

**TESIS DOCTORAL.**

Variación histoquímica en los procesos de rizólisis de las piezas dentarias de la primera dentición.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
Facultad de Odontología | Cátedra de Odontopediatría



Doctorando: Od. Alicia Noemí Nannini  
Directora: Prof. Dra. Martha Siragusa

**AÑO 2011**

Recibido: Nov. 2011 | Aceptado: Sep. 2012

**INDICE**

INTRODUCCION .....	1514
MARCO TEORICO	1518
▪ Anatomía, fisiología e histología de las piezas dentarias de la primera dentición .....	1518
▪ Cronología de la reabsorción de piezas dentarias de la primera dentición .....	1525
▪ Mecanismos de defensa de la pulpa de dientes deciduos ..	1534
PLANTEO DEL PROBLEMA .....	1539
OBJETIVOS	
▪ General .....	1539
▪ Particulares .....	1539
HIPOTESIS .....	1539
MATERIAL Y METODOS .....	1540
RESULTADOS .....	1542
DISCUSION .....	1553
CONCLUSIONES .....	1558
ANEXOS .....	1559
BIBLIOGRAFIA .....	1561

## INTRODUCCION

La pulpa dentaria presenta características anatómicas y funcionales que la diferencian de otros tejidos conjuntivos del organismo, ya que se encuentra en una cavidad rígida, carece de circulación colateral, con un reducido aporte nutritivo a través del foramen apical, pero en estados adultos, conserva aspectos embrionarios. La pulpa dentaria deriva de la cresta neural cefálica. Las células experimentan una extensa migración, descendiendo a ambos lados de la cabeza hacia el maxilar y la mandíbula formando los gérmenes dentales *(Murakami et al, 1999)*.

Durante el desarrollo del diente, numerosos factores contribuyen al crecimiento y a la diferenciación de las células relacionadas con la formación de tejidos duros y blandos. Se ha demostrado que la interacción entre tejido epitelial y mesénquima es crucial para la organogénesis dental. Dicha interacción se regula en la matriz extracelular por moléculas que median una secuencia ordenada y específica de sucesos. *(Thesleff, 1995; Martínez, 1998)*

La matriz extracelular o intercelular está conformada por fibras y sustancia fundamental. Las propiedades de la matriz son las que confieren a cada tipo de tejido sus características funcionales.

Por su resistencia a la tracción y su elasticidad, las fibras elásticas son la base de la función mecánica de sostén; cualitativa y cuantitativamente, el colágeno es la fibra más importante y más abundante, principalmente los de tipo I y tipo III; sirven de almacén para el depósito de elastina y el ensamblaje de las fibras elásticas. *(Devlin, 2004; Mithieux y Weiss, 2005; Rodríguez-Cabello, Reguera y cols, 2005)*

Por su consistencia y contenido hídrico, la matriz amorfa o sustancia fundamental es el medio de transporte de elementos entre la sangre y las células de los tejidos, a la vez que amortigua y se opone a las fuerzas de presión. La conforman glicosaminoaglicanos y glicoproteínas de adhesión.

Se han diferenciado 6 grupos de glicosaminoaglicanos: Ácido hialurónico, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato.

Las glicoproteínas de adhesión son grandes moléculas polipeptídicas acompañadas por cadenas laterales de hidratos de carbono que se fijan al colágeno, por lo que facilitan la adherencia celular a la matriz extracelular; actúan como moléculas de adhesión y pueden unirse a receptores específicos de la membrana plasmática, estableciendo una continuidad entre el interior de la célula y el espacio extracelular. *(Geneser Finn, 2000; Adams, 2001; Abraham, 2006; Schmidt y Friedl, 2010)*

La razón de la denominación moléculas de adhesión reside en que, para que una molécula pueda actuar con otra de la superficie celular adyacente o de la matriz circundante ambas deben establecer contacto mediante la formación de puentes intermoleculares. La finalidad esencial de la interacción entre dos moléculas es el

paso de información de una célula a la otra. (Thomas y Speight, 2001; Butler, Brunn y Qin, 2003; Mailet, 2006; Abraham, 2006; Pizzi y Crowe, 2007; Bertl y cols, 2009)

Se distinguen moléculas de adhesión celular (inmunoglobulinas, cadherinas y selectinas) y de adhesión al sustrato (integrinas, fibronectina, laminina, tenascina y CD44). La molécula CD44 es una glucoproteína. Es una de las más importantes moléculas de adhesión al sustrato, y uno de los clúster de diferenciación antigénico en leucocitos y eritrocitos. (Lesley y cols, 2000)

El gen CD44 está localizado en el cromosoma 11p13. Está codificado por 20 exones. Los exones 1-5 y 16-20 se expresan en forma constante y constituyen la forma estándar de CD44 predominante en la mayoría de los tipos celulares; los exones 6-15 pueden incorporarse a la estructura constante en la porción extracelular en una o más combinaciones por un proceso regulado de adhesión alternativo formando diferentes isoformas variables con características de adhesión distintivas (se han descrito al menos 12 diferentes isoformas por un mecanismo de adhesión). Las isoformas de CD44 varían entre 80 y 160 kD. (Banerji y cols, 2007; Naor y cols, 2008)

La correlación encontrada entre la expresión de CD44 y la capacidad migratoria de diferentes subpoblaciones de linfocitos avalaron el concepto de que se expresa sobre la superficie de diversos tipos celulares, incluyendo las del linaje hematopoyético, ya que los linfocitos circulantes de sangre periférica o los linfocitos T medulares expresan altos niveles de CD44. (Lesley y cols, 2000; Pure y Cuff, 2001)

Actualmente se sabe que CD44 cumple una variedad de funciones: es un antígeno de diferenciación durante la linfopoyesis, actúa como molécula de adhesión en interacciones entre linfocitos y células endoteliales, en la migración leucocitaria hacia los sitios de inflamación y en la diferenciación celular, participa en la adhesión celular, puede remodelar la matriz extracelular durante el desarrollo embriogénico y constituye un potencial marcador de malignidad tumoral y metástasis. (Kimata et al, 1983; Laurent and Fraser, 1992; Knudson y Knudson, 1993; De Grendele. Estess y Siegelman, 1997; Borland, Ross y Guy, 1998; Stoop, Gal y cols, 2002)

Pertenece a la superfamilia de proteínas vinculantes de hialuronato o hyaladherinas. La conexión entre el receptor de hialuronato y CD44 fue inicialmente sugerido en 1989 por los estudios de Goldstein y cols y los de Stamenkovic y cols; estos trabajos reportaron que el dominio extracelular de CD44 es homólogo a la región que une hialuronato de la proteína unida al cartílago, sugiriendo que el CD44 es capaz de unir hialurónico y así semejarse fuertemente al receptor hialuronato. (Ponta y cols, 2003)

El ácido hialurónico se expresa sobre la matriz extracelular en diferentes células dentarias, en los odontoblastos, en los ameloblastos y en los tejidos conectivos y fluidos del organismo. (Lesley, English y cols, 1995; Aruffo y cols, 1990; Felszeghy et al, 2005) En la década del '90 se estudió la localización histoquímica del ácido hialurónico en el epitelio oral humano, usando una prueba de reacción específica para el hialuronato. Se

encontró que esta sustancia estaba presente en el epitelio bucal y gingival, pero su localización se correlacionaba con el tipo de queratinización. (Tammi et al, 1990)

Una década después, *Felszeghy y cols* (2001) evaluaron el patrón de distribución del hialuronato, receptor del CD44, durante el desarrollo dental humano, no habiendo hasta entonces información sobre tal presencia en estructuras dentales en diferentes estadios del desarrollo. La localización inmunohistoquímica del CD44 fue estudiada usando un anticuerpo monoclonal H3, que específicamente reconoce, en la estructura común de todas las isoformas del CD44, un determinante antigénico que produce la reacción específica a través de una inmunoglobulina. La lámina dental expresó una señal muy fuerte de presencia de CD44; el epitelio externo del esmalte fue negativo. En la región coronal del germen dentario los ameloblastos pre secretores mostraron una intensa reacción mientras que las pocas células epiteliales internas diferenciadas del esmalte no evidenciaron señales en el contacto con el epitelio externo del esmalte. Una moderada reacción fue detectada en el retículo estrellado. Los ameloblastos secretores y el estrato intermedio mostraron una fuerte señal de adhesión de superficie de CD44. Una intensa reacción también fue observada en los odontoblastos y sus procesos. En la pulpa, cercano a la capa odontoblástica, débiles títulos fueron observados en las paredes de los vasos capilares. Los autores concluyeron que la distribución de CD44 en el germen dental humano corresponde a la misma del hialuronato en la mayoría de las localizaciones, sugiriendo que durante el desarrollo dentario esta proteína de transmembrana juega un rol importante en los eventos mediados por hialuronato.

La principal propiedad del ácido hialurónico es su capacidad de embeberse en agua hasta aumentar más de 50 veces su peso seco, lo que da a la sustancia fundamental un alto grado de elasticidad, favoreciendo el intercambio de gases y moléculas pequeñas y actuando de barrera al paso de macromoléculas y cuerpos extraños. Por esta propiedad, se lo considera responsable de proveer hidratación a la matriz extracelular. (Aruffo et al, 1990; Murakami et al, 1999; Bajorath, 2000; Pure y Cuff, 2001; Felszeghy et al, 2001; Mesa Aguado, Aneiros Cachaza y O'Valle Ravassa, 2001; apud Pisterna, 2006.)

Además de su adhesión al ácido hialurónico, el receptor CD44 tiene una predominante afinidad de adhesión a ligandos de la matriz extracelular. (Hynes, 2002) CD44 también puede interactuar con otros ligandos, sirviendo como un co-receptor para otros receptores de señalización como heparán sulfato (axón 3), condroitín sulfato (axón 5), laminina, colágeno tipo I y VI, fibronectina, osteopontina y selectinas E- y L-. (Bourguignon y cols, 2000; Bourguignon y cols, 2001; Bendall y cols, 2004; Singleton y Bourguignon, 2004; Naor y cols, 2007; Ouhtit y cols, 2007; Takada y cols, 2007)

La interacción de CD44 con diferentes ligandos parece ser mediada por distintos tipos de adhesión celular; la molécula de CD44 puede dividirse en tres principales dominios: El dominio citoplásmico (el cual media la interacción con el citoesqueleto, haciendo puentes entre los ligandos extracelulares y las actinas del citoesqueleto, induciendo la señalización intracelular). El dominio medio (contiene las inserciones de las diferentes isoformas y donde se llevan a cabo los principales cambios,

responsables del "homing" linfocitario) y el dominio amino-terminal (que se liga al hialuronato) (Legg y cols, 2002; Singleton y cols, 2004; Ponta y cols, 2003; Banerji y cols, 2007; Bourguignon 2008)

CD44 se expresa en todos los vertebrados, sobre la superficie de diversos tipos celulares que incluyen macrófagos, neuronas, células epiteliales y la mayoría de las células tumorales; particularmente en el caso del epitelio, se expresa sobre células que llevan cabo la activación de la división celular. (Pure y Cuff, 2001; Stoop y cols, 2002; Hynes, 2002; Day y Prestwich, 2002; apud Pisterna, 2006; Zhu y cols, 2006; Naor y cols, 2008; D'Arrigo y cols, 2009; Wang et al. 2009; Wolny y cols, 2010)

Además de actuar de enlace al ácido hialurónico incluido en un tejido, la molécula de CD44 inmoviliza el ácido hialurónico en la superficie celular. El ácido hialurónico de superficie está constitutivamente presente como pseudópodos en las puntas ciliares de las células donde son detectables la formación de adherencias focales. (Zimmerman y cols, 2002; Rilla y cols, 2008)

La interacción de CD44-ácido hialurónico también producen una rápida activación de la degradación de proteínas (proteólisis) de superficie por medio de las familia de metaloproteinasas (conocidas proteínas que actúan en el proceso de rizólisis dental); estas proteínas rompen el dominio externo de las moléculas de CD44 y así limitan la adhesión celular. (Nagano y cols, 2004)

En contraste con los hallazgos *in vitro* con respecto a la contribución de CD44 a la migración de células en un sustrato de ácido hialurónico, estudios en ratones con deficiencia de CD44 mostraron una pérdida de defectos obvios de desarrollo, de regeneración y de función inmunológica, indicando una intacta migración celular intersticial. (Protin y cols, 1999; Naor y cols, 2008) En relación con estos resultados, otros autores se preguntan en qué medida otros receptores de adhesión de ácido hialurónico, compensan la pérdida de CD44. (Naor y cols, 2007; Chen y cols, 2008)

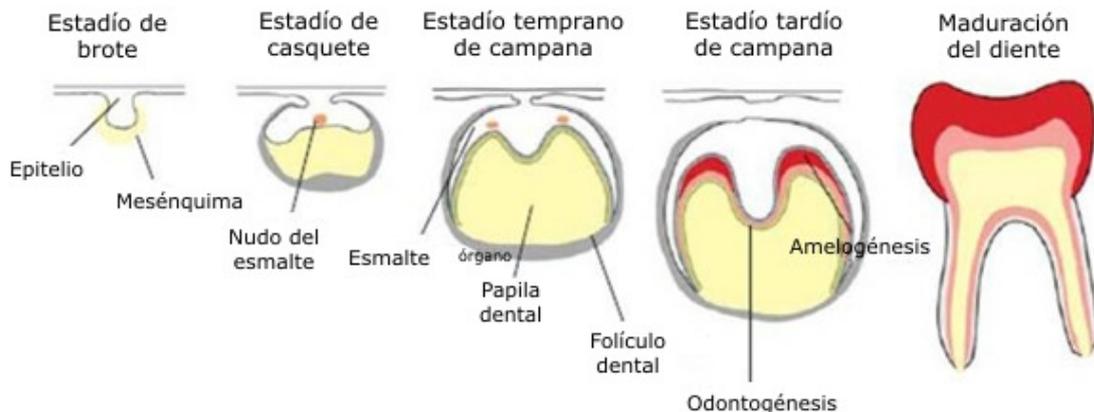
Otros investigadores realizaron un análisis cuantitativo de imágenes digitales de las expresiones del ácido hialurónico en gérmenes dentales humanos. Concluyeron que el ácido hialurónico puede desempeñar un rol transitorio en la fase temprana del desarrollo de la organización de la matriz del esmalte. Observaron una señal muy débil en la pared de los túbulos dentinales mientras que el resto de la matriz de la dentina no estaba teñida. Los odontoblastos y la pulpa también estaban teñidos moderadamente, y estas reacciones fueron decreciendo gradualmente con la edad, lo que sugiere que el AH podría contribuir al desarrollo de la matriz y la pulpa. (Felszeghy et al, 2000)

## MARCO TEORICO

### ANATOMIA, FISILOGIA E HISTOLOGIA DE LAS PIEZAS DENTARIAS DE LA PRIMERA DENTICION

El tejido potencialmente odontogénico puede ser identificado a partir del día 28 de vida intrauterina, al mismo tiempo que se desintegra la membrana bucofaringea e islotes de epitelio odontogénico se organizan en diferentes puntos del arco maxilar y mandibular, con capacidad de coalescencia como para formar una lámina dental continua en la 6ª semana de vida intrauterina. (Thesleff, 2003)

En la lámina dental, gracias a una intensa y localizada proliferación, se forman en la octava semana 10 centros específicos epiteliales y se profundizan en el ectomesénquima de cada maxilar. En los sitios correspondientes a los 20 dientes primarios de esta lámina se originarán, alrededor del quinto mes de gestación, los gérmenes de los 32 dientes permanentes, los primordios, por lingual o palatino de los elementos primarios, para incisivos, caninos y premolares, y hacia distal de la lámina para los dientes accesorios, o sea, los molares. El inicio del primer molar permanente se establece muy temprano, al cuarto mes de vida intrauterina. A partir de ese punto, el desarrollo de las piezas dentarias se puede describir en los clásicos estadios de brote, casquete y campana. (Ikeda y Tsuji, 2008) (Figura 1)



**Figura 1.**

Secuencia clásica de etapas en la odontogénesis

Fuente: E.Ikeda y T.Tsuji. Growing bioengineered teeth from single cell: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8(6): 735-744

En el estadio de brote se distinguen células cúbicas periféricas y células poligonales internas. Los brotes o gérmenes dentales que se corresponden con el número de dientes temporales se desarrollan a la 8ª semana de desarrollo intrauterino como proliferaciones locales de la lámina dental. Alrededor de estas proliferaciones ectodérmicas, las células mesenquimatosas adyacentes procedentes de la cresta neural cefálica sufren un proceso de condensación, ya sea por un aumento de la proliferación celular o porque disminuye la sustancia extracelular que constituirán la papila dental. En este proceso, las células epiteliales muestran poco cambio respecto a su forma o función, ya que aún no han comenzado el proceso de histodiferenciación. El extremo posterior de la lámina dental continúa su crecimiento profundizando en el tejido

conjuntivo de la mandíbula y el maxilar, ya que proveerá los brotes de los dientes permanentes que no tienen predecesores deciduos; por esta función también se la denomina lámina madre, sucesiva o definitiva. *(Pashley y Liewehr, 2006)*

En el estadio de casquete, aproximadamente a la 10<sup>o</sup> semana de vida intrauterina, las células de la lámina dental han proliferado para formar una concavidad que produce un aspecto similar al de un capuchón. Las células externas del casquete son cuboides y constituyen el epitelio externo del esmalte; las de la parte interna son alargadas y representan el epitelio interno del esmalte. Entre el epitelio externo e interno del esmalte existe una red de células, conocida como retículo estrellado, conocida así por la disposición reticular ramificada de los elementos celulares. A la zona donde se unen los epitelios externos e internos del esmalte se la denomina asa cervical; conforme siguen proliferando las células que forman el asa, se produce una mayor invaginación en el mesénquima, asumiendo forma acampanada *(Pashley y Liewehr, 2006)*

En el estadio de campana (3<sup>o</sup> mes de desarrollo intrauterino), el ectomesénquima de la papila dental queda parcialmente rodeado por el epitelio invaginado. Se distinguen dos etapas: inicial y avanzada. En la etapa inicial, el órgano del esmalte comprende cuatro capas (epitelio externo, retículo estrellado, epitelio intermedio e interno preameloblastos); en la papila dental aún no hay diferenciación de odontoblastos y el saco dentario se describe como una cápsula vascular fibrilar, que posteriormente dará origen al cemento y será la cobertura de la raíz dental y del ligamento periodontal. En el estadio avanzado de campana, en la concurrencia entre su borde y contorno, se organiza la membrana epitelial de Hertwing, que estará a cargo de la formación radicular. La expresión de esta membrana por mitosis está bajo control genético determinando las varias formas (incisivos, caninos y molares), la longitud, la curvatura, el diámetro y el número de raíces de la pieza dentaria; en la medida en que la membrana migra hacia apical se doblará hacia adentro en un ángulo aproximado de 45<sup>o</sup>, para doblar un diafragma con apertura central, la cual puede modelarse para determinar una, dos o más raíces; la interrupción de la capa celular interna permite la migración de los cementoblastos y la eventual inserción de fibras a medida que migren apicalmente *(Pashley y Liewehr, 2006)*. Delimitada por el saco dentario, esta estructura amelodentinaria, que encierra en su interior las células de la pulpa, se pliega, creando así las formas y lugares de cúspides y surcos; y en su exterior se relaciona con las células del folículo dentario, el cual formará las estructuras de soporte periodontales.

La aposición de dentina es más lenta en la raíz que en la corona, el patrón de mineralización es semejante, pero los glóbulos de calcificación son más pequeños. Además, los índices de calcio y fósforo son menores en dentina radicular que en la coronal, y las fibras colágenas en la dentina del manto son más gruesas, lo que va creando unos espacios irregulares, hipomineralizados, llenos de aire, lo cual se conoce como la zona granular de Tomes. Por último, el número de odontoblastos es menor (8.000/mm<sup>2</sup>) comparado con la parte coronal donde pueden llegar a haber de 45-60.000/mm<sup>2</sup>. *(Gómez de Ferrari y Campos Muñoz, 2005)*

## Interacción epitelio-mesénquima

El factor más importante en la regulación epitelio-mesénquima para la diferenciación de odontoblastos radiculares es la sustancia fundamental; sus componentes han sido considerados esenciales para la morfogénesis epitelial, la diferenciación de odontoblastos y la posterior formación de predentina.

En esta interacción se distinguen tanto las moléculas de adhesión celular como las de adhesión al sustrato; las primeras actúan como receptores de superficie especializados en reconocer otras células a las que se adhieren para constituir los tejidos y órganos; las segundas cumplen un rol importante en la fisiología de las células inmunes y son responsables de la interacción que se establece en procesos patológicos.

Durante el desarrollo del diente, las interacciones de las moléculas de adhesión son responsables de la señalización de los eventos que comienzan con la iniciación del diente y que luego conducen a la diferenciación entre ameloblastos y odontoblastos, responsables de la secreción de esmalte y dentina, respectivamente. Los factores de crecimiento son los responsables de tales interacciones; los conduce a una cadena de señales intracelulares sobre la expresión de genes en el núcleo de la célula, mediada por factores de transcripción, proteínas que participan en la regulación de la transcripción del ADN. Los factores de transcripción son estimulados por señales citoplasmáticas, que al ser activados adquieren la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular, ya sea activando o reprimiendo la transcripción de diversos genes. Esto implica que los factores de crecimiento pueden genéticamente regular la proliferación y diferenciación celular; son responsables de la señalización de los eventos claves en la morfogénesis, diferenciación y regeneración tisular.

El germen del diente empieza a formarse desde las interacciones entre el epitelio de la mucosa oral y el mesénquima en el sitio del diente futuro. Durante estos procesos, la expresión de genes que codifican proteínas y actúan como factor de transcripción de otros genes, indicando qué tipo de células se deben reproducir (genes homeobox) es inducida por las acciones coordinadas de factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de adherencia. La activación de estos genes guiará cada yema dental a lo largo de un camino para desarrollar un diente de un determinado tamaño y forma que está predeterminado por su posición. Este control transcripcional de la expresión génica puede tener efectos de gran alcance, tanto en términos de eventos intra como extracelulares, cuyo resultado es la transducción de la señal al núcleo de la célula. (Tziafas, Smith y Lesot, 2000; Smith y Lesot, 2001; Smith, 2002)

Los roles de los factores de crecimiento durante el desarrollo y regeneración dentaria han sido identificados durante la década de 1990. En particular, el potencial de los factores de crecimiento, particularmente del factor transformante de crecimiento (TGF- $\beta$ ) y de las proteínas osteogénicas (BMPs), han sido demostrados tanto en experiencias *in vivo* como *in vitro*. La aplicación directa o transdentinal de TGF-1 y BMP-7 a los odontoblastos de pulpas cultivadas también ha permitido demostrar la capacidad de estos factores de crecimiento indicando una dentinogénesis reaccionaria. Estos hallazgos sugirieron interesantes oportunidades en el enfoque terapéutico de la reparación tisular dentaria, así como se comenzó a comprender cómo funciona un proceso regenerativo en el diente. (Mekin y cols, 2000; Sloan, Rutherford y Smith, 2000; Mander y Neubuser, 2001)

Junto a los anteriores, el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) han sido identificados como moléculas señalizadoras en la diferenciación de odontoblastos a nivel coronal y radicular. (Smith, 2003)

Los odontoblastos producen los componentes de la matriz orgánica de la predentina que incluyen colágeno (90% tipo I) y proteoglicanos; también sintetizan varias proteínas no colágenas, como: sialoproteína ósea, sialoproteína dentinaria, fosforina dentinaria, osteocalcina, osteonectina y osteopontina. Estas proteínas están encargadas de controlar la deposición de cristales de hidroxiapatita mediante la atracción de iones de  $\text{Ca}^+$  y  $\text{PO}_4$  para ser enucleados y formar los glóbulos de calcificación. (Cohen y Burn, 2002; Hargreaves y Goodis, 2002)

En la etapa de casquete, un centro de señalización transitorio epitelial denominado "nudo de esmalte" se estima que regula los destinos de cada célula y las interacciones entre epitelio y mesénquima. La formación de este nudo de esmalte así como su delimitación espacial también está regulada por proteínas osteogénicas (BMP-4), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor Wnt (una familia de moléculas secretadas muy conservadas que regulan las interacciones celulares durante la embriogénesis), entre otras proteínas. (Tucker, Headon y cols, 2000; Thesleff, 2003; Thesleff, 2006)

En la etapa de campana del germen dentario, el proceso de diferenciación en esmalte por parte de los ameloblastos y en dentina por parte de los odontoblastos también está regulado por la acción de expresiones de los genes de distintas células implicadas. En este sentido, se sabe que un factor de transcripción importante en la mineralización de tejidos como la dentina, es la proteína RUNX-2, también denominada Cbfa-1. Este factor es un potente condicionante para que el mesénquima de la papila dental responda a las señales epiteliales, sin embargo no se ha demostrado claramente su presencia en el mesénquima radicular. (Hargreaves y Goodis, 2002)

En 1997, se evaluó la localización del ácido hialurónico en gérmenes de dientes deciduos en la etapa de campana. Compararon el ácido hialurónico detectado con una proteína de unión marcada con biotina, con el contenido de sulfatos de condroitina (SC) identificado con un anticuerpo monoclonal. Se encontró considerable cantidad de ácido hialurónico en el retículo estrellado aunque también se observó SC. Por otro lado, la papila contenía similares cantidad de ácido hialurónico y SC, mientras que la predentina y la dentina sólo contenían SC y el esmalte no contenía SC pero se observó leve cantidad de ácido hialurónico alrededor del límite entre los ameloblastos y el esmalte. Los autores discutieron la relevancia del ácido hialurónico en el retículo estrellado y enfatizaron la importancia de llevar a cabo investigaciones con y sin digestiones de proteasas. (Matthiessen et al, 1997)

Felszeghy et al (2005) investigaron la localización de las sintasas de ácido hialurónico y las enzimas que lo polimerizan en gérmenes de dientes humanos desde diferentes etapas del desarrollo. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica, ratificaron el patrón de distribución del ácido hialurónico en los diversos tejidos del primordio dental en la etapa de campana, y concluyeron que la sintasa del ácido hialurónico se produce localmente en diferentes células dentarias; estos resultados proporcionaron un apoyo adicional indirecto a la sugerencia de que el ácido hialurónico puede contribuir a la regulación de la morfogénesis dental y a la formación de los tejidos duros dentarios.

Las células epiteliales de la vaina radicular actúan como centros de señalización mediante la expresión de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), principalmente la BMP-2 y -4. Las BMPs, vuelven a ser unas de las moléculas más importantes en la señalización para que se produzca esta diferenciación. La BMP-4 se ha encontrado expresada en pre-odontoblastos tempranos que bordean la vaina epitelial radicular. Subsecuentemente, se ha visto la expresión de BMP-2 Y BMP-7 en pre-odontoblastos y odontoblastos durante un corto periodo en la diferenciación de estos últimos. Finalmente, se ha observado la BMP-3 en odontoblastos maduros en el área radicular. Esta proteína también se ha encontrado fuertemente expresada en las células del folículo dental que se encuentran cercanas a la zona radicular, por lo que se ha sugerido que la BMP-3 podría regular la función de osteoblastos y cementoblastos. Parece ser que uno de los objetivos principales de la regulación de las BMPs en dentina radicular es la modulación en la producción de BSP, ya que ésta se coexpresa con BMP-2, -3 y -7 en la diferenciación de odontoblastos, únicamente en la zona radicular. *(Yamashiro, 2003; Chen, Zhao y Mundy, 2004)*

Otro factor de transcripción de la dentina radicular es la proteína de matriz dentinal-1 (DMP-1). Esta proteína esta asociada en el aumento de la tasa de mineralización de la dentina. Se ha observado la marcación positiva por parte de odontoblastos radiculares a esta proteína en molares de ratas Wistar, mientras que no se ha encontrado marcación en odontoblastos coronales. *(Toyosawa, 2004)*

Se ha sugerido que la tenascina puede ser importante como estimulante de la diferenciación de los odontoblastos, asociada con cambios en la expresión de moléculas extracelulares. Esta proteína se localiza en los tejidos mesenquimatosos dentales simultáneamente con otras moléculas de adhesión específicas a las que se une, para regular conjuntamente cambios en la morfología celular, la adhesión de las células proliferativas y la condensación del tejido que rodea el mesénquima dental, efectos modulados por el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y por el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). *(Vainio y Jalkanen, 1989)*

Recientemente se ha publicado una experiencia donde se analizaron las expresiones de tenascina, fibronectina, colágenos I y III, osteonectina y proteína osteogénica (BMP-4) en la matriz extracelular de tejido pulpar en dientes deciduos durante el período de resorción fisiológica. El análisis inmunohistoquímico mostró que todas las proteínas analizadas fueron expresadas en el tejido pulpar; la tenascina, el colágeno I y osteonectina mostraron amplia e intensa reactividad en pulpas de dientes con 2/3 de longitud radicular pero mostraron débil y escasa reactividad en dientes con 1/3 reabsorbido o con falta de raíz; la expresión de fibronectina, colágeno III y BMP-4 no varió con la fase de reabsorción. Los autores concluyen que las expresiones de tenascina, colágeno I y osteonectina reducida en la matriz extracelular durante las distintas fases de reabsorción puede estar relacionado a la decreciente respuesta pulpar al daño durante la progresión de la resorción radicular. *(Bönecker, Mantesso y cols, 2009)*

## Folículo dental

El folículo dentario es el tejido fibrocelular que inicialmente rodea el órgano del esmalte, más tarde rodea la corona y posteriormente la raíz. De allí provienen los cementoblastos, pero además es el origen del ligamento periodontal y del hueso alveolar, como cripta primero y alvéolo después. Las células mesenquimáticas del folículo se organizan en tres capas; las más internas para los mencionado cementoblastos, las externas conforman el alvéolo con función de osteoblastos y las intermedias, transformadas en fibroblastos, elaboran fibras colágenas que resultan unidas al hueso y al diente al ser sus extremos incluidos en hueso y cemento (fibras de Sharpey).

El tejido del ligamento periodontal experimenta cambios de orientación durante los primeros estadios formativos, el proceso eruptivo y finalmente en la fase funcional de las piezas dentarias, conjuntamente con una continua condición de remodelado de las fibras, síntesis y degeneración, que involucra todo el espesor del ligamento. (Abramovich, 1999)

La estructura del hueso alveolar se forma asociada al desarrollo dentario, primero como una delgada cáscara rodeando cada germen y ganando altura en la medida en que se alarga la raíz del diente. El desarrollo se inicia a la 8ª semana intrauterina, como un surco abierto hacia la cavidad bucal formado por las corticales del maxilar y la mandíbula, que contiene los vasos y nervios alveolares además de los gérmenes; progresivamente éstos van quedando rodeados de criptas independientes. La conformación del alvéolo corresponde a formas y número de raíces, y está igualmente sometido a una continua remodelación por demandas funcionales; es el que eventualmente responde a la solicitud de fuerzas ortodónticas, por ejemplo. (Escobar Muñoz, 2010)

## Erupción dentaria

La erupción es un fenómeno complejo que da lugar al movimiento de un diente a través del hueso alveolar y de la mucosa para emerger en la cavidad bucal. Es un capítulo de un proceso que se inicia tan pronto como concluye la formación coronaria o, lo que es lo mismo, cuando comienza la formación radicular. Se especula sobre algunos factores que la pudieran determinar, que suceden en el momento de la erupción pudieran ser el ó los responsables del proceso; entre tales factores, se mencionan la formación radicular, la proliferación de la vaina epitelial de Hertwing, la del tejido conectivo de la papila dental, el crecimiento simultáneo de los maxilares, las presiones por acción muscular, la aposición y resorción de hueso. (Dennison y cols, 2000)

También se ha sugerido que factores neonatales como el bajo peso al nacer ( $\leq 2500$  gr) y/o prematuros (<37 semanas de gestación) postergan el tiempo de la erupción dentaria respecto de los que nacen a término y/o con peso adecuado. (Caixeta y Corrêa, 2007; Aktoren, Tuna y cols, 2010)

En la erupción dentaria se distinguen tres fases. Una primera *fase pre eruptiva*, periodo en el cual la raíz dental empieza su formación y comienza a moverse hacia la superficie en la cavidad bucal desde su bóveda ósea. Una segunda fase, denominada *fase eruptiva pre funcional*, consiste en un proceso de desarrollo de la raíz dental durante el surgimiento del diente a través de la encía, la raíz siempre tiene la mitad o dos tercios de la longitud final al momento de la emergencia gingival. Y una tercera *fase eruptiva*

funcional o pos eruptiva, una vez que erupciona dentro de la cavidad bucal y se encuentra con su antagonista del arco opuesto (Tabla 1).

Dentición primaria	Formación del germen	Inicio de mineralización	Corona completa	Erupción*	Raíz completa	
Incisivos	3 - 4 meses intraútero	4 - 6 meses	2-3 meses	6 - 9 meses	1 - 15 años después de la erupción	
Caninos			9 meses	16-18 meses		
1º molares			6 meses	12-14 meses		
2º molares			12 meses	20-30 meses		
Dentición permanente						
Incisivos	30 semanas intraútero	3-4 meses (Lat.max 10-12 meses)	4-5 años	Mand. 6-8 a Max. 7-9 a	2-3 años después de la erupción	
Caninos		4-5 meses	6-7 años	Mand. 9-10 a Max. 11-12 a		
Premolares	24 sem intraútero	1.5 - 2.5 años	5-7 años	10-12 a		
1º molar		Nacimiento	2.5 - 3 años	6-7 a		
2º molar		6º mes	2.5 - 3 años	7-8 años		11-13 a
3º molar		6º año	7 - 10 años	12-16 años		17-21 a

**Tabla 1.** Cronología de la dentición primaria y permanente

\* en dientes primarios: perforación de mucosa y exposición de cúspide o borde coronario

Fuente: Escobar Muñoz (2010). *Crecimiento y desarrollo de la dentición y de la oclusión. Cap. 2*

La raíz de un diente temporal completa su formación al año de hacer su erupción; por lo tanto, a los 3-4 años de edad todos los dientes temporales han completado su formación radicular. Una vez completa la dentición primaria, hay un período de más o menos tres años durante el cual no hay erupción de nuevos dientes. Sin embargo, un número de sucesivos cambios delatan el continuo proceso de crecimiento y desarrollo del paciente infantil. Además de los cambios relativos a la posición y los desgastes de cúspides y bordes, la dentición presenta la aparición gradual de un plano retromolar por distal de los segundos molares. Por su parte, en el sector frontal se producen cambios notorios en el sector incisal de ambos arcos por la presencia cercana de las coronas de los sucesores permanentes, visibles en el abultamiento de las tablas óseas vestibulares. Los gérmenes dentarios presentan diversos niveles de maduración y reubicaciones en relación con sus predecesores primarios. El complejo craneofacial en su conjunto expresa cambios sutiles de la arquitectura, casi imperceptiblemente, junto con el aumento de movilidad de algunos incisivos. En rigor, el denominado período de reposo resulta aplicable sólo a la falta de aparición de nuevos dientes en la boca y no hace justicia a la dinámica de cambios de este período. (Escobar Muñoz, 2010)

## CRONOLOGIA DE LA REABSORCION DE PIEZAS DENTARIAS DE LA PRIMERA DENTICION

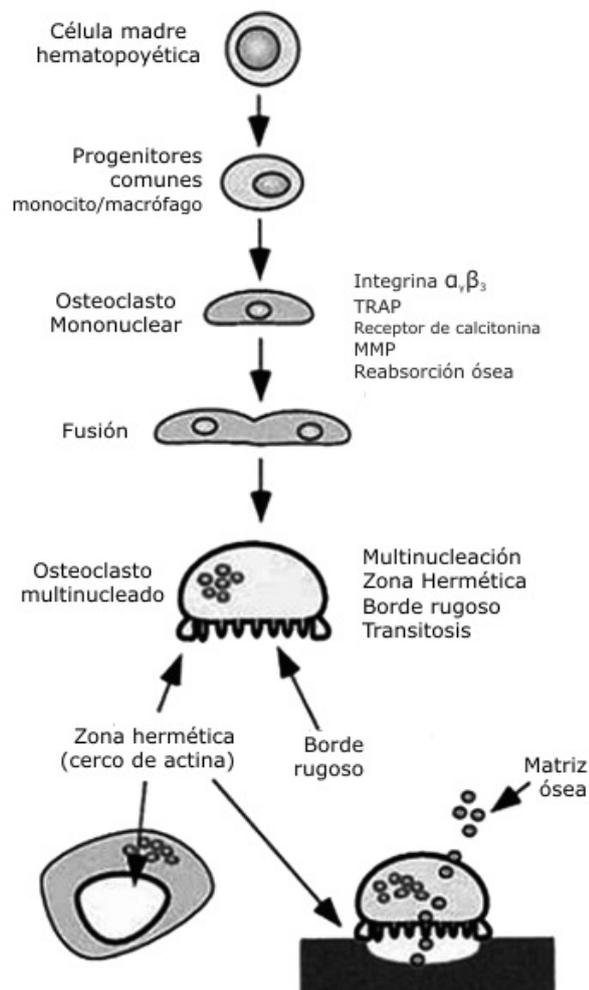
Como se ha referido, los osteoblastos son derivados de las células madres del mesénquima con un potencial único para diferenciarse en adipocitos, condrocitos y células del estroma. Los osteoclastos, en cambio, son derivados de las células madres hematopoyéticas. Estos dos tipos de células, de diferentes orígenes, cooperan entre sí para mantener la hemostasia del tejido óseo.

La exfoliación de los dientes temporales, fenómeno fisiológico propio del ciclo vital de la fórmula primaria, se manifiesta con una progresiva reabsorción o resorción radicular que termina con la caída del diente. Las células responsables de la reabsorción fisiológica del tejido dental son los odontoclastos.

Estructuralmente los odontoclastos poseen similares características que los osteoclastos; sin embargo, son generalmente más pequeños que los osteoclastos. Hasta 1980, el origen de los odontoclastos multinucleados fue controversial, pero entonces el trabajo de Ash y cols (1980) permitieron determinar su auténtico origen. El origen de los odontoclastos es, como el de los osteoclastos, también a partir de la línea de los monocitos sanguíneos y un progenitor mielóide, que dan origen tanto a un linaje monocito-macrófago como a un linaje osteoclástico (médula ósea). (Aubin y Bonnelye, 2000) (Figura 2)

### Diferenciación odontoclástica

La diferenciación odontoclástica tiene varios aspectos y funciones muy característicos: Los odontoclastos mononucleares se adhieren firmemente al hueso y se fusionan con otros para formar odontoclastos multinucleados. El mecanismo involucrado en la fusión celular no es aún muy claro, se postula un mecanismo similar a la fusión viral, dado que algunos inhibidores previenen fusiones osteoclásticas. La fusión celular no es un fenómeno específico de los odontoclastos, pues se ha visto en otros tejidos como la placenta y miotúbulos, pero la multinucleación es el aspecto más llamativo de este tipo de células. (Miyamoto y Suda, 2002)



**Figura 2.** Origen y desarrollo del odontoclasto  
Fuente: Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 2003; 52(1): 1-7.

Los odontoclastos son células multinucleadas (entre 10 y hasta 100 núcleos), que contienen numerosas mitocondrias con gránulos electrodensos de fosfato de calcio. En su superficie, presentan un "borde rugoso" formado por abundantes microvellosidades irregulares provistas de filamentos de actina, donde se originan invaginaciones tubulares muy tortuosas en la membrana plasmática y se introducen profundamente en el citoplasma, donde existen también pequeñas vesículas o lisosomas comprendidos en el complejo de Golgi. Viven alrededor de dos semanas y desaparecen por apoptosis (muerte celular programada por la fragmentación en partículas con membrana que permite su fagocitosis sin inflamación). Son las responsables de la destrucción de las partes orgánica e inorgánica del hueso. Son activos tanto en los procesos de la renovación fisiológica del hueso como en los de su pérdida patológica. (Chambers, 2000; Lerner, 2000)

Las propiedades metabólicas y enzimáticas de los odontoclastos son también similares a la de los osteoclastos. (Oshiro y cols, 2001; Arana y Bradaschia, 2009) La principal diferencia en biología dental y ósea es que el hueso sufre constantemente remodelación fisiológica, mientras el diente sufre resorción "normal" sólo en el caso de dentición primaria, pero más intrigante sigue siendo la pregunta de por qué la raíz del diente permanente no se reabsorbe. (Harokopakis-Hajishengallis, 2007)

Resultados obtenidos en estudios previos mostraron que no existen diferencias histológicas en los tejidos pulpaes de los dientes temporales y permanentes, pero sí existe una diferencia desde el punto de vista fisiológico, como es la reabsorción de los dientes temporales; por esto, se cree que los mecanismos que producen estos fenómenos no se encuentran en los constituyentes histológicos del diente, sino a nivel enzimático. (Xu, y cols, 1993)

Estudios *in vitro* de la misma época han mostrado que la pulpa temporal, al colocarla sobre geles de colágeno, presenta una actividad colagenolítica pero esta actividad no se constató en pulpas permanentes; para los autores, este hecho podría indicar la posibilidad de que exista un factor difusible en forma "activa" en la pulpa de los dientes temporales (la colagenasa). Se puede entonces suponer que la función de la colagenasa no es necesariamente igual en pulpa de dientes temporales que en pulpa de permanentes y que en primer caso puede estar asociada a la reabsorción fisiológica y en el segundo a procesos de renovación y reparación. (Sarmiento y cols, 1994)

En la actualidad, poco se sabe sobre cómo aparecen los precursores de los odontoclastos, qué causa su diferenciación, quién les da la señal para comenzar la reabsorción de la raíz del diente primario en un tiempo y área específicas, por qué la transcitosis comienza del lado basal al apical del odontoclasto permitiendo la descarga de restos óseos desmineralizados, y por qué se activan prematuramente en algunas condiciones patológicas y no en otras. La mayoría del conocimiento sobre la reabsorción de tejidos duros está basada en estudios sobre reabsorción ósea osteoclástica. Actualmente, no hay adecuada evidencia científica para probar que las células que reabsorben los tejidos duros dentales pertenezcan a un tipo celular diferente a los osteoclastos. (Harokopakis-Hajishengallis, 2007)

Los osteoclastos multinucleados y algunos mononucleados (monocitos) con potencial resortivo son positivos a la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), por esto es que se usa como el marcador más característico de este proceso. También lo es el receptor de calcitonina. (Miyamoto y Suda, 2003)

Aplicando el marcador TRAP, siguiendo criterios histológicos y de citodiferenciación se pudo dividir en proceso de reabsorción en cuatro etapas; *pre reabsorción*, donde la pared de la cámara pulpar es cubierta con una capa odontoblástica y ningún odontoclasto multinucleado

pudo ser detectada en dicha cámara (nula tinción positiva para TRAP), *reabsorción temprana*, donde odontoclastos multinucleados se detectan en la cámara pero el resto de la superficie pulpar sigue aún cubierta por la capa odontoblástica (regular tinción-TRAP), *reabsorción tardía*, donde los odontoblastos desaparecen de la cámara pulpar y domina la presencia de odontoclastos multinucleados alineados (tinción-TRAP dominante), y *reabsorción final*, donde la superficie de dentina de la cámara pulpar ha sido parcial o totalmente reabsorbida. (Sahara y cols, 1996)

Posteriores investigaciones de los mismos autores pudieron profundizar tales hallazgos, obteniendo información de la citodiferenciación de los odontoclastos y mostrándolo en dientes deciduos de conejos, considerándolo un proveedor de material adecuado e ideal. (Sahara 2001) De ambas investigaciones, los estudios histomorfométricos de la longitud de la superficie radicular confirmaron que la clasificación por características histológicas que los autores propusieron representa una secuencia de eventos durante el proceso de reabsorción.

La reabsorción fisiológica de las raíces de los dientes temporales es un proceso intermitente en el que se alternan períodos de reabsorción activa con otros más prolongados de reposo, durante los cuales se ponen en marcha procesos reparadores que restablecen la inserción periodontal de la zona reabsorbida. Durante estos períodos de reparación sobre la superficie radicular, se deposita cemento radicular ordinario, y si estos procesos de reparación superan por algún motivo a los de reabsorción, el resultado puede ser una anquilosis, con la consiguiente infraoclusión del diente.

Al final de la reabsorción, los odontoclastos gradualmente pierden su borde rugoso y se separan de la superficie reabsorbida (Sahara, 1996). Se demostró histomorfométricamente la posición de un tejido cementoide, constituido por haces de fibras, lagunas, canalículos y cementocíticos en formación depositados en forma irregular sobre lagunas de reabsorción dentinaria, como una reacción de reparación de los tejidos duros radiculares en superficies dentinarias en reabsorción en etapas de reparación tisular. (Martínez, 1994)

Esta reparación explicaría la reorganización del ligamento periodontal luego en un período de reposo, que sigue al de reabsorción. El tejido periodontal experimenta una desorganización de sus componentes, cesando la síntesis de colágeno y su posterior degradación. Las fibras principales se liberan del cemento y del hueso, observándose una compresión local de los vasos sanguíneos y una pérdida importante de sus componentes celulares. (Harokopakis-Hajishengallis, 2007)

El epitelio gingival y la unión gíngivo-dental también participan en el proceso de resorción del diente primario. Como la resorción radicular avanza, ambos migran apicalmente, debido a la inflamación a la unión gíngivo-dental. El epitelio migra debajo de la corona del diente reabsorbido, aislando y protegiendo de la inflamación en el tejido pulpar remanente al germen del diente permanente en desarrollo. No se ha establecido a ciencia cierta cómo es que se produce la eliminación del tejido pulpar, pero se sabe que en este proceso intervienen células fagocitarias del mismo tejido, tales como macrófagos y fibroblastos modificados, pero ya en etapas tardías. Antes de la caída del diente temporario, la pulpa adopta un aspecto de tejido de granulación o atrofia pulpar. El epitelio bucal también interviene en la caída y exfoliación del diente deciduo, a partir de su adelgazamiento y proliferación por debajo del margen de la corona, sin ocasionar una lesión importante sobre la mucosa de la zona. (Harokopakis-Hajishengallis, 2007)

## Proceso de reabsorción

El papel fundamental de los osteoblastos en el proceso osteoclastogénico fue hipotetizado hace bastante tiempo. *(Rodan y Martin, 1981)* Ellos referían que la remodelación ósea era llevada a cabo por dos importantes células: los osteoblastos y los osteoclastos, que el osteoblasto era considerado el responsable celular de iniciar el proceso resorptivo con la síntesis de la matriz orgánica y su calificación, y que los osteoclastos, a través de sus propiedades endócrinas y paracrinas, completaban el proceso. Para los autores, el osteoblasto y no el osteoclasto poseían receptores de hormonas reabsorptivas óseas como la parathormona, Vitamina D e interleuquina. Pero se requirieron varios años para confirmar estos hechos y caracterizarlos.

Actualmente se prefiere pensar la etiología de la reabsorción dentaria como una sucesión encadenada de factores de transcripción y de eventos mediados por integrinas que comprenden un operativo ordenado, permitiendo una regulación específica de los mismos. *(Harokopakis-Hajishengallis, 2007; Wang y McCauley, 2010)*

En este sentido, varios autores opinan que toda resorción es el efecto de la inflamación asentada sobre un tejido mineralizado, que la reabsorción dental es una consecuencia que sigue a un proceso inflamatorio del ligamento periodontal y/o la pulpa del diente. Según este criterio, toda resorción sería un proceso mediado por complejas interacciones entre factores humorales locales (citoquinas) y elementos celulares (monocitos y clastos multinucleados) especializados en la destrucción de tejidos duros. *(Ne, Whitterspoon y Gutmann, 1999; Del Nero-Viera, 2005, Baer, 2001)*

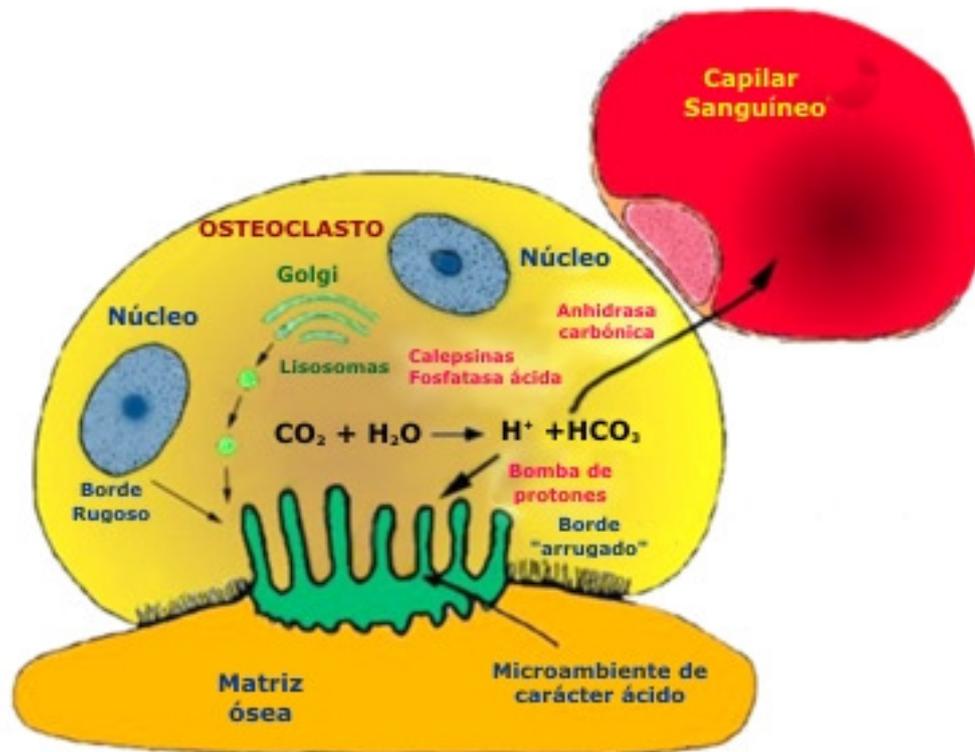
El proceso inflamatorio se produce en sitios de compresión, causado por constricción de la microvasculatura del ligamento periodontal. La inflamación produce, en primera instancia, alteraciones vasculares en los tejidos radiculares, peri-radulares y pulpares, mediados ahora por la histamina y la bradiquinina, reconocidos como potentes vasodilatadores ante la falta de oxígeno, resultando en una necrosis focal en las adyacencias del ligamento y vasos de la pulpa. Como consecuencia de la vasodilatación, aumenta el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, lo que permite la salida de líquidos y de proteínas, originando un edema que acompaña la migración de neutrófilos polimorfonucleares. Las primeras células que aparecen en el área necrótica son los macrófagos. Estas células son responsables de la reabsorción inicial de la capa precementicia. Se ha demostrado que estos macrófagos son posteriormente seguidos por células multinucleadas (odontoclastos), los cuales atacan el cemento y eventualmente la dentina. *(Brudvik y Rygh, 1993)*

El proceso de reabsorción por si mismo puede describirse como bimodal, comprometiendo la degradación de la estructura inorgánica del cristal de hidroxiapatita y la estructura orgánica de colágeno del hueso. El proceso resorptivo comienza cuando el odontoclasto se adhiere a la matriz de hueso. La penetración inicial en el precemento/cemento se mostró que ocurre en la periferia del área hialinizada del diente. Un número aumentado de células gigantes multinucleadas fueron observadas adyacentes a áreas de reabsorción. Se han descrito lagunas de reabsorción penetrando el cemento y la dentina en dientes premolares humanos. *(Abass y Hartsfield Jr, 2007)*

La característica más sorprendente y única del citoesqueleto del odontoclasto se encuentra en el sitio de contacto célula-sustrato. La mediación de la interacción célula-sustrato en la interfase entre el odontoclasto y el hueso es facilitada por proteínas de la familia de las integrinas. La adhesión de los odontoclastos al hueso mineralizado a través de la expresión en superficie de la molécula de adhesión  $\alpha_v\beta_3$  receptor (receptor de vitronectina). Este

receptor es una proteína transmembrana, cuyo extremo intracelular está unido al citoesqueleto de actina y cuyo extremo extracelular se une a moléculas de adhesión que se fijarán al calcio de los cristales de hidroxapatita del hueso. En esta instancia, los odontoclastos organizan sus elementos citoplasmáticos, polarizando áreas de la membrana basal que permiten al aparato de Golgi la excreción de enzimas lisosomales que no salen a la matriz extracelular sino que quedan atrapadas contra el hueso, donde acontecerá el proceso resortivo. Allí, con la superficie del hueso y por debajo del borde rugoso de la superficie celular del odontoclasto como fronteras, se genera una cámara hermética y con un microambiente ácido donde acontecerá el proceso resortivo. (Teitelbaum, 2007)

La enzima anhidrasa carbónica II (CA II), la cual es específica para osteoclastos, también es importante en establecer un pH ácido subosteoclástico. La CA II cataliza la conversión intracelular de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y agua formando bicarbonato ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), éste es muy inestable y se disocia liberando iones  $\text{H}^+$  que son bombeados al espacio osteoclástico y que disuelven rápidamente el componente óseo mineralizado. Privado el hueso de su capa orgánica protectora, el espacio resortivo es un medio sin oxígeno, periféricamente sellado, de extrema acidez (pH 3.0 a 4.5), donde distintas moléculas de adhesión (proteinasas) se fijan las sales cristalinas que comprenden el componente inorgánico del hueso (iones de calcio y fosfato en forma de hidroxapatita); a un pH de 5.0 o más bajo, la disolución de hidroxapatita se incrementa dramáticamente, y la reabsorción de tejidos duros puede ocurrir. (Ne, Whitterspoon y Gutmann, 1999) (Figura 3)



**Figura 3.**

Mecanismo de la resorción ósea

Fuente: Sistema óseo. Estructura y función.

Disponible en [http://www.iqb.es/cbasicas/fisio/cap06/cap6\\_3.htm](http://www.iqb.es/cbasicas/fisio/cap06/cap6_3.htm) (Consultado el 17/05/2011)

Los odontoclastos parecen expresar múltiples proteínas de integrina, algunas de las cuales están involucradas en la adhesión celular a la matriz de hueso; varias de ellas han sido identificadas, de las cuales el colágeno tipo I, la osteopontina y la sialoproteína ósea son las integrinas más involucradas. El importante uso de las integrinas en la adhesión y función de los osteoclastos ha sido demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*. Se sostiene que los odontoclastos degradan el mineral óseo y el colágeno con asincronía temporal sugiriendo que la fase inorgánica es removida antes de la colagenogénesis. La resorción interna no es sólo de la dentina; después de removerla, los odontoclastos también remueven grandes áreas de esmalte.

Tres grupos de moléculas de adhesión están involucradas en el proceso de degradación del mineral óseo: colagenasas y matriz de metaloproteinasas (MMP) que actúan con un pH neutro (7.4) y la familia proteínasa cisteína, la cual actúa con un pH ácido. Las proteínas cisteína son secretadas por el osteoclasto en la zona clara de su borde rugoso, donde el pH es más ácido, mientras que la colagenasa parece activarse en la superficie ósea reabsorbida, donde el pH es cercano al neutral debido a la capacidad *buffering* de las sales óseas disueltas. (Lindskog and Lilja, 1983, Lilja y cols, 1983; Keeling y cols, 1993; Vandevska-Radunovic y cols, 1997; Yamaguchi y cols, 2004)

Las metaloproteinasas (MMP) juegan un papel principal en facilitar la posterior adhesión de odontoclastos en las paredes de la cámara; estas proteínas degradan la superficie mineralizada produciendo la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos, predisponiendo al tejido de superficie a la reabsorción osteoclástica. Las MMPs son aproximadamente 159, 28 de las cuales son específicas de la matriz extracelular. (Morrison y cols, 2001) Conociendo el papel de las MMP en la regulación del remodelado óseo, estudios indicaron que pueden ser de importancia para determinar dónde y cuándo "atacan" al hueso los odontoclastos (Holliday, 2003). Redlich (2004) realizó cultivos de células del ligamento periodontal, las cuales se sometieron a una fuerza centrífuga durante diferentes periodos de tiempo, y determinó que el ligamento periodontal se remodela tras la aplicación de una fuerza ortodóncica en gran parte por la expresión genética de las MMP-1 en los fibroblastos presentes.

Se ha sugerido que la proteína morfogénica ósea (BMP), en combinación con 1.25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub> tiene un profundo efecto de crecimiento odontoclástico así como en el reclutamiento de odontoclastos. Los receptores del factor de necrosis tumoral (y β (TNF-( -β) regulan la odontoclastogénesis. Junto con la interleuquina-1, ambas citoquinas reclutan los osteoclastos para la reabsorción ósea.

## Regulación de la actividad odontoclástica

La mayoría de los factores regulatorios operan a través de receptores de superficie localizados en odontoblastos mientras que pocos actúan directamente sobre odontoclastos.

Un resumen de los factores regulatorios involucrados en la actividad de células clásticas incluyen a citoquinas (Nakashima y cols, 2000; Teitelbaum, 2000; Harokopakis-Hajishengallis, 2007), factores de crecimiento (Koseki y cols, 2002; Sato y cols, 2009; Jensen y cols, 2010), hormonas (McCarthy, Ji y Centrella, 2000; Boabaid y cols, 2004; Minuto y cols, 2005; Tang y Meng, 2009; Atfi y Baron, 2010) y otras moléculas. (Manolagas, 2000; Kalia, Melsen y Verna, 2004; Li y cols, 2010)

Son importantes factores que intervienen directamente en la reabsorción fisiológica del hueso, pero también se incluyen aquellos mediadores químicos producidos por reacciones inflamatorias subsecuentes a una lesión mecánica o a la infección.

El ligando RANKL (abreviatura de ligando del receptor activador del factor de transcripción  $K\beta$ ) está asociado a la membrana celular de los odontoblastos. Si hay suficiente contacto célula-célula, el RANKL se fijará sobre un receptor de membrana de los precursores odontoclásticos. Este receptor es altamente específico y se denomina RANK (abreviatura de Receptor Activator of Nuclear Factor  $K\beta$ ). La unión del RANKL al receptor RANK induce la activación de una cascada de sucesos intracelulares que llevan finalmente a la diferenciación y activación de los odontoclastos; como consecuencia de esta situación se produce la acción de estas células sobre el hueso libre subyacente y se inicia la resorción ósea.

Además del RANKL, los odontoblastos producen una proteína que inhibe el desarrollo de los odontoclastos *in vitro* e *in vivo*. Esta proteína es la Osteoprotegerina (OPG) y es también un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). La OPG es un factor soluble, esto es, no está anclado a la membrana celular y actúa predominantemente en el medio intercelular. La OPG actúa a este nivel como un receptor señuelo, uniéndose al RANKL y neutralizándolo, impidiendo su fijación al RANK; de esta forma inhibe la diferenciación, la sobrevivencia y la fusión de células precursoras de odontoclastos, bloquea la activación de odontoclastos maduros e induce su muerte celular programada (apoptosis).

Por medio de lo anterior, la resorción ósea se regula por la relación entre RANKL y OPG. Si predomina RANKL el sistema se inclinará hacia una resorción ósea aumentada; en tanto que si predomina OPG, se producirá una inhibición de la resorción ósea de mayor o menor medida en función del predominio relativo de OPG. (Aubin y Bonnelye, 2000; Oshiro y col, 2002; Xing, Schwarz y Boyce, 2005; Harokopakis-Hajishengallis, 2007)

Otra molécula que participa en la resorción dental es el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF ó CSF1). M-CSF es un factor de crecimiento hematopoyético involucrado en el crecimiento, sobrevivencia, proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas (macrófagos, osteoclastos, fibroblastos y células endoteliales). Uno de los mecanismos de acción del M-CSF es la de regular positivamente al factor RANK en las células progenitoras de osteoclastos, otro

mecanismo inhibe al gen de la OPG y así ambos mecanismos promueven la osteoclastinogénesis. Las expresiones de RANK, OPG y M-CSF por células dentales son importantes para la diferenciación y activación de los preodontoclastos, tanto en condiciones de reabsorción radicular fisiológica como patológica. (Lossdorfer, Gotz y Jager, 2002; Heinrich y cols, 2005; Boyce y Xing, 2008)

Factores sistémicos como la parathormona o drogas tales como la indometacina afectan los procesos de reabsorción de hueso y raíz; esta droga es un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, y su acción inhibe la función de reabsorción de los osteoclastos mientras que mejora la reabsorción radicular por los odontoclastos. (Lasfargues y Saffar, 1993)

La parathormona no afecta la reabsorción radicular, pero estas conclusiones deben ser aún tomadas con cautela; se ha demostrado que la parathormona no actúa directamente en los odontoclastos, en cambio causa fisuras en la capa osteoblástica, la cual cubre el hueso y a la cual los osteoclastos son atraídos y ligados para comenzar la reabsorción. A diferencia de los osteoblastos, los cementoblastos que cubren la superficie radicular no responden a la estimulación de las glándulas paratiroides en el mismo modo, lo cual puede explicar la resistencia de la superficie radicular a esta hormona. Esta explicación es avalada también por la observación que un diente traumatizado que se anquilosa pierde la protección de la capa ameloblástica, resultando que la raíz se "pega" al hueso alveolar y la administración de parathormona causa reabsorción tanto del hueso como de la raíz. (Lindskog, Blomlof y Hammarstrom, 1987)

Sahara y cols (1996) refieren que no observaron reabsorción odontoclástica durante el hiperparatiroidismo.

## Patrón de reabsorción

Una evolución importante tuvo la determinación del sitio de reabsorción inicial en la pieza dentaria y el patrón que ésta seguía cuando progresaba. Inicialmente se decía que las reabsorciones eran simétricas cuando progresaban.

En 1990 analizaron en 64 dientes deciduos humanos, el proceso de reabsorción radicular, con microscopio óptico; se pudo observar que la reabsorción más avanzada de la raíz en los deciduos se produce en las áreas apicales. La posición de la reabsorción varía en estos dientes; la superficie lingual se reabsorbió más extensamente que la labial en los dientes anteriores mientras que en los deciduos molares fue más avanzada la reabsorción del área furcal y la superficie de cemento interradicular de las raíces, donde se observaron lagunas de reabsorción en el conducto radicular y la cámara pulpar, y en algunas raíces de dientes deciduos se observó claramente la aparición de cemento celular reparador y de fibra periodontal *(Liao et al, 1990)*

Posteriormente se informó que en molares deciduos la reabsorción se iniciaba simultáneamente en el ápice, en la superficie interna de la raíz y la bifurcación, que en el caso de los molares superiores se veía primero en las raíces mesial y distal y luego en la palatina, y en los inferiores había una marcada reabsorción inicial en la raíz distal seguida de la mesial. Nuevos estudios contradijeron estos hallazgos al encontrar que en el estadio de reabsorción inicial, la progresión más comúnmente observada fue la lateral, y cuando avanzaba la reabsorción a un estadio medio podía pasar de apical a horizontal y de lateral a diagonal en el 80% de los casos. *(Ochoa, Aguilar y Espinal, 2001)*

Articulando con los dientes permanentes, la resorción radicular del diente primario se inicia en el sitio de la raíz que está más cerca al sucesor permanente. En los dientes anteriores, por ejemplo, la corona completa del sucesor permanente se encuentra lingual al tercio apical de la raíz del predecesor primario. El movimiento eruptivo del diente permanente tiene una dirección incisal y vestibular; esto causa la resorción de la superficie lingual del tercio apical de la raíz del diente primario. Una vez que hay resorción de la superficie vestibular, el diente permanente es encontrado debajo de la raíz del diente primario. Desde aquel momento, la resorción sigue adelante horizontalmente en una dirección incisal, hasta que el diente primario se exfolie y el diente permanente erupcione en la cavidad oral.

En estudios recientes de revisión sobre los eventos moleculares e histológicos en la reabsorción fisiológica de la raíz en dientes primarios se sostuvo que la reabsorción de la raíz parece ser iniciada y regulada por el retículo estrellado y el folículo dental de los dientes permanentes subyacentes por medio de la secreción de moléculas estimuladoras, es decir, citoquinas y factores de transcripción. Los dientes primarios sin sucesor permanente finalmente también exfolian, pero la comprensión del mecanismo es escasa: Esta revisión también aportó que el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la reabsorción de la raíz fisiológica puede permitir demorar o incluso inhibir la exfoliación de los dientes primarios en aquellos casos en los que los dientes sucesores permanentes no están presentes, y por ende, es conveniente la preservación de los dientes primarios. *(Harokopakis-Hajishengallis, 2007)*

## MECANISMOS DE DEFENSA DE LA PULPA DE DIENTES DECIDUOS

El núcleo de la pulpa dental contiene grandes vasos sanguíneos y nervios, que están rodeados por un tejido conectivo laxo. Debido a la extensión de las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos en los túbulos dentinales, estas células constituyen la parte principal del complejo pulpa-dentina. Cuando este complejo es agredido por diversas causas fisiológicas o patológicas, reacciona en un intento por defender la pulpa.

La reacción puede ser tanto la *reparación tisular*, donde la continuidad es restaurada pero el tejido curado difiere en anatomía y función, o la *regeneración tisular*, donde tanto la anatomía como la función son restauradas. En este sentido, en la región oral, las heridas de piel y de mucosa son reparadas con la formación de cicatrices; en cambio, los tejidos dentales son únicos en comparación con la mayoría de los demás tejidos en el cuerpo debido a su marcada capacidad de regeneración. (Andreasen y Lovschall, 2010)

Un ejemplo de *reparación tisular* es la producción de dentina esclerótica o reaccionaria que cierra considerablemente el lumen de los túbulos como mecanismo de defensa biológico pulpar; este mecanismo intenta detener el avance del proceso de caries disminuyendo la permeabilidad dentinaria por medio de aposición de material calcificado como: apatita y otros cristales (1º línea de defensa) que actúa como un escudo de protección contra los irritantes y que provee tiempo adicional para que actúe la 2º línea de defensa, que es la dentina reparativa: los odontoblastos en descanso se reactivan o son reemplazados por las células mesenquimales y se produce una nueva dentina reparativa; la cantidad que se forma de ésta es proporcional a la cantidad de tejido sano que se corta en el lado del esmalte. A medida que los odontoblastos son estimulados por la lesión que avanza, la pulpa deposita dentina reparativa debajo de los túbulos afectados, este mecanismo pretende mantener una pared dentinal entre la lesión y la pulpa limitando la difusión de sustancias tóxicas. (Llena, Montaña y Forner, 2000; Fuks, 2000; Smith, 2003)

En la *regeneración tisular*, no obstante, lo que distingue las células de una estirpe de las de otra no es la información genética de que disponen, sino la expresión diferencial de unos u otros genes (la expresión de los genes se traduce en la síntesis de proteínas); así, las células que expresan determinados genes producen unas proteínas específicas. Lo que determina qué genes expresa una célula y qué genes no expresa, no es el contenido genético de la célula sino factores entre los que se hallan el microambiente en que vive la célula y que contiene gran cantidad y diversidad de señales que le indican y le ordenan cuál debe ser su patrón de comportamiento. Una célula madre (también denominadas *stem cells*, células progenitoras, troncales, del tronco, precursoras, estaminales, entre otras acepciones) es una célula "genérica" que puede hacer copias exactas de sí misma indefinidamente. Además, una célula madre tiene la capacidad de producir líneas celulares especializadas para varios tejidos del cuerpo, tales como: músculo cardíaco, tejido cerebral, tejido hepático, fibras periodontales y dentina, entre otras. (Ying, Nichols y Evans, 2002; Jiang y cols, 2002; Körbling y Estrov, 2003; Wilmut, 2004; Daley 2004; Martin y cols, 2005; Chan, O' Donoghue, De la Fuente y cols, 2005)

La medicina regenerativa es la disciplina médica que se ha basado fundamentalmente en los nuevos conocimientos sobre las células madres y en su capacidad de convertirse en células de diferentes tejidos. Se sustenta en la terapia celular, en la administración de elementos subcelulares y en la ingeniería de tejidos, conductas utilizadas para reemplazar por células sanas a las células dañadas por diversos procesos en

determinados tejidos, propone reparar los tejidos dañados mediante mecanismos similares a los que, de forma natural, emplea el organismo para la renovación de las poblaciones celulares que van envejeciendo y que deben ser sustituidas por otras que suplen su función. (Donovan y Gearhart, 2001; López Moratalla, 2003; Rosenthal, 2003)

Para la *regeneración tisular* es necesario que ocurran tres factores determinantes. El primero, que una población celular específica del tejido (por ejemplo, células progenitoras de la pulpa o del ligamento periodontal, esté presente después de la lesión; si estas células no estuvieran presentes, se llevará a cabo una reparación en vez de una regeneración. El segundo, deben existir condiciones que sean conductivas para la migración de células específicas del tejido hacia el sitio de la herida. El tercer factor es la presencia de cuerpos extraños contaminantes o bacterias; la inflamación vinculada a una herida contaminada conduce a la reparación en vez de regeneración, probablemente debido a que la contaminación lleva a una formación de tejido granular inflamado a expensas de la proliferación y migración de células específicas del tejido. (Barry y Murphy, 2004)

Si bien las distintas modalidades terapéuticas vigentes ofrecen óptimos resultados, una forma ideal de tratamiento con enfoque regenerativo sería aquella que los tejidos pulpares necróticos o enfermos sean reparados o reemplazados por tejido pulpar sano para revitalizar el diente. El rol de las células de la pulpa dental de dientes deciduos como agente bioactivo para la reparación y regeneración tisular es tema de investigación recurrente en las últimas décadas. La pulpa dental joven, particularmente la pulpa de la dentición decidua, tiene un alto potencial regenerativo; la evidencia radica en la alta celularidad y vascularización de este tejido, fundamentalmente en estadios anteriores a la reabsorción fisiológica. (Murray y cols, 2002)

En la actualidad, cuatro tipos de células *stem* dentales humanas han sido aisladas y caracterizadas:

- a) células madre de la pulpa dental (Gronthos y cols, 2000)
- b) células madre de dientes deciduos (Miura y cols, 2003)
- c) células madres de la papila apical (Sonoyama y cols, 2008)
- d) células madre del ligamento periodontal (Seo y cols, 2004; Kramer y cols, 2004; Seo, Miura y cols, 2005; Ivanovsky y cols, 2006; Yamazaki y cols, 2007; Kadar y cols, 2009)

La identificación de estas células dentales provee una mejor comprensión de la biología de los tejidos de la pulpa y del ligamento periodontal, y su potencial regenerativo después del daño tisular. (Huang, 2008)

*Thesleff* (2000) destacó la base genética del desarrollo dentario y de defectos dentales, diciendo que los genes regulatorios del desarrollo han sido conservados en un alto grado durante la evolución. Cadenas de genes similares regulan el desarrollo de los dientes al igual que el de otros órganos, y que la supresión de la función de muchos de estos genes altera el desarrollo del diente detenido pero también muestran defectos en muchos otros tejidos.

Ese mismo año se logró aislar una población clonogénica, rápidamente proliferativa de células de pulpa dental humana posnatal (CPD). Estas células se compararon con las células estromales de la médula ósea (CMO), reconocidos precursores de los osteoblastos. Se encontró que las CPD producían, esporádicos nódulos densamente calcificados y no formaban adipocitos, mientras que las CMO habitualmente calcificaban a lo largo de la capa celular adherente con grupos de adipocitos abundantes en lípidos.

Los autores concluyeron que las CPD tienen la habilidad de formar un complejo similar a la pulpa-dentina. (Gronthos et al, 2000)

Posteriormente, este mismo equipo de investigadores encontró que los dientes deciduos humanos exfoliados contienen células clonogénicas altamente proliferativas (*células madres en dientes primarios*), capaces de diferenciarse en una variedad de células (nervios, adipocitos, odontoblastos). Por primera vez lograron aislar células madres provenientes de este tipo de dientes y confirmaron que estas células son posibles de diferenciarse en una variedad de tipos celulares (células nerviosas, adipocitos y odontogénicas, identificadas clínica e inmunofenotípicamente). Después de trasplantadas *in vivo*, los autores hallaron que estas células eran capaces de inducir la formación de hueso. Refirieron que estas células son completamente diferentes de las identificadas por este mismo equipo, descritas en el párrafo anterior, en términos de que no sólo derivan de tejidos accesibles sino que proveen una cantidad de células suficiente para aplicaciones clínicas potenciales. (Miura, Gronthos, Zhao et al, 2003)

Goldberg y Smith (2004) publicaron una actualización sobre los fundamentos biológicos para la ingeniería reparadora y de los tejidos, en términos de las matrices celulares y extracelulares de la dentina y la pulpa dental. Después de explayarse sobre el estado del arte en la biología de los odontoblastos, la biología pulpar y su reparación, los autores concluyen que algunas moléculas halladas en la matriz extracelular de la dentina puede tener potencial en terapia dental como agentes bioactivos para la reparación de la pulpa o la ingeniería de los tejidos.

Otro estudio inmunológico trató de determinar, en la pulpa de dientes deciduos, cómo varía la distribución y la densidad de distintas células inmunocompetentes durante el proceso de reabsorción fisiológica de la raíz. Compararon tres grupos de dientes extraídos en distintas etapas de reabsorción; un grupo con dientes deciduos intactos, otro grupo de dientes cuya reabsorción fue menor al tercio del largo de la raíz, y un tercer grupo de dientes donde la reabsorción era de 1/2 a 2/3 del largo de la raíz. Los autores concluyeron que las células inmunocompetentes de la pulpa de los dientes deciduos se incrementan conforme al avance de la reabsorción de la raíz fisiológica, y sugieren que la inmunocompetencia de los dientes deciduos es alterada por este proceso. (Angelova et al, 2004)

Investigaciones ratificaron que la principal tarea de estas células provenientes de la dentición decidua parece ser la formación de tejido mineralizado, el cual puede ser usado para mejorar la regeneración ósea orofacial. (Papaccio y cols, 2006; Luisi y cols, 2007; Wei y cols, 2007; Seo y cols, 2008) No obstante, este tipo de células *stem* son también trasplantadas a tejidos cerebral y dérmico en ratas, desarrollando características nerviosas muy replicables y viables; numerosos estudios coinciden en que estas células resultan una fuente segura de un material replicable para producir dentina y tejido neurológico autogénico. (Gronthos y cols, 2002; M.Miura y cols, 2003; Shi y Gronthos, 2003; Miletich y Sharpe, 2004; Nosrat y cols, 2004; Shi y cols, 2005; Y.Miura y cols, 2006; Techawattanawisal y cols, 2007; Widera y cols, 2007; Ma, Wang y cols, 2007; D'Aquino y cols, 2007; Arthur y cols, 2008; Koyama y cols, 2009)

En términos de la identificación de marcadores de diferenciación celular, células *stem* obtenidas de la pulpa de dientes deciduos obtenidas de niños sanos entre 6 y 10 años, posteriormente cultivadas mostraron intensa positividad para marcadores de diferenciación osteoblástica como osteocalcina, RUNX-2 y CD44, proveyendo evidencia de que los dientes deciduos proveen un "nicho" aprovechable de células *stem*, y que es

una fuente ideal de osteoblastos así como tejido mineralizado, listo para la regeneración ósea, trasplante y terapias clínicas tisulares. (Laino y cols, 2006)

Investigadores italianos refirieron el problema que significaba para los cirujanos orales y craneofaciales hallar huesos para injertos, y ratificaron que las células madres derivadas de la pulpa dental humana eran óptimas para la diferenciación en osteoblastos y representaban una fuente potencial de producción *in vitro* de hueso autónomo. Los autores describieron sus resultados preliminares en este nuevo campo y su potencial aplicación en cirugía maxilofacial. La pulpa dental fue extraída de 34 dientes humanos permanentes de pacientes adultos (19-37 años); después de procesadas las células fueron seleccionadas usando técnicas moleculares de adherencia (STRO-1, CD34, CD45, CD44 y RUNX-2). Los osteoblastos diferenciados, después de 30 días de cultivo, comenzaron a secretar una matriz mineralizada extracelular, la cual 2 semanas después, construyó un considerable número de muestras de tejido óseo en tridimensión. Los autores concluyeron diciendo que contaban con fuerte evidencia que la pulpa dental de dientes deciduos es un "nicho" de células madres del estroma y que es una ideal fuente de osteoblastos así como de tejido mineralizado, listo para la regeneración ósea, trasplante y terapias clínicas basadas en tejidos. (Laino y cols, 2006)

Si bien se conoce la multipotencialidad de estas células, aún no se sabía si pueden generar tejido pulpar dental *in vivo*. Se evaluaron las características morfológicas del tejido formado cuando este tipo de células se siembran en celdas biodegradables dentro de ranuras dentales humanas y luego transplantadas en ratones inmunodeprimidos. Se observó que el tejido resultante presentó arquitectura y celularidad muy similar a la de la pulpa dental fisiológica; un análisis con microscopía electrónica e inmunohistoquímica de la sialoproteína dental sugirió que las células se diferenciaron en odontoblastos *in vivo*. Notablemente, estas células también se diferenciaron en células endoteliales, ratificando a las células madres de dientes deciduos como una fuente viable para la ingeniería tisular. (Cordeiro y cols, 2008)

Otro aspecto del análisis de las células *stem* de dientes deciduos humanos para reconstruir defectos óseos craneales de gran tamaño es el que se realizó en ratas sin inmunodepresión; estas células nunca se habían utilizado en experimentos similares. Se realizaron dos grandes defectos similares y simétricos (8x5 mm) en cada región parietal de 8 ratas no inmunocomprometidas. En 6/8 ratas el lado izquierdo fue suplantado con una membrana de colágeno sólo y el lado derecho con colágeno más células *stem*, y en 2/8 el lado derecho con colágeno sólo y nada agregado del lado derecho. Los hallazgos de esta investigación sugirieron que estas células *stem* son una fuente celular adicional para corregir grandes defectos craneales en ratas, y constituye un modelo promisorio para la cirugía craneofacial. (De Mendoga Costa y cols, 2008)

Un estudio logró aislar y caracterizar células madres de la pulpa dental en un diente supernumerario (un *mesiodens*) de un paciente varón sano de 20 años de edad. Estas células fueron comparadas con las del canino deciduo inferior izquierdo. Siguiendo métodos de cultivo similares a otras investigaciones, en ambos tipos de dientes 73% y 83% de las células respectivas fueron capaces de formar colonias. Los autores concluyen que los dientes supernumerarios junto con los deciduos también representan –junto a los permanentes– una valorable fuente de células madres, demostrando la viabilidad de estas células en un tejido que generalmente es desechado. (Huang, Chen y cols, 2008)

La expresión de múltiples marcadores de células *stem* en células de la pulpa dental cultivadas en medios libres de suero fue recientemente analizada. Las líneas de células *stem* se desarrollan en medios que contienen generalmente suero fetal bovino; sin embargo, el potencial alergénico y la posibilidad de contaminación cuando se usa un medio que contiene suero podría ser una barrera para el trasplante y en consecuencia para la introducción de métodos terapéuticos con este tipo de células en aplicaciones clínicas. Se estudió la conservación de células dentales mesenquimáticas en cuatro diferentes medios de cultivo libres de suero. La viabilidad de los tests mostró una diferencia significativa entre el control y los medios de cultivo libres de suero, tanto en células provenientes de pulpa de dientes deciduos como permanentes se desarrolló utilizando cuatro marcadores específicos: CD44, CK19, nestin y P63; de todos, el que mostró la más alta tasa de proliferación fue el medio ITS-X con factor embriotrófico (ETF), sugiriendo ser un idóneo medio de cultivo de células madres de pulpa dental humana, preservando la pluripotencialidad en la diferenciación. (Hirata y cols, 2010)

Una prometedora terapia celular para la regeneración ósea utilizando cultivos de células madre de dientes deciduos, pulpa y médula ósea y luego implantándolas en la mandíbula se está desarrollando. Se comprobó que las células madre provenientes de dientes deciduos, pulpa dental y médula ósea con tienen la capacidad para formar el hueso y sugieren que la formación de hueso con células *stem* provenientes de dientes deciduos puede tener el potencial de generar un injerto entre un niño y sus padres. Este estudio preclínico podría allanar el camino para la terapia de células madre en reconstrucción maxilofacial ortopedia y oral. (Yamada y cols, 2010)

Recientemente se han publicado dos trabajos muy importantes sobre el tema. Uno de ellos refiere a la aislación de células madres de la pulpa de dientes deciduos en diferentes niveles de reabsorción fisiológica; lograron cultivar y aislar células madres proveniente de pulpas dentarias en etapas avanzadas de reabsorción (grupo I) pero no lograron cultivos celulares en pulpas que no mostraban ninguna característica resorptiva visible (grupo II); estas células fueron medidas con distintos marcadores celulares, incluyendo CD44, y con citometría de flujo se cuantificó la cinética de la producción celular *in vitro*. Los autores vinculan la aislación y obtención de células madres con el proceso fisiológico de rizólisis. (Bernardi y cols, 2011)

El otro trabajo reporta los resultados de la comparación de dos métodos de cultivos de células *stem* provenientes de dientes deciduos en el potencial de diferenciación osteo-odontogénica. Se compararon la conducta biológica de las células *stem* de los cultivos provenientes de disociación enzimática y de extensión directa proveniente de tejidos pulpares; los cultivos provenientes de la primera comprendieron poblaciones de células heterogéneas mientras que las provenientes de la segunda eran más delgadas y heterogéneas. La tasa de mineralización y la cantidad de matriz mineralizada producida fue más alta en los cultivos de disociación enzimática, por esto se sugiere que las células provenientes de estos cultivos muestran un mejor potencial de biomineralización, lo cual podría ser de ventaja para la aplicación en terapéuticas clínicas. (Bakopoulou y cols, 2011)

## PLANTEO DEL PROBLEMA

Los eventos fisiológicos que se involucran en los procesos del recambio dentario, como la presión que ejerce la corona del diente permanente en su camino eruptivo sobre las raíces de las piezas primarias, generan modificaciones histoquímicas que inducen el proceso de reabsorción radicular.

Se trata de ampliar los conceptos teóricos que fortalezcan los conocimientos referidos al proceso fisiológico de reabsorción radicular.

## OBJETIVOS

### General

El objetivo general de la tesis fue determinar los niveles de concentración de CD44 a través de un marcador específico, el ácido hialurónico, en distintos estadios del desarrollo radicular y en las etapas involutivas en tejido pulpar inflamado, sano y supernumerario de las piezas dentarias de la primera dentición.

### Particulares

- ⊕ Determinar el grado de adhesión eritrocitaria en piezas dentarias deciduas, medido en distintas diluciones geométricas de lisado pulpar y ácido hialurónico (puro, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024)
- ⊕ Estimar el parámetro de sensibilidad del método para medir el grado de adhesión eritrocitaria como cuantificador de la concentración de CD44.
- ⊕ Describir al grupo de pacientes incluidos en términos de la edad, sexo, factor y grupo sanguíneo.
- ⊕ Clasificar las muestras de tejido pulpar de acuerdo a las características patológicas (pulpa decidua sana, pulpa decidua con caries) y fisiológicas (supernumerarios deciduos, supernumerarios permanentes).
- ⊕ Cuantificar la concentración de CD44 en cada uno de los grupos evaluados.
- ⊕ Comparar cuantitativamente el grado de aglutinación entre los grupos establecidos.
- ⊕ Articular los resultados obtenidos con el diagnóstico clínico.

## HIPOTESIS

La magnitud de la presencia de CD44 en la pulpa dental está en correlación con la complejidad del proceso de reabsorción radicular.

## MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con pacientes atendidos en un consultorio odontológico privado y los que concurrieron al Servicio de Odontopediatría de FOR-UNR.

Como criterio de inclusión se seleccionaron piezas que por diversas patologías debieron realizarse diferentes tratamientos odontológicos en dientes deciduos que involucraran extirpaciones pulpares o extracciones. También se incluyeron piezas de dientes supernumerarios. Fueron excluidos aquellos pacientes con diagnóstico de alguna enfermedad sistémica que pudiere influir en la respuesta biológica de reparación.

El tejido pulpar provino de piezas dentarias deciduas derivadas a endodoncia con diagnóstico de pulpitis irreversible y de otras piezas con pulpa sana que por motivos ortodóncicos debieron realizarse exodoncias; también se incluyó tejido pulpar proveniente de dientes supernumerarios (deciduos y permanentes) que debieron ser extraídos por alteración en la ubicación en la arcada dentaria. Para cada pieza dentaria incluida en la muestra se completó una planilla de recolección de datos que incluyó un consentimiento considerando las normas de ética de la UNR (*Ver en Anexos: Planilla de recolección de datos*).

Para la extirpación pulpar de las piezas dentarias se hizo la apertura de la cámara pulpar y con una cucharita tipo Black se extrajo la pulpa. Todas las muestras de pulpa obtenidas fueron sumergidas en solución fisiológica en tubos Eppendorf y congeladas a -20°C, hasta su procesamiento

### Descripción de la técnica de dosaje de CD44

El procesamiento consistió en la aplicación de la técnica de dosaje de CD44 mediante la cuantificación de la inhibición de la adhesión o aglutinación. En las reacciones de inhibición de la aglutinación, la estimación de la especificidad y título de anticuerpo se realizó en base a la competencia entre antígenos particulados y solubles por los sitios de combinación. Esto pudo ser homologado a la reacción Receptor de Hialuronato (CD44-Hialuronato). En estas reacciones se combina primero el ligando con el receptor soluble, inhibiendo luego la adhesión (aglutinación) indirecta de células indicadoras. Se interpretó que en presencia del CD44, el ácido Hialurónico fue consumido produciendo una disminución de la agregación de los eritrocitos. (D'Arrigo y cols, 2009)

### Materiales

- 1) Solución de Hialuronato (*Sigma-Aldrich 1876 Hyaluronic acid, sodium salt form umbilical cord*)
- 2) Lisado de tejido pulpar extraído de:
  - a) piezas dentarias deciduas con tejido pulpar sano
  - b) piezas dentarias deciduas con tejido pulpar con caries penetrante.
  - c) piezas dentarias provenientes de dientes supernumerarios (deciduos y permanentes).
- 3) Sistema revelador: eritrocitos del mismo grupo sanguíneo y Rh del paciente, bromelinizados (*Sigma B22.52*), suspendidos al 2% en buffer fosfato salino (BPS).
- 4) Testigo positivo para la adhesión: solución de Hialuronato + BPS + sistema revelador.
- 5) Testigo negativo: BPS + sistema revelador

## Método

**1º paso:** Sistema revelador. Se adicionó un volumen y medio de bromelina (*Sigma B22.52*) de concentración 5mg/ml, a un volumen de "coulot" de glóbulos rojos, se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente los glóbulos rojos fueron lavados centrifugándolos 3 veces durante 3 minutos a 3000 RPM. Luego de este proceso, se retiró el BPS sobrenadante con una pipeta aspirativa y se lo suspendió en BPS al 2%. Concomitantemente se rotularon 11 tubos limpios como "puro", "1/2", "1/4", "1/8", "1/16", "1/32", "1/64", "1/128", "1/256", "1/512" y "1/1024", respectivamente.

**2º paso:** Se tomó la muestra de pulpa a estudiar lo más triturada posible. Esta pulpa se agregó al primer tubo rotulado ("puro") y al segundo ("1/2"). Se procedió entonces a realizar la dilución geométrica: Se tomó todo el volumen del 2º tubo ("1/2") y se pasó una gota al 3º ("1/4"), devolviendo al tubo original lo que sobró. Así se procedió sucesivamente hasta el último tubo, completando toda la serie y teniendo en todos los tubos el mismo volumen de líquido. Del 2º tubo al 11º tubo se agregó una gota de BPS (depósito de la pipeta en el fondo del tubo).

**3º paso:** En cada uno de los 11 tubos rotulados se colocó una gota de Hialuronato y se llevo a incubar en heladera durante 15 minutos a 4º C. También se realizó una dilución del suero del paciente del mismo grupo de la muestra para utilizar como testigo.

**4º paso:** Bromelinizar. En un tubo aparte se mezclaron 6 gotas de los glóbulos rojos lavados y 9 gotas de bromelina, colocándolos en un tubo limpio. Este tubo se incubó durante 15 minutos a 37°C.

**5º paso:** Se colocó una gota de los glóbulos rojos bromelinizados en cada uno de los tubos rotulados en que se realizó la dilución geométrica, inclusive en el 1º tubo ("puro") y se incubó 24 horas en heladera.

Pasado este tiempo, se realizó la lectura; los resultados de las titulaciones se expresaron en scores (*Goudeman y Marsalet, 1967*):

Score 10: +++ (>10 aglutinados grandes)  
 Score 8: ++ (3 a 10 aglutinados)  
 Score 5: + (1 a 3 aglutinados)  
 Score 2: ± (trazas)  
 Score 0: - (sin aglutinados)

### Análisis estadístico

Los resultados de las titulaciones expresadas por un score fueron aplicados en una expresión matemática denominada "parámetro de sensibilidad" (*Valverde y Rasia, 1982*) que combina título y grado de dilución, simbolizado con  $\alpha$  y estimado como:

$$\alpha = \sum_{i=1}^n (E_i / D_i) 10^{-3}$$

donde

$E_i$  = score del grado de adhesión eritrocitaria y

$D_i$  = dilución del suero.

La estimación de este valor  $\alpha$  fue calculado para cada muestra de tejido pulpar, variando el título (representado por el score) y el respectivo nivel de dilución. Este parámetro permitió cuantificar con mayor precisión el aumento de sensibilidad de una técnica específica.

La relación de la edad del paciente con el respectivo parámetro de sensibilidad se estudió con el coeficiente de correlación de Spearman; su significancia estadística se midió en términos de la inclusión del 0 (correlación nula) en el respectivo intervalo de confianza del 95%.

Para evaluar la existencia de diferencias entre las medianas del parámetro de sensibilidad de los subgrupos considerados se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis.

Para identificar cuáles subgrupos se diferenciaron entre sí se aplicó la prueba de la Mann-Whitney.

En todas las pruebas estadísticas, un valor de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

**RESULTADOS**

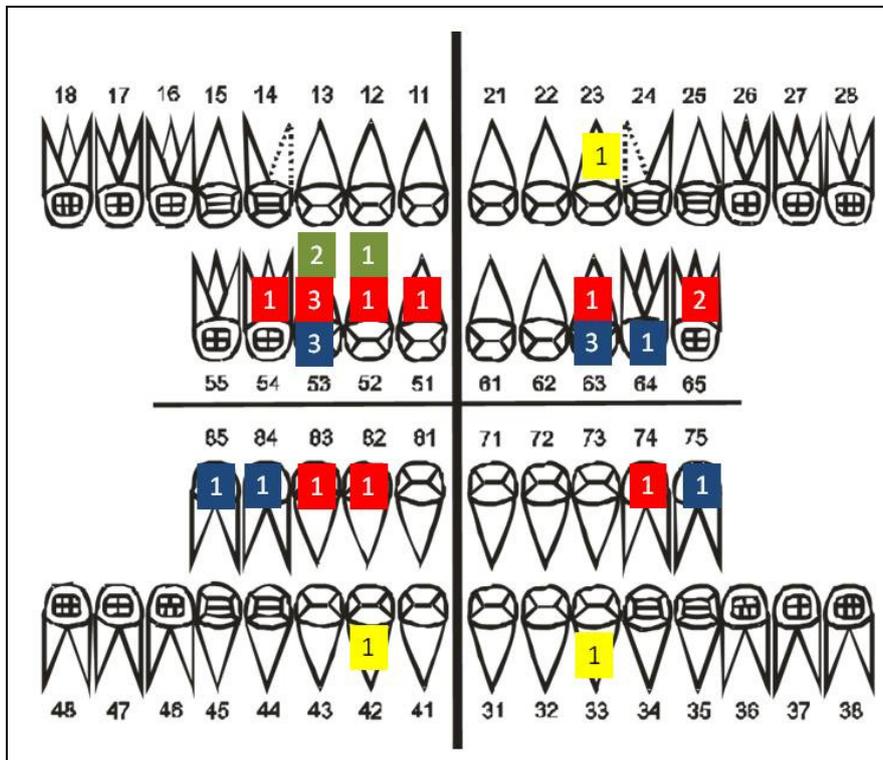
**Características de las muestras analizadas.**

Fueron evaluadas 28 muestras de pulpa dentaria proveniente de 25 pacientes (12 varones y 13 mujeres) comprendidos entre 2 y 13 años.

Se registró el grupo y factor sanguíneo de los pacientes, resultando que más de la mitad tuvieron el grupo A+ (16 pacientes, 64%), seguido por el grupo O+ (7 pacientes, 32%); sólo 1 paciente tuvo el grupo B+ (4%).

Considerando el origen de las pulpas, 25 muestras provinieron de dientes deciduos (10 con pulpa sana, 12 con pulpa con caries y 3 supernumerarios con pulpa sana) y 3 provinieron de dientes supernumerarios permanentes (los 3 con pulpa sana).

La *Figura 1* indica la distribución de las muestras de las respectivas piezas dentarias que se incluyeron en este estudio.



**Figura 1.** Muestras pulpares extraídas de las piezas dentarias.

- En azul n=10 muestras de pulpa decidua sana.
- En rojo n=12 muestras de pulpa decidua con caries
- En verde n=3 muestras de pulpa supernumeraria decidua sana.
- En amarillo n= 3 muestras de pulpa supernumeraria permanente sana

Considerando la diversidad de situaciones, se procedió a clasificarlas en cuatro grupos diferentes:

- **Grupo I** (en azul) (n= 10) Muestras de pulpa decidua sana
- **Grupo II** (en rojo) (n= 12) Muestras de pulpa decidua con caries
- **Grupo III-a** (en verde) (n= 3) Muestras de pulpa supernumeraria decidua sana
- **Grupo III-b** (en amarillo) (n= 3) Muestras de pulpa supernumeraria permanente sana

La pulpa obtenida en cada una de las muestras de los diferentes grupos fue sometida a una técnica bioquímica de detección de la presencia de CD44. Como se describió en Material y Métodos, esto pudo ser homologado a la reacción CD44-Hialuronato, combinando lisado de tejido pulpar con una solución de Hialuronato en distintas diluciones para investigar al receptor de Hialuronato (CD44) soluble.

Se determinó la dosis subaglutinante del ligando (Hialunorato). Los títulos de aglutinación se registraron de la siguiente manera: sin aglutinados,  $\pm$ , +, ++, +++, y se le asignaron los 0, 2, 5, 8 y 10, respectivamente. *(Goudeman y Marsalet, 1967)*

Los scores fueron analizados con una expresión matemática que *Valverde y Rasia (1982)* denominaron "parámetro de sensibilidad" (simbolizado con  $\alpha$ ), que permite combinar el título (a través de su score) con el respectivo grado de dilución.

La utilización del parámetro permitió cuantificar con más precisión el aumento de sensibilidad de una técnica con relación a otra menos perfeccionada o estándar.

### **Grupo I. Pulpa dentaria decidua sana (n= 10 muestras)**

Fueron evaluados 10 muestras de pulpa dentaria decidua sana proveniente de 10 pacientes de ambos sexos (4 masculinos y 6 femeninos).

La edad promedio de los mismos fue de 10.4 años (grupo etario: 8-12 años).

En términos del grupo y factor sanguíneo de los pacientes, se registraron 6 pacientes con grupo A+ y 4 pacientes con grupo 0+.

Se extirparon pulpas de las siguientes piezas deciduas: 53 (3 muestras), 63 (3 muestras), 64, 75, 84 y 85 (1 muestra cada una).

La identificación de los pacientes, los resultados de adhesión eritrocitaria (indicativa de la presencia de CD44) y el score correspondiente a cada dilución se expone en la *Tabla 1*.

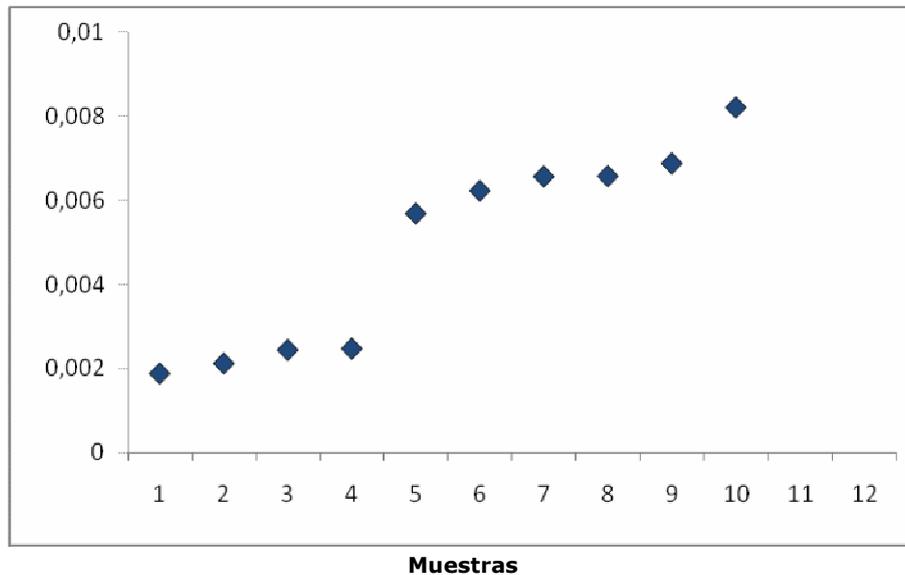
Pieza dental	edad	sexo	Grupo sang.	Nivel de dilución (D)											
				puro	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	
84	10	M	A+	-	-	+	+	+	+	+	±	+	-	-	
63	12	M	A+	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	+	+++	+++	
53	9	F	A+	-	±	±	±	±	-	-	-	+	±	-	
85	11	F	0+	+	±	+++	+++	++	++	+	++	++	++	-	
75	10	F	0+	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	
64	12	F	0+	+	++	+	+	++	+	-	+	-	-	+	
53	11	F	A+	++	+	+++	++	++	+	++	++	+	+	+	
63	8	F	A+	±	±	±	-	+	+++	++	+	±	++	++	
53	10	M	0+	+	+	++	++	++	+++	++	+++	++	++	+	
63	11	M	A+	-	±	±	+	±	±	+	±	+	++	+	

**Tabla 1.** Identificación, grado de adhesión eritrocitaria para cada nivel de dilución en pulpa sana de dientes deciduos (n= 10 muestras)

La *Tabla 2* y la *Figura 2* muestran la estimación del parámetro de sensibilidad  $\alpha$  para cada muestra procesada. En este grupo de pacientes, el parámetro de sensibilidad  $\alpha$  promedio fue de **0.00493**, con un rango que varió entre **0.00190** y **0.00821**. El valor de la mediana fue de **0.00596**.

Pieza dental	Nivel de dilución (D)												Sensibilidad $\alpha$
	puro	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024		
84	0	0	5	5	5	5	5	2	5	0	0	0,00246	
63	8	8	8	8	10	10	8	10	10	10	10	0,00821	
53	0	2	2	2	2	0	0	0	5	2	0	0,00190	
85	5	2	10	10	8	8	5	8	8	8	0	0,00569	
75	10	5	5	10	10	10	10	10	10	10	0	0,00623	
64	5	8	5	5	8	5	0	5	0	0	5	0,00658	
53	8	5	10	8	8	5	8	8	5	5	5	0,00688	
63	2	2	2	0	5	10	8	5	2	8	8	0,00232	
53	5	5	8	8	8	10	8	10	8	8	5	0,00657	
63	0	2	2	5	2	2	5	2	5	8	5	0,00245	

**Tabla 2.** Identificación, score de adhesión eritrocitaria para cada nivel de dilución y parámetro de sensibilidad en pulpa sana de dientes deciduos (n= 10 muestras)



**Figura 2.** Parámetro de sensibilidad de adhesión eritrocitaria en dientes deciduos con pulpa sana (n=10)

### Grupo II. Pulpa dentaria decidua con caries (n= 12 muestras)

Fueron evaluados 12 muestras de pulpa dentaria decidua con caries proveniente de 10 pacientes de ambos sexos (5 masculinos y 5 femeninos).

La edad promedio de los mismos fue de 8.8 años (grupo etario: 2-11 años).

En términos del grupo y factor sanguíneo de los pacientes, se registraron 6 pacientes con grupo A+, 3 pacientes con grupo 0+ y 1 paciente con grupo B+.

Se extirparon pulpas de las siguientes piezas deciduas: 53 (3 muestras), 65 (2 muestras), 51, 52, 54, 63, 74, 82 y 83 (1 muestra cada uno).

La *Tabla 3* expone la identificación de los pacientes y los resultados de concentración correspondiente a cada dilución.

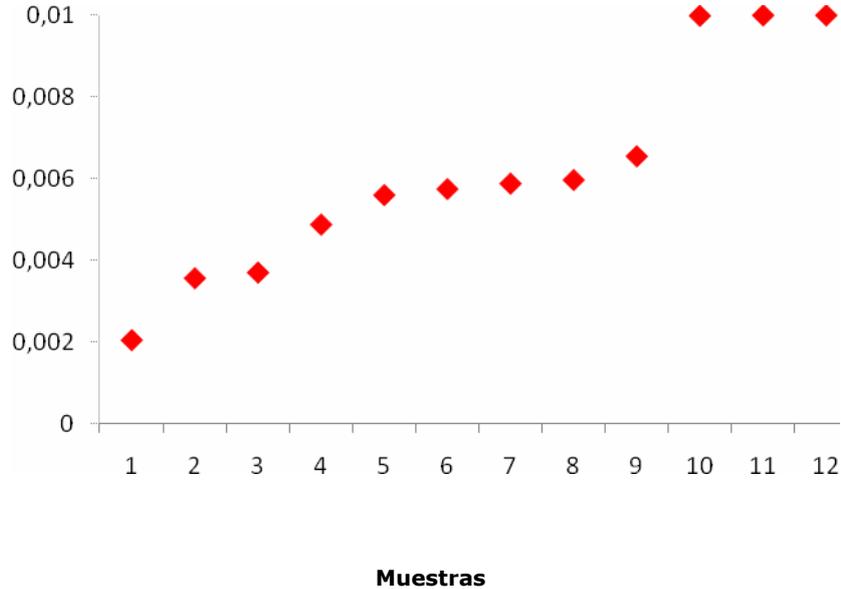
Pieza Dental	edad	sexo	Grupo sang.	Nivel de dilución (D)											
				puro	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	
53	5	M	B+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	
65	11	F	A+	±	±	+	+	++	+	±	-	-	+	-	
51	2	M	A+	±	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	
63	9	F	0+	±	±	±	±	+	-	-	-	-	-	-	
53	9	F	0+	±	+	+	++	++	+	+	++	++	++	++	
52	11	M	A+	±	+	++	+	+	++	+	++	++	++	++	
74	8	F	A+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
54	8	F	0+	-	+	+	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	
65	10	M	0+	-	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	
83	11	M	A+	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
82	11	M	A+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	
53	10	F	A+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

**Tabla 3.** Identificación, grado de adhesión eritrocitaria para cada nivel de dilución en pulpa con caries de dientes deciduos (n= 12 muestras)

La *Tabla 4* y la *Figura 3* muestran la estimación de sensibilidad del método para cada muestra procesada. En este grupo de pacientes con pulpa de dientes deciduos con caries, el parámetro de sensibilidad  $\alpha$  promedio fue de **0.00606**, con un rango que varió entre **0.00206** y **0.00999**. El valor de la mediana fue de **0.00575**.

Pieza dental	Nivel de dilución (D)												Sensibilidad $\alpha$
	puro	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024		
53	5	5	5	5	5	5	2	0	0	0	0	0	0,00488
65	2	2	5	5	8	5	2	0	0	5	0	0	0,00357
51	2	5	8	8	8	8	10	10	10	10	10	10	0,00655
63	2	2	2	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0,00206
53	2	5	5	8	8	5	5	8	8	8	8	8	0,00560
52	2	5	8	5	5	8	5	8	8	8	8	8	0,00588
74	0	0	5	10	10	10	8	10	10	10	10	10	0,00371
54	0	5	5	8	10	10	10	8	10	10	10	10	0,00597
65	0	5	5	8	8	8	8	8	8	10	10	10	0,00575
83	2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0,00999
82	0	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	0,00998
53	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0,00999

**Tabla 4.** Identificación, score de adhesión eritrocitaria para cada nivel de dilución y parámetro de sensibilidad en pulpa con caries de dientes deciduos (n= 12 muestras)



**Figura 3.** Parámetro de sensibilidad de adhesión eritrocitaria en pulpa con caries de dientes deciduos (n=12)

**Grupo III-a. Pulpa de diente supernumerario deciuo (n= 3 muestras)**

Fueron evaluadas 3 muestras de pulpa dentaria de diente supernumerario deciduos provenientes de 3 pacientes (2 masculinos y 1 femenino) cuyas edades fueron 7, 13 y 8 años, respectivamente. Los tres pacientes tuvieron grupo sanguíneo A+.

Los dientes extraídos que permitieron la obtención de muestras pulpares fueron la pieza #52 y dos piezas #53.

En la *Tabla 5* se detallan las características de las muestras analizadas así como el grado de adhesión eritrocitaria en cada una de las diluciones.

Pieza dental	EDAD	SEXO	GRUPO SANG.	Nivel de dilución (D)												
				puro	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		
52	8	F	A+	±	±	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	
53	7	M	A+	-	-	±	±	++	++	±	++	++	++	++	++	
53	13	M	A+	-	±	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	

**Tabla 5.** Identificación, grado de adhesión eritrocitaria para cada nivel de dilución en pulpa de diente supernumerario deciduos (n= 3 muestras)

En la *Tabla 6* se detallan la estimación del parámetro de sensibilidad para las 3 muestras. En este subgrupo, el parámetro de sensibilidad  $\alpha$  promedio fue de **0.00309**, con un rango que varió entre **0.00165** y **0.00424**. El valor de la mediana fue de **0.00340**.

Pieza dental	Nivel de Dilución (D)											Sensibilidad $\alpha$
	puro	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
52	2	2	5	5	5	5	2	2	2	2	2	0,00340
53	0	0	2	2	2	8	2	8	8	8	10	0,00165
53	0	2	5	8	8	8	8	8	8	8	10	0,00424

**Tabla 6.** Identificación, score de adhesión eritrocitaria para cada nivel de dilución y parámetro de sensibilidad en pulpa de diente supernumerario decíduo (n= 3 muestras)

**Grupo III-b Pulpa de diente supernumerario permanente (n= 3 muestras)**

Fueron evaluadas 3 muestras de pulpa dentaria de diente supernumerario permanentes provenientes de 3 pacientes (2 masculinos y 1 femenino) cuyas edades fueron 13, 13 y 8 años, respectivamente. Dos pacientes tuvieron grupo sanguíneo A+ y uno 0+.

Los dientes extraídos que permitieron la obtención de muestras pulpares fueron las piezas #23, #42 y #43.

En la *Tabla 7* se detallan las características de las muestras analizadas así como el grado de adhesión eritrocitaria en cada una de las diluciones.

Pieza dental	EDAD	SEXO	GRUPO SANG.	Nivel de dilución (D)										
				puro	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
42	13	M	0+	-	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
43	8	F	A+	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
23	13	M	A+	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++

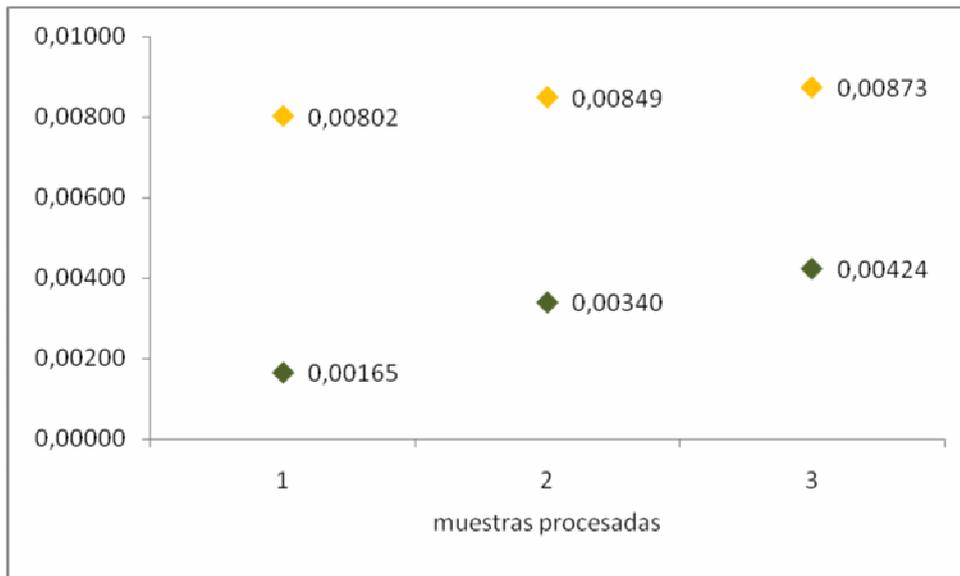
**Tabla 7.** Identificación, grado de adhesión eritrocitaria para cada nivel de dilución en pulpa de diente supernumerario permanentes (n= 3 muestras)

En la *Tabla 8* se detallan la estimación del parámetro de sensibilidad para cada muestra procesada. En este grupo de muestras de pulpa de dientes supernumerarios permanentes, el parámetro de sensibilidad  $\alpha$  promedio fue de **0.00841**, con un rango que varió entre **0.00802** y **0.00873**. El valor de la mediana fue de **0.00849**.

Pieza dental	Nivel de Dilución (D)											Sensibilidad
	Puro	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	$\alpha$
42	0	8	10	8	10	10	10	10	8	10	10	0,00874
43	0	8	8	10	10	10	10	10	10	10	8	0,00849
23	5	8	8	8	8	8	8	10	10	10	10	0,00802

**Tabla 8.** Identificación, score de adhesión eritrocitaria para cada nivel de dilución y parámetro de sensibilidad en pulpa de diente supernumerario permanente (n= 3 muestras)

En la *Figura 4* se observa la adhesión eritrocitaria en ambos grupos de dientes supernumerarios. Los resaltados en verde corresponden al parámetro de sensibilidad obtenido en las muestras de origen deciduo y los amarillos en las muestras de origen permanente.

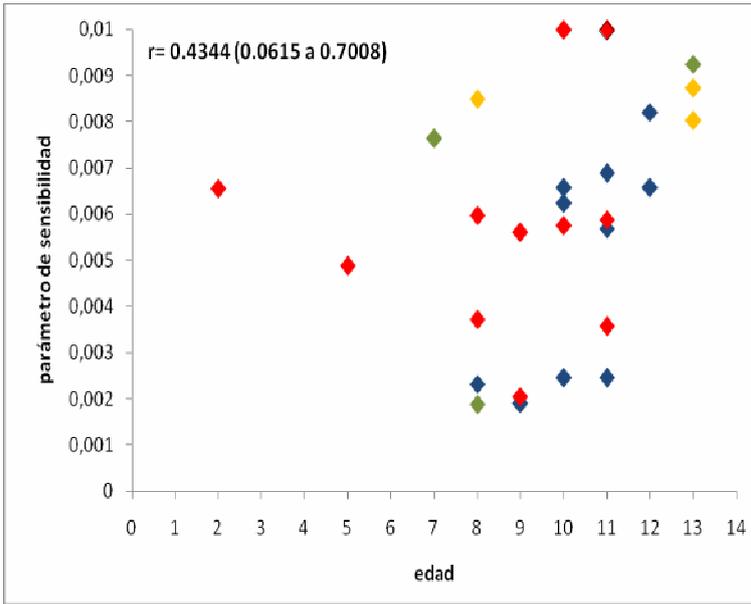


**Figura 4.** Parámetro de sensibilidad de adhesión eritrocitaria en pulpa de dientes supernumerarios deciduos (n=3) y permanentes (n=3)

### Relación de la edad en las distintas etapas involutivas del diente

La *Figura 5* muestra la influencia de la edad en las etapas involutivas del diente. La edad evidenció una relación estadísticamente significativa con la concentración de CD44 (coeficiente de Spearman: 0.4344; IC95%: 0.0615 a 0.7008).

La influencia de la edad fue más evidente en los títulos de aglutinación en la pulpa de dientes supernumerarios permanentes. En efecto, la aglutinación eritrocitaria, indicativa de la presencia de CD44, fue notablemente mayor en la pulpa de estas piezas permanentes (rombos color amarillo), que mantuvieron valores de sensibilidad entre 0.008 y 0.01, en tanto que en el resto de los pacientes con dientes deciduos (supernumerarios o no) mayoritariamente mostraron valores inferiores en los títulos de aglutinación.



En azul n=10 muestras de pulpa decidua sana.  
 En rojo n=12 muestras de pulpa decidua con caries  
 En verde n=3 muestras de pulpa supernumeraria decidua sana.  
 En amarillo n= 3 muestras de pulpa supernumeraria permanente sana

Figura 5.- Parámetro de sensibilidad de adhesión eritrocitaria en relación a la edad del paciente

**Relación del sexo en las distintas etapas involutivas del diente**

La evidencia sugirió que el sexo no influyó en las etapas involutivas del diente.

La Figura 6 muestra que el sexo no estuvo relacionado con los niveles de CD44 detectados en la pulpa de las piezas dentarias de los pacientes (coeficiente de Spearman: 0.3582; IC95%: -0.02888 a 0.6518).

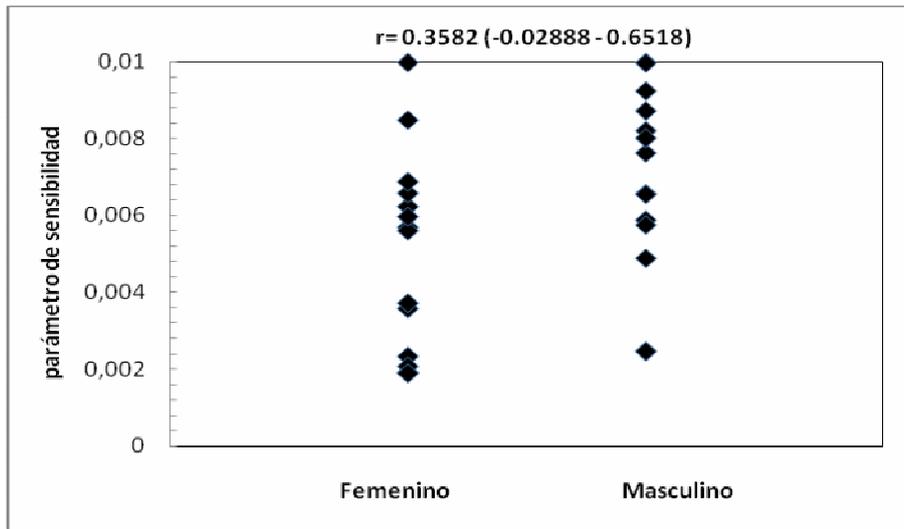
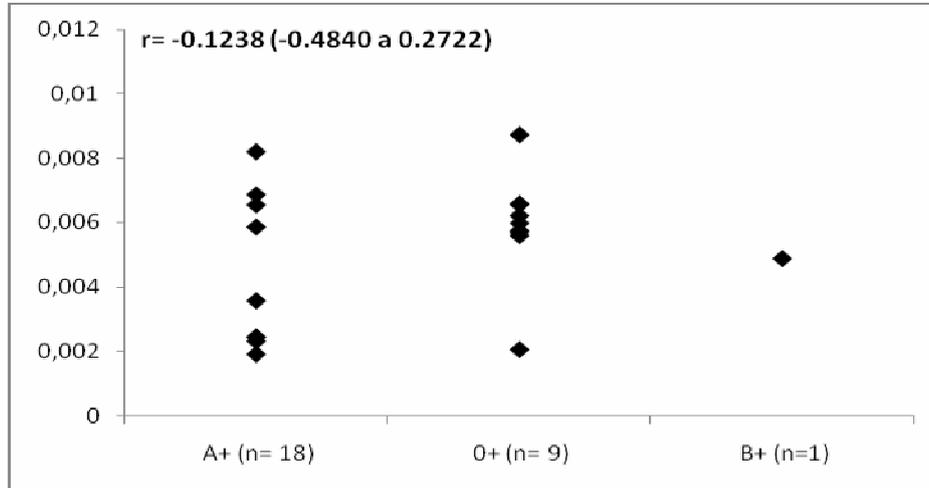


Figura 6. Parámetro de sensibilidad de adhesión eritrocitaria en relación al sexo del paciente

### Relación del grupo sanguíneo en las distintas etapas involutivas del diente

La *Figura 7* muestra que el tipo sanguíneo (grupo y factor) del paciente no tuvo influencia en la involución del diente. La evidencia mostró que el grupo y factor sanguíneo no se correlacionó con los niveles de CD44 detectados en la pulpa de las piezas dentarias de los pacientes (coeficiente de Spearman:  $-0.1238$ ; IC95%:  $-0.4840$  a  $0.2722$ ).

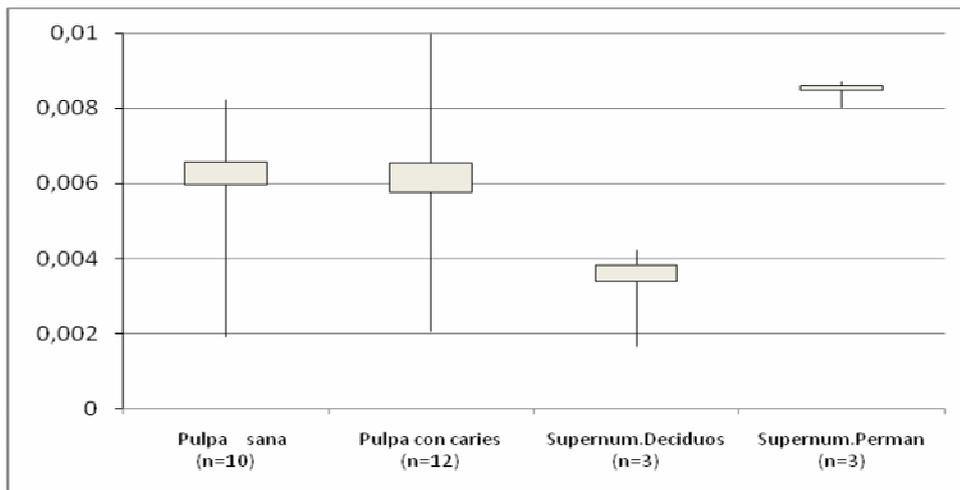


**Figura 7.**

Parámetro de sensibilidad de adhesión eritrocitaria en relación al grupo y factor sanguíneo del paciente

### Análisis comparativo de los grupos

El grado de concentración de CD44 mostró diferencias entre los grupos analizados pero con una significancia estadística *borderline* ( $P=0.0583$  de la prueba de Kruskal-Wallis) (*Figura 8*). La gran variabilidad de concentración dentro y entre los grupos evaluados demandó un análisis específico entre los grupos.



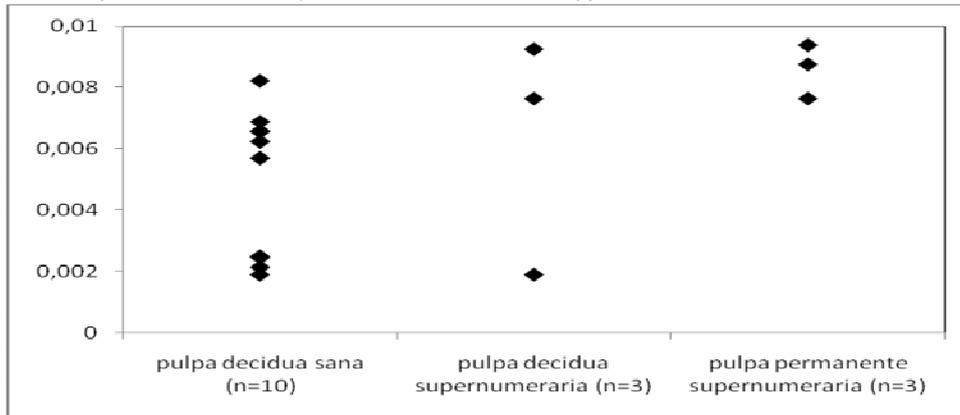
**Figura 8.** Parámetro de sensibilidad de adhesión eritrocitaria en los grupos analizados

**Pulpa diente deciduo sana vs pulpa diente deciduo con caries**

La pulpa de dientes deciduos sanos mostró similar concentración de CD44 que las muestras provenientes de dientes deciduos con caries ( $P= 0.6277$  de la prueba de Mann-Whitney).

**Pulpa diente deciduo sana vs pulpa dientes supernumerarios (Figura 9)**

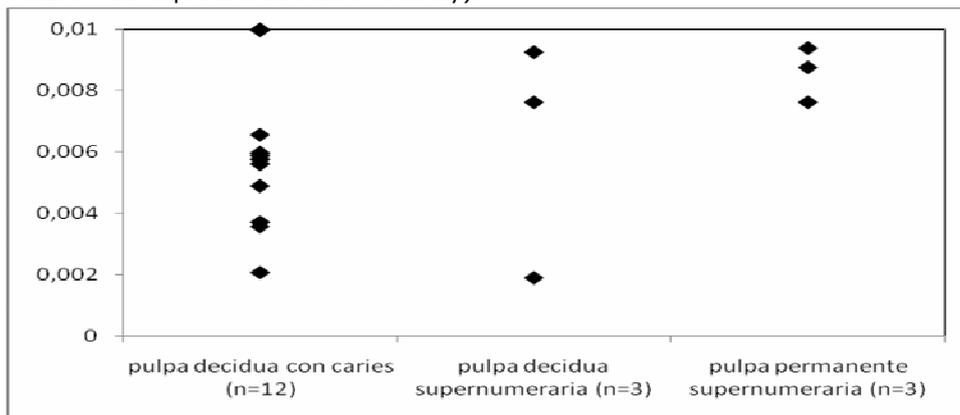
- supernumerarios deciduos:** La pulpa decidua sana mostró similar grado de aglutinación de CD44 que la pulpa de diente supernumerario deciduo ( $P= 0.2867$  de la prueba de Mann-Whitney).
- supernumerarios permanentes:** La pulpa de dientes supernumerarios permanentes mostró significativamente más concentración de CD44 que la pulpa de dientes deciduos sanos ( $P= 0.0140$  de la prueba de Mann-Whitney).



**Figura 9.-** Sensibilidad de adhesión eritrocitaria en pulpa decidua sana y pulpa de diente supernumerario

**Pulpa decidua con caries vs supernumerarios (Figura 10)**

- supernumerarios deciduos:** La pulpa decidua con caries mostró significativamente mayor grado de concentración de CD44 que la pulpa de diente supernumerario deciduo ( $P= 0.0484$  de la prueba de Mann-Whitney).
- supernumerarios permanentes:** La pulpa de dientes deciduos con caries mostraron similar concentración de CD44 que la pulpa de dientes supernumerarios permanentes ( $P= 0.2330$  de la prueba de Mann-Whitney).



**Figura 10.-** Sensibilidad de adhesión eritrocitaria en pulpa decidua con caries y pulpa de diente supernumerario

**Pulpa de dientes supernumerarios deciduos vs permanentes**

La pulpa de diente supernumerario decidua mostró significativamente menor concentración de CD44 que la hallada en pulpa proveniente de dientes supernumerarios permanentes ( $P= 0.0026$  de la prueba de Mann-Whitney).

## DISCUSION

En esta tesis se analizaron las modificaciones histoquímicas en los procesos de reabsorción radicular en las piezas dentarias de la primera dentición.

La osteoclastogénesis es el efecto de un proceso inflamatorio asentado sobre un tejido mineralizado. Esto se ha sugerido al observar, entre otras cosas, que las citoquinas pro-inflamatorias son esencialmente las mismas que las citoquinas pro-resortivas y que lo único que varía es el tipo de tejido donde la inflamación se asienta. Los procesos inflamatorios, al igual que otras funciones biológicas, requieren de la interacción de las moléculas de adhesión en la señalización de eventos a través de la membrana celular (del exterior al interior, y viceversa); se rigen con cursos de tiempo diferentes, que van desde segundos a días. El conocimiento de la regulación de la expresión de estas moléculas, su estado de activación en la superficie del diente, la distribución celular y tisular y sus posibles interacciones, son de crucial importancia en la comprensión de los mecanismos de acción involucrados en el proceso de reabsorción radicular. En el proceso de reabsorción fisiológica, el proceso inflamatorio se produce en los sitios de compresión, causado por constricción de la microvasculatura del ligamento periodontal. (Ne, Whitterspoon y Gutmann, 1999; Baer, 2001; Thomas y Speight, 2001; Butler, Brunn y Qin, 2003; Del Nero-Viera, 2005; Maillet, 2006; Abraham, 2006; Pizzi y Crowe, 2007; Bertl y cols, 2009)

La molécula de adhesión CD44 es el receptor de Hialuronato, es decir, la responsable de la adhesión de células al hialuronato. CD44 está adherida a los microfilamentos de actina, presentes en el borde de los odontoclastos. En base a la competencia entre antígenos particulados y solubles por los sitios de combinación, homologado por la reacción CD44-Hialuronato, se utilizó una reacción de inhibición de la aglutinación para estimar la sensibilidad y título del anticuerpo. La técnica de dosaje de CD44 en las muestras de lisado pulpar se realizó en dos etapas: La primera, neutralizando el CD44 con el receptor soluble (ácido hialurónico); y la segunda, midiendo la actividad del Hialuronato no neutralizado a través de su acción adherente sobre un sistema revelador (glóbulos rojos del mismo grupo y factor sanguíneo del paciente bromelinizados y suspendidos al 2% en buffer de fosfato salino). Este fenómeno de adhesión se observó macroscópicamente en distintos niveles de dilución, titulando el grado de aglutinación. (D'Arrigo y cols, 2009) Para cuantificar la concentración de CD44 se estimó un parámetro de sensibilidad ( $\alpha$ ) en base al título obtenido y al nivel de dilución (Valverde y Rasia, 1982), en muestras de tejido pulpar proveniente de dientes deciduos sanos, con caries y supernumerarios (deciduos y permanentes).

El estudio de distribución de la molécula de adhesión CD44 en el tejido pulpar dental se realizó para establecer el patrón de expresión bajo condiciones normales *in vitro* comparándolo con condiciones patológicas (procesos de caries) y fisiológicas (dientes supernumerarios). Se observó que el parámetro  $\alpha$ , como indicador de la concentración de CD44 en la pieza de tejido pulpar dentario, proveyó un óptimo sistema para estudiar las variaciones histoquímicas en el proceso de reabsorción fisiológica de los dientes deciduos.

El sexo, si bien fue registrado en la ficha del paciente y reportado en los resultados, no mostró una vinculación estadísticamente significativa con la concentración de CD44.

El grupo sanguíneo y factor de cada paciente también fue registrado y considerado en los resultados pero no mostró evidencias estadísticamente significativas de correlación con la concentración de CD44 en la pulpa dental de los diferentes grupos evaluados.

La edad de los pacientes que proveyeron las pulpas mostró una relación estadísticamente significativa con la edad. Se observó que la concentración de CD44 se incrementaba con las edades mayores, en consonancia con el aumento de la actividad resorptiva.

Algunos autores refieren que la expresión de hialuronato endotelial resulta en interacciones aumentadas CD44-adhesión dependiente; de este modo, la producción local de citoquinas en el interior del lecho vascular inflamado aumenta la expresión de hialuronato sobre las células endoteliales y por esta razón posibilita las interacciones CD44-hialuronato, y consecuentemente la extravasación de células inflamatorias, ratificado en la comparación de pulpa sana y con caries de dientes permanentes. *(apud Pistera, 2006)*

Un primer análisis realizado en esta tesis, vinculado a estos conceptos pero evaluado en dientes deciduos, demostró que el nivel de concentración de CD44 fue estadísticamente similar en las muestras de pulpa sana y con caries. Se supone que tal similitud respondió a que los pacientes de ambos grupos estaban en pleno proceso de reabsorción fisiológica; la edad promedio en el grupo de pulpa sana de dientes deciduos (10.4 años, rango 8-12 años) coincide con el período de erupción del canino y primer premolar mandibular y maxilar permanentes; la raíz de los deciduos se muestra 2/3 reabsorbida. La edad media del grupo con pulpa de piezas deciduas con caries (8.8 años, rango: 5-11 años) representa la etapa final del primer período de reemplazo de fórmula primaria por permanente; las raíces de los dientes deciduos han sido completamente reabsorbidas.

Un estudio de reciente publicación que reporta la aislación de células madres proveniente de pulpa de dientes deciduos vincula la proliferación celular a la etapa de reabsorción fisiológica en que se encuentra el diente de donde se extrajo la pulpa. Utilizaron diferentes marcadores, medidos con citometría de flujo, incluyendo CD44. Si bien el estudio se focalizó en la cinética de producción celular *in vitro*, se comprobó que la concentración de CD44 continúa siendo altamente positiva en las lecturas citométricas de los cultivos celulares. *(Bernardi y cols, 2011)*

Un segundo análisis incluyó la pulpa de dientes supernumerarios. Autores refieren que la mayoría de los pacientes con dientes primarios supernumerarios desarrollan anomalías en la dentición permanente. *(Skrinjaric y Barac-Furtinovic, 1991; Whittington y Durward, 1996; Nik-Hussein y Abdul Majid, 1996; Yonezu y cols, 1997)*

Históricamente se reservaba este fenómeno principalmente para el sexo masculino, pero estudios de incidencia que incluyeron la revisión de más de 8000 radiografías señalaron que es más frecuente en el sexo femenino. *(Kaya y cols, 2011)* Otros autores sugirieron que el patrón de ubicación de estos dientes depende del género; piezas en la región de la línea media ocurren más frecuentemente en hombres mientras que en la región incisal son más frecuentes en las mujeres. *(Kuchler y cols, 2011)* Los supernumerarios se

observan con mayor frecuencia en la dentición permanente (0.1%-3.8%); la proporción permanente primaria más aceptada es de 5 permanentes a 1 deciduo. *(García-Roco Pérez, 2010)*

Aunque la epidemiología de los dientes supernumerarios ha sido bien estudiada, la etiología genética exacta y los mecanismos moleculares que promueven este tipo de dientes no ha sido aún completamente clarificada. Sus morfologías diferentes, las regiones afectadas y el momento del desarrollo de tales dientes hacen de sostén a varias teorías acerca de esta condición. Una teoría sugiere que el supernumerario se crea como resultado de una dicotomía de la yema del diente. Otra teoría, bien sustentada en la literatura, es la teoría de hiperactividad, que sugiere que este diente está formado por hiperactividad local de la lamina dental. También se ha sugerido que son consecuencia de atavismo, una reversión a un tipo más primitivo de dentición; sin embargo, el atavismo no puede explicar la presencia de dientes supernumerarios en las regiones canina y la línea media o formas tuberculadas en cualquier región. La herencia también puede desempeñar un papel en la aparición de esta anomalía; son más comunes en los familiares de los niños afectados que en la población general. Genes mutantes también podrían explicar esta anomalía. *(Liu, 1995; Garvey, Barry y Blake, 1999; Kuchler y cols, 2011)*

Un número de modelos con ratas está actualmente permitiendo investigar la compleja genética de los dientes supernumerarios. Muchas de las secuencias de señalización molecular conocidas involucradas en el desarrollo normal del germen dentario pueden generar un diente adicional si son reguladas inapropiadamente; esto incluye factor de crecimiento fibroblástico, factor de necrosis tumoral, proteínas Wnt y proteínas osteogénicas, las cuales proveen de genes candidatos que pueden potencialmente jugar un rol en la formación de dientes supernumerarios humanos. *(Fleming y cols, 2010)*

En particular, la regulación coordinada de la actividad molecular de señalización es importante para asegurar un apropiado número dental y hay diferentes requerimientos para esta regulación en los tejidos epiteliales y mesenquimáticos a lo largo de los ejes de las mandíbulas y entre sí. En modelos de ratones se ha comprobado un número de mecanismos fundamentales que facilitan la formación de dientes supernumerarios. Un proceso clave parece ser la muerte temprana del primodio del diente vestigial presente en el embrión, obtenida a través de la supresión de la ruta de señalización del desarrollo (también denominada Shh) dentro de estos dientes tempranos. Sin embargo, la restricción de la señalización de proteínas Wnt es también importante en el control del número dentario, con transducción aumentada siendo capaz de generar múltiples brotes dentarios en el epitelio oral o dientes existentes en sí mismos, en tejidos adultos y embriogénicos. Así, la actividad descontrolada de esta secuencia puede conducir a la formación de tumores, conteniendo tejidos odontogénicos múltiples y dientes pobremente formados. La secuencia alterada a lo largo del aspecto buco-lingual de la mandíbula puede producir directamente un diente extra del epitelio oral en una fila duplicada. Juntos, todos estos hallazgos tienen relevancia para poblaciones humanas, donde los dientes supernumerarios son vistos en asociación tanto con dentición primaria como permanente. *(Cobourne y Sharpe, 2010)*

Estudios moleculares recientes con estos dientes revelaron que la señalización de la interleuquina-11 es esencial para el normal desarrollo de huesos craneofaciales y dientes, y que su función es controlar el número de éstos; estos resultados abren la posibilidad de regular la señalización de esta proteína. *(Nieminen y cols, 2011)*

No se encontraron estudios publicados que midan la actividad de la molécula CD44 en dientes supernumerarios, para poder comparar experiencias. En este estudio, la concentración de CD44 en piezas de dientes supernumerarios varió significativamente según si éstos fueran primarios o permanentes. La evidencia mostró que la pulpa dental de supernumerarios permanentes registró más del doble de concentración de CD44 que en la de supernumerarios deciduos, sugiriendo que la mayor sensibilidad registrada responde a que en este tipo de dientes permanentes no hay proceso de reabsorción activos.

La concentración de CD44 en muestras de pulpa sana de dientes supernumerarios permanentes fue significativamente mayor que la registrada en la pulpa de deciduos, con o sin caries, y aún significativamente superior a la reportada en la pulpa de dientes supernumerarios deciduos. En términos moleculares, estos hallazgos sugieren que la molécula del receptor de Hialuronato está presente de manera más considerable en pulpas dentarias donde no hay procesos de reabsorción. Esta evidencia ratifica lo publicado en la literatura que la molécula de CD44 juega un rol en la regeneración tisular. *(Laino y cols, 2006; Andreasen y Lovschall, 2010; Hirata y cols, 2010)*

En general, los tejidos humanos tienen un potencial muy limitado para regenerar. Sin embargo, los recientes avances en la investigación de células madre y en ingeniería de tejidos prometen nuevas perspectivas para la regeneración de tejidos en la práctica dental en el futuro. Las células madre han sido descubiertas en muchos tejidos adultos, incluidos los dientes, y las células madre de embriones tienen el potencial para formar todos los tejidos adultos. Con los rápidos avances en la biología molecular, falta poco tiempo para desarrollar esmalte, dentina, ligamento periodontal, hueso o incluso dientes, completamente nuevos para los pacientes en el futuro. *(Thesleff y Tummers, 2003)*

Con los estudios realizados en los últimos 20 años se pudo comenzar a entender el desarrollo dentario a nivel genético. Se han identificado genes con funciones claves en la mediación de comunicación celular, considerado el mecanismo más importante mecanismo del desarrollo embrional; esta comunicación está mediada por un importante número de moléculas con señalizaciones diferentes, que son enviadas a las cercanías de la superficie celular para el contacto con sus respectivos receptores. Conformando una red de señalización muy compleja. Combinando el conocimiento de la regulación molecular del desarrollo dental con los avances en investigaciones de células madres, el foco está puesto en las potenciales aplicaciones de la regeneración tisular en la práctica dental. *(Thesleff, 2003)*

Los avances científicos en la creación de biomateriales restaurativos, la tecnología de cultura de células in vitro, el injerto de tejido, la ingeniería de tejidos, la biología molecular y el proyecto genoma humano constituyen la base para la introducción de nuevas tecnologías en Odontología. Ya se ha demostrado que los dientes mineralizan en respuesta a una lesión, pero sólo en los últimos años se ha localizado la posición de las células madre alrededor de los vasos sanguíneos. Las células han sido identificadas como pericitos miofibroblastoides. La capacidad para controlar la diferenciación y la proliferación de estas células está siendo examinada para crear terapias celulares que puedan resolver problemas dentales más eficazmente que los actuales regímenes de tratamiento. *(Murray y García Godoy, 2004)*

En la última década, la investigación sobre las posibles aplicaciones de células madre en odontología ha hecho grandes progresos. Hay al menos cinco tipos diferentes de células del estroma mesenquimales (MSCs) multipotentes. Se ha reportado que las MSCs derivadas del tejido dental son capaces de generar complejos como el de pulpa-dentina, así como diferenciarse en células progenitoras periodontales y craneofaciales. Además de las células madre adultas, las células madre embrionarias son una fuente de células alternativas para la regeneración de tejidos dentales. Además de estas células madre comúnmente reportadas, otras células progenitoras con propiedades MSC también se encuentran en las glándulas salivales, en el músculo de la lengua, paladar y mucosa oral, y estos pueden desempeñar un papel en la recuperación de la función de los tejidos que residen. (Liu y Cao, 2010)

Las investigaciones de *Miura y cols* (2003, 2006) dieron evidencia que las células madres provenientes de dientes deciduos representan una población de células madre posnatales capaces de reproducirse y diferenciarse multipotencialmente. Los dientes deciduos pueden ser una fuente considerable de estas células, que con intervención de la ingeniería tisular, permiten reparar estructuras dañadas del diente, inducir la regeneración ósea y tratar las reconstrucciones tisulares, en ocasiones incluso de grandes dimensiones como pueden ser la de cuerpos mandibulares y condilares.

También se han aislado y caracterizado células madres provenientes de un diente supernumerario, rescatando la viabilidad de obtener este tipo de células en pulpas de piezas dentarias que generalmente son descartadas. (Huang, Chen y cols, 2008)

A partir de un nuevo paradigma en la investigación, *Huang, Snyder y cols* (2008) injertaron células madres dentales de monos rhesus sin diferenciar en el hipocampo de ratones inmunodeprimidos. Estos autores refirieron que el implante estimuló la proliferación de células neuronales endógenas y se detectaron células madres neurales preexistentes y también neuronas maduras en el sitio del injerto; también hicieron referencia a que el implante promovió la señalización de factores de crecimiento hasta un mes después del implante. Ratificaron que las células madres de la pulpa dental tienen un potencial terapéutico valioso y único, y en el caso que ellos describieron, un potencial estimulador y modulador de la respuesta a la reparación local en el sistema nervioso central; concluyeron su investigación diciendo que las células madres dentales serían una fuente preferible a otras, evitando los problemas asociados con el rechazo del implante por causas inmunológicas.

La ingeniería tisular es la ciencia de diseño y fabricación de nuevos tejidos. Los tres ingredientes claves son señales de morfogénesis, las células madre para responder a la morfogénesis y la estructura de la matriz extracelular. Caries, pulpitis y periodontitis apical aumentan los costos de la atención de la salud y la consiguiente pérdida de la productividad económica; en última instancia, resultan en una pérdida prematura y por lo tanto, disminuye la calidad de vida de los dientes. Los avances con células madre/progenitoras de pulpa dental podrían dar un impulso para regenerar el tejido dentinal sin la eliminación de toda la pulpa.

## CONCLUSIONES

CD44 es una glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular. Su principal ligando es el hialuronato, aunque también pueden estar implicados otros ligandos como la laminina, fibronectina y colágeno de tipo I y IV.

CD44 participa en la migración y motilidad celular mediante su adhesión a moléculas de la matriz extracelular. Tiene una amplia distribución tisular, especialmente en leucocitos y eritrocitos. Estudios recientes, tanto en animales de experimentación como en tumores humanos, han implicado la expresión de CD44 en la biología de diferentes tumores.

En los dientes permanentes, se ha comprobado mayor concentración en tejidos pulpares sintomáticos la expresión de esta molécula es mayor que en procesos pulpares crónicos y casi inexistente en tejidos pulpares sanos.

Con el presente trabajo se ha comprobado que la concentración de CD44 en dientes deciduos se incrementa acorde a la edad de los niños, en consonancia con el aumento de la actividad resortiva en los procesos de rizólisis en piezas dentarias de la primera dentición.

Se demostró que el nivel de concentración de CD44 fue estadísticamente similar en las muestras de pulpa decidua sana y con caries, atribuible a que las piezas dentarias de ambos grupos estaban en pleno proceso de reabsorción fisiológica (edades promedios: 10.4 y 8.8 años, respectivamente).

La concentración de CD44 en muestras de pulpa sana de dientes supernumerarios permanentes fue significativamente mayor que la registrada en la pulpa de deciduos, con o sin caries, y aún significativamente superior a la reportada en la pulpa de dientes supernumerarios deciduos. En términos moleculares, estos hallazgos sugieren que la molécula del receptor de Hialuronato está presente de manera más considerable en pulpas dentarias donde no hay procesos de reabsorción. Esta evidencia ratifica lo publicado en la literatura que la molécula de CD44 juega un rol en la regeneración tisular.

Se propone que en futuras investigaciones se utilicen técnicas de medición cuantitativas (ejemplo ELISA) para determinar la concentración de CD44.

**ANEXOS****Planilla de recolección de datos**

Iniciales del Paciente: ..... Edad: .....  
 Obra Social: ..... Grupo Sang: .....  
 Iniciales del Padre/Madre/Tutor: ..... Tel: .....  
 Domicilio: ..... Localidad: .....

**Historia Médica:**

¿Está bajo tratamiento por alguna enfermedad?  No  Sí  
 ¿Es alérgico a aspirina/penicilina/anestesia?  No  Sí  
 Cuando se lastima o extrae un diente, ¿le sangra  
 excesivamente y requiere atención para detener el sangrado?  No  Sí  
 ¿Problemas cardíacos / hepatitis / artritis / presión sanguínea alta /  
 gastritis o úlcera / cáncer / enfermedades venéreas / diabetes / VIH  
 / asma / epilepsia / sinusitis / problemas renales / drogadicción?  No  Sí

Diente extraído: ..... Rotulado como Muestra # .....

Motivo de la extracción: .....

Pulpa sana  Pulpa con carie  Diente supernumerario

### **Consentimiento informado**

Por la presente reconozco que la Dra Alicia Nannini me ha informado del tipo de tratamiento que debe efectuarse (extracción) mi hijo/a en base al diagnóstico realizado. A su pedido he manifestado todo lo que conozco respecto a la salud de mi hijo. Se me ha explicado en términos comprensibles para mí y reconozco haber entendido acabadamente la tarea propuesta. De igual manera se me ha informado de los riesgos y complicaciones que puedan surgir y, ante la posibilidad de que aparezcan consecuencias no previsibles, dada la capacidad que el conozco a la Dra antes mencionada, las aceptaré como inherentes a la tarea a realizar.

Comprendo que la concurrencia regular a las citas programadas en el consultorio, así como el uso correcto de la aparatología y el cumplimiento de las indicaciones del profesional, hacen al éxito del tratamiento de mi hijo/a y son de mi exclusiva responsabilidad.

Además autorizo al profesional citado anteriormente a proveer los servicios o tratamientos adicionales que consideren razonables, incluyendo , aunque no limitados a ellos, la administración de anestesia local, prácticas radiológicas y otros métodos diagnósticos necesarios para resolver la prestación mencionada. También se me han descrito todas las variantes de tratamiento y sus correspondientes posibilidades y riesgos, y en ejercicio del derecho de mi hijo/a, considerándome suficientemente informado/a al respecto, opto por el que se ha detallado en esta ficha, firmando de conformidad al pie de la misma.

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Por la presente autorizo a la Dra Alicia Nannini y/o asociado o JTP de su elección a realizar en mi hijo/a el tratamiento odontológico correspondiente. He conversado con el profesional sobre la naturaleza y propósito del tratamiento, sobre la posibilidad de complicaciones, riesgos, posibles métodos alternativos. Autorizo a la

Dra a proveer los servicios o tratamientos adicionales que considere razonables.

Para preservar los derechos de la intimidad del niño no se aportan los DNI ni las firmas de los adultos responsables. Dicha autorización figura en los registros de la Cátedra de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de Rosario -UNR-.

**BIBLIOGRAFIA**

- (1) Abass SK, Hartsfield Jr JK. Orthodontics and External apical root resorption. *Semin Orthod* 2007; 13: 246-256.
- (2) Abraham CM. Moléculas de adhesión. Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2006; 22(2): 1-15.
- (3) Abramovich A. Histología y embriología dentaria. (2ª ed). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 1999, pp: 1-41.
- (4) Abukawa H, Shin M, Williams BW. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 66 (5): 601-606.
- (5) Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 94-100.
- (6) Adams JC. Cell-matrix contact structures. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(3): 371-92.
- (7) Aktoren O, Tuna EB, Guven Y, Gokcay G. A study on neonatal factors and eruption time of primary teeth. *Community Dent Health* 2010; 27(1): 52-6.
- (8) Alhadlaq A, Mao J. Tissue-engineered Neogenesis of Human-shaped Mandibular Condyle from Rat Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res* 2003; 82(12): 951-956.
- (9) Andreasen JO, Lovschall H. Respuesta de los tejidos orales al trauma. En: *Texto y Atlas a color de lesiones traumáticas*. Barcelona: Amolca 2010. Cap. 2, p.62 .
- (10) Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 2004; 49(1): 29-36.
- (11) Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(3): 446-50.
- (12) Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CV, Seed B. CD44 is a principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-1313.
- (13) Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 2008; 26: 1787-1795.
- (14) Ash P, Loutit JF, Townsend KM. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature* 1980; 283: 669-670.
- (15) Atfi A, Baron R. PTH battles TGF-beta in bone. *Nat Cell Biol* 2010; 12(3): 205-7.
- (16) Aubin JE, Bonny E. Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Medscape women's health* 2000; 5(2): 5.
- (17) Avishai, Müller R, Gabet Y y cols. New approach to quantifying developmental variation in the dentition using serial microtomographic imaging. *Microsc Res Tech* 2004; 65: 263-269.
- (18) Baer PN. External resorption associated with tooth eruption. *J C Ped Dent* 2001; 25(2): 123-5.
- (19) Bajorath J. Molecular organization, structural features and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* 2000; 39: 103-111.
- (20) Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 2011; 88(2): 130-41.
- (21) Banerji S, Wright AJ, Noble M, Mahoney DJ, Campbell ID, Day AJ, Jackson DG. Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 234-239
- (22) Barbería Leache E. Erupción dentaria. Prevención y tratamiento de sus alteraciones. *Pediatr Integral* 2001; 6(3):229-240.
- (23) Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-84.
- (24) Bendall LJ, Nilsson SK, Khan NI, James A, Bonnet C, Lock RB, Papa R, Bradstock KF, Gottlieb DJ. Role of CD44 variant exon 6 in acute lymphoblastic leukaemia: association with altered bone marrow localisation and increased tumour burden. *Leukemia* 2004; 18: 1308-1311
- (25) Bernardi L, Bonato Luisi S, Fernandes R, Pires Dalberto T, Valentim L, Bogo Chies J. Medeiros Fossati A, Pranke P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod* 2011; 37: 973-979.
- (26) Bertl K, An N, Bruckmann C, Dard M, Andrukhov O, Matejka M, Rausch-Fan X. Effects of enamel matrix derivative on proliferation/viability, migration, and expression of angiogenic factor and adhesion molecules in endothelial cells in vitro. *J Periodontol* 2009; 80(10): 1622-30.
- (27) Boabaid F, Berry JE, Koh AJ, Somerman MJ, McCauley LK. The role of parathyroid hormone-related protein in the regulation of osteoclastogenesis by cementoblasts. *J Periodontol*. 2004; 75(9): 1247-54.
- (28) Bönecker M, Mantesso A, de Araújo NS, Araújo VC. Expression of proteins in the extracellular matrix of pulp tissue in human primary teeth during physiologic root resorption. *Quintessence Int*. 2009; 40(7): 553-8.
- (29) Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD44. *Immunology* 1998; 93: 139-48.
- (30) Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 interaction with Tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J Biol Chem* 2000; 275: 1829-1838
- (31) Bourguignon LY, Zhu H, Zhou B, Diedrich F, Singleton PA, Hung MC. Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during

- (32) ovarian tumor cell migration and growth. *J Biol Chem* 2001; 276: 48679–48692
- (33) Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 251–259.
- (34) Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473(2): 139–146.
- (35) Brudvik P, Rygh P. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. *Eur J Orthod* 1993; 15: 249–263.
- (36) Buchalla W, Attin T, Schulte-Mönting, Hellwig E. Fluoride uptake, retention and remineralization efficacy of a highly concentrated fluoride solution on enamel lesions in situ. *J Dent Res* 2002;81(5):329-333
- (37) Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res.* 2003; 44(Suppl 1): 171-8.
- (38) Caixeta FF, Corrêa MS. Evaluation of the dental eruption pattern and of enamel defects in the premature child. *Rev Assoc Med Bras* 2005; 51(4): 195-9.
- (39) Cobourne MT, Sharpe PT. Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(3): 314-24.
- (40) Cohen S, Burn R. *Vías de la pulpa* (8º ed). Madrid: Mosby. 2002. Cap.11, pp: 566-567.
- (41) Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.*, 2008; 34(8): 962-9.
- (42) Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 2000; 192: 4-13.
- (43) Chan J, O'Donoghue K, de la Fuente J, et al. Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells* 2005; 23: 93-102.
- (44) Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22(4): 233-41.
- (45) Chen Z, Zhuo W, Wang Y, Ao X, An J (2008) Down-regulation of layilin, a novel hyaluronan receptor, via RNA interference, inhibits invasion and lymphatic metastasis of human lung A549 cells. *Biotechnol Appl Biochem* 2008; 50: 89–96
- (46) Daley G. Missed opportunities in embryonic stem-cell research. *N Engl J Med* 2004; 351: 627.
- (47) Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding Proteins: Tying Up the Giant. *J Biol Chem* 2002; 277(7): 4585–4588
- (48) D'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1162-1171.
- (49) D'Arrigo M, Riquelme B, Valverde J, Foresto P. Análisis de la energía de adhesión intercambiada en la unión CD44-hialuronato. *e-universitas* 2009; 1(2): 305-312 [www.e-universitas.edu.ar](http://www.e-universitas.edu.ar)
- (50) Del Nero-Viera G. La resorción como proceso inflamatorio. Aproximación a la patogenia de las resorcciones dentaria y periodontal. *RCOE* 2005; 10(5-6): 545-556.
- (51) De Grendele H, Estess P, Siegelman M. Requirement for CD44 in activate T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 1997; 278: 672-5.
- (52) De Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, Cerruti H, Alonso N, Passos-Bueno MR. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg* 2008; 19(1): 204-10.
- (53) Devlin TM. *Bioquímica*, 4ª edición. 2004. Barcelona: Reverté.
- (54) Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-7.
- (55) Escobar Muñoz F. Crecimiento y Desarrollo de la dentición de la oclusión. En Bordoni, Escobar Rojas y Castillo Mercado (Eds) *Odontología Pediátrica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2010, pp: 21-46.
- (56) Felszeghy S, Hyttinen M, Tammi R, Tammi M, Módis L. Quantitative image analysis of hyaluronan expression in human tooth germs. *Eur J Oral Sc* 2000; 108(4): 320-326.
- (57) Felszeghy S, Módis L, Tammi M, Tammi R. The distribution pattern of hyaluronan receptor CD44 during human tooth development. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 939-945.
- (58) Felszeghy S, Mészár Z, Prehm P, Módis L. The expression pattern of hyaluronan syntase during human tooth development. *Arch Oral Biol* 2005 50(2):175-9.
- (59) Fleming PS, Xavier GM, DiBiase AT, Cobourne MT. Revisiting the supernumerary: the epidemiological and molecular basis of extra teeth. *Br Dent J.* 2010 ; 208(1): 25-30.
- (60) Fuks AB. Tratamiento de la pulpa par alas denticiones primaria y permanente juvenile. *Clin Odont Nort* 2000;3: 625-653.
- (61) Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 346–352.
- (62) García-Roco Pérez ON. Hiperdoncia multiple por supernumerarios. Revision del tema a proposito de un caso clinic. *Revista Electrónica de Portales Médicos* 2010. Disponible en: <http://www.portalesmedicos.com/revista/index.htm> (Consultado el 14/07/2011)
- (63) Garvey MT, Barry HJ, Blake M. Supernumerary teeth—an overview of classification, diagnosis and management. *J Can Dent Assoc* 1999; 65(11): 612-6.
- (64) Geneser Finn. *Histología* 3ª ed. Buenos Aires: Panamericana. Cap.8, pp: 198.
- (65) Gómez de Ferrari ME y Campos Muñoz, A. *Histología y embriología bucodental* 2ª Ed, 2005. Ed.Panamericana
- (66) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(25): 13625-13630.

- (67) Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-535.
- (68) Hargreaves, K y Goodis H. Seltzer and Bender's (eds) *Dental Pulp* (3ª ed). Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc. 2002; p: 13-100.
- (69) Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J Oral Sci* 2007; 49(1): 1-12.
- (70) Heinrich J, Bsoul S, Barnes J, Woodruff K, Abboud S. CSF-1, RANKL and OPG regulate osteoclastogenesis during murine tooth eruption. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 897-908.
- (71) Hirata TM, Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Ishikawa H, Nakahara T, Mitev V, Tanaka T, Haapasalo M. Expression of multiple stem cell markers in dental pulp cells cultured in serum-free media. *J Endod* 2010; 36(7): 1139-44.
- (72) Holliday LS. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2003; 82(9): 687-91.
- (73) Hollister SJ, Levy RA, Chu TM y cols. An image-based approach for designing and manufacturing craniofacial scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29(2): 67.
- (74) Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 2008; 36: 379-386.
- (75) Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(9): 571-4.
- (76) Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells* 2008; 26: 2654-2663.
- (77) Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-687.
- (78) Ikeda E, Tsuji T. Growing bioengineered teeth from single cell: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8(6): 735-744.
- (79) Ivanovsky S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis* 2006; 12: 358-363.
- (80) Jensen ED, Pham L, Billington CJ Jr, Espe K, Carlson AE, Westendorf JJ, Petryk A, Gopalakrishnan R, Mansky K. Bone morphogenic protein 2 directly enhances differentiation of murine osteoclast precursors. *J Cell Biochem* 2010; 109(4): 672-82.
- (81) Kadar k, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz G, Blazsek J, Kallo K, Szabo E, Gera I, Gerber G, Varga G. Differentiation potential of stem cells from human dental origin-promise for tissue engineering. *Journal of physiology and pharmacology* 2009; 60(7): 167-175.
- (82) Kalia S, Melsen B, Verna C. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in acute and chronic corticosteroid treatment. *Orthod Craniofac Res* 2004; 7(1): 26-34
- (83) Kaya GS, Yapici G, Omezli MM, Davi E. Non-syndromic supernumerary premolars. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16(4): 522-5.
- (84) Keeling SD, King GJ, McCoy EA, Valdez M. Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993; 103: 320-326.
- (85) Kimata, K., Honma, Y., Okayama, M., Oguri, K., Hozumi, M., Suzuki, S.. Increased synthesis of hyaluronid acid by mouse mammary carcinoma cell variants with high metastatic potential. *Cancer Res.* 1983; 43, 1347-1354.
- (86) Knudson, C.B., Knudson, W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.* 1993; 7: 1233-1241.
- (87) Koseki T, Gao Y, Okahashi N, Murase Y, Tsujisawa T, Sato T, Yamato K, Nishihara T. Role of TGF-beta family in osteoclastogenesis induced by RANKL. *Cell Signal* 2002; 14(1): 31-36.
- (88) Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349: 570-82.
- (89) Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67: 501-506.
- (90) Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res* 2004; 83(1): 27-34.
- (91) Küchler EC, da Costa AG, Costa Mde C, Vieira AR, Granjeiro JM. Supernumerary teeth vary depending on gender. *Braz Oral Res* 2011; 25(1): 76-9.
- (92) Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Naro F, Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006; 206(3): 693-701.
- (93) Lasfargues, J, Saffar SL. Inhibition of prostanoid synthesis depresses alveolar bone resorption but enhances root resorption in the rat. *Anat. Rec.* 1993; 237:458-465.
- (94) Laurent, T.C., Fraser, J.R. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992; 6: 2397-2404.
- (95) Legg JW, Lewis CA, Parsons M, Ng T, Isacke CM. A novel PKC- regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 399-407
- (96) Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biology* 2000; 19: 107-20.
- (97) Lesley J, English N, Perschl A, Gregoroff J, Hyman R. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med* 1995; 182: 431-7.
- (98) Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem* 2000; 275: 26967-26975.

- (99) Li Y, Messina C, Bendaoud M, Fine DH, Schreiner H, Tsiagbe VK. Adaptive immune response in osteoclastic bone resorption induced by orally administered *Aggregatibacter actinomycetem-comitans* in a rat model of periodontal disease. *Mol Oral Microbiol* 2010; 25(4): 275-92.
- (100) Liao SC, Chang HP. The study of root resorption of human deciduous teeth. *Histological observation by light microscope*. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* 1990; 6(2): 88-99.
- (101) Lilja E, Bjornstedt T, Lindskog S. Cellular enzyme activity associated with tissue degradation following orthodontic tooth movement in man. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 381-390.
- (102) Lindskog S, Lilja E. Fibrinogen and IgG in the hyaline zone in man after orthodontic movement. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 156-158.
- (103) Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. Comparative effects of parathyroid hormone on osteoblast and cementoblasts. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 386-389.
- (104) Liu JF. Characteristics of premaxillary supernumerary teeth: a survey of 112 cases. *ASDC J Dent Child* 1995; 62(4): 262-5.
- (105) Liu H, Cao T. Dental application potential of mesenchymal stromal cells and embryonic stem cells. *Chin J Dent Res* 2010; 13(2): 95-103.
- (106) López Moratalla N. La racionalidad terapéutica en la medicina regenerativa con células troncales embrionarias o de adulto. *Anal Real Acad Nal Farm* 2003; 69: 21-45.
- (107) Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 2002; 71: 45-52.
- (108) Llana-Puy MC, Montaña-Llorens C, Forner-Navarro L. Fibronectine levels in stimulated whole – saliva and their relationship with cariogénica oral bacteria. *International Dental Journal* 2000;50: 57-59.
- (109) Luisi SB, Barbachan JJ, Chies JA, Filho MS. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta1 and acidic fibroblast growth factor in culture. *J Endod* 2007; 33: 833-835.
- (110) Ma J, Wang Y, Yang J, et al. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. *Neurochem Int* 2007; 51: 57-65.
- (111) Maillat M. *Biología Celular* (reimpresión de 1ª ed). Barcelona: Masson. 2006 p.69.
- (112) Mander M, Neubuser A. FGF signaling is necessary for the specification of the odontogenic mesenchyme. *Dev Biol* 2001; 240: 548-59.
- (113) Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-37.
- (114) Marks S Jr, Gorski JP, Wise GE. The mechanisms and mediators of tooth eruption. *Models for developmental biologists*. *Int. J Dev Biol* 1995; 39: 223-230.
- (115) Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 2005; 11: 228-232.
- (116) Martínez JP. *Inmunología*. 1998. Buenos Aires: Pirámide. Cap.10, pp:179.
- (117) Martínez M. Diferencias topográficas y estructurales entre dientes deciduos y dientes con retención prolongada. *Univer odontológica* 1994; 13(25): 17-25.
- (118) Matthiessen ME, Garbarsch C, Engelbrecht Olsen B, Hellström S, Engström-Laurent A. Hyaluronan in human deciduous tooth germs in the bell stage. *Histochemistry and immunohistochemistry*. *Acta Anat (Basel)* 1997; 159(1): 1-7.
- (119) McCarthy TL, Ji C, Centrella M. Links among growth factors, hormones, and nuclear factors with essential roles in bone formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(4): 409-22.
- (120) Mekin M, Joffre-Romeas A, Farges J-C, Couble ML, Magloire H, Bleicher D. Effects of TGFβ-1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *J Dent Res* 2000; 79: 1689-96.
- (121) Mesa Aguado F, Aneiros Cachaza J, O'Valle Ravassa F. Estudio inmunohistoquímico del efecto antiproliferativo del ácido hialurónico sobre la mucosa gingival en pacientes con enfermedad periodontal. *IV Congreso Virtual Hispano Americano de Anatomía Patológica*. 2001. Poster E-036.
- (122) Miletich I, Sharpe PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res Part C Embryo Today* 2004; 72: 200-212.
- (123) Minuto F, Palermo C, Arvigo M, Barreca AM. The IGF system and bone. *J Endocrinol Invest* 2005; 28(8 Suppl): 8-10.
- (124) Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Advances in Protein Chemistry* 2005; 70: 437-461.
- (125) Miura M, Gronthos S, Zhao M, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Cell Biology* 2003; 100(10): 5807-5812.
- (126) Miura Y, Gao Z, Miura M, -M. Seo B, Sonoyama W, Chen W, Gronthos S, Zhang L, Shi S. Mesenchymal Stem Cell-Organized Bone Marrow Elements: An Alternative Hematopoietic Progenitor Resource. *Stem Cells* 2006; 24(11): 2428-2436.
- (127) Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 2003; 52(1): 1-7.
- (128) Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM (2001) Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2- MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *Journal of Biology Chemistry* 2001; 276: 47402-10.
- (129) Murakami S, Takayama S, Ikezawa K et al. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res* 1999; 34: 425-30.

- (130) Murray PE, Smyth TW, Hafez AA y cols. Analysis of pulpar reactions to restorative procedures. Material, pulp capping and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(6): 509-20.
- (131) Murray PE, Garcia-Godoy F. Stem cell responses in tooth regeneration. *Stem Cells Dev* 2004 Jun;13(3):255-62.
- (132) Nagano O, Murakami D, Hartmann D, De Strooper B, Saftig P, Iwatsubo T, Nakajima M, Shinohara M, Saya H (2004) Cellmatrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol* 2008; 165: 893-902
- (133) Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of TNF-Kappa B ligand: modulation fo the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Communi* 2000; 275: 768-775.
- (134) Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 2005; 31(10): 711-8.
- (135) Naor D, Nedvetski S, Walmsley M, Yayon A, Turley EA, Golan I, Caspi D, Sebban LE, Zick Y, Garin T, Karussis D, Assayag-Asherie N, Raz I, Weiss L, Slavin S, Golan I. CD44 involvement in autoimmune inflammations: the lesson to be learned from CD44-targeting by antibody or from knockout mice. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1110: 233-247
- (136) Naor D, Wallach-Dayan SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 260-267
- (137) Ne RF, Whitterspoon DE, Gutmann JL. Tooth resorption. *Quintessence Int* 1999; 30: 9-25
- (138) Nieminen P, Morgan NV, Fenwick AL, Parmanen S, Veistinen L, Mikkola ML, van der Spek PJ, Giraud A, Judd L, Arte S, Brueton LA, Wall SA, Mathijssen IM, Maher ER, Wilkie AO, Kreiborg S, Thesleff I. Inactivation of IL11 Signaling Causes Craniosynostosis, Delayed Tooth Eruption, and Supernumerary Teeth. *Am J Hum Genet.* 2011 Jul 7.
- (139) Nik-Hussein NN, Abdul Majid Z. Dental anomalies in the primary dentition: distribution and correlation with the permanent dentition. *J Clin Pediatr Dent* 1996; 21(1):15-9.
- (140) Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 2388-2398.
- (141) Ochoa M E, Aguilar G, Espinal GE. Radiographic and clinical comparison of the diagnosis of root resorption in deciduos teeth; *Rev Fac Odont Univ Ant* 2001; 12(2): 33-37.
- (142) Olsson H, Davies J, Holst K, Schröder U, Pertersson K. Dental pulp capping: effect of Emdogain gel on experimentally exposed human pulps. *International Endodontic Journal* 2005; 38: 186-194.
- (143) Oshiro T, Shibasaki Y, Martin TJ, Sasaki T. Immunolocalization of vacuolar-type H -ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFKappa B ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec* 2001; 264: 305-311.
- (144) Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin deficient mice. *Anat Rec* 2002; 266: 218-225.
- (145) Ouhitt A, Abd Elmageed ZY, Abdraboh ME, Lioe TF, Raj MH. In vivo evidence for the role of CD44s in promoting breast cancer metastasis to the liver. *Am J Pathol* 2007; 171: 2033-2039
- (146) Papaccio G, Graziano A, D´Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells and their differentiated osteoblast: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* 2006; 208: 319-325.
- (147) Pashley D y Liewehr F. Estructura y funciones del complejo dentinopulpar. En Cohen y Hargreaves (Eds). *Vías de la pulpa. II parte: La ciencia avanzada de la endodoncia.* 9º ed. Barcelona: Elsevier. 2006; Cap.12, pp: 468-522.
- (148) Pisterna GV. Estudio de la incidencia de los mecanismos de adhesión celular en los procesos inflamatorios de la pulpa. UNR (Tesis doctoral). *Electronic Journal of Endodontic Rosario Año 5 #2.* Septiembre 2006. [www.endojournal.com.ar](http://www.endojournal.com.ar)
- (149) Pizzi MA, Crowe MJ. Matrix metalloproteinases and proteoglycans in axonal regeneration. *Exp Neurol* 2007; 204(2): 496-511
- (150) Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 33-45
- (151) Protin U, Schweighoffer T, Jochum W, Hilberg F. CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets. *J Immunol* 1999; 163: 4917-4923.
- (152) Pure E, Cuff C. A crucial role of CD44 in inflammation. *Trends in Molecular Medicine* 2001; 7: 213-221.
- (153) Redlich M. The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and beta-actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2004; 39(1): 27-32.
- (154) Rilla K, Tiihonen R, Kultti A, Tammi M, Tammi R. Pericellular hyaluronan coat visualized in live cells with a fluorescent probe is scaffolded by plasma membrane protrusions. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 901-910
- (155) Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblast in hormonal control in bone resorption: a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 349.

- (156) Rodríguez-Cabello JC, Reguera J, Girotti A, Alonso M, Testera AM. Developing functionality in elastin-like polymers by increasing their molecular complexity: the power of the genetic engineering approach. *Progress in Polymer Science* 2005; 30(11): 1119-1145.
- (157) Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med* 2003; 349: 267-74.
- (158) Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Susuki K. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. *The Anatomical Record* 1996; 244:33-49.
- (159) Sahara N. Cellular events at the onset of physiological root resorption in rabbit deciduous teeth. *Anat Rec* 2001; 264: 387-396.
- (160) Sarmiento J, Clavijo E, González L, Guerrero C. Cuantificación de colagenasa en pulpa de dientes temporales y permanentes. *Rev Fed Odontol Colomb* 1994; 49(182): 33-40.
- (161) Sasaki T, Motegi N, Suzuki H, Watanabe Ch, Tadokoro K, Yanagisawa T, Higashi S. Dentin resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. *Am J Anat* 1988; 183(4): 303-315.
- (162) Sato MM, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, Tamura M. Bone morphogenetic protein-2 enhances Wnt/beta-catenin signaling-induced osteoprotegerin expression. *Genes Cells* 2009; 14(2): 141-53.
- (163) Schmidt S, Friedl P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 83-92.
- (164) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Br ahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
- (165) Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res* 2005; 84(10): 907-912.
- (166) Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, Lee JS, Shi S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis* 2008; 14: 428-434.
- (167) Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 191-199.
- (168) Singleton PA, Bourguignon LY. CD44 interaction with ankyrin and IP3 receptor in lipid rafts promotes hyaluronan-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling leading to nitric oxide production and endothelial cell adhesion and proliferation. *Exp Cell Res* 2004; 295: 102-118
- (169) Skrinjarić I, Barac-Furtinović V. Anomalies of deciduous teeth and findings in permanent dentition. *Acta Stomatol Croat* 1991; 25(3): 151-6.
- (170) Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by BMP7 in vitro. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 173-7.
- (171) Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 425-37.
- (172) Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res* 2002; 36: 223-32.
- (173) Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *Dent Educ* 2003; 67(6): 678-89.
- (174) Sodek J. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000; 24: 99-126.
- (175) Sonoyama W, Lou Y, Yamaza T, Tuan RS, Fang D, Wang S, Shi S, Wang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008; 34: 166-171.
- (176) Stoop R, Gal I, Glant TT, McNeish JD, Mikecz K. Trafficking of CD44 deficient murine lymphocytes under normal and inflammatory conditions. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2532-42.
- (177) Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol* 2007; 8: 215
- (178) Tammi R, Tammi M, Häkkinen L, Larjava H. Histochemical localization of hyaluronate in human oral epithelium using a specific hyaluronate-binding probe. *Arch Oral Biol* 1990; 35(3): 219-224.
- (179) Tang X, Meng H. Osteogenic induction and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> oppositely regulate the proliferation and expression of RANKL and the vitamin D receptor of human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 2009; 54(7): 625-33.
- (180) Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M, Abe M, Takagi Y, Morita I. Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 917-923.
- (181) Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclast: review. *Science* 2000; 289: 1504-8.
- (182) Teitelbaum S. Rous-Whipple Award Lecture. Osteoclasts: What do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 2007; 170(2): 427-435
- (183) Thesleff I. Regulation of organogenesis: Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int. J. Dev. Biol* 1995; 39: 35-50.
- (184) Thesleff I. Genetic basis of tooth development and dental defects. *Acta Odont Scand* 2000; 58(5): 191-194.
- (185) Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintess Int* 2003; 34: 613-20.
- (186) Thesleff I, Tummers M. Stem cells and tissue engineering: prospects for regenerating tissues in dental practice. *Med Princ Pract* 2003; 12 Suppl 1: 43-50.
- (187) Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defect. *Am J Med Gene (Part A)* 2006; 140: 2530 -5.

- (188) Thomas GI, Speight PM. Cell adhesion molecules and oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 479.
- (189) Toyosawa S. mRNA expression and protein localization of dentin matrix protein-1 during dental root formation. *Bone* 2004; 34: 124-33.
- (190) Tucker A, Headon DJ, Schneider P, et al. Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 2000; 127(21): 4691-700.
- (191) Tzaifas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000; 28: 77-92.
- (192) Vainio S y Jalkanen M. Syndecan and tenascin expression is induced by epithelial-mesenchymal interactions in embryonic tooth mesenchyme. *Cell Biol* 1989;108(5):1945-53.
- (193) Valverde de Rasia JR, Rasia RJ. Soluciones de baja fuerza iónica en las pruebas de Coombs para la detección de anticuerpos anti-Rh. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 1982; 16(2): 297-305.
- (194) Vandevska-Radunovic V, Kvinnsland IH, Kvinnsland S, Jonsson R. Immunocompetent cells in rat periodontal ligament and their recruitment incident to experimental orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 36-44.
- (195) Vandevska-Radunovic V, Kvinnsland IH, Kvinnsland S, Jonsson R. Immunocompetent cells in rat periodontal ligament and their recruitment incident to experimental orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 36-44.
- (196) Von Andrian UH, Mackay CR. Advances in Immunology: T cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000; 343: 1020-34.
- (197) Wang SJ, Wong G, Heer AM de, Xia W, Bourguignon LY. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope* 2009; 119: 1518-1530
- (198) Wang Z, McCauley LK. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis* 2010 Jul 23th 16(4).
- (199) Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod* 2007; 33: 703-708.
- (200) Whittington BR, Durward CS. Review Survey of anomalies in primary teeth and their correlation with the permanent dentition. *N Z Dent J* 1996; 92(407): 4-8.
- (201) Widera D, Grimm WD, Moebius JM, et al. Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 447-460
- (202) Wilmut I. Human cells from cloned embryos in research and therapy. *BMJ* 2004; 328: 415-416
- (203) Wolny PM, Banerji S, Gounou C, Brisson AR, Day AJ, Jackson DG, Richter RP. Analysis of CD44-hyaluronan interactions in an artificial membrane system. Insights into the distinct binding properties of high and low molecular weight hyaluronan. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 30170-30180.
- (204) Xing L, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunol Rev* 2005; 208: 19-29.
- (205) Xu LX, Ohsaki Y, Nagata K, Kiirisu K. Immunohistochemical studies on the distribution and age-related changes of types I and III Collagen in the oral mucosa of mice. *J Dent Res* 1993; 72(9): 1336-1343.
- (206) Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Sugito T, Yoshimi R, Nagasaka T, Ueda M. A Feasibility of Useful Cell-Based Therapy By Bone Regeneration With Deciduous Tooth Stem Cells, Dental Pulp Stem Cells, Or Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Study Using Tissue Engineering Technology. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(6): 1891-1900.
- (207) Yamaguchi M, Ozawa Y, Nogimura A, Aihara N, Kojima T, Hirayama Y y cols. Cathepsins B and L increased during response of periodontal ligament cells to mechanical stress in vitro. *Connect Tissue Res* 2004; 45: 181-189.
- (208) Yamashiro T. Expression of bone morphogenetic proteins and Msx genes during root formation. *Dent Research* 2003; 82(3): 172-6.
- (209) Yamazaki h, Tsuneto M, Yoshino M, Yamamura K, Hayashi S. Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells* 2007; 25(1): 78-87.
- (210) Yildirim S, Yapar M, Sermet U, Sener K, Kubar A. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105: 113-120.
- (211) Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-548.
- (212) Yonezu T, Hayashi Y, Sasaki J, Machida Y. Prevalence of congenital dental anomalies of the deciduous dentition in Japanese children. *Bull Tokyo Dent Coll* 1997; 38(1):27-32.
- (213) Zhang L, Underhill CB, Chen L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behaviour. *Cancer Res* 1995; 55: 428-33
- (214) Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A, Wu GD. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells* 2006; 24: 928-935
- (215) Zimmerman E, Geiger B, Addadi L. Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J* 2002; 82: 1848-1857.