

Revisión de Tema

Medios de almacenamiento de dientes para estudios de color

Teeth storage media for color studies

Meios de armazenamento de dentes para estudos de cor

Carolina Torres-Rodríguez¹ , Ana Milena Santiago-Medina² , Edgar Delgado-Mejía³ 

1. PhD, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Facultad de Odontología. Departamento de Salud Oral.

2. Odontóloga, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

3. MSc, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

Fecha correspondencia:

Recibido: noviembre de 2019.

Aceptado: mayo de 2020.

Forma de citar:

Torres-Rodríguez C, Santiago-Medina AM, Delgado-Mejía E. Medios de almacenamiento de dientes para estudios de color. Rev. CES Odont 2020; 33(2): 136-146.

Open access

© Derecho de autor

Licencia creative commons

Ética de publicaciones

Revisión por pares

Gestión por Open Journal System

DOI: <http://dx.doi.org/10.21615/cesodon.33.2.12>

ISSN 0120-971X

e-ISSN 2215-9185

Resumen

Todos los medios de almacenamiento usados para ensayos de investigación alteran las propiedades físicas y/o químicas de los dientes, especialmente el color dental. El objetivo de este trabajo es establecer cual es el medio de almacenamiento más indicado para dientes que van a ser usados en estudios de color, basados en una revisión sistematizada y proponer un protocolo específico. Mediante las palabras clave "storage, medium", "teeth", "color", "stability", "saliva", "formalin", "thymol", "ethanol" conectadas por AND o OR y consultando las bases de datos PubMed, ScienceDirect, Embase, Scopus, Scielo, Lilacs y Google Scholar, se seleccionaron artículos con nueve criterios de evaluación a tres niveles de evidencia (alto, medio y bajo). Se realizó la síntesis y el análisis de la literatura, y como producto se establecieron los parámetros para el protocolo de almacenamiento. El resultado final arrojó 8 artículos, dos con nivel de evidencia alto para la saliva natural y/o saliva artificial sin carboximetilcelulosa. Tres con nivel de evidencia medio para el timol 0,1%, cloramina T 0,5%, glutaraldehído 2% y formalina 10%. Tres con nivel de evidencia bajo para el etanol, óxido de etileno o hidróxido de potasio. El medio de almacenamiento más indicado es saliva humana seguida por saliva sintética sin carboximetilcelulosa y se estableció con estos parámetros el protocolo del almacenamiento.

Palabras clave: diente, color, medios de almacenamiento.

Abstract

All storage media used in research assays alter some of the physical and/or chemical properties of the teeth, especially tooth color. The objective was to establish which is the most appropriate medium for storing teeth for color studies based a systematized review, and to propose a specific protocol. Using as keywords "storage", "medium", "teeth", "color", "stability", "saliva", "formalin", "thymol", "ethanol" connected by AND o OR and consulting PubMed, ScienceDirect, Embase, Scopus, Scielo, Lilacs and Google Scholar databases, articles were selected to provide information on storage media with eight criteria for evaluating at three levels of high,

medium and low evidence. An analysis and synthesis of the literature led to the results and the storage protocol. The search yielded eight articles, two with a high level of evidence for natural saliva and / or artificial saliva without carboxymethylcellulose. Three with a medium level of evidence for 0.1% thymol, 0.5% chloramine T, 2% glutaraldehyde and 10% formalin. Three with low evidence level for ethanol, ethylene oxide or potassium hydroxide. Storage medium most indicate is human saliva, followed by synthetic saliva without carboxymethylcellulose and so a storage protocol was established.

Keywords: tooth, color, storage; medium.

Resumo

Todos os meios de armazenamento utilizados para ensaios de pesquisa alteram as propriedades físicas e/ou químicas dos dentes, especialmente a cor dos dentes. O objetivo é estabelecer qual meio de armazenamento é mais adequado para os dentes serem usados em estudos de cores com base em uma revisão sistemática, e propor um protocolo específico. Usando as palavras-chave "storage medium", "teeth", "color", "stability", "saliva", "formalin", "thymol", "ethanol" conectados por AND ou OR e consultando as bases de dados PubMed, ScienceDirect, Embase, Scopus, Scielo, Lilacs e Google Scholar, os artigos foram selecionado com nove critérios de avaliação em três níveis de evidência (alto, médio e baixo). Foi feita a análise, síntese da literatura e como produto foram estabelecidos os parâmetros para o protocolo de armazenamento. O resultado final rendeu 8 artigos, dois com alto nível de evidência para saliva natural e/ou saliva artificial sem carboximetilcelulose. Três com nível médio de evidência para timol 0,1%, cloramina T 0,5%, glutaraldeído 2% e formalina 10%. Três com baixo nível de evidência de etanol, óxido de etileno ou hidróxido de potássio. O meio de armazenamento mais indicado é a saliva humana, seguida pela saliva sintética sem carboximetilcelulose e o protocolo de armazenamento foi estabelecido com esses parâmetros

Palavras-chave: dente, cor, meios de armazenamento.

Introducción

El uso de diferentes medios de desinfección y almacenamiento pueden generar cambios en la estructura y composición del esmalte que afectan sus propiedades físicas (ópticas) (1-4) y químicas. Esto representa un gran reto para los investigadores, especialmente en estudios de color, donde se requieren medios que afecten lo menos posible y que no interfieran en los resultados.

Desde la creación del Biobanco de Dientes de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá en el 2014 (5) se ha recopilado información a partir de revisiones bibliográficas y estudios in-vitro, con el fin de estandarizar la mayor cantidad de variables posibles respecto a la manipulación de las muestras. Esto permite obtener resultados comparables con estudios similares y permitir un avance real y confiable en el conocimiento. Producto de este ejercicio se han establecido protocolos de recolección, transporte, desinfección, almacenamiento y sellado reversible para diversos tipos de ensayos (6-8).

El Biobanco cuenta actualmente con un protocolo de almacenamiento en Cloramina T al 0,5% a 4°C (8). Este compuesto químico tiene excelentes características como desinfectante, es activo frente a virus, hongos, bacterias Gram+ y Gram-, estable a

temperaturas altas o bajas, biodegradable y de manipulación segura; a pesar de ser efectivo y conservador (9,10) dista de ser perfecto, ya que en estudios recientes se ha encontrado que los especímenes que llevan mucho tiempo sumergidos en este compuesto, presentan cambios de color. Esto representa un problema, ya que si los dientes sobre los que se van estudiar color están muy blancos, seguramente no presentarán grandes diferencias postratamiento, lo que complica la lectura e interpretación de los resultados. Actualmente se proponen otros como, solución balanceada de Hank, etanol 70% y Azida de sodio 0,2% (3,11) pero presentan problemas de desinfección, cambios en las propiedades de los especímenes y toxicidad.

El objetivo de este artículo es establecer el medio de almacenamiento más indicado para dientes que van a ser usados en estudios de color basados en una revisión sistematizada, y proponer un protocolo específico. Adicionalmente permitirá conocer el estado del arte respecto a los efectos y/o cambios que generan los diferentes medios de almacenamiento sobre algunas propiedades de los dientes.

Materiales y métodos

Tipo de investigación: secundaria.

Pregunta de la revisión sistematizada: ¿Cuál es el medio de almacenamiento más indicado y que afecte menos las propiedades físico-químicas de dientes que van a ser usados en en estudios de color?

Fuentes y búsqueda de información: Dos revisores de forma ciega consultaron las bases de datos Cochrane, Prospero, Tripdatabase, Epistemonikos y DARE, en las cuales no se encontraron revisiones sistemáticas publicadas referentes a medios de almacenamiento de dientes para estudios de color. Adicionalmente se hicieron búsquedas en las bases de datos PubMed, ScienceDirect, Embase, Scopus, Scielo y Lilacs usando como palabras clave: "storage, medium, teeth, color, stability, saliva, formalin, Thymol, Ethanol", conectadas por el operador booleano AND o OR de diferentes maneras (tabla No 1) y la búsqueda manual por el método bola de nieve. Los límites fueron artículos primarios experimentales, disponibles de cualquier año, texto completo, idioma inglés, portugués o español. Los criterios de exclusión fueron artículos que usaran medios de almacenamiento para dientes avulsionados y/o reimplantados y ensayos de adhesión a diferentes materiales diferentes al diente (12).

Tabla 1. Estrategias de búsqueda

1	Storage	AND	Medium	AND	Teeth				
2	Storage	AND	Medium	AND	Teeth	AND	Color		
3	Storage	AND	Medium	AND	Teeth	AND	Color	AND	Stability
4	Storage	AND	Teeth	AND	Color	AND	Saliva		
5	Storage	AND	Medium	AND	Teth	AND	Color	AND	Saliva
6	Storage	AND	Teeth	AND	Color	AND	Formalin		
7	Storage	AND	Medium	AND	Teeth	AND	Color	AND	Formalin
8	Storage	AND	Teeth	AND	Color	AND	Thymol		
9	Storage	AND	Medium	AND	Teeth	AND	Color	AND	Thymol
10	Storage	AND	Teeth	AND	Color	AND	Etanol		
11	Storage	AND	Medium	AND	Teeth	AND	Color	AND	Etanol

Selección de los estudios: Se seleccionaron primero por título, luego por resumen y posteriormente por texto completo. Posteriormente fueron evaluados por dos revisores independientes. Se establecieron que para ser elegibles debían tener un mínimo de los criterios utilizados para la evaluación (12), figura 1.

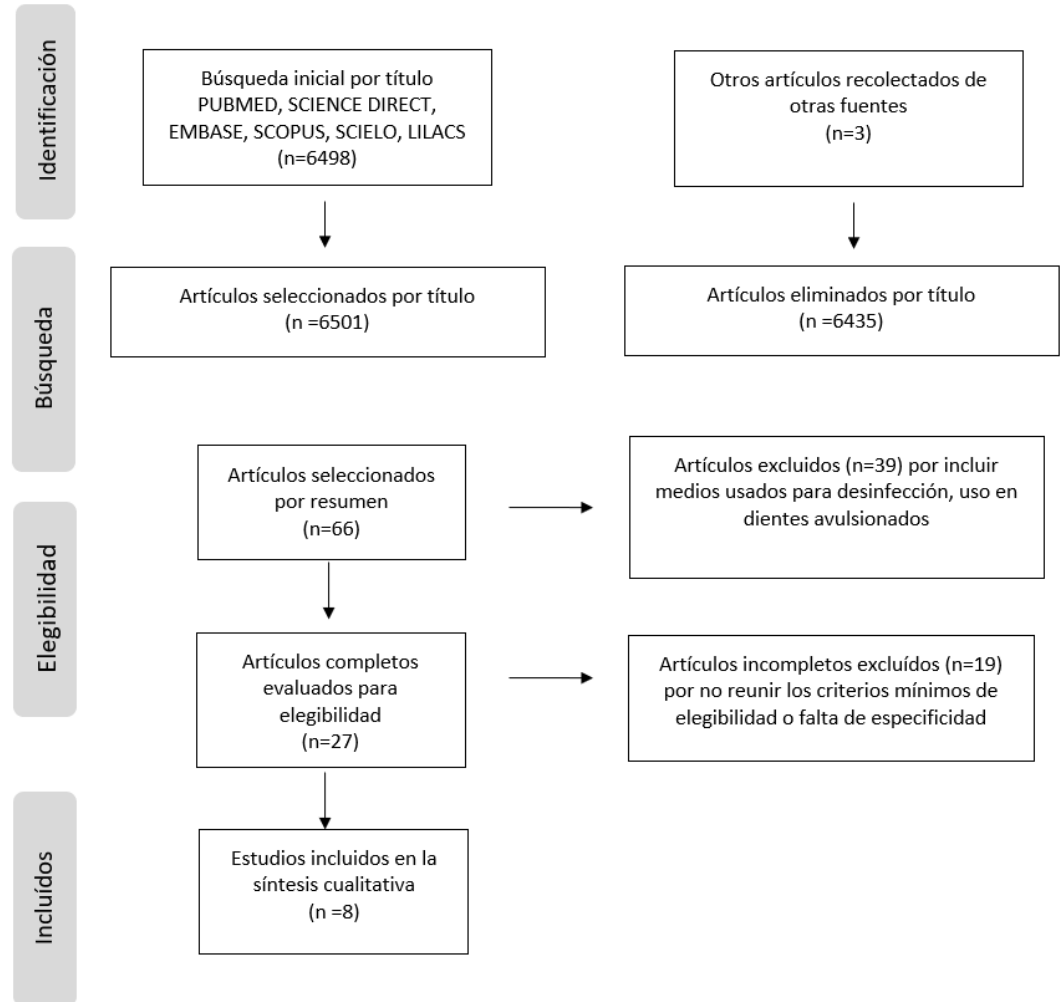


Figura 1. Procedimientos de selección de estudios de acuerdo a la guía prisma

Proceso de recolección de los datos y síntesis de la evidencia: Los datos se reunieron en una tabla en formato Microsoft Excel de Microsoft® Office 2013; en la que se incluyó información como: año de la publicación, revista, autores, título del artículo, tipo de dientes, medio de almacenamiento, objetivo del artículo, grupo de estudio (control y experimental), resultados, discusión o conclusión relacionada con el medio de almacenamiento. Los artículos se evaluaron respecto a la información que ofrecen sobre los medios de almacenamiento usados, y para dar información respecto a la rigurosidad de cómo se realizaron los estudios y si se controlaron los sesgos, se establecieron nueve criterios de evaluación: medio de almacenamiento usado, tamaño de la muestra usada, tiempo de almacenaje, tratamiento estadístico, metodología bien establecida y reproducible, entrenamiento o nivelación del evaluador, presencia de un grupo control, efectos o cambios que generan los medios de

almacenamiento sobre las propiedades químicas o físicas, pertinencia del artículo; cada uno de los criterios recibió una calificación así; 0= No da información, 1= Información insuficiente, 2= Información completa, con un máximo posible de 14 puntos; seguidamente el nivel de evidencia de los artículos, creado por los autores, se clasificó según el puntaje obtenido así; ≥ 11 =Alto; 6-10=Medio; <6 = Bajo.

Resultados

El resultado de la búsqueda se observa en la gráfica No 1. Los 27 artículos seleccionados se leyeron detenidamente los títulos, los resúmenes, los textos completos y se descartaron 19 artículos por no reunir los criterios mínimos de elegibilidad y/o falta de especificidad. Se revisaron minuciosamente 8 artículos completos, todos en idioma inglés, seis en dientes humanos y dos en dientes bovinos. El consolidado de los resultados se presenta en la tabla No 2 donde se describe los criterios y la evaluación obtenida de cada artículo.

Según los criterios de evaluación, sólo 2 artículos presentaron un nivel de evidencia alto, Bajaj N. y col. 2014 (13) y Zeczkowski M. y col. 2015 (14). Ambos estudios presentan información completa sobre los medios de almacenamiento empleados, Bajaj N. y col en 2014 reportan cambios en el color hacia tonalidades más blancas en 35% de los especímenes almacenados en saliva sintética; sin embargo, ellos consideran que el tipo de esterilización previo jugó un papel fundamental en este cambio (13). Zeczkowski M. y col en 2015 mencionan que los especímenes almacenados en agua purificada presentaron cambios significativos en las propiedades mecánicas y en la estabilidad del color, presentando como el mejor medio de almacenamiento la saliva natural. También afirman que la saliva artificial sin carboximetilcelulosa es una buena opción como medio de almacenamiento para estudios in vitro ya que los resultados de la variabilidad del color son comparables con el grupo control "In situ" (14).

Tres de los 8 artículos presentaron un nivel de evidencia medio Salem M. y col. 2015 (15), Tosun y col. 2007 (16) y Lee J.J. y col 2007 (17). El artículo de Salem M. y col. presentan información sobre la formalina al 10% como medio de almacenamiento que no afecta significativamente la microdureza de la dentina o el esmalte, sin embargo, no incluye otros medios de almacenamiento, ni grupo control, ni datos sobre la estabilidad o alteración del color (15). Por su parte Tosun G. y col. en 2007 reportan una disminución de la fuerza de adhesión de los dientes almacenados en timol al 0,1% y una similitud en la fuerza de adhesión de los dientes almacenados en formalina o en agua destilada (16). Lee J.J. y col en 2007 mencionan que el cloruro de sodio al 0,9% disminuye la resistencia de unión compuesto-dentina. Para la cloramina T al 0,5%, el glutaraldehído al 2% y la formalina al 10%, reportan que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la resistencia de unión compuesto-dentina antes y después del almacenamiento. La única referencia de variabilidad del color la manifiestan en el caso de hipoclorito al 5,25%, el cual cambio el color de los especímenes haciéndolos más blancos (17).

Los otros tres artículos evaluados presentaron un nivel de evidencia bajo [Dewald J. 1997 (9), Taube y col. 2010 (18) y Immerz y col. 2012 (19)]. Dewald J. en 1997 (9), manifiesta que sólo hubo cambios en los dientes que fueron almacenados en etanol y los que estuvieron en óxido de etileno que no presentaron alteraciones. Taube y col en 2010 reportan la degradación del esmalte y la pérdida superficial de sustancia en los especímenes sumergidos en hidróxido de potasio (18). Immerz y col. en 2012

menciona la posibilidad de un cambio de color debido al medio de almacenamiento timol al 0,1% (19). La información que ofrecen estos artículos respecto a los medios de almacenamiento, teniendo en cuenta los criterios de evaluación, es muy pobre, por lo tanto, su validez es limitada.

Tabla 2. Tabla de evaluación y análisis de los artículos

No	Autor	Medio de almacenamiento usado	Tamaño de la muestra	Tiempo de almace-naje	Trata-miento es-tadístico	Metodología bien establecida y reproducible	Nivel-ación del evalua-dor	Grupo con-trol	Perti-nencia del artí-culo	Efecto PFOQ	To-tal	Nivel de viden-cia
1	Zeczowski M. y col. 2015 (14)	Saliva natural Saliva artificial Agua purificada	2	1	2	2	2	2	1	SI	13	ALTO
2	Bajaj N. y col. 2014 (13)	Saliva artificial	2	2	2	2	2	2	2	SI	14	ALTO
3	Salem M. y col. 2015 (15)	Formalina al 10%	2	0	2	1	2	0	1	SI	8	MEDIO
4	Tuson G. y col. 2007 (16)	Timol al 0,1% Formalina al 10% Agua destilada	2	2	1	1	2	0	1	SI	8	MEDIO
5	Lee J.J. y col. 2007 (17)	Cloruro de sodio al 0,9% Cloramina T al 0,5% Hipoclorito de sodio al 5,25% Formalina al 10% Glutaraldehido al 2%	1	1	1	1	2	0	1	SI	7	MEDIO
6	Dewald JP. 1997 (9)	Etanol óxido de etileno	0	0	1	1	1	0	1	SI	4	BAJO
7	Taube F y col. 2010 (18)	Hidróxido de potasio	0	1	1	1	1	0	0		4	BAJO
8	Immerz y col. 2012 (19)	Timol al 0,1%	2	1	1	0	1	0	0	Si	5	BAJO

Fuente: elaboración propia.

Discusión

Para responder la pregunta de investigación ¿Cuál es el medio de almacenamiento más indicado y que afecte menos las propiedades fisico-químicas de dientes que van a ser usados en en estudios de color? sí se parte desde el enfoque biomimético y conociendo que la sustancia en la que están sumergidos los dientes naturales es la saliva, se puede afirmar que el medio de almacenamiento más indicado será, desde luego, el que más se asemeje a la saliva natural.

La composición de la saliva natural difiere con la edad y entre personas, e incluso en una misma persona varía en los diferentes tiempos del día y sí hay o no presencia de estímulo. La fracción que más varía es principalmente la orgánica, corresponde al 0,1% aproximadamente de su contenido, es excesivamente compleja, nadie en

este momento podría imitarla aceptablemente y su costo sería impagable ya que contiene diversos componentes como proteínas, inmunoglobulinas, polipéptidos, bacterias etc.

Zeczkowski M. y col. en 2015 en su estudio utilizó como medio de almacenamiento saliva natural, recolectada de donantes sanos con características específicas, y sometida a diferentes procesos de filtración y centrifugado para posterior almacenamiento y uso (14). Todo esto genera altos costo ya que cambia la potencial zeta de la bioapatita y modifica la relación calcio/sodio. La variación en la composición de la saliva de los posibles donantes haría poco probable la reproducibilidad de las condiciones entre un estudio y otro.

La siguiente opción es la saliva sintética. En el estudio de Bajaj N. y col en 2014, el 35% de los especímenes presentaron un cambio significativo de color después de doce semanas de almacenamiento. Esta variabilidad en el color está influenciada según los autores por el proceso de esterilización previo (30 minutos de ultrasonificación en 5 ml de H₂O² al 6%) y el uso de dientes deciduos, ya que presentan un mayor porcentaje de contenido orgánico en su composición (13). Zeczkowski M. y col. en 2015 usaron saliva sintética sin carboximetilcelulosa (CMC) como medio de almacenamiento y afirman que la presencia de CMC puede reducir la remineralización de los dientes mediante la formación de complejos calcio y / o fosfato, dando como resultado la falta de disponibilidad de estos iones para la sustitución mineral. Además, la CMC puede disminuir la velocidad de difusión de los minerales en la estructura del diente (14). Otro estudio menciona que la saliva sintética que usaron y que contenía cloruro de calcio causó precipitación de sales en la superficie lo que podría afectar en alguna medida el color (20).

Se propone un tipo de saliva sintética que imite el contenido inorgánico, elaborada explícitamente para estudios de color, sin ningún ión que lo afecte, como el calcio, hierro o el cerio. Cabe notar que previamente se debe hacer una desinfección mecánica y química efectiva de la raíz y la cámara pulpar de los especímenes, manteniendo la corona tan intacta como sea posible (8) y teniendo en cuenta que el tiempo de almacenamiento no debe exceder más de 4 semanas (20,21). Tiene una gran ventaja frente a los otros medios y es que no afecta la fluorescencia (11).

Los artículos presentan otros 9 posibles medios de almacenamiento entre ellos la formalina al 10% (13,14,17,19) y el glutaraldehído al 2% (19); si bien estos estudios declaran que no afectan significativamente ni la microdureza, ni la resistencia de adhesión del esmalte y la dentina, estos compuestos químicos reaccionan con las sustancias nitrogenadas (parte orgánica de los dientes) alterando la dureza, ya que entrecruzan las cadenas proteicas y las convierte de termoplásticas a termoestables, lo que genera un cambio en las propiedades.

Por su parte el etanol al 0,1% (9) actúa extrayendo el agua de la parte orgánica del esmalte y de la dentina deshidratando los especímenes. El hidróxido de potasio a pH 14 (15) hidroliza rápidamente las proteínas produciendo degradación y pérdida de sustancia superficial. El agua destilada o purificada (16,19), extrae sales del diente y cambia indirectamente la permeabilidad, porosidad, resiliencia, dureza, debido a la diferencia de presión osmótica. El hipoclorito de sodio al 5,25% (17,22) es un oxidante y desinfectante fuerte que afecta rápidamente la parte orgánica del diente, alterando entre otras cosas, la superficie del esmalte (23) y el color. Ninguno de estos se recomienda como medio de almacenamiento.

El cloruro de sodio al 0,9% disminuye la resistencia de unión dentina-compuesto (19) probablemente debido a que saca del diente el magnesio, el calcio, el potasio, el sulfato y los carbonatos; sin embargo, no afecta el sodio y ni el cloro; por lo tanto, se puede utilizar como un medio de almacenamiento alternativo, sencillo, fácil y económico.

La cloramina T al 0,5% no altera significativamente la resistencia de unión compuesto-dentina (19), presenta buenas características como medio de almacenamiento, no obstante, no es ideal para estudios de color, sí los especímenes pasan demasiado tiempo almacenados en esta sustancia.

El timol al 0,1% altera la superficie aplanándola y dando aspecto de pulido; disminuye la resistencia de adhesión diente-resina (11) y es insoluble en agua a pH neutro lo que tendría perspectivas de uso, ya que no es oxidante. Lo único que puede pasar es que se oxide por el oxígeno del aire y forme benzoquinonas que podrían colorear el espécimen.

El agua destilada es de origen natural y es un medio común para almacenamiento. No tiene efecto antibacterial, no remueve el componente inorgánico de la superficie después de 30 días y mantiene las propiedades. Sin embargo, puede causar pequeños cambios en el esmalte con el tiempo (11) ya que al tener pocos electrolitos en solución, va a disolver selectivamente calcio, magnesio, sodio y potasio de los cationes y los fosfatos y los carbonatos de los aniones hasta que alcance el producto de solubilidad de cada compuesto. Esto hace que se elimine paulatinamente la capa más superficial y externa del esmalte, cosa que puede afectar algunas propiedades superficiales como la proporción calcio / fósforo y el potencial zeta. También cambiará proporcionalmente la porosidad, la rugosidad, lo que puede llegar a afectar la adhesión y la permeabilidad. Hay que tener en cuenta que la solubilidad de los componentes del esmalte es muy baja, pero de todas formas es del orden de los miligramos. La recomendación de estar renovando el agua es deletérea ya que agrava este proceso que es un "leaching" o lixiviado.

Finalmente se presenta esta revisión sistematizada, ya que no cumple con todos los criterios para una revisión sistemática como son los riesgos de sesgo, las medidas de resumen, la síntesis de los resultados y los resultados estadísticos adicionales; pero sí se aplicaron criterios sistematizadores y de calidad, en elegibilidad, fuente de información, búsqueda, selección de los estudios, proceso de recolección, evaluación y análisis de la información.

A pesar de las limitaciones por la poca literatura existente, la confusión entre los medios de desinfección y almacenamiento, ya que son dos momentos diferentes, en los cuales según la prueba se puede usar el mismo o varios materiales, la disparidad de los métodos de medición de color, y con base en la interpretación de los resultados desde la físico-química, se propone el siguiente protocolo de desinfección y almacenamiento de dientes para estudios de color:

Protocolo de desinfección y almacenamiento de dientes para estudios de color

1. Eliminación manual de restos de tejido periodontal y pulpar del espécimen fresco siguiendo las indicaciones del protocolo de limpieza del Biobanco de Dientes de la Universidad Nacional de Colombia (8).
2. Irrigación retrógrada con 10 ml de hipoclorito de sodio al 5,25% (8).
3. Sumersión de la raíz del espécimen 15 minutos en hipoclorito de sodio al 5,25% (8).
4. Lavar profusamente con agua destilada por un minuto (8).
5. Almacenar en saliva artificial específica para este uso baja en calcio y fósforo para evitar remineralización inducida 4°C (10) por un tiempo 3 a 4 semanas (20,21) ó agua destilada 4°C (10) sin recambio hasta 4 semanas (11).

Conclusión

Se considera esta revisión pertinente debido necesidad de estandarización de los protocolos en los Biobancos de Dientes con fines educativos e investigativos y se concluye que la saliva natural es medio más indicado de almacenamiento para estudios de color, seguida de la saliva sintética sin ningún ión que afecte el color o agua destilada.

Agradecimientos

Agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, por ser la entidad que financia el proyecto de Biobanco de Dientes identificado con el código Hermes 17514.

Declaración sobre conflicto de intereses

Los autores manifiestan que son independientes con respecto a las instituciones financiadoras, y que durante la ejecución del trabajo o la redacción del manuscrito no han incidido intereses o valores distintos a los que usualmente tiene la docencia y la investigación. El artículo está adscrito al grupo de investigación Gramo (Grupo de Aplicación de Materiales a la Odontología) y al proyecto titulado Biobanco de Dientes de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Está registrado en el Sistema de Información de Investigación con el código Hermes 17514. El aporte de la entidad consiste en tiempo de jornada de trabajo de los docentes participantes en investigación, servicios de biblioteca, y adquisición de artículos, etc.

Referencias

1. Kaul R, Kaul V, Farooq R, Wazir ND, Khateeb SU, Malik AH, Masoodi AA. Cut off values of laser fluorescence for different storage methods at different time intervals in comparison to frozen condition: A 1 year in vitro study. *J Conserv Dent* 2014; 2(17):124-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778506>.
2. Maranhao de Melo K, Klautau EB, Pereira PMM, Guimaraes RB, Pantoja VG. The effect of storage solutions on enamel of bovine teeth. *Salusvita* 2009; 2 (28): 129-134. <http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/lilacs/salusvita/2009v28n2/salusvita2009v28n2p129-134.pdf>.

3. Kishta-Derani M, Neiva G, Yaman P, Dennison D. In vitro evaluation of tooth-color change using four paint-on tooth whiteners. *Oper Dent* 2007; 4(32):394-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17695613>.
4. A Secilmis, E Dilber, N Ozturk, F Gokmen. The effect of storage solutions on mineral content of enamel. *Materials Sciences and Applications* 2013; 4, págs. 439-445. https://file.scirp.org/pdf/MSA_2013070213141555.pdf.
5. González-Pita LC, Úsuga-Vacca MV, Torres-Rodríguez C, Delgado-Mejía E. Biobanco de dientes humanos para investigación en odontología. *Acta Odontológica Colombiana* 2014; 1(4):9-21. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actaodontocol/article/view/44602>.
6. Santiago-Medina AM, Torres-Rodríguez C, Delgado-Mejía E. Corte y sellado reversible de dientes para obtener superficies internas de esmalte incólumes. *Acta Odontológica Colombiana* 2015; 2(5):13-20. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actaodontocol/article/view/55302>.
7. Rojas-Ramirez JS. Evaluación de tratamientos previos sobre dientes extraídos para estudios de investigación. [Trabajo final de grado Odontología]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Odontología 2014. <http://www.hermes.unal.edu.co/pages/Consultas/Proyecto.xhtml;jsessionid=5D55D-CB87B4B96B6AF4E06A12879C5E2.tomcat6?idProyecto=14007>.
8. González-Pita LC, Rojas-Ramirez JS, Úsuga-Vacca MV, Torres-Rodríguez C, Delgado-Mejía E. Protocolos diseñados para el biobanco de dientes de la Universidad Nacional de Colombia. *Acta Odontológica Colombiana* 2014; 2(4):79-93. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actaodontocol/article/view/48748>.
9. Dewald, JP. The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: A review of infection control considerations. *Dent Mater* 1997; 2(13): 74-81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9467308>.
10. Almeida Curylofo-Zotti F, Lorencetti-Silva F, de Almeida Coelho J, Maciel Monteiro R, Watanabe E, Aparecida Milori Corona S. Human teeth biobank: Microbiological analysis of the teeth storage solution. *Microsc Res Tech* 2017; 81 (3):332-337. doi: 10.1002/jemt.22984.
11. Buchwald T, Okulus Z. Determination of storage solutions influence on human enamel by raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 2018; 96: 118-24. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.04.003>.
12. Linares-Espinós E, Hernandez V, Dominguez-Escrig JL, Fernández-Pello S, Hevia V, Mayor J, Padilla-Fernández B, Ribal MJ. Metodología de una revisión sistemática *Actas Urol Esp* 2018; 42(8):499-506. doi: 10.1016/j.acuro.2018.01.010.
13. Bajaj N, Grewal N, Monga P, Grewal S. Association of physical properties and maintenance of sterility of primary teeth in human tooth bank. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2014; 32 (4): 279-85. doi: 10.4103/0970-4388.

14. Zeczowski M, Tenuta LMA, Ambrosano GMB, Aguiar FHB, Lima DANL. Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: An in vitro vs. in situ study. *J Dent* 2015; 49 (9):1154-61. doi:10.1016/j.jdent.2015.06.004.
15. Salem-Milani A, Zand V, Asghari-Jafarabadi M, Zakeri-Milani P, Banifatemeh A. The effect of protocol for disinfection of extracted teeth recommended by center of disease control (CDC) on microhardness of enamel and dentin. *J Clin Exp Dent* 2015; 7(5): e552-6. doi: 10.4317/jced.52280
16. Tosun G, Sener Y, Sengun A. Effect of storage duration/solution on microshear bond strength of composite to enamel. *Dent Mater J* 2007; 26(1): 116-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17410901>
17. Lee JJ, Nettey-Marbell A, Cook A Jr, Pimenta LA, Leonard R, Ritter AV. Using extracted teeth for research: the effect of storage medium and sterilization on dentin bond strengths. *J Am Dent Assoc* 2007; 138(12):1599-603 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056105>
18. Taube F, Ylmén R, Shchukarev A, Nietzsche S, Noreén J.G. Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents. *J Dent* 2010; 38(1):72-81. doi: 10.1016/j.jdent.2009.09.006.
19. Immerz I, Proff P, Roemer P, Reicheneder C, Faltermeier A. An investigation about the influence of bleaching on shear bond strength of orthodontic brackets and on enamel colour. *ISRN Dent* 2012; 2012:375849. doi: 10.5402/2012/375849.
20. Tuzuner T, Turgut S, Ozen B, Kılınc H, Bağış B. Storing Tooth Segments for Optimal Esthetics. *J Clin Pediatr Dent* 2016; 40(2): 113-7. doi: 10.17796/1053-4628-40.2.113.
21. Kantoor P, Srivastava N, Rana V, Adlakha V. K. Alterations in the mechanical properties of the extracted human teeth to be used as biological restorations on storing them in different storage media: an in vitro study. *Dent Traumatol* 2015; 31(4):308-313. doi: 10.1111/edt.12158.
22. Da Silva D, Vasconcelos U, Valente V, Martins C, De Moura G. Influence of a new method of sterilization on the morphology and physical properties of extracted human teeth. *Rev Odontol UNESP* 2018; 47(2):106-111. doi: 10.1590/1807-2577.
23. Silva Moura J, Azevedo Rodrigues LK, Del Nel Cury AA, Castor Xisto Lima EM, Mathews Cunha Rodrigues Garcia R. Influence of storage solution on enamel demineralization submitted to pH cyclic. *J Appl Oral Sci* 2004; 12 (3): 205-208. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049253>.