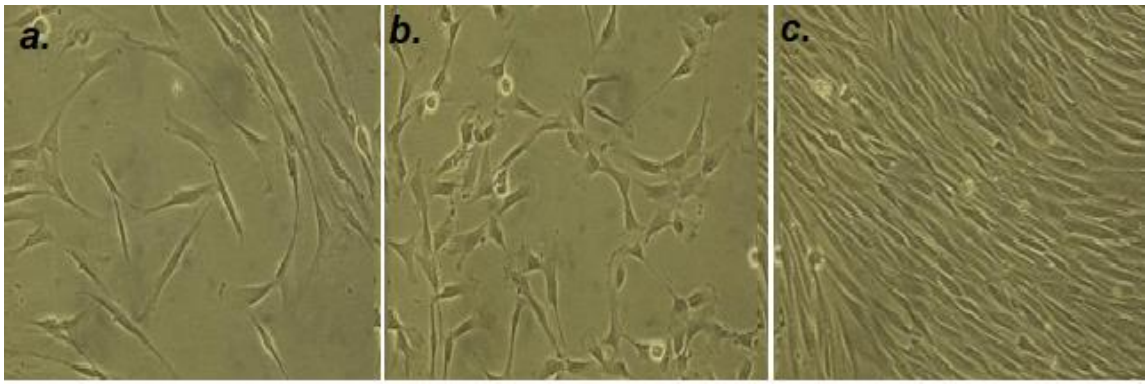

Imagen 20. *Morfología celular y crecimiento en monocapa de los molares criopreservados con DMSO (30 días)*

5. CONCLUSIONES

Las piezas dentales que no se congelaron con agentes crioprotectores, presentaron además de las fallas inducidas y mecánicas antiguas, fallas térmicas, debido al efecto que tiene el proceso de criopreservación sobre la estructura mineral de diente y la dentina. Además, se encontró, que los grupos de dientes que se sumergieron en soluciones que contenían DMSO no presentaron deterioro en la superficie de la pieza dental en consecuencia de la baja temperatura del nitrógeno líquido, logrando actuar como agentes que protegían la integridad de la dentina y el esmalte en los terceros molares. los grupos que contenían PVA presentaron un patrón de deterioro (patrón de panal de abeja) causado por el ácido generado en el medio de cultivo, ocasionando desmineralización y grabado ácido, provocando la afectación en la estructura dentaria durante el proceso de criopreservación

El PVA ha sido reportado en la literatura como una alternativa al uso de agentes de criopreservación porque además de crear una matriz polimérica que protege al diente de la deshidratación, es biocompatible y puede preservar la integridad biológica de estos. Sin embargo, el efecto del pH ácido encontrado en estos tratamientos producto de la reacción con el medio de cultivo DMSO afectó las estructuras de los dientes e intervino en las propiedades mecánicas al generar desmineralización y generar lo que

reportamos como efecto panal de abeja en las piezas dentarias. Por este motivo, no es preciso determinar el efecto directo del PVA en las propiedades mecánicas del diente.

En los resultados biológicos, no fue posible establecer un cultivo *in vitro* de células provenientes de los molares criopreservados en PVA, este resultado se asocia con el pH ácido del medio, que causó una alteración de las funciones e integridad biológica de estas muestras.

6. RECOMENDACIONES

Para mejores resultados en la implementación de un protocolo de criopreservación de terceros molares, se sugiere tener más control en los parámetros de entrecruzamiento físico por congelamiento/descongelamiento para las muestras que emplean PVA, además se sugiere realizar pruebas con diferentes concentraciones de PVA y diferentes pesos moleculares.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, la reacción entre el PVA y el medio de cultivo α-MEM, provocó una acidificación que causó alteraciones en la estructura mineral, así como en la integridad biológica de las piezas dentales, por esta razón se recomienda tener estricto control de las condiciones de pH a partir del establecimiento de soluciones buffer, que permitan amortigua el pH de la mezcla y preservarlo estable aún al ser sometido a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido.

Para tener mayor certeza sobre la viabilidad celular después de los procesos de criopreservación, se recomienda en próximos trabajos realizar ensayos biológicos más exhaustivos, para la determinación del efecto citotóxico, como reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) o inmunohistoquímica con marcadores celulares específicos que permitan caracterizar los linajes celulares obtenidos de las piezas dentales y establecer si son Células Madre y su capacidad de diferenciación, esto con el fin de enfocar el trabajo hacia los objetivos propuestos desde la odontología regenerativa.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Madden RH, Teaford MF, Smith MM, Ferguson MWJ. Development, Function and Evolution of Teeth. Vol. 16, Palaios. 2001. 418 p.

2. BATES JF, STAFFORD GD, HARRISON A. Masticatory function—a review of the literature: III. Masticatory performance and efficiency. Vol. 3, Journal of Oral Rehabilitation. 1976. 57–67 p.

3. Nakata M. Masticatory function and its effects on general health. Int Dent J. 1998;48(6):540–8.

4. Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, Ando T, Hayashi Y, Kihara T, et al. Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2018;497(3):876–82.

5. Amrollahi P, Shah B, Seifi A, Tayebi L. Recent advancements in regenerative dentistry: A review. Mater Sci Eng C. 2016;69:1383–90.

6. Lambrichts I, Driesen RB, Dillen Y, Gervois P, Ratajczak J, Vangansewinkel T, et al. Dental Pulp Stem Cells: Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds. J Endod. 2017;43(9):S12–6.

7. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Critical reviews in oral biology & medicine: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in Regenerative Medicine. J Dent Res. 2009;88(9):792–806.

8. Martín-Ibáñez R, Hovatta O, Canals JM. Cryopreservation of Human Pluripotent Stem Cells : Are We Going in the Right Direction ? Curr Front Cryobiol [Internet]. 2012; Available from: http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/cryopreservation-of-human-pluripotent-stem-cells-are-we-going-in-the-right-direction-

9. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, et al. Cryopreservation and its clinical applications. Integr Med Res. 2017;6(1):12–8.

10. Mora-Magaña I, Quiroz A, Altamirano Bustamante MM. Los ancos de células madre de cordón umbilical y su necesidad de regulación en México. Bioeth Updat. 2019;5(2):121–37.

11. Matinez JC, Briceño I, Hoyos A, Gómez A. Biobancos A strict and essentisl strategy conservation of. Acta Medica Colomb. 2012;37:158–62.

12. Lee SH, Inaba A, Mohindroo N, Ganesh D, Martin CE, Chugal N, et al. Three-dimensional Sphere-forming Cells Are Unique Multipotent Cell Population in Dental Pulp Cells. J Endod. 2017;43(8):1302–8.

13. Guadarrama Plata O, Guadarrama Quiroz LJ, Robles Bermeo NL. Aplicaciones odontológicas de las células madre pulpares de dientes temporales y permanentes: revisión de estudios in vivo. Rev ADM. 2018;75(3):127–34.

14. Botero TM, Nör JE. Tissue Engineering Strategies for Endodontic Regeneration. Stem Cell Biol Tissue Eng Dent Sci. 2014;419–30.

15. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. J

Immunol. 2009;183(12):7787–98.

16. Differentiation SC. Stem Cell Differentiation. :371–5.

17. Lozinskii VI, Domotenko L V., Vainerman YS, Rogozhin S V. Some thermomechanical properties of polyvinyl alcohol cryogels. Polym Sci USSR. 1989;31(9):1983–8.

18. Gerritsen AE, Allen PF, Witter DJ, Bronkhorst EM, Creugers NHJ. Tooth loss and oral health-related quality of life: A systematic review and meta-analysis. Health Qual Life Outcomes. 2010;8(1):126.

19. Upadhyaya C, Humagain M. The pattern of tooth loss due to dental caries and periodontal disease among patients attending dental department (OPD), Dhulikhel Hospital, Kathmandu University Teaching Hospital (KUTH), Nepal. Kathmandu Univ Med J. 2009;7(25):59–62.

20. Handelsman M. Surgical guidelines for dental implant placement. Br Dent J. 2006;201(3):139–52.

21. Smith ATJ, Cooper PR. Cellular Signaling in Dentin Repair and Regeneration. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. Elsevier Inc.; 2014. 405–417 p.

22. Investigación I, Especialista E, Grado DI. Histogénesis Del Esmalte Dentario. Consideraciones Generales. Arch Médico Camagüey. 2007;11(3).

23. Nelson SJ. Dental anatomy, physiology, and occlusion. Wheeler's Dental Anatomy, Physiology, & Occlusion. 2015. 251–265 p.

24. Chen J, Leblanc ARH, Jin L, Huang T, Reisz RR. Tooth development, histology, and enamel microstructure in Changchunsaurus parvus: Implications for dental evolution in ornithopod dinosaurs. PLoS One. 2018;13(11):1–18.

25. Rao M. Stem cells and regenerative medicine. Stem Cell Res Ther. 2012;3(4):27.

26. Khojasteh A, Sadeghi N. Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillomandibular atrophy: A preliminary human study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2016;45(7):864–71.

27. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part I: Stem cell sources. J Prosthodont Res. 2012;56(3):151–65.

28. Hughes FJ. Mesenchymal Stem Cells and Periodontal Regeneration. Curr Oral Heal Rep. 2014;1(1):1–8.

29. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part II: Clinical applications. J Prosthodont Res. 2012;56(4):229–48.

30. Magallanes Fabián M, Carmona Rodríguez B, Álvarez Pérez M. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. Rev odontológica Mex. 2010;14(1):15–20.

31. Simon S, Cooper P, Isaac J, Berdal A. Tissue engineering and endodontics [Internet]. Preprosthetic and Maxillofacial Surgery: Biomaterials, Bone Grafting and Tissue Engineering. Woodhead Publishing Limited; 2011. 336–362 p.

32. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315–7. A

33. Potdar PD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. World J Stem Cells. 2015;7(5):839.

34. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: Historia, biología y aplicación clínica. Rev Investig Clin. 2006;58(5):498–511.

35. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, et al. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2015;33(3):627–38.

36. Aydin S, Şahin F. Stem Cells Derived from Dental Tissues. Adv Exp Med Biol. 2019;1144(August):123–32.

37. Yalvaç ME, Yilmaz A, Mercan D, Aydin S, Dogan A, Arslan A, et al. Differentiation and neuro-protective properties of immortalized human tooth germ stem cells. Neurochem Res. 2011;36(12):2227–35.

38. Akiyama K, Hara Satoshi E, Kuboki T. Immunotherapy in Transplantation [Internet]. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. Elsevier Inc.; 2014. 831–839 p.

39. Yalvaç ME, Yarat A, Mercan D, Rizvanov AA, Palotás A, Şahin F. Characterization of the secretome of human tooth germ stem cells (hTGSCs) reveals neuro-protection by fine-tuning micro-environment. Brain Behav Immun. 2013;32(March):122–30.

40. Kim JH, Jo CH, Kim HR, Hwang Y Il. Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells from the periodontal ligament, umbilical cord, and adipose tissue. Stem Cells Int. 2018;2018.

41. Trivanović D, Jauković A, Popović B, Krstić J, Mojsilović S, Okić-Djordjević I, et al. Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. Life Sci. 2015;141:61–73.

42. Vasandan AB, Shankar SR, Prasad P, Sowmya Jahnavi V, Bhonde RR, Jyothi Prasanna S. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. J Cell Mol Med. 2014;18(2):344–54.

43. ATCC. Cryopreservation Guide. ATCC Guid [Internet]. 2010;1–16. Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/~/media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx

44. Yalvac M, Ramazanoglu M, Tekguc M, Bayrak O, Shafigullina A, Salafutdinov I, et al. Human Tooth Germ Stem Cells Preserve Neuro-Protective Effects after Long-Term Cryo-Preservation. Curr Neurovasc Res. 2010;7(1):49–58.

45. Barenberg SA, Mueller EP. Biomedical Materials. Vol. 16, MRS Bulletin. 1991. 22–25 p.

46. Penmetcha S, Arali V. Cryopreservation of teeth: Freeze them now to use later. J Clin Diagnostic Res. 2011;5(4):899–902.

47. Lozinsky VI. Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes. Russ Chem Bull. 2008;57(5):1015–32.

48. Lozinsky VI, Galaev IY, Plieva FM, Savina IN, Jungvid H, Mattiasson B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. Trends Biotechnol. 2003;21(10):445–51.

49. De Lara Janz F, De Aguiar Debes A, De Cássia Cavaglieri R, Duarte SA, Romão CM, Morón AF, et al. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. J Biomed Biotechnol. 2012;2012.

50. Solodova E V, Academy R, Federation R. the Polymer Aqueous Solutions Containing Additives of Some Polyols. Polymer (Guildf). :171–7.

51. Datta N, Pal M, Roy U, Mitra R, Pradhan A. World Journal of Pharmaceutical Research. Infection. 2014;13(April):15.

52. Shakya AK, Holmdahl R, Nandakumar KS, Kumar A. Polymeric cryogels are biocompatible, and their biodegradation is independent of oxidative radicals. J Biomed Mater Res - Part A. 2014;102(10):3409–18.

53. Alexandre N, Ribeiro J, Gärtner A, Pereira T, Amorim I, Fragoso J, et al. Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting - In vitro and in vivo studies. J Biomed Mater Res - Part A. 2014;102(12):4262–75.

54. Mansur HS, de S. Costa E, Mansur A a. P, Barbosa-Stancioli EF. Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. Mater Sci Eng C. 2009 Jun;29(5):1574–83.

55. Okay O. Polymeric cryogels macroporous gels with remarkable properties. Vol. 263, Advances in Polymer Science. 2014. iii–iv.

56. Rabbani Khorasgani M, Ahmadi Majd S, Talebi A, Khezri M, Moshtaghian SJ. Application of Chitosan/PVA Nano fiber as a potential wound dressing for streptozotocin-induced diabetic rats. Int J Biol Macromol. 2016;92:1162–8.

57. Chiellini E, Corti A, D'Antone S, Solaro R. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. Vol. 28, Progress in Polymer Science. 2003. 963–1014 p.

58. Peppas NA, Hassan CM. Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing / thawing methods. Adv Polym Sci. 2000;153:37–65.

59. Gaaz TS, Sulong AB, Akhtar MN, Kadhum AAH, Mohamad AB, Al-Amiery AA, et al. Properties and applications of polyvinyl alcohol, halloysite nanotubes and their nanocomposites. Molecules. 2015;20(12):22833–47.

60. Hyon SH, Cha WI, Ikada Y. Preparation of transparent poly(vinyl alcohol) hydrogel. Polym Bull. 1989;22(2):119–22.

61. Lozinsky V, Kolosova O, Michurov D, Dubovik A, Vasil'ev V, Grinberg V. Cryostructuring of Polymeric Systems. 49. Unexpected "Kosmotropic-Like" Impact of Organic Chaotropes on Freeze–Thaw-Induced Gelation of PVA in DMSO. Gels. 2018;4(4):81.

62. Hassan CM, Peppas N a. Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites. Vol. 153, Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites. 2000. 37–65 p.

63. Lozinsky VI, Plieva FM. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell

immobilization. 3. Overview of recent research and developments. Enzyme Microb Technol. 1998;23(3–4):227–42.

64. Zakeri M. Assessment of the Non-linear Stress-strain Characteristics of Poly (vinyl alcohol) Cryogel. 2017;(May).

65. Rogers ZJ, Bencherif SA. Cryogelation and cryogels. Gels. 2019;5(4):6–7.

66. Liebergall M, Schroeder J, Mosheiff R, Gazit Z, Yoram Z, Rasooly L, et al. Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: A randomized and prospective preliminary study. Mol Ther. 2013;21(8):1631–8.

67. Yin H, Cui L, Liu G, Cen L, Cao Y. Vitreous cryopreservation of tissue engineered bone composed of bone marrow mesenchymal stem cells and partially demineralized bone matrix. Cryobiology [Internet]. 2009;59(2):180–7.

68. Universidad D, Constanza L, Pita G, Sebastián J, Ramírez R, Viviana M, et al. Investigaciones originales Originals researchs Protocolos diseñados para el biobanco de dientes de la Universidad Nacional de Colombia * Designing protocols for the human teeth biobank of the Universidad Nacional de Colombia. 2014.

69. Kruse CR, Singh M, Targosinski S, Sørensen JA, Eriksson E, Nuutila K. The effect of pH on cell viability , cell migration , cell proliferation , wound closure and wound re-epithelialization : in vitro and in vivo study. :1–29.

70. Brown BN, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. Transl Res. 2014;163(4):268–85.

71. Hak Y, Min Z, Chul J, Ju E, Jong S, Kim J. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank — A preliminary study. 2005;51:322–9.

72. Yan W, Tenwalde M, Øilo M, Zhang H, Arola D. Effect of cryopreservation of teeth on the structural. Dent Mater. 2018;1–8.

73. Dios J De, Alcolea A, Herna A, Jose A. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human , bovine , porcine and ovine teeth. 2015;0:0–7.

74. Ijbara M, Wada K, Tabata MJ, Wada J, Inoue G, Miyashin M. Enamel Microcracks Induced by Simulated Occlusal Wear in Mature , Immature , and Deciduous Teeth. 2018;2018.

75. Kim MH, Kim I, Kim SH, Jung MK, Han S, Lee JE, et al. Cryopreserved human adipogenic-differentiated pre-adipocytes: A potential new source for adipose tissue regeneration. Cytotherapy. 2007;9(5):468–76.

76. J. S. ZIGLER, JR., J. L. LEPE-ZUNIGA. B. VISTICA AIG. Analysis of the cytotoxic effects of ligth-exposed HEPES-containing culture medisum. 1985;21(5):1–6.

77. Yao T. cell culture media : History , characteristics , and current issues. 2017;(September 2016):1–19.

8. ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DEL PBS

MATERIALES Y EQUIPOS

No.	Equipos	No.	Materiales
1	Balanza analítica	1	Agitador Magnético agitación
1	Plancha térmica con agitación	1	Balón volumétrico 1000 mL
1	pH – metro	1	Autoclave

REACTIVOS

Reactivo	Cantidad	Peso molecular	Grado de hidrólisis	Marca
Agua Destilada	1000 mL			
Solución de calibración de NaCl 1N				
Solución de calibración de HCl 1N				
KCl	0.2 g			
KH_2PO_4	0.2 g			
NaCl	8 g			
$NaHPO_4$	1.22 g			

PROCEDIMIENTO

1. Pesar en una balanza analítica:

- 0.2 g KCl
- 0.2 g KH_2PO_4
- 8 g NaCl
- 1.22 g de $NaHPO_4$

2. Llevar las cantidades pesadas al balón de 1000 mL y agregar agua destilada hasta ajustar el volumen señalado.
3. Agitar la solución anterior, sin calor, hasta que los solutos se disuelvan en su totalidad (aproximadamente 20 minutos).
4. Ajustar el pH a 7.2 agregando lentamente gotas de NaOH o HCl según sea el caso.
5. Envasar en un frasco limpio
6. Esterilizar a 121 ºC por 30 minutos.

ANEXO 2. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

MATERIALES Y EQUIPOS

No.	Equipos	No.	Equipos
1	Balanza analítica	1	Varilla para agitación
1	Balón volumétrico	1	Filtro 0,22 µm
1	pH – metro	1	Frascos Falcon de 50 mL
1	Pesa sustancias		
1	Nevera		

REACTIVOS

Reactivo	Cantidad	Peso molecular	Grado de hidróli-sis	Marca
Agua Mili Q	900 mL			
Bicarbonato de Sodio	2 g			
Solución de calibración (HCl - NaoH)				
Medio de cultivo en polvo α MEM	10,17 g			

PROCEDIMIENTO

1. Medir 900 mL de agua mili Q tipo II a temperatura entre 15 y 20 °C.

2. Pesar el medio de cultivo en polvo en la balanza analítica.

3. Adicionar 10,17 gramos de α MEM liofilizado al agua mili Q.

4. Enjuagar y sacar el pesa sustancias con una pequeña cantidad de agua para remover las trazas del medio en polvo y añadir a la solución.

5. Adicionar los 2 g de bicarbonato de sodio a la mezcla y llevar al agitador magnético hasta obtener una solución homogénea.

6. Adicionar el agua miliQ restante hasta obtener el volumen final de 1 litro y mezclar.

7. Ajustar el pH entre 6,9 y 7,1 utilizando HCl 1N o NaOH 1N (sigma sugiere ajustar el pH del medio de 0,1 a 0,3 unidades de pH por debajo del deseado, debido a que este puede aumentar durante la filtración.).

8. Realizar filtración de medio utilizando membrana con porosidad de 0,22 µm

9. Dispensar de manera aséptica en frascos de 50 mL, sellarlos con papel parafinado y marcarlos con: fecha, contenido, pH, número de alícuota/número total de alícuotas y quien preparo, para almacenarlo en la nevera.

ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES DE INVESTIGACIÓN

El propósito de este consentimiento es proveer a los participantes en esta investigación una clara explicación de la naturaleza de la misma, así como de su rol en ella como participantes.

La presente investigación es conducida por Carlos Andrés Fernández Herrera de la Universidad CES. El objetivo de este estudio es **CRIOPRESERVACIÓN DENTAL Y SUS EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD DE PDLC**

Procedimientos:

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.

Riesgos y molestias: Los riesgos del procedimiento son mínimos y son aquellos asociados al procedimiento terapéutico.

Las muestras dentales tomadas durante el examen clínico serán procesadas y utilizadas únicamente con el objetivo de la investigación y al terminar el proceso de análisis y procesado serán destruidas.

Costo: Nada de los procesos o procedimientos realizados para la toma de la muestra le significaran costo alguno. Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma. Si alguna de las preguntas durante la entrevista le parece incómodas, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no responderlas.

Desde ya le agradecemos su participación.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación, conducida por_____ _. He sido informado (a) de que la meta de este estudio es

_____

_____

_____

Me han indicado también que tendré que responder una historia clínica odontológica, lo cual tomará aproximadamente_____minutos.

Me han informado que donaré mis dientes (terceros molares) para ser procesadas y almacenadas para determinar cómo es el comportamiento de las células de mis dientes a diferentes formas de preservación mediante técnicas de congelación.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona. De tener preguntas sobre mi participación en este estudio, puedo contactar a Carlos Andrés Fernández al teléfono 3014821096 o Luis Carlos Vesga al celular 3116094188.

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando éste haya concluido. Para esto, puedo contactar a Carlos Andrés Fernández o Luis Carlos Vesga a los teléfonos anteriormente mencionados.