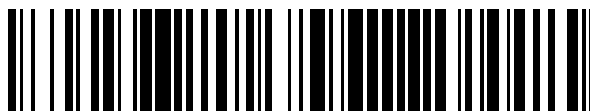


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 847**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 35/32 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2011** **PCT/IB2011/000966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011** **WO11141789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2011** **E 11724755 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2568804**

54 Título: **Método para criopreservación de pulpa dental**

30 Prioridad:

12.05.2010 IT MI20100839

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.06.2018

73 Titular/es:

**FONDAZIONE IRCCS "CA" GRANDA - OSPEDALE
MAGGIORE POLICLINICO" (100.0%)
Via Francesco Sforza, 28
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**GIOVENTÚ, SILVIA;
FRASCA, STEFANIA;
ANDRIOLO, GABRIELLA;
LAZZARI, LORENZA;
REBULLA, PAOLO;
BONINO, FERRUCCIO y
MONTELATICI, ELISA, GIOVANNA, ANGELA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 670 847 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para criopreservación de pulpa dental

5 La presente invención se refiere a un método para criopreservación de pulpa de un diente con el fin de aislar células madre, en especial células madre mesenquimales, a partir de la pulpa.

10 Las células madre adultas constituyen una fuente inagotable de células multipotentes, que pueden diferenciarse – si así se requiere – en diversas líneas celulares. Gracias a esta propiedad, las células madre adultas pueden usarse en el campo de la medicina regenerativa para diversos propósitos. Por ejemplo, las propiedades terapéuticas colectoras de las células madre que se toman a partir de la sangre o médula ósea, permitieron – aunque en forma limitada – resolver enfermedades que alguna vez fueron consideradas como incurables.

15 Estas propiedades de las células madre adultas han desarrollado, recientemente, un interés cada vez mayor de parte de los científicos, quienes han realizado grandes esfuerzos para obtener células madre a partir de diversas fuentes de tejido.

20 La pulpa de dental constituye una fuente de células madre especialmente interesante. Se evidenció, en efecto, que este tejido constituye un excelente depósito de células madre con una de las mayores proporciones de células madre/masa de tejido que se hayan encontrado jamás.

Las células madre que derivan a partir de pulpa dental tienen un nivel proliferativo y plasticidad celular considerables y esto resulta ser un aspecto muy importante para posibles aplicaciones terapéuticas.

25 Las células madre de la pulpa dental pueden originar diferentes células de origen mesenquimal, tales como, osteoblastos, adipocitos, condrocitos, células de músculo estriado, así como también, células de origen no mesenquimal, tales como melanocitos.

30 En especial, mediante el transplante de células madre de pulpa dental en una encía animal, se evidenció que estas células pueden generar nervios, huesos, cartílago y dientes *ex novo*.

35 En la actualidad, las aplicaciones que hacen uso de las células madre a partir de pulpa dental se enfocan en la regeneración ósea, tanto en el campo dental como en el maxilofacial (en resumen, en el futuro, sería posible regenerar dientes y el periodonto que los soporta, directamente en el sitio anatómico) y en el campo ortopédico.

Mientras tanto, se realizan estudios específicos con el fin de verificar el posible uso futuro de células madre a partir de pulpa dental para propósitos autólogos o alogénicos.

40 Los resultados son alentadores e indican que estas células madre pueden usarse, además, para regeneración de músculos y nervios y para mantener la estabilidad del tejido graso.

Otra ventaja de la pulpa dental consiste en que constituye una fuente muy rica y potencialmente inagotable de células madre, gracias al gran número de dientes que podrían usarse potencialmente para extracción de este tejido.

45 A la luz de las potencialidades de las células madre que derivan de la pulpa según se describe anteriormente, los científicos han planteado el problema de cómo estas células pueden preservarse y “depositarse” para posibles usos terapéuticos futuros, ya sean autólogos o alogénicos.

50 Se conocen métodos para preservación y depósito de células madre que derivan a partir de la pulpa dental en el campo. Por ejemplo, en algunos biobancos específicos, con el fin de criopreservar las células madres de la pulpa dental, se usa un protocolo que incluye una etapa en la que el diente se parte de manera tal que se extrae la pulpa dental, seguida de una etapa en la que la pulpa se trata de manera tal que se recuperan las células madres contenidas en esta. Las células madre se almacenan luego en nitrógeno líquido una vez que son amplificadas.

55 Como una alternativa al método de criopreservación de células madre que se extraen a partir de un diente, se conocen métodos en los que un diente intacto, se extrae a partir de su asiento, se somete a criopreservación y depósito. El propósito de criopreservación y depósito de un diente intacto consiste en recuperar la pulpa y las células madre contenidas en este en una siguiente etapa, solo cuando existe una verdadera necesidad terapéutica.

60 El primero de los enfoques que se describen anteriormente permite recuperar células madre a partir de pulpa dental, por ejemplo, células madre mesenquimales, con una gran efectividad en cuanto a rendimiento y vitalidad celular. Sin embargo, este método presenta la desventaja de ser bastante costoso tanto por el tiempo que se necesita para recuperar y amplificar las células como desde un punto de vista económico.

65 De hecho, una persona que se interesa en este método de criopreservación se ve forzada a enfrentar costos bastante altos cuando se extrae el diente, sin siquiera estar segura de un posible uso terapéutico futuro. De hecho,

este método incluye la extracción del diente, su trituración para recuperar la pulpa y el aislamiento y cultivo eventuales de las células madre contenidas en la pulpa para criopreservación de estas con posterioridad; esto sin asegurarse que durante su vida, la misma persona tendrá la necesidad real de usar las células criopreservadas con un propósito terapéutico.

5 En cambio, el método de criopreservación del diente intacto tiene la ventaja de ser más rápido y menos costoso para el organismo a cargo de la criopreservación y, como consecuencia, para la persona interesada en criopreservar el diente.

10 Sin embargo, la criopreservación de un diente intacto no asegura necesariamente un éxito absoluto al momento de descongelar dicho diente, tanto en lo que se refiere al porcentaje de recuperación de células madre como en términos de calidad de células recuperadas.

15 El alcance y el resultado de posibles aplicaciones dependerá de la cantidad y calidad de células madre recuperadas. Las células madre que se recuperan en una etapa que continúa a la criopreservación deberán tener aún la capacidad de proliferación y diferenciación que caracteriza a las células madre que se aíslan a partir de la pulpa de un diente fresco, que no se somete a criopreservación.

20 Los porcentajes de recuperación de células madre y la calidad de las células recuperadas luego de descongelar un diente criopreservado entero no son enteramente satisfactorias. Esto se debe, probablemente, al hecho de que el esmalte del diente es un poco poroso, un material muy duro, resistente a diversos químicos, debido justamente a su función biológica. Estas propiedades constituyen, sin embargo, una desventaja en cuanto a que el éxito de la criopreservación en términos de porcentaje de recupero de las células y de vitalidad luego del descongelamiento se ve comprometido.

25 El documento WO2007/070883 divulga el procedimiento criogénico de una parte de diente que consiste en la segmentación de un diente aislado para obtener, luego de separar la corona, dos piezas por separado: una de ellas es el cuello del diente, que contiene la cavidad de pulpa principal.

30 El documento US5846080 informa que los láseres de neodimio y de erbio se usan en odontología para cortar diversos tipos de tejidos. Además, el documento enseña a usar los láseres para obtener pequeños orificios como de 200 micrómetros de diámetro que pueden tener cualquier profundidad deseada. Los orificios se usarían para drenar abscesos o medicación inyectable y, por lo tanto, resultan adecuados para permitir el flujo de fluidos.

35 El documento US2003/068305 enseña que las células madre mesenquimales se diferencian en diversas células de derivación mesenquimal: osteoblastos, condrocitos y otras.

40 El problema técnico subyacente de la presente invención consiste en proporcionar un método para la criopreservación de pulpa dental (y, por lo tanto, de las células madre contenidas en esta) que resulta ser simple y económico y que, al mismo tiempo, asegura buenos resultados en cuanto a los porcentajes de recuperación posterior al descongelamiento y de vitalidad de las células, considerando de manera significativa su capacidad proliferativa y de diferenciación.

45 Este problema se resuelve mediante un método para criopreservación de pulpa dental como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a un método para criopreservación de pulpa de un diente entero y aislado que comprende las siguientes etapas:

50 a. realización de, al menos, un orificio en un diente entero con un láser en el que dicho orificio alcanza, al menos, la dentina y no atraviesa la pulpa;

b. colocación del diente perforado de esta manera en contacto con un agente criopreservante;

55 c. ajuste del diente en contacto con el agente criopreservante a una temperatura criocongelante.

De acuerdo con una realización preferida, el diente es preferiblemente un diente de leche, más preferiblemente un diente de leche sin exfoliar. Además, el diente es, preferiblemente, un diente aislado de una persona de entre 6-20 años de edad, más preferiblemente, de entre 5-14.

60 De acuerdo con una realización preferida, dicho al menos un orificio se realiza en el área del cuello de dicho diente.

Preferiblemente, el orificio consiste de 1 a 4 orificios, más preferiblemente, de 1 a 2 orificios para un diente canino o un diente incisivo; preferiblemente, de 2 a 4 para un diente molar.

65

De acuerdo con una realización preferida, dicho al menos un orificio tiene un diámetro de 0,001 a 0,5 milímetros, preferiblemente de 0,07 a 0,3 milímetros.

5 De acuerdo con una realización preferida adicional, dicho orificio se constituye de manera tal que atraviesa las capas de esmalte y dentina y alcanza la capa de pulpa, sin dañar la pulpa.

10 De acuerdo con una realización preferida, la etapa de a) perforación del diente se lleva a cabo con un láser que tiene una longitud de onda de 1064 a 10600 nm, preferiblemente con un láser que se selecciona de un grupo que consiste de neodimio, holmio, erbio cromo y láseres de CO₂, más preferiblemente, con un láser que se selecciona de entre erbio y neodimio.

15 Preferiblemente, el agente criopreservante se selecciona de un grupo que consiste de DMSO, glicerol, triol, sucrosa, trialosa, lactosa, etileno o propilenglicol, dextrano, hidroxietil almidón, polivinilpirrolidona, formamida, 1-2-propanodiol, etanol, metanol y polietileno; preferiblemente, dicho agente criopreservante es DMSO.

De acuerdo con una realización referida, la etapa de criocongelación c) se lleva a cabo a una temperatura de -15 °C a -196 °C, preferiblemente de -50 a -90 °C.

20 De acuerdo con una realización preferida, el método comprende una etapa adicional de descongelar el diente y/o partir el diente y/o aislar las células madre a partir de pulpa dental.

25 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un diente criopreservado perforado que se obtiene mediante el método que se divulga anteriormente, caracterizado porque comprende, al menos, un orificio, en el que dicho orificio alcanza, al menos, la dentina y no atraviesa la pulpa.

La presente invención se describe a continuación de manera detallada, con referencia además a las figuras adjuntas, en las que:

30 - La Figura 1 muestra la sección de un diente molar y su asiento fisiológico;

-La Figura 2A muestra un diente entero que se extrae de la boca y se perfora con el método de acuerdo con la presente invención;

35 -La Figura 2B representa una sección del diente de la Figura 2A que muestra la trayectoria del orificio por dentro del diente;

40 -Las Figuras 3A-B muestran la morfología de las células madre mesenquimales aisladas a partir de la pulpa dental de un diente de la primera dentición (sin exfoliar); en especial, la Figura 3A representa las células madre mesenquimales en confluencia; la Figura 3B representa una colonia de células madre mesenquimales que se definen como "de fondo redondo";

45 -Las Figuras 3C-D muestran la morfología de las células madre mesenquimales que se aíslan a partir de la pulpa dental de un diente de leche nuevo (sin exfoliado), intacto (sin perforar), que se descongela luego de la criopreservación en presencia de DMSO (Figura 3C) o sin DMSO (Figura 3D);

-Las Figuras 3E-F muestran la morfología de las células madre mesenquimales que se aíslan a partir de la pulpa dental de un diente de leche (sin exfoliar), que se descongela luego de la perforación y criopreservación de acuerdo con el método de la presente invención;

50 -La Figura 4 muestra las divisiones acumuladas de la población de células madre mesenquimales que se aíslan a partir de la pulpa dental de un diente de leche (sin exfoliar); MSC1 y MSC2: células madre mesenquimales a partir de pulpa de un diente de leche nuevo (sin exfoliar); MSC3: células madre mesenquimales a partir de un diente de leche (sin exfoliar), intacto (sin perforar), criopreservado en presencia de DMSO; MSC4: células madre mesenquimales que se aíslan a partir de la pulpa de un diente de leche (sin exfoliar), intacto (sin perforar), criopreservado sin DMSO; MSC5, MSC6 y MSC7: células madre mesenquimales que se aíslan a partir de pulpa dental de un diente de leche (sin exfoliar), perforado y criopreservado de acuerdo con el método de la presente invención; MSC8: células madre mesenquimales que se aíslan a partir de pulpa dental de un diente de leche nuevo (sin exfoliar); dichas células se someten a una etapa de criocongelación en presencia de DMSO y luego, a una etapa de descongelación.

60 -Las Figuras 5a-5b-5c-5d muestran el análisis citofluorimétrico de células madre mesenquimales que se aíslan a partir de pulpa dental de dientes de leche (sin exfoliar).

65 Con el fin de asistir en la comprensión de la presente invención, la Figura 1 representa una sección de un diente, en especial de un diente molar, que se ubica en su asiento natural, la encía. El número 1 se refiere a un diente molar entero.

El diente 1 comprende una corona 2 que se proyecta a partir de la encía 3, una raíz 4 que se sujeta el hueso 5 alveolar y un cuello 6 que representa el área de transición entre la corona y la raíz.

5 El diente se cubre mediante una capa de esmalte 7 resistente y mineralizada, cuya función consiste en proteger las partes internas más delicadas.

Por debajo del esmalte existe una capa resistente de dentina 8, que constituye la mayor parte del diente.

10 La parte más interna del diente se constituye de pulpa 9 dental, que es extremadamente sensible a los cambios repentinos de temperatura y consiste de tejido blando, altamente vascularizado.

15 En la boca, los dientes se sostienen mediante el periodonto, que se constituye a partir de la encía que rodea el cuello y cubre el hueso subyacente, de un complejo de fibras (que se definen como ligamento periodontal; no se muestra en la figura) que pueden asegurar una posición correcta del diente en el asiento del hueso y, eventualmente, del cemento 10 (que recubre la parte externa de la raíz dental) y de hueso 5 alveolar (que se constituye de la pared interna del alveolo en el que se sitúa el diente).

20 Dos clases de dientes existen en los seres humanos. La primera serie incluye dientes de leche, también conocidos como temporarios, renacidos, o, según se usa en adelante en la presente invención, dientes de leche.

Los dientes de leche comienzan a aparecer, de manera general, hacia el sexto mes y un niño de dos años de edad tiene normalmente 20 dientes.

25 La segunda serie de dientes, o segunda dentición o la dentición de término equivalente consiste de dientes permanentes.

El primordio dental, a partir de cual se desarrollan los dientes permanentes, yace dentro de los huesos maxilares en un punto que se corresponde con el diente de leche.

30 Alrededor del sexto año de edad de una persona, los dientes permanentes comienzan a desarrollarse y empujan hacia afuera a los dientes de la primera serie. Este procedimiento puede continuar durante seis años (veinte años solo para los "dientes sabios") y, al finalizar, un adulto tiene 32 dientes.

35 Los mamíferos y humanos tienen diferentes tipos de dientes: incisivos, caninos, premolares y molares.

La presente invención se refiere a un método para criopreservación de pulpa de un diente de acuerdo con la reivindicación 1. El método se aplica a un diente aislado (*ex vivo*), que se extrae o retira a partir de su asiento natural.

40 El método de acuerdo con la presente invención puede aplicarse a cualquier diente, preferiblemente el diente es un diente de leche, más preferiblemente, es un diente de leche, sin exfoliar. En el contexto de la presente invención, un diente sin exfoliar se refiere a un diente que se retira o se extrae a partir de su asiento natural antes de su intercambio fisiológico.

45 Además, el diente que se usa de manera ventajosa en el método de acuerdo con la invención es un diente entero que incluye raíz/raíces y corona.

El diente puede ser un canino, un incisivo o un molar, preferiblemente, un canino.

50 De acuerdo con la presente invención, el diente puede aislarse o retirarse o extraerse de cualquier persona. En especial, el método se aplica a un diente que se aísla o se retira o se extrae de una persona de entre 6-20 años de edad, preferiblemente, de entre 5-14.

55 En una realización preferida de la invención, el diente puede pertenecer a una persona sana, preferiblemente, sin ninguna enfermedad sistémica, o a una persona que sufre de una enfermedad sistémica, preferiblemente, con excepción de las enfermedades exantemáticas, o a una persona que sufre de un síndrome o desorden genético.

60 El método incluye realizar, al menos, un orificio (o perforación) en un diente, preferiblemente, con un láser. En una realización preferida, el número de orificios puede variar de entre 1 a 4 lo que depende del tipo de diente. En especial, pueden existir 1 a 2 orificios para un canino o un incisivo, mientras que se pueden realizar de 2 a 4 orificios en un molar.

65 El orificio es preferiblemente un microagujero (o microperforación); más preferiblemente, consiste de un orificio con un diámetro de 0,001 a 0,5 mm, preferiblemente, de 0,07 a 0,3 mm.

El orificio (o perforación) se realiza de manera tal de alcanzar, al menos, la dentina de dicho diente.

En una realización preferida de la invención, el orificio atraviesa por completo la capa de esmalte y parcialmente la capa de dentina.

5 En otra realización de la invención, el orificio atraviesa las capas de esmalte y dentina y alcanza la capa de pulpa sin penetrar la pulpa.

10 En otra realización de la invención, el orificio atraviesa las capas de esmalte y dentina y penetra la pulpa en unos pocos micrones, en especial, la pulpa se penetra en un espesor de 3 a 30 micrones, preferiblemente, de 5 a 10 micrones.

10 En ambos casos, la perforación no atraviesa la pulpa sino que solo atraviesa las capas de esmalte y dentina.

15 Se recomienda que, al aplicar el método de acuerdo con la invención, el orificio no penetre la capa de pulpa. Sin embargo, en algunos casos, en especial cuando el método se aplica usando algunos tipos de láseres (por ejemplo, láser de neodimio), se puede asumir que la pulpa se penetra en el espesor referido anteriormente, sin causar sobrecalentamiento ni dañar, por lo tanto, la vitalidad de las células de la pulpa.

20 En cualquier caso, tanto la condición en la que el orificio penetra por completo la capa de dentina como la condición en la que el orificio atraviesa solo parcialmente la dentina, ambas permiten el acceso del agente criopreservante a aquellas partes del diente que son inaccesibles de manera fisiológica. De hecho, por regla general, un diente no puede penetrarse fácilmente mediante un agente (por ejemplo, un agente criopreservante de acuerdo con la presente invención) gracias a la capa de esmalte resistente que recubre cada diente. Esta arquitectura hace que las regiones que forman el núcleo dental (por ejemplo, la pulpa) sean difíciles de acceder e impide la optimización de una criopreservación de estas regiones.

25 En cambio, un diente que se perfora de acuerdo con el método de la presente invención permite que el agente criopreservante penetre el diente a través de los orificios que se formaron y, por lo tanto, facilita la penetración del agente criopreservante con respecto al diente.

30 La perforación de la corona dental de acuerdo con la invención es una perforación sin traspaso, por ejemplo, no atraviesa el diente de lado a lado (Figuras 2A y 2B).

El orificio se realiza, preferiblemente, en la conexión corona-raíz (cuello).

35 En especial, la Figura 2A muestra una realización de la invención con respecto a un diente molar en la que se realizaron dos orificios 11 usando el método de acuerdo con la invención.

Los dos orificios se sitúan en la región de cuello del diente.

40 La Figura 2B es una sección del diente molar de la Figura 2A. En especial, la sección muestra una trayectoria preferida de la perforación, en la que el orificio atraviesa por completo las capas de esmalte 7 y dentina 8 y alcanza la pulpa 9 sin penetrarla.

45 La perforación del diente, de acuerdo con la presente invención, puede ejecutarse directamente luego de retirar el diente o en una etapa posterior.

En el último caso, el diente que se retira se almacenará preferiblemente en una solución desinfectante, antibacteriana y nutritiva que permite que el diente mantenga una buena vitalidad hasta la perforación.

50 Dicha solución nutritiva puede incluir un medio de cultivo, por ejemplo, RPMI, y/o suero fetal bovino y/o un antibiótico/antimicótico, por ejemplo, una mezcla de penicilina/estreptomicina.

55 Preferiblemente, el diente que se extrae y se sumerge en la solución nutritiva se almacena en condiciones de frío, a una temperatura de 0 °C a 10 °C, preferiblemente, de 2 a 6 °C.

La perforación del diente se lleva a cabo con un láser que tiene una longitud de onda adecuada para perforar un tejido resistente tal como el esmalte y un tejido resistente y poroso tal como la dentina.

60 El láser que se usa de manera ventajosa en la presente invención tiene una longitud de onda de 1064 a 10600 nm. Preferiblemente, tal láser tiene un diámetro de fibra de 200-700 µm; una energía de pulso de 27-90 mJ; una potencia de 0,5-10 W; una frecuencia de 4-50 Hz.

El láser puede usarse ya sea en contacto o no (preferiblemente, en contacto), en modo continuo, pulso o superpulso.

El láser permite eliminar, en primer lugar, las sustancias más ricas en agua, lo que permite retirar de manera extremadamente precisa y selectiva, partes de esmalte dental y dentina, y acceder a canales de raíz sin correr el riesgo de retirar, romper o sobrecalentar la pulpa.

- 5 La principal ventaja de un láser que tiene una longitud de onda de 1064 a 10600 nm yace, precisamente, en la longitud de onda que se emite, que representa la que se requiere para trabajar en la dentina. Otra ventaja, más allá de la reducción del incremento de temperatura en los tejidos circundantes, según ya se analizó anteriormente, se refiere a la posibilidad de limitar el rango de acción de la luz de láser sobre áreas muy pequeñas; resulta posible trabajar, de este modo, solo en el área de interés sin dañar los tejidos dentales circundantes. Otra ventaja consiste en que este láser no produce vibraciones y elimina, de este modo, problemas asociados con microfracturas que se originan en tejidos dentales mediante la acción dinámica del torno.

- 15 Más allá de la acción fototérmica el láser lleva a cabo, además, una acción fotomecánica con respecto a los tejidos que se tratan. El modo de operación hace que el pulso corto origine un pico de energía en el sitio de aplicación, que se revela como un aumento de presión. Este aumento continúa con una recuperación tan violenta del tejido que da como resultado la ruptura de las conexiones y el desprendimiento de fragmentos de tejido. De este modo, se obtiene el retiro del tejido dental a partir de microexplosiones; en otras palabras, no existe explosión de las partículas de tejido.

- 20 En este caso no existe, además, aumento de temperatura en los tejidos circundantes.

El láser que se usa preferiblemente en la invención se elige, por lo tanto, a partir de: neodimio, holmio, erbio, erbio cromo y láseres de CO₂. Preferiblemente, el láser que se usa se selecciona de entre neodimio y erbio.

- 25 Un láser de neodimio (Nd:YAG) tiene como medio activo un cristal de aluminio e itrio (YAG) dopado de átomos de neodimio (Nd:Y₃Al₅O₁₂) y emite luz con una longitud de onda de 1064 nm. Este láser, cuando se usa de acuerdo con la presente invención, puede perforar un diente penetrando la pulpa en un espesor de 5-10 µm.

- 30 Un láser de holmio (Ho:YAG) tiene como medio activo un cristal de aluminio e itrio (YAG) dopado de átomos de holmio (Ho:Y₃Al₅O₁₂) y emite luz con una longitud de onda de 2100 nm.

Un láser de erbio (Er:YAG) es un láser en estado sólido, cuyo medio activo es un núcleo sintético de cristal de aluminio e itrio, dopado de átomos de erbio, y emite luz con una longitud de onda de 2940 nm.

- 35 El láser erbio cromo (YSGG) tiene como medio activo un cristal de galio, escandio e itrio, dopado de átomos de erbio y cromo, y emite luz con una longitud de onda de 2780 nm.

Un láser de CO₂ tiene un medio activo en estado sólido con una longitud de onda de 9600 a 10600 nm.

- 40 Se perfora el diente con un láser manteniendo, preferiblemente, el diente en una posición adecuada de manera tal que se perfora con pinzas dentales.

Luego de la perforación, el diente perforado se pone en contacto con un agente criopreservante, preferiblemente mediante inmersión en dicho agente criopreservante.

- 45 El diente perforado se pone en contacto con el agente criopreservante durante un período de 5 minutos a 1 hora, preferiblemente, 10-30 minutos.

- 50 El diente perforado se pone en contacto o se sumerge preferiblemente en el agente criopreservante a una temperatura de 0-10 °C, más preferiblemente, 2-6 °C.

El propósito de las dos últimas etapas consiste en permitir que el agente criopreservante penetre por completo el diente a través de los orificios realizados en este último.

- 55 A pesar de que DMSO, glicerol y triol constituyen los agentes criopreservantes preferidos, en especial, DMSO, se pueden usar uno o más criopreservantes con el mismo propósito: sucrosa, triálolosa, lactosa, etilenglicol o propilenglicol, dextrano, hidroxietil almidón, polivinilpirrolidona, formamida, 1-2 propanodiol, etanol, metanol o polietileno.

- 60 El diente se perfora y se pone en contacto con el fluido criopreservante y se somete luego a criocongelación.

La criocongelación tiene lugar a una temperatura de -15 °C a -196 °C, preferiblemente, -50 °C a -90 °C.

- 65 En una realización preferida, la criocongelación se ejecuta con un descenso de temperatura programado hasta que se alcanza la temperatura que se requiere para almacenar la muestra durante el período deseado (a saber, hasta

que una persona necesita recuperar células madre para usos terapéuticos). A modo de ejemplo, la temperatura puede descender a razón de 1-5 grados por minuto.

La criopreservación puede llevarse a cabo luego de perforar el diente o en una etapa posterior,

En el último caso, el diente perforado puede almacenarse en un contenedor adecuado en condiciones de frío, preferiblemente a una temperatura de 2 a 10 °C. La etapa de preservación puede durar como máximo un período de 48-72 horas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un diente aislado criopreservado, en especial, con el método de la presente invención, caracterizado porque se realiza, al menos, un orificio, preferiblemente con un láser, de manera tal que se alcanza la dentina. Dicho orificio se realiza, preferiblemente, en la conexión corona-raíz (cuello).

Dicho diente se criopreserva en contacto con un agente criopreservante, preferiblemente DMSO.

Dicho diente se usa, luego de su descongelación y partición, para aislar células de la pulpa dental, en especial, células madre, preferiblemente células madre mesenquimales.

En otro aspecto, la invención se refiere a una población celular (aislada) que puede obtenerse a partir de la pulpa dental criopreservada de acuerdo con el método de la presente invención.

Dicha población celular comprende células madre aisladas, preferiblemente células madre mesenquimales aisladas (MSCs) que derivan a partir de la pulpa dental.

En especial, con el fin de obtener dicha población celular, el diente criopreservado de acuerdo con la presente invención puede descongelarse. Preferiblemente, la descongelación del diente se lleva a cabo a una temperatura de 30-45 °C.

En esta etapa, se prefiere diluir o retirar el agente criopreservante en la muestra descongelada, por ejemplo, mediante una etapa de contacto con, al menos, una solución de lavado. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, PBS.

Luego, se puede partir o triturar o moler el diente descongelado, por ejemplo, con un dispositivo mecánico, preferiblemente, mediante una prensa o un triturador de nueces.

En la etapa de partición del diente, se prefiere hacer palanca con el dispositivo mecánico que se usa en el punto o puntos de perforación del diente. Al presentar mayor debilidad en estos puntos, el diente cederá más rápido facilitando la acción de partición.

Una vez que el diente se tritura, se extrae la pulpa, usando preferiblemente pinzas estériles y trabajando, de manera general, en condiciones de esterilidad.

De este modo, se extrae la pulpa dental y se somete luego a disociación usando cualquier técnica conocida en el campo.

Por ejemplo, la disociación puede ser mecánica o la disociación o digestión puede ser enzimática.

Entre los ejemplos de enzimas que pueden usarse para disociación se puede elegir: tripsina, colagenasa, hialuronidasa o mezclas de celulasa.

La disociación puede llevarse a cabo a una temperatura que varía de entre 32 a 40 °C.

La duración de la etapa de disociación puede variar de entre 30 minutos a 2 horas.

La disociación finaliza cuando la muestra de pulpa dental se separa por completo en sus componentes celulares.

La muestra de pulpa dental puede someterse a una etapa de lavado. La etapa de lavado puede ejecutarse con uno o más agentes que se seleccionan a partir de un grupo que comprende: PBS, HBSS, con calcio y magnesio o sin ellos, que se agregan con (o sin) glicina, alanina, glucosa, insulina, EDTA o EGTA o albúmina o dextrano o un medio de cultivo, por ejemplo, RPMI.

Las células de la pulpa dental que se recuperan de este modo, a saber, células madre, en especial, células madre mesenquimales, se someten a amplificación en cultivo, usando cualquier técnica conocida en el campo.

Por ejemplo, el cultivo puede incluir una etapa de germinación celular en un soporte adecuado (por ejemplo, placas de plástico o matraces), en un medio de cultivo adecuado.

La densidad de germinación de células de la pulpa dental es de 1000-1000000 células/cm², preferiblemente 5000-7000 células/cm².

El medio de cultivo se selecciona de entre: MEM alfa glutamax, DMEM, MEM alfa, RPMI, Iscove's y F1.

El medio puede agregarse con diversos nutrientes tales como suplementos, por ejemplo, Suero Fetal Bovino, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, factores de crecimiento que se eligen a partir del grupo que comprende EGF, FGF, VEGF y HGF, o un gel de plaquetas.

El medio puede contener, además, antibióticos y/o antimicóticos, por ejemplo, gentamicina, penicilina y estreptomina.

Por ejemplo, el medio de cultivo puede incluir MEM alfa glutamax, preferiblemente enriquecido con suero fetal bovino y/o penicilina/estreptomina.

El cultivo celular puede realizarse bajo condiciones de temperatura, humedad y/o presión de CO₂ controladas.

En especial, la temperatura puede oscilar entre 25 a 37 °C; la humedad relativa varía de 80 al 98%, la presión es, preferiblemente, presión atmosférica; la presión de CO₂ puede variar de 3 al 10%.

Las células que crecen en adhesión se disocian de las células que se cultivan de este modo.

La disociación puede ocurrir según se describe anteriormente; preferiblemente, la disociación celular puede llevarse a cabo de manera enzimática, más preferiblemente con la enzima colagenasa A.

La población celular que se obtiene luego del cultivo *in vitro* comprende células de la pulpa dental, en especial, células madre, preferiblemente, células madre mesenquimales.

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a una población aislada de células madre mesenquimales que derivan de pulpa dental de un diente criopreservado luego de perforación con láser de acuerdo con la presente invención, con una tasa de proliferación de 4 a 4,5, calculándose dicha tasa de proliferación como duplicaciones acumuladas de la población (CDP) durante un período de diez días.

En otra realización, dichas células madre mesenquimales expresan el siguiente panel marcador CD90, CD73, CD105, CD44 y HLA-ABC, CD146, NG2, PDGF-Rbeta, alfa-SMA y, preferiblemente, no expresan el siguiente panel marcador CD34, CD45, CD56, CD31, CD 144, KDR y HLA-DR.

En una realización preferida, dichas células madre mesenquimales pueden obtenerse a partir de pulpa dental criopreservada de acuerdo con el método de la presente invención.

Dichas células madre mesenquimales pueden diferenciarse en células de origen mesodérmico, en especial, pueden generar células adiposas, cartilaginosas u óseas.

Un objeto adicional de la divulgación de la invención: una población de células que se diferencian a partir de dichas células madre mesenquimales; una población que comprende células madre mesenquimales a partir de pulpa dental (preferiblemente, pulpa criopreservada de acuerdo con el método de la invención) y células madre mesenquimales diferenciadas.

Otro aspecto de la divulgación se refiere al uso de las células madre mesenquimales de la invención para generar *in situ* o *ex situ* células diferenciadas, preferiblemente de tipo osteogénicas o condrogénicas o adipogénicas.

Estas células madre mesenquimales y/o las células madre mesenquimales diferenciadas se usan como un medicamento, preferiblemente, para trasplante autólogo o alogénico.

Como una alternativa, estas células madre mesenquimales y/o células madre mesenquimales diferenciadas se usan para tratar enfermedades degenerativas del hueso o del tejido de cartílago, o en ingeniería de tejido de huesos, cartílagos, discos intervertebrales, músculo, estroma de médula, fibras, tejido graso, tejidos asociados con los dientes y otros tejidos conectivos.

Dichos tejidos asociados con los dientes tienen preferiblemente un origen ectodérmico, más preferiblemente, incluyen esmalte, cemento (un tejido que se asemeja en gran medida al tejido óseo), dentina y pulpa.

Dichas células madre mesenquimales y/o las células madre mesenquimales diferenciadas, de acuerdo con la presente divulgación, pueden usarse en terapia celular para aplicaciones dentales tales como, por ejemplo, regeneración ósea, que puede realizarse, además, mediante trasplante autólogo en áreas maxilofaciales, por ejemplo, en la mandíbula y huesos de quijada.

Las células madre mesenquimales y/o las células madre mesenquimales diferenciadas de acuerdo con la presente divulgación pueden usarse, además, en medicina regenerativa o de reemplazo luego de un trauma, una enfermedad o el envejecimiento.

5 EJEMPLO

Selección de los pacientes “donantes”

Criterios de inclusión

- 10 Niños de 7 a 11 años de edad;
- Dientes de leche;
- 15 Procedimientos radiculares intactos;
- Elementos dentales suplementarios.
- Criterios de exclusión
- 20 Procesos de caries
- Corona dental que se trata previamente con amalgama y compuestos
- 25 Pulpotomías y pulpectomías previas
- Reabsorción radicular o apical
- Heridas periapicales
- 30 Elementos dentales desvitalizados o “no vitales”
- Bruxismo severo
- 35 Enfermedades sistémicas
- Selección de dientes
- Los dientes que se usan son caninos e incisivos.
- 40 Extracción de dientes de leche
- Los dientes de leche, sin exfoliar todavía, se retiran de la cavidad oral luego de anestesia local (el tipo de anestesia y anestésico se deciden en base a la edad y salud de la persona).
- 45 Una vez que los elementos dentales se extraen, se retiran los residuos de encías y ligamento periodontal, si existen, con una gasa estéril embebida con solución fisiológica. Una vez que se descontamina cuidadosamente la superficie externa, el diente se sumerge en una ampolla de polipropileno de 5 ml que contiene el medio de cultivo adecuado (RPMI-20%-FBS-1%-penicilina/estreptomicina) y se almacena en un refrigerador a 4 °C en posición vertical.
- 50 Preparación del elemento dental aislado
- El diente:
- 55 -se extrae de la ampolla con pinzas dentales;
- se mantiene a la misma altura con respecto a los bordes de la corona usando las puntas de las pinzas;
- se realizan dos orificios sin traspaso con un láser Nd:YAG en el canal radicular por debajo de la conexión raíz-corona.
- 60 Para caninos e incisivos se decidió realizar solo dos orificios de manera que se impidió que el diente se sobrecaliente, aunque se retiró, al mismo tiempo, parte del esmalte y de la dentina para contribuir con la penetración del agente criopreservante en la pulpa dental y posterior apertura del diente.
- 65

El láser que se usó tiene los siguientes parámetros:

Longitud de onda= 1064 nm,

5 Diámetro de fibra= 320 μ m,

Energía del pulso= 40 mJ,

Potencia= 0,7/1,7 W,

10 Frecuencia= 10 Hz,

no se enfoca sino que diverge en 20 °C, por lo tanto, el punto con la mayor concentración se sitúa en la superficie y debe usarse, por lo tanto, en contacto.

15 Transporte del diente

20 Luego de la perforación, el diente se introduce en una ampolla de 2 ml criogénica (crioampolla) apirogénica, no citotóxica, estéril, constituida a partir de polipropileno, con tapón roscado con rosca externa constituida de polietileno de alta densidad. La ampolla contiene en su interior el medio de cultivo según se describe anteriormente. La ampolla se coloca dentro de una caja de retención de ampollas constituida de poliestireno de manera que mantiene el diente en posición vertical.

25 Desde la perforación hasta el transporte, el diente se almacena en un refrigerador a 4 °C.

Depósito del diente de leche aislado

30 Dentro de las 48-72 horas a partir de la extracción, el diente se transfiere con pinzas desechables a una crioampolla de 2 ml que contiene una solución criopreservante (DMSO 10%-dextrano 90%).

35 La ampolla se almacena durante 20 minutos a 4 °C de manera tal que permite que el agente criopreservante penetre el diente. La crioampolla se introduce luego en un dispositivo que contiene alcohol propílico, que permite que una temperatura controlada descienda. Luego, la ampolla que contiene el diente se coloca en un congelador mecánico a -80 °C durante, al menos, 12 horas.

El dispositivo que contiene alcohol propílico permite el descenso de una temperatura controlada a una velocidad de enfriamiento de -1 °C/min. Esta velocidad de enfriamiento define la cinética ideal para una buena criopreservación y una buena recuperación celular.

40 Descongelamiento y partición del diente de leche aislado.

El diente se descongela y la pulpa dental se extrae a partir de las siguientes etapas:

45 -introducción del diente en una bolsa estéril;

-introducción de la bolsa que contiene el diente en un baño con agitación continua a 37 °C durante 3 minutos;

-introducción del diente en una ampolla que contiene 10 ml de PBS de manera tal que permite la dilución de DMSO;

50 -partición mecánica del diente;

- extracción de pulpa con pinzas estériles desechables e introducción en un tubo contenedor.

55 Morfología de células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de: un diente de leche (sin exfoliar) nuevo (no criopreservado); un diente de leche (sin exfoliar) criopreservado intacto (sin orificios); un diente de leche (sin exfoliar) criopreservado luego de perforación con láser de acuerdo con el método que se describe anteriormente.

60 Una muestra de pulpa dental que se obtiene luego de la trituración de: un diente de leche nuevo (no sometido a criopreservación); un diente de leche criopreservado intacto con o sin DMSO; un diente de leche criopreservado luego de perforación con láser de acuerdo con el método que se describe anteriormente, se procesa con colagenasa A 1 mg/ml (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Alemania) a una temperatura de 37 °C durante 1 hora hasta que se completa la disociación de la muestra.

65 Luego del procesamiento de la muestra, se reunió la suspensión de células de pulpa dental y se diluyó en solución salina regulada con fosfato (PBS; Gibco, Grand Island, NY, USA); la suspensión celular diluida se centrifugó luego a

1400 rpm durante 10 minutos. El comprimido de células se resuspendió y las células obtenidas se sembraron en un medio de cultivo que comprende: MEM alfa glutamax 1% (Introvigen, Carlsbad, CA, USA), 20% de Suero Fetal Bovino (FBS; Biochrom AG, Berlín, Alemania), 1% de penicilina/estreptomicina (P/S, Sigma- Aldrich; St. Louis, MO, USA).

El medio de cultivo se reemplazó con medio nuevo cada tres días y las células madre mesenquimales que derivan a partir de pulpa dental se cultivaron bajo condiciones a largo plazo a 37 °C en atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂.

Las células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de muestras de un diente de leche nuevo pueden mantenerse en cultivo en condiciones a largo plazo, mostrando una forma de huso (Figura 3A) y formando colonias que se definen como "de fondo redondo" (Figura 3B).

Las células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de muestras de un diente de leche criopreservado intacto con DMSO (Figura 3C) o sin DMSO (Figura 3D) pueden mantenerse en cultivo pero las células son, de manera evidente, apoptóticas y se encuentran bajo sufrimiento.

Las células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de muestras de un diente de leche criopreservado que continúa con la perforación con láser de acuerdo con el método que se describe anteriormente (Figuras 4E-F) pueden proliferar y mostrar la forma de huso típica de células madre mesenquimales aisladas a partir de un diente nuevo.

Proliferación y expansión de células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de un diente de leche criopreservado o nuevo (intacto y perforado).

Cuando las células que derivan a partir de la pulpa dental de un diente, que se cultivan adheridas a la superficie en la que se sitúan en placa (de manera general, una placa o matraz de diversos tamaños), alcanzan una confluencia del 80%, se retiran de la superficie de adhesión mediante un tratamiento con tripsina-EDTA (Gibco), se cuentan y se siembran de nuevo en un matraz de 75 cm² a una concentración de 5000-7000 células/cm² bajo las condiciones de cultivo que se describen anteriormente.

En cada etapa del cultivo celular, cada conteo de células y dilución fueron registrados y se utilizaron para calcular la expansión potencial en términos del número de duplicaciones acumuladas de población celular (CPD).

El número de duplicaciones de células (PD) se calculó mediante la resolución de la siguiente ecuación:

$$PD = \log (N)/\log 2$$

en la que N representa la diferencia entre el número de células reunidas luego del tratamiento con tripsina (Ni) y el número de células que se sembraron (NO). El CPD se calculó como la suma de los PDs que ocurrieron durante los 70 días de cultivo de largo plazo.

El crecimiento de las células madre mesenquimales que derivan de las muestras de un diente de leche nuevo resulta ser siempre muy alto durante toda la fase de cultivo (vease Figura 4, MSCs1 y MSCs2), aun cuando las células aisladas se sometieron a una etapa de criop congelación (MSCs8). La tasa de proliferación de las células madre mesenquimales que derivan a partir de las muestras de un diente de leche criopreservado intacto con o sin DMSO, aunque sin haberse sometido al tratamiento de perforación que se describe anteriormente, ha demostrado ser siempre muy baja (véase Figura 4, MSCs3 y MSCs4).

La tasa de proliferación de las células madre mesenquimales que derivan de las muestras de un diente de leche criopreservado luego de perforación con láser de acuerdo con el método que se describe anteriormente, es similar a la de las células que se extraen a partir de un diente nuevo (véase Figura 4, MSCs5, MSCs6 y MSCs7).

En especial, la población celular de células madre mesenquimales que derivan de pulpa dental se caracteriza por una tasa de proliferación alta según se determina mediante el cálculo de las duplicaciones acumuladas de población (CPD), las que, durante un periodo de cultivo de diez días, resultan ser muy altas en el caso de células madre mesenquimales aisladas a partir de dientes nuevos sin criopreservar (valor de la media 5,3), de las células madre mesenquimales aisladas a partir de dientes criopreservados luego de perforación con láser de acuerdo con la invención (valor de la media 4,1), y de células madre mesenquimales aisladas a partir de dientes nuevos y que se someten a criopreservación (valor de la media 5,1).

En el caso de células madre mesenquimales aisladas a partir de dientes criopreservados sin perforación con láser, caracterizadas por una tasa de proliferación baja, resultó posible calcular el CPD luego de 40 días de cultivo (valor de la media 2,5).

Análisis citofluorimétrico de células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de un diente de leche nuevo y de un diente de leche criopreservado que se someten a perforación de acuerdo con la presente invención.

5 Las células madre mesenquimales aisladas a partir de muestras de un diente de leche nuevo o de un diente de leche criopreservado que se someten a perforación a partir de la invención, se caracterizaron mediante análisis citofluorimétrico durante las diversas etapas de cultivo (Figuras 5a-5b-5c-5d).

10 Las células se lavaron con PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente (RT) y se incubaron luego bajo condiciones de oscuridad con los siguientes anticuerpos de ratón anti-humanos conjugados: CD31-PE (Becton Dickinson, BD, San Jose, CA, USA), CD34-PE (BD), CD44-FITC (BD), CD45-PC7 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), CD73-PE (BD), CD90-PE (Chemicon, Temecula, CA, USA), CD105-PE (ImmunoTools, Friesoythe, Alemania), CD146-PE/FITC (BioCytex, Marsella, Francia), alfa-SMA FITC (Sigma-Aldrich), NG2-PE (Beckman Coulter), PDGF-Rbeta PE (BD), HLA-ABC-FITC (BD), HLA-DRPE (BD), CD144-FITC (VE-cadherin; Bender MedSystem, Burlingame, CA, USA), KDR-PE (BD).

15 Los diversos isotipos de inmunoglobulinas conjugadas se usaron como control negativo: IgG1 PEFITC (Chemicon), IgG1-PC7 (Beckman Coulter) y IgG1-APC (BD). Luego de la incubación con los anticuerpos, las células se lavaron con PBS que contiene Albúmina de Suero Bovino (BSA) 0,1 %.

20 Usando un citofluorímetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter) se consiguieron, al menos, 50.000 eventos y los gráficos de las Figuras 5a-5b-5c-5d se generaron mediante análisis con software CXP.

25 Las células madre mesenquimales aisladas a partir de muestras de un diente de leche nuevo o de un diente de leche criopreservado perforado de acuerdo con la invención, que se cultivaron en la etapa 3, se retiraron de los matraces usando tripsina y fueron caracterizadas mediante citofluorimetría.

30 Las células madre mesenquimales aisladas a partir de muestras de un diente de leche nuevo y de muestras de un diente de leche criopreservado perforado de acuerdo con la presente invención han demostrado el inmunofenotipo normal de las células madre mesenquimales, a saber: CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD44⁺ y HLA-ABC⁺.

Estas células expresan, además, CD146, NG2, PDGFRbeta, alfa-SMA, pero no expresan CD34, CD45 y CD56.

35 Además, estas células resultan negativas para la expresión de CD31, CD144, KDR y HLA-DR, confirmando, de este modo, su perfil normal de células madre mesenquimales (Figuras 5a-5b-5c-5d). Por lo tanto, las células madre mesenquimales aisladas a partir de un diente de leche perforado y criopreservado de acuerdo con la presente invención, se caracterizan debido a los siguientes inmunofenotipos: CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD44⁺, HLA-ABC⁺, CD146⁺, NG2⁺, PDGF-Rbeta⁺ y alfa-SMA⁺. Además, las células son CD34⁻, CD45⁻, CD56⁻, CD31⁻, CD144⁻, KDR⁻ y HLADR⁻.

40 Los mismos porcentajes de los marcadores que se enumeran anteriormente se encontraron, además, en las células en la sexta etapa de cultivo.

45 En especial, los marcadores que se analizan son: CD146, alfa-SMA (SMA), PDGFRbeta (PDGFRB), CD90, CD44, CD73, HLA-ABC, HLA-DR, CD105, KDR, CD144, CD31, CD45 and CD34. Las células resultan positivas para: CD90, CD73, CD105, CD44, HLA-ABC, CD146, NG2, PDGFRB, SMA.

Las células resultan negativas para: CD34, CD45, CD56, CD31, CD144, KDR y HLA-DR.

50 Diferenciación de células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de un diente de leche nuevo (sin exfoliar).

Las células madre mesenquimales aisladas a partir de la pulpa dental de un diente de leche nuevo se diferenciaron a nivel adipogénico y osteogénico usando medios de cultivo adecuados.

55 Con el fin de inducir la diferenciación adipogénica, las células madre mesenquimales se colocaron en placas a una densidad celular de $2,1 \times 10^4$ células/cm² en un medio que se conoce como Inducción Adipogénica de MSC humanas y Mantenimiento (art. nro. PT-3102B/PT-4135 y PT-3102A/PT-4122 - Lonza).

60 Cuando las células alcanzaron la confluencia, se llevaron a cabo 3 ciclos de inducción/mantenimiento, luego se cultivaron las células madre mesenquimales durante 7 días adicionales en el medio agregado que se conoce como Medio de Mantenimiento de Diferenciación Adipogénica (Lonza), reemplazando el medio de cultivo cada 2-3 días.

Las células se tiñeron con solución Rojo Aceite O (Sigma-Aldrich) de manera tal de mostrar vacuolas lipídicas.

Con el fin de diferenciar osteogénicamente las células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de un diente de leche nuevo, se cultivaron $3,1 \times 10^3$ células/cm² durante 3 semanas en un medio que se conoce como Medio Osteogénico de MSC humanas (art. nro. PT-3924/PT4120 Lonza).

5 Las células que fueron inducidas para lograr diferenciación osteogénica se fijaron, en primer lugar, con alcohol etílico 70% durante 1 hora y se tiñeron luego durante 10 minutos con 40 mM de Rojo Alizarín S (Sigma-Aldrich) para mostrar los depósitos de calcio.

10 Las imágenes de los ensayos colorimétricos se consiguieron con microscopio Nikon Eclipse TS100 equipado con lentes 40x/0,55 Ph1 ADL y 20x/0,40 Ph1 ADL, y las fotografías se consiguieron con una cámara Nikon Digital Slide DS-L1.

15 Las células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de un diente de leche nuevo pueden diferenciarse, bajo un estímulo de diferenciación adecuado, en células de los linajes osteogénicos y adipogénicos.

20 Bajo condiciones de diferenciación osteogénica, las células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de un diente de leche nuevo mineralizan con rojo Alizarín y se tiñen específicamente para depósito de calcio. Bajo condiciones de diferenciación adipogénicas, las células madre mesenquimales aisladas a partir de pulpa dental de un diente de leche nuevo generan vacuolas lipídicas luego de 2 semanas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para criopreservación de la pulpa de un diente entero y aislado, que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a. realizar al menos un orificio en un diente entero con un láser en el que dicho orificio alcanza, al menos, la dentina y no atraviesa la pulpa;
 - b. poner el diente perforado de este modo en contacto con un agente criopreservante;
 - 10 c. ajustar el diente en contacto con el agente criopreservante a una temperatura de cri congelación.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho diente es un diente de leche, preferiblemente un diente de leche sin exfoliar.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho diente es un diente aislado de una persona de entre 6-20 años de edad, preferiblemente de entre 5-14.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho al menos un orificio se constituye en el área del cuello de dicho diente,
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho al menos, un orificio consiste de 1 a 4 orificios, preferiblemente de 1 a 2 orificios para un diente canino o un diente incisivo; preferiblemente de 2 a 4 para un diente molar.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho al menos, un orificio tiene un diámetro de 0,001 a 0,5 milímetros, preferiblemente de 0,07 a 0,3 milímetros.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho orificio se constituye de manera tal que atraviesa las capas de esmalte y de dentina y alcanza la capa de pulpa, sin dañar la pulpa.
- 30 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de a) perforación del diente se lleva a cabo con un láser que tiene una longitud de onda de 1064 a 10600 nm, preferiblemente con un láser que se selecciona de un grupo que consiste de neodimio, holmio, erbio/cromo y láseres de CO₂, más preferiblemente, con un láser que se selecciona entre erbio y neodimio.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente criopreservante se selecciona de un grupo que consiste de DMSO, glicerol, triol, sucrosa, trialosa, lactosa, etileno o propilenglicol, dextrano, hidroxietil almidón, polivinilpirrolidona, formamida, 1-2-propanodiol, etanol, metanol y polietileno; preferiblemente, dicho agente criopreservante es DMSO.
- 40 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de cri congelación c) se lleva a cabo a una temperatura a partir de -15 °C a -196 °C, preferiblemente de -50 a -90 °C.
- 45 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, una etapa de descongelación del diente y/o de partición del diente y/o de aislamiento de células madre a partir de pulpa dental.
12. Un diente perforado criopreservado que se obtiene mediante el uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque comprende, al menos, un orificio en el que dicho orificio alcanza, al menos, la dentina y no atraviesa la pulpa.
- 50

Fig.1

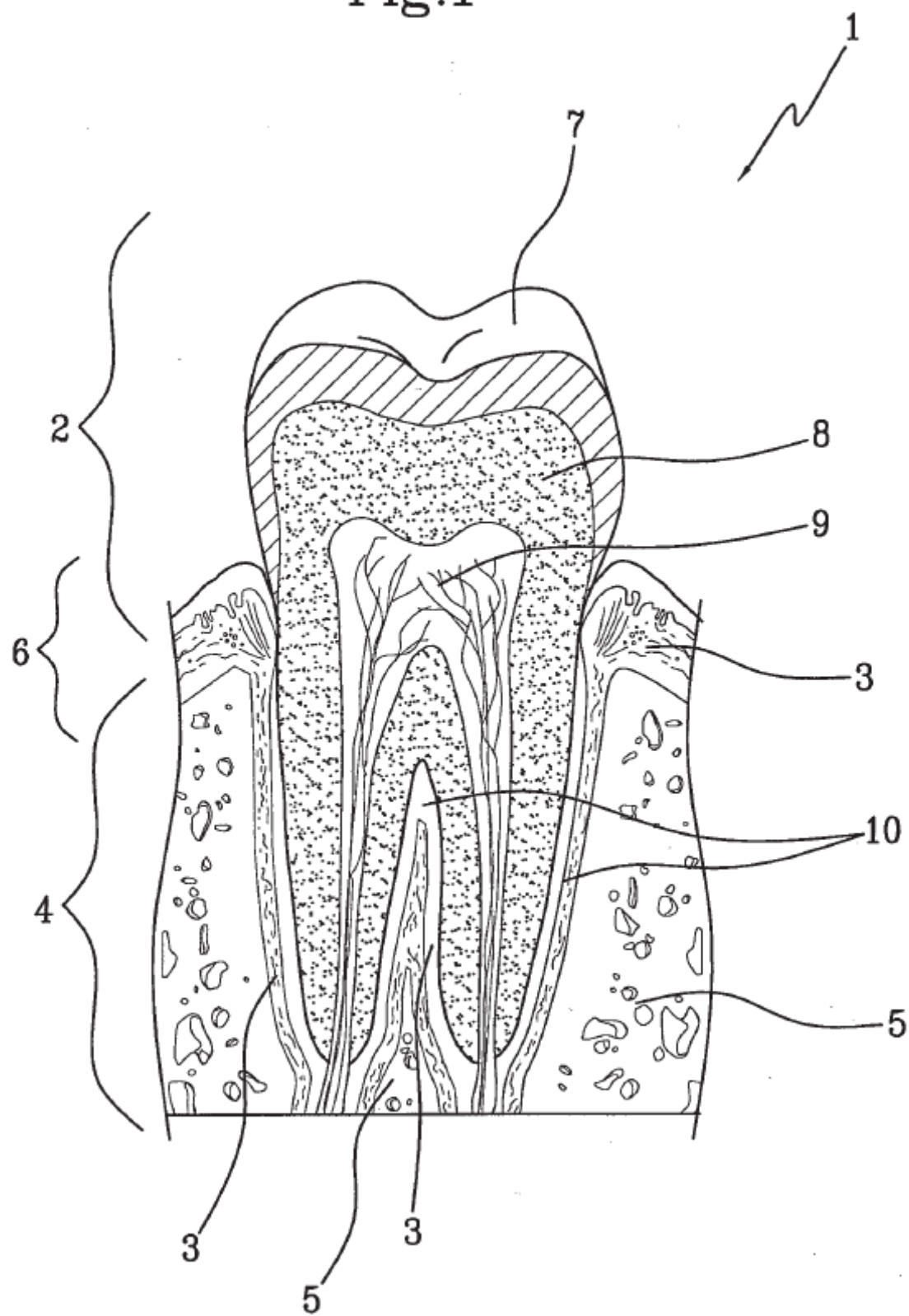


Fig.2A

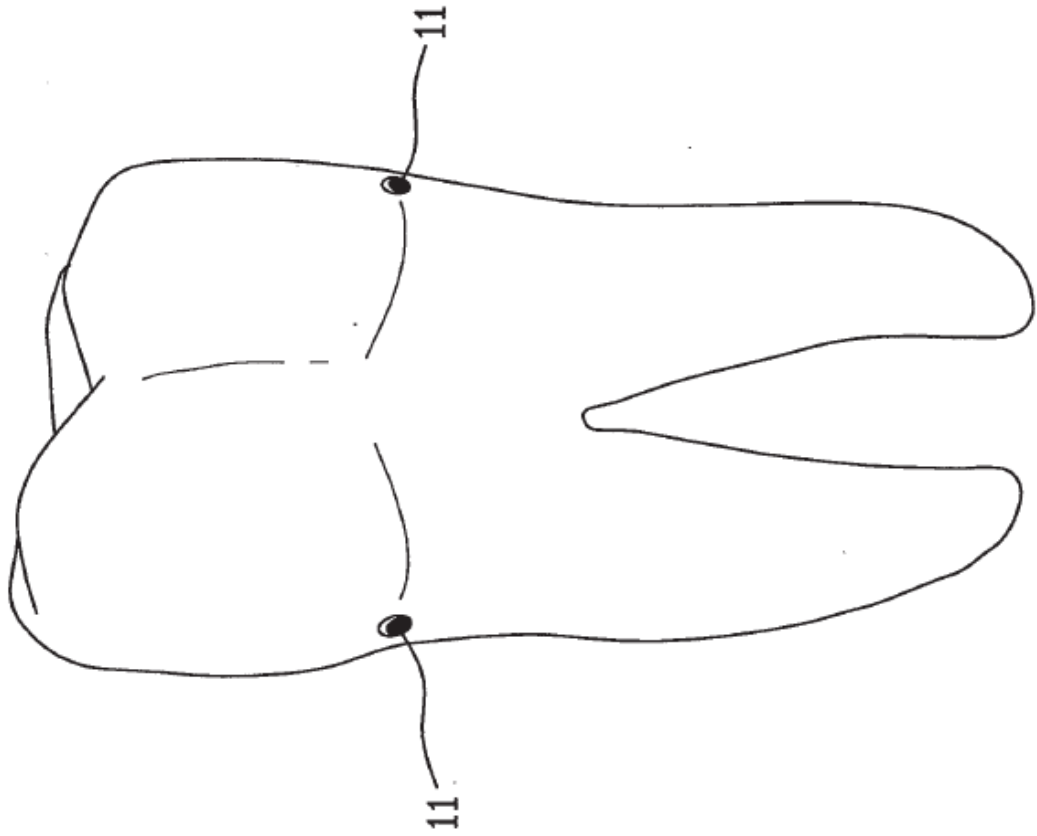
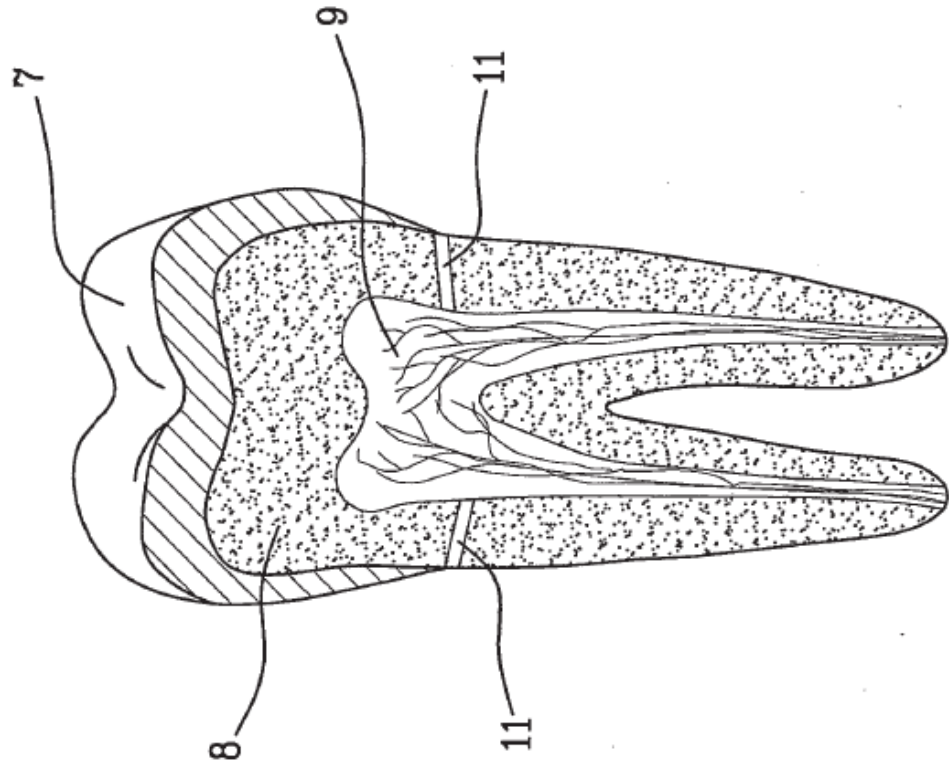


Fig.2B



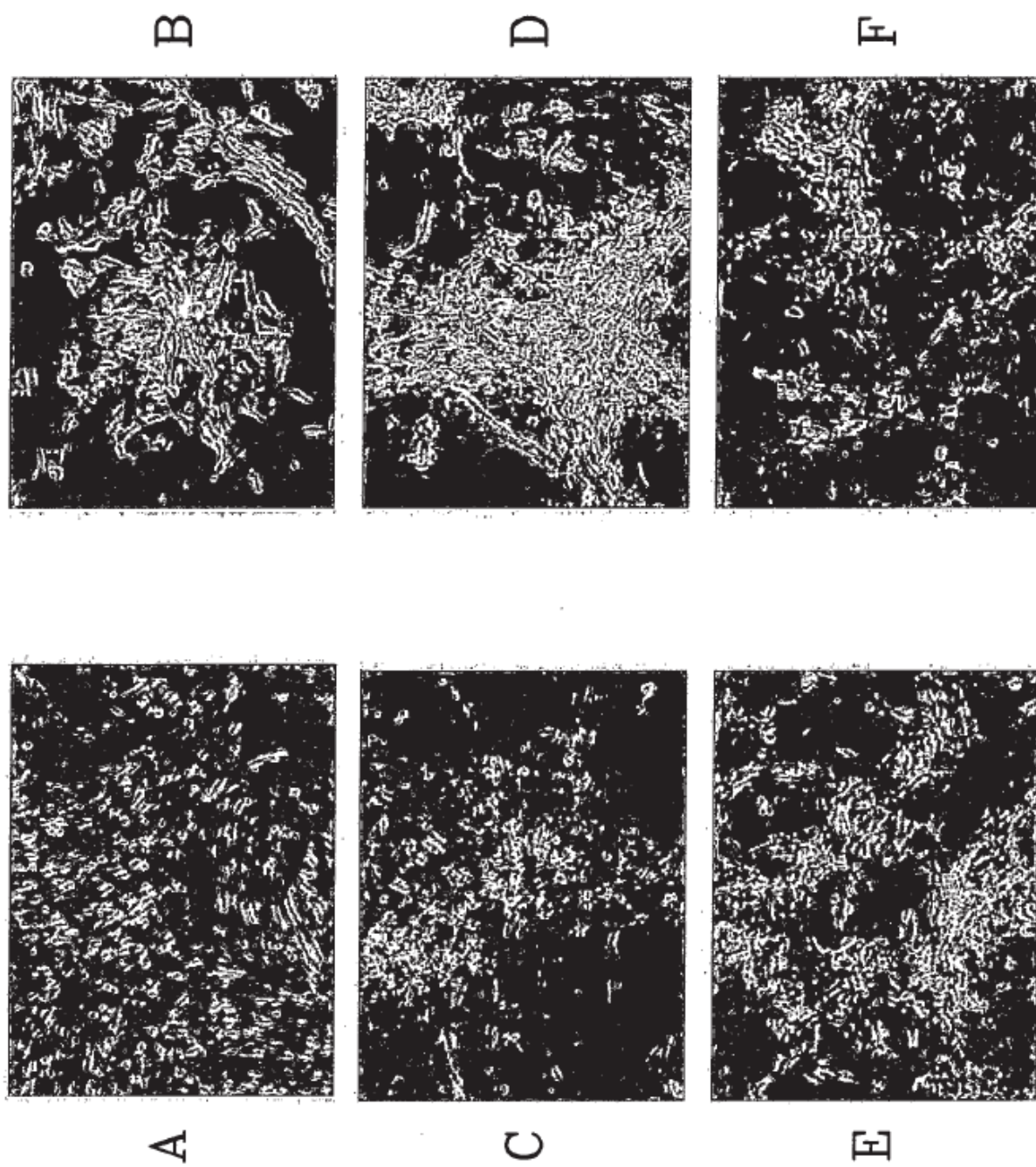


Fig.3

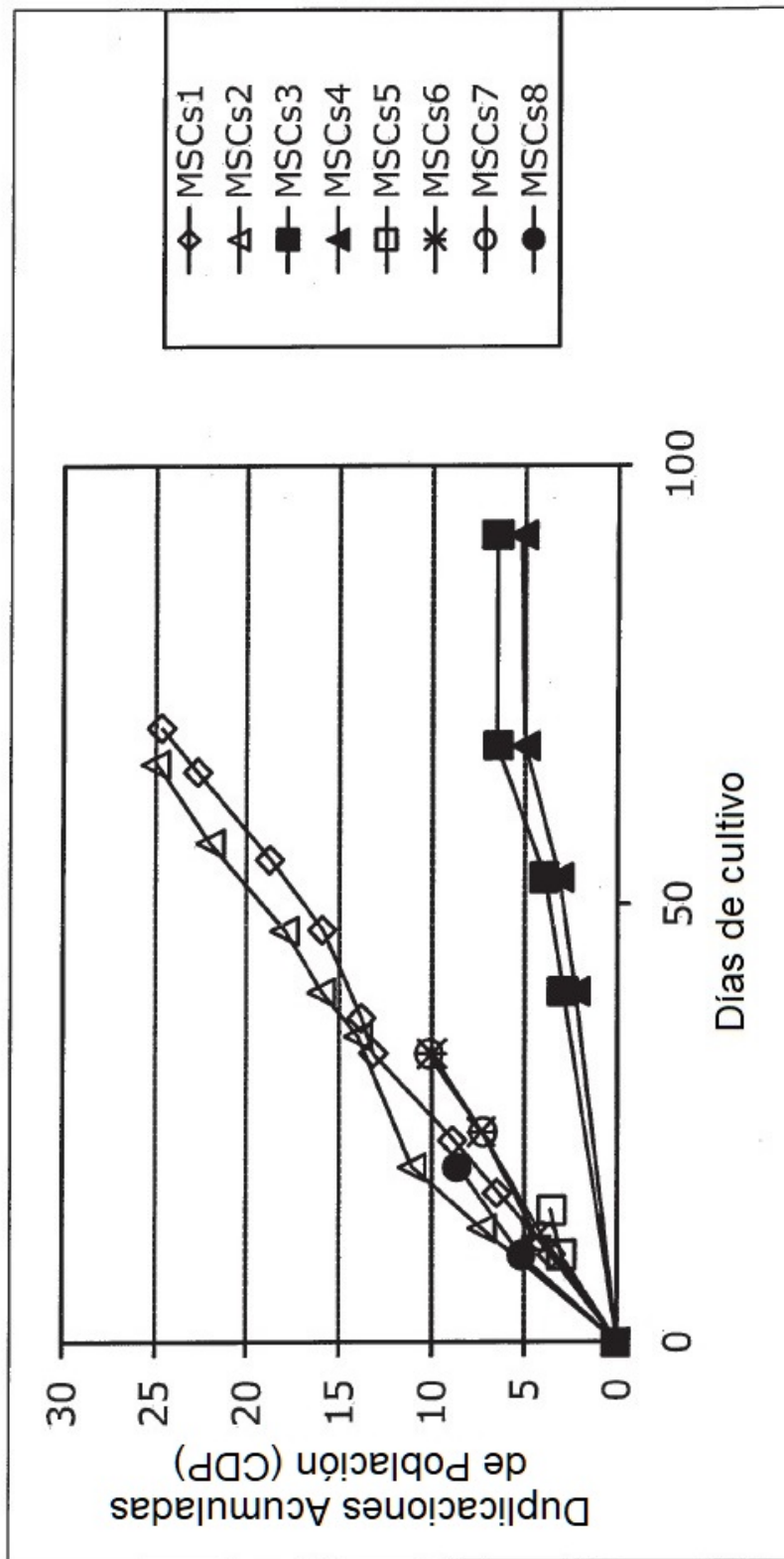


Fig.4

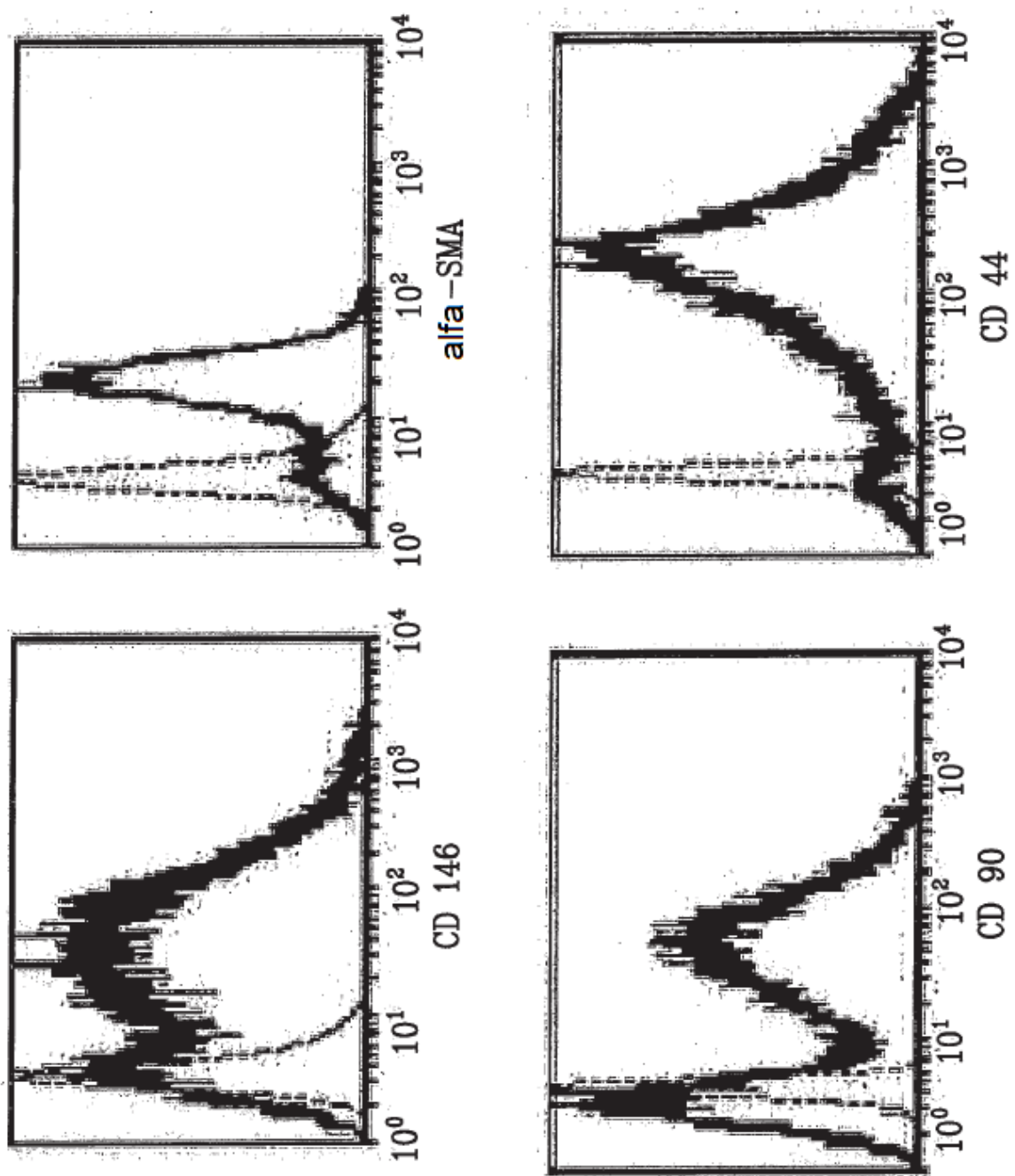


Fig.5a

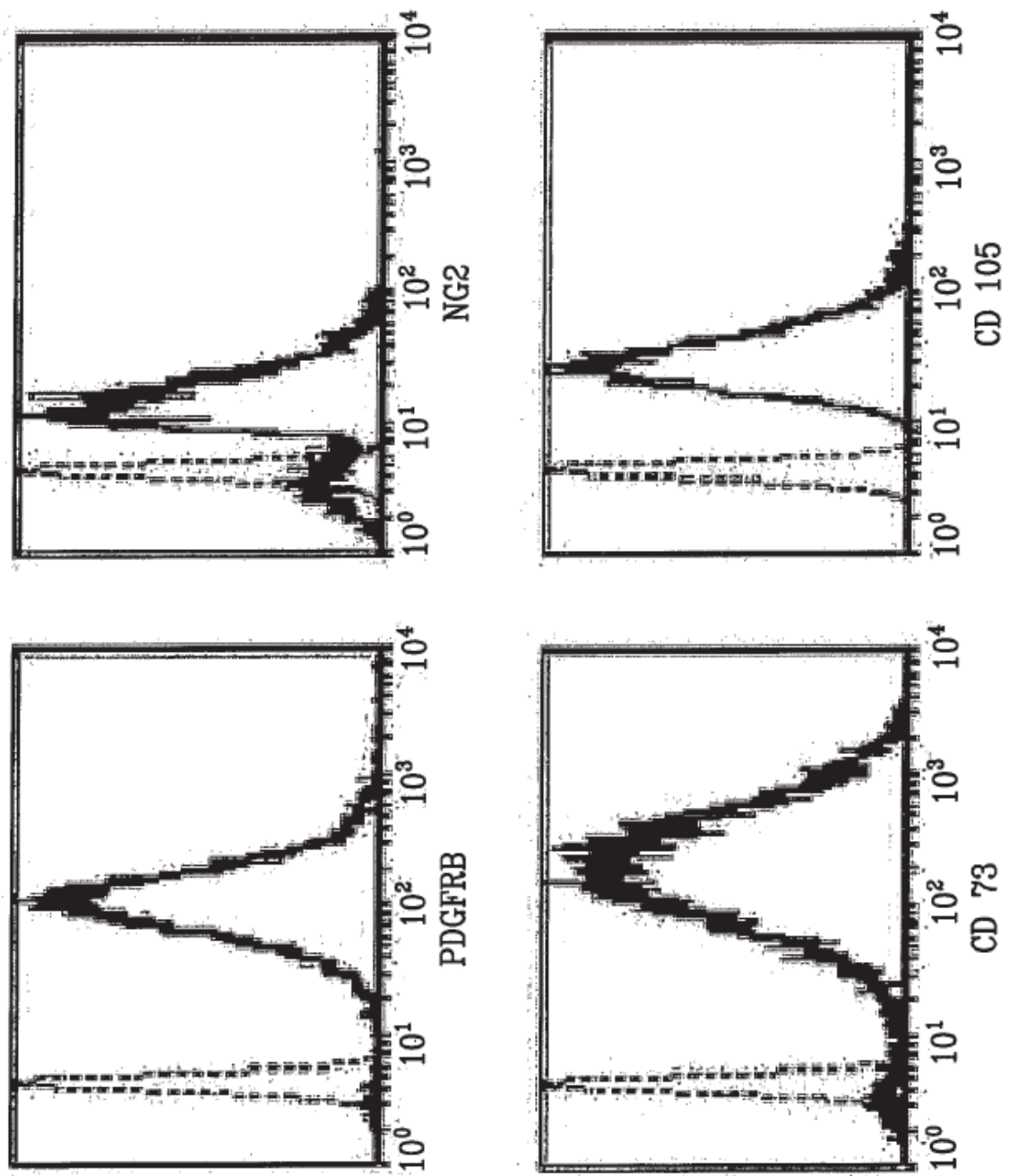


Fig.5b

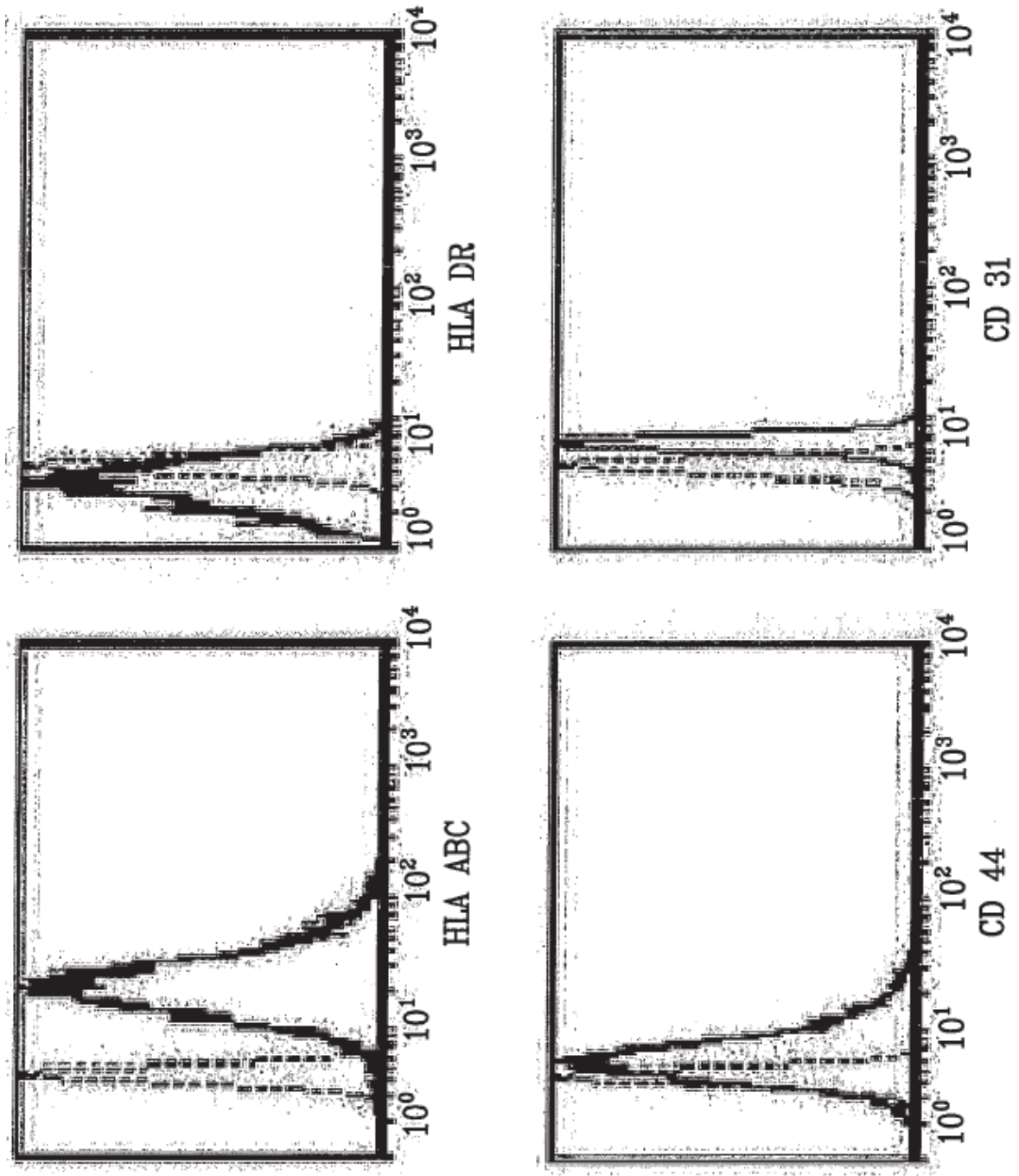


Fig.5c

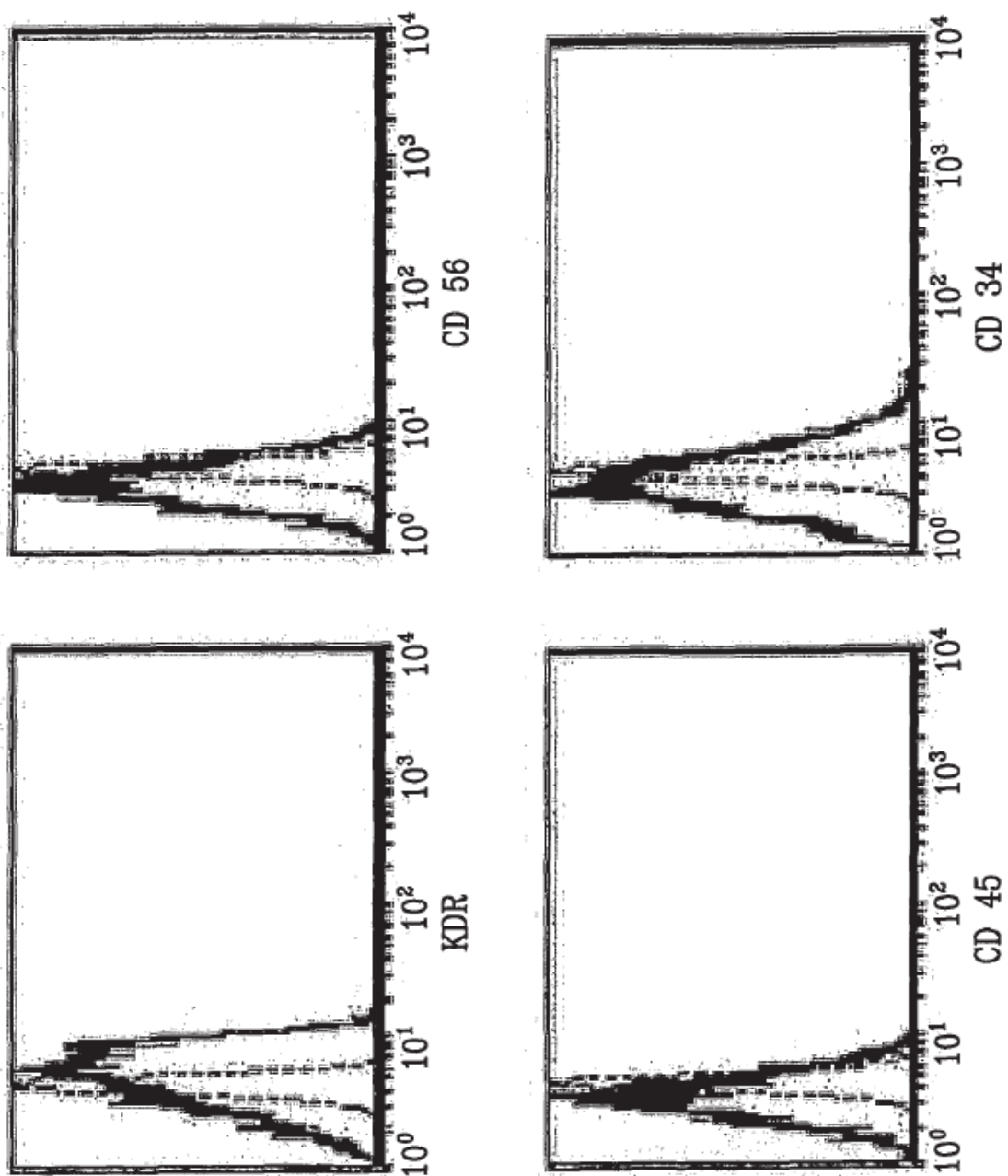


Fig.5d