



DENTINA REACCIONAL DURANTE LA PROGRESIÓN DE CARIES EN DIENTES HUMANOS

Trabajo de Investigación

Requisito para optar al

Título de Cirujano Dentista

Alumnas: Bárbara Castillo Vargas

Natalia Cortés Campos

Docente Guía: Dr. Eduardo Couve Montané

Cátedra de Biología Celular

Valparaíso - Chile

2013



DENTINA REACCIONAL DURANTE LA PROGRESIÓN DE CARIES EN DIENTES HUMANOS

Trabajo de Investigación

Requisito para optar al

Título de Cirujano Dentista

Alumnas: Bárbara Castillo Vargas

Natalia Cortés Campos

Docente Guía: Dr. Eduardo Couve Montané

Cátedra de Biología Celular

Valparaíso – Chile

2013

AGRADECIMIENTOS

Esta carrera la elegí desde que era niña, y sin la ayuda de Dios y de mi familia no hubiese podido llevarla a cabo, es por esto que quiero agradecer de forma muy especial

A mi madre, que con su esfuerzo pude entrar a estudiar lo que quería, que cada gota de lágrima que derramó y angustias por las que pasó por no tenerme cerca no fueron en vano, hoy en día soy una mujer feliz, orgullosa de mi profesión y de lo que soy.

A mis abuelos, por su constante preocupación de que estuviera bien. Sé que cada noche se arrodillaban por mí, pidiendo a Dios que me cuidara por estar sola, tan lejos de ustedes y de mi familia.

A mis hermanas, tía y primo, por su ayuda y constante preocupación, pilares para mis abuelos y madre. A Alondra, mi hermana, que fue mi paciente durante varios años y también colaboradora en mi Tesis.

A mi padre, que me ayudó durante mi estadía en Viña del Mar, por sus comidas de domingo, y por su preocupación.

A mis amigos y familiares, que colaboraron con nuestra tesis, proporcionándonos lo que necesitábamos para llevarla a cabo.

A Rodrigo Osorio, por su simpatía y buena disposición, ayudándonos en todo lo que es el procesamiento de muestras.

Al Departamento de Biología y Ciencias Ambientales, Laboratorio de Microscopía Electrónica Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, que nos facilitó sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

Y por último pero no por eso menos importante, a mi Profesor guía, Eduardo Couve Montané, que con su ayuda, entusiasmo, dedicación y colaboración nos demostró que la biología celular es realmente sorprendente. En mi paso por la universidad fueron pocos los docentes que realmente motivaban o vibraban al hablar de lo que ellos sabían llegando a entusiasmar a sus alumnos con algo determinado, y usted Doc, fue uno de ellos, por no decir el único. Y gracias a ello nos permitió llevar a cabo un excelente proyecto de Tesis.

A todos ellos gracias
Bárbara Castillo Vargas

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo he culminado una etapa muy importante de mi vida, por lo que me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que son su ayuda han colaborado en la realización de ésta tesis, en especial al Dr. Eduardo Couve Montané, profesor guía de esta investigación, que nos orientó, apoyó y supervisó en la realización de la misma; pero sobre todo por su motivación, con la cual fue capaz de mostrarnos un aspecto de la biología celular realmente interesante y poco conocida por nosotras.

También me gustaría agradecer a Rodrigo Osorio, por la ayuda y buena disposición en enseñarnos el procesamiento de muestras o en aclarar dudas cuando se nos presentaban.

Al Departamento de Biología y Ciencias Ambientales, Laboratorio de Microscopía Electrónica Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, que nos facilitó sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

También me gustaría agradecer a mi familia, especialmente a mi mamá, que ha sido incondicional en todo este proceso, siendo mi pilar fundamental tanto académicamente como en el día a día.

Y por último, pero no menos importante a mis amigos, por su colaboración y apoyo en ésta última etapa de mi carrera.

A todos ellos, muchas gracias
Natalia Cortés Campos

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
1. Complejo Dentino-Pulpar (CDP)	3
1.1 Función dentinogénica del odontoblasto	6
1.2 Inervación de la pulpa dental y sensibilidad dentinaria	8
1.3 Mecanismos de defensa del CDP	11
2. Caries Dental y Complejo Dentino-Pulpar	13
2.1 Lesiones de progresión lenta	14
2.2 Lesiones de progresión rápida	14
2.3 Caries Dental y Dentinogénesis terciaria	15
2.4 Dentina Reaccional e Inmuno-defensa a la progresión de patógenos	16
PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS/OBJETIVOS	21
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Tipo de estudio	22
Universo	22
Criterios de inclusión/exclusión	22
Muestra (tamaño y forma de selección)	23
Unidad de estudio	23
Definición de variables a evaluar	23
Forma de recolección de información	24
- Microscopía Óptica y Confocal	26
Limitaciones del estudio	26
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	37
SUGERENCIAS	38

	PÁGINA
RESUMEN	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	

La historia de la odontología se remonta a la antigua Mesopotamia (3500 A. C.) en donde se creía que el “gusano dentario” era el causal de la destrucción y dolor de los dientes. Así mismo, todas las enfermedades se consideraban como una maldición del organismo, y los tratamientos consistían en exorcismos y prácticas mágicas en donde se invocaba a los dioses para sanar el dolor que los aquejaba.

La creencia de que el “gusano dentario” era el causal de la caries dental estuvo vigente hasta el siglo XVIII, hasta que Pierre Fauchard en 1728 publica su obra maestra llamada “El cirujano dentista o tratado sobre los dientes”. Fauchard trató la anatomía y morfología dental, además de las anomalías de los dientes; escribió sobre la caries dental, sus causas y el modo de prevenirlas; y lo más importante, es que rechazó la teoría del “gusano dentario”, ya que creía que la caries era el resultado de un desequilibrio humoral.

Posteriormente, hacia finales del siglo XIX (1882), W. Miller propuso la “Teoría acidogénica de la caries”, en donde la caries dental es el resultado de la actividad de microorganismos capaces de producir ácidos a partir de los carbohidratos de la dieta, los que producen la descalcificación y disolución del esmalte y de la dentina. Esta teoría estuvo vigente durante muchos años, hasta que en 1960 P. Keyes, propone la “Triada de Keyes” donde se establece que la caries es una enfermedad multifactorial; determinada principalmente por los microorganismos cariogénicos, el hospedero susceptible y el sustrato adecuado, todo esto sujeto a un determinado tiempo (Keyes, 1960). A pesar de que la “Triada de Keyes” fue aceptada por un largo periodo, actualmente la “Teoría Ecológica de la Caries Dental” propuesta en 1994 por Marsh es la que se encuentra vigente. Esta teoría establece que la caries dental es el resultado de un desequilibrio que ocurre en la microflora normal debido a un factor desencadenante (estrés), en donde las bacterias que la conforman, principalmente bacterias Gram-Positivas comienzan a secretar ácidos, bajando el PH de la cavidad oral y así proporcionan un ambiente adecuado para la colonización de bacterias Gram-Negativas anaerobias (Marsh, 1994).

A pesar de que conocemos las causas que originan la caries dental, hasta el día de hoy es una de las enfermedades con mayor prevalencia e incidencia en el mundo entero, siendo la tercera enfermedad después del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares según la clasificación de la OMS. En Chile, cerca del 98% - 100% de los adultos poseen caries (Gamonal et al., 1998) (Badenier and cols. 2007). Es por esta alta prevalencia que es de suma importancia comprender los procesos biológicos que atraviesa el diente durante la progresión de la caries. Así mismo, en las últimas décadas ha incrementado la expectativa de vida de las

personas, excediendo incluso los 80 años en países desarrollados, lo que lleva a que exista una necesidad de preservar la salud, incluyendo la salud oral que es una parte importante en la vida de las personas y que a menudo se deja de lado (Tsakos, 2011).

Se sabe que las bacterias que invaden la dentina, generan respuestas defensivas a nivel de la capa odontoblástica, en donde los odontoblastos, células dendríticas y macrófagos reconocen estos antígenos a través de receptores tipo Toll y desencadenan la respuesta inmune. Esta respuesta se caracteriza por la secreción de dentina reaccional, la que es producida cuando existen noxas de estímulos moderados (Smith et al., 1995).

El odontoblasto cuando se enfrenta a estímulos externos se reactiva, experimentando diversos cambios tanto en función como en actividad y estos cambios podrían estar asociados con variaciones ultraestructurales; pero esta información hasta ahora es insuficiente. La observación de esto se ve obstaculizada por la inexistencia de información cronológica sobre los cambios en los tejidos durante la lesión y, en consecuencia, a menudo no es fácil de identificar si odontoblastos reaccionales o células reparativas tipo-odontoblastos están siendo estudiadas (Goldberg and Smith, 2004).

Dentro de los tipos de dentina que produce el odontoblasto en respuesta a los estímulos nocivos del medio externo, nuestro interés se centra en la dentina terciaria, específicamente reaccional, y los cambios que experimenta el odontoblasto en respuesta a la progresión de la caries en dientes permanentes; considerando que la dentina reaccional constituye un mecanismo inmuno-defensivo fundamental contra patógenos.

De acuerdo a la búsqueda de información, nos hemos dado cuenta que a pesar de que la caries dental es una de las enfermedades de mayor prevalencia en el mundo, el conocimiento de las reacciones fisiológicas y fisiopatológicas que enfrenta el Complejo Dentino-Pulpar frente a la caries aún es poco comprendido. Por estas razones es que consideramos que el estudio del Complejo Dentino-Pulpar es de gran importancia, ya que nos ayudaría a comprender el por qué el diente puede reaccionar de distintas maneras frente noxas como por ejemplo una caries dental; y así mismo quizás en un futuro próximo implementar mejores tratamientos y materiales que sean más compatibles con la vitalidad del Complejo Dentino-Pulpar.

1. Complejo Dentino-Pulpar (CDP)

La pulpa dental se origina a partir de las células ectomesenquimáticas de la papila dental, células derivadas de la cresta neural durante el desarrollo temprano craneo-facial. La organización periférica de la pulpa dental en un diente maduro se corresponde con el Complejo Dentino-Pulpar (CDP). El CDP es la unidad funcional de la pulpa dental y a través de sus componentes la pulpa es capaz de desarrollar una actividad dentinogénica, sensorial y defensiva. La función fisiológica y fisiopatológica que afecte a esta unidad (CDP) compromete respuestas reparativas y de mantención con el propósito de conservar la vitalidad dental (Mjor, 2001)

En la disposición de los componentes estructurales del CDP, podemos observar cinco zonas diferentes: la interfase preentina/dentina, la capa odontoblástica, la zona acelular de Weil, la capa sub-odontoblástica y la zona central de la pulpa o tejido pulpar propiamente tal (Fig. 1A).

El CDP está conformado fundamentalmente por odontoblastos, células dentinogénicas que forman una empalizada pseudoestratificada en la interfase de preentina y pulpa periférica (Couve and Schmachtenberg, 2011). Los odontoblastos proyectan sus prolongaciones, llamados procesos odontoblásticos que se alojan en los túbulos dentinarios (Fig. 1B).

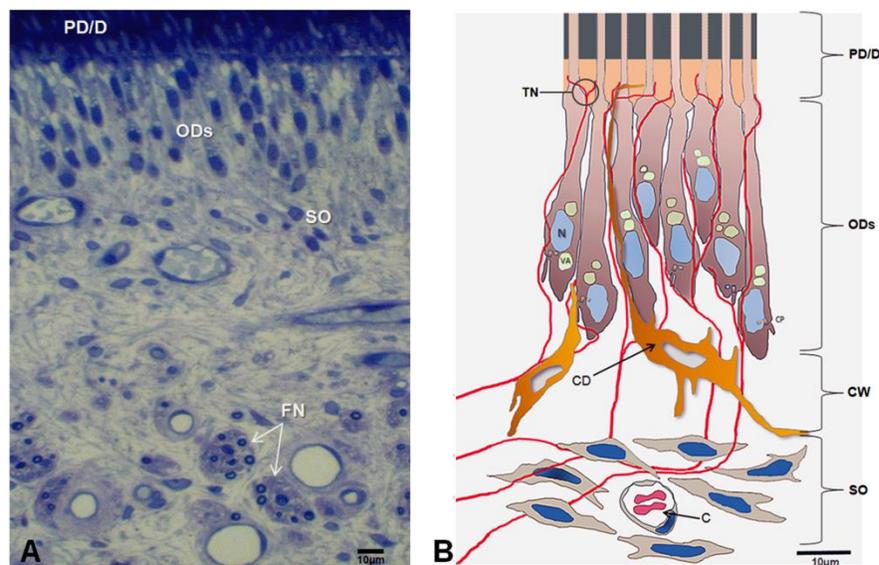


Figura 1 Complejo Dentino-Pulpar (CDP). **A.** Microfotografía óptica del CDP de un diente permanente sano (individuo joven). **B.** Representación esquemática del CDP. La capa odontoblástica (ODs) da soporte a una extensa red de terminales nerviosos amielínicos (TN) que conforman parte del

Plexo de Raschkow. Células dendríticas inmaduras (CD) proyectan procesos hacia la interfase predentina-dentina (PD/D). A nivel de la capa sub-odontoblástica (SO) es posible encontrar capilares (C) integrados a la red microvascular que da nutrición a los elementos celulares del complejo. (CP, cilio primario; FN, fascículos nerviosos del Plexo de Raschkow; N, núcleo; VA, vacuola autofágica; CW, capa acelular de Weil).

La densidad celular dentro de la empalizada odontoblástica varía, pudiendo llegar a 45.000 células por mm^2 . El cuerpo celular del odontoblasto presenta una extensión de aproximadamente 50 μm de alto dependiendo del estado de actividad dentinogénica y un diámetro de unos 5 μm en promedio. El núcleo se encuentra polarizado hacia la pulpa dental, y los organelos ubicados en el citoplasma como el retículo endoplasmático rugoso (RER), el complejo de Golgi y las mitocondrias se encuentran más hacia dirección dentinaria (Arana-Chavez and Massa, 2004). La actividad de los odontoblastos se refleja en el número y tipo de organelos presentes en su citoplasma, por lo que estas células presentan todas las características de los organelos asociados a síntesis de proteínas, colágeno principalmente, y producción de proteoglicanos (sustancia fundamental), sin embargo el número y tipo de organelo varía dependiendo de la actividad secretora. Una abundancia de RER, un bien desarrollado complejo de Golgi, ribosomas dispersos, mitocondrias, vesículas y vacuolas son características de estructuras asociadas a la síntesis de proteínas. También se pueden observar microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (Mjor et al., 2001).

En cuanto al proceso odontoblástico podemos decir que es un estrechamiento del citoplasma celular, el que penetra en la dentina mineralizada, relleno el lumen de los túbulos dentinarios. Este proceso odontoblástico está compuesto por el tronco principal, con un diámetro de 0,5 a 1 μm , y finas ramas laterales de 0.1 a 0.2 μm . La extensión del proceso odontoblástico dentro de los túbulos dentinarios corresponde a 0,7 μm , por lo que la profundidad de penetración es limitada. El proceso odontoblástico carece de la mayor parte de los organelos que se encuentran en el cuerpo celular. Su ultraestructura está caracterizada por microtúbulos y filamentos aunque ocasionalmente se pueden encontrar estructuras tales como mitocondrias y ribosomas en condiciones normales. El proceso odontoblástico en la región de la predentina exhibe características que reflejan la transición desde célula a proceso odontoblástico (Arana-Chavez and Massa, 2004).

Podemos describir al odontoblasto como una célula secretora, de origen post-mitótico que posee en su estructura celular cilios primarios. Estos cilios primarios son los responsables de detectar las señales tróficas provenientes del medio ambiente para que la diferenciación celular del odontoblasto se lleve a cabo. El odontoblasto comienza con la secreción de proteínas de la predentina antes de que ocurra la secreción de matriz de esmalte por los ameloblastos. Así, podemos encontrar que el ciclo de vida del odontoblasto pasa por varios cambios morfológicos dependiendo de

la etapa en que se encuentre a lo largo de su existencia. Couve describe cuatro etapas morfológicas por las que pasa un odontoblasto. La primera etapa corresponde a la célula pre-odontoblástica, la cual se caracteriza por ser de tamaño corto (aproximadamente 15µm) y de forma cilíndrica, en la que la polarización de los organelos celulares están principalmente limitados al núcleo, ésta forma celular está estrechamente asociada con el epitelio dental interno y la membrana basal. La segunda etapa corresponde al odontoblasto secretor, éste aumenta su tamaño intracelular con numerosos organelos, los cuales se encuentran altamente polarizados. Los odontoblastos transitorios corresponderían a la tercera etapa, en donde estas células reducen su actividad secretora, se vuelven más estrechas y sus organelos tienen un menor nivel de polarización. Aparecen en esta etapa las vacuolas autofágicas, las que muy probablemente serían las responsables de la degradación de los componentes intracelulares. Finalmente nos encontramos con los odontoblastos viejos, que se caracterizan por poseer un núcleo centralizado, menor número de organelos y por contener grandes vacuolas. Estos odontoblastos viejos al igual que su retículo endoplasmático, complejo de Golgi y mitocondrias disminuyen en tamaño y polarización (Couve, 1986). Cilios primarios están presentes en todas las etapas (Fig. 2).

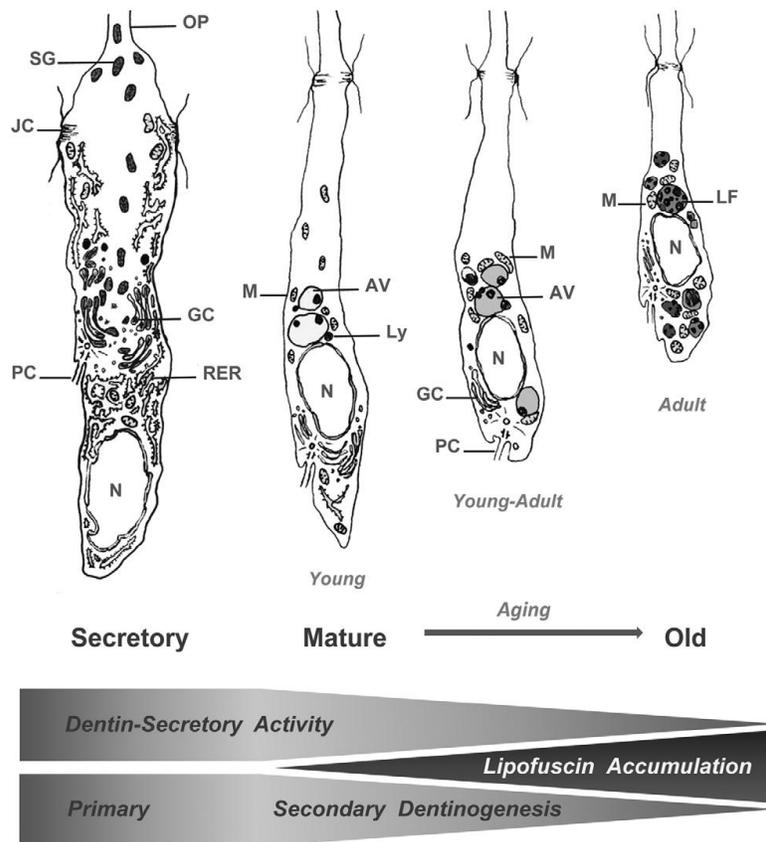


Figura 2 Esquema representativo del ciclo de vida del odontoblasto humano. Durante el desarrollo dentario, odontoblastos secretores son las células formadores de dentina primaria. Después de la erupción dentaria, en la pulpa dental coronal los odontoblastos reducen su actividad secretora y adquieren un estado de madurez caracterizado por la presencia de vacuolas autofágicas (AV). El progreso de envejecimiento de odontoblastos maduros implica la acumulación de depósitos de lipofuscina (LF). Tres grupos de edades individuales se indican en cursiva debajo de sus correspondientes condiciones de odontoblasto. Complejo de Golgi (GC); complejos de unión (JC); lisosomas (Ly); mitocondrias (M); núcleo (N); proceso odontoblástico (OP); cilio primario (CP); retículo endoplasmático rugoso (RER); gránulos secretores (SG). Extraído de (Couve et al., 2013).

A nivel del CDP se desarrollan las funciones fundamentales de la pulpa dental, tal como la nutrición de la capa odontoblástica y las funciones sensitivas y defensivas. El CDP constituye la primera barrera de defensa de la pulpa dental, protegida por una gruesa capa de dentina, la que se incrementa por la deposición de dentina secundaria o terciaria, ya sea en procesos fisiológicos o fisiopatológicos.

1.1 Función dentinogénica del odontoblasto

La función principal del odontoblasto durante la dentinogénesis es la síntesis y secreción de dentina, y posteriormente la mineralización de la matriz. En este punto, se ha llegado a la sugerencia de que existen dos sitios de secreción en el odontoblasto, el primero a nivel del cuerpo celular en el que se produce predentina y el segundo en el frente de mineralización que da la altura de la dentina peritubular (Linde, 1989). Esta hipótesis ayuda a explicar muchas de las diferencias en la composición dentro de la matriz dentinaria. Además, estudios electrofisiológicos recientes realizados por Ikeda y Suda, demostraron que los odontoblastos coronales de dientes permanentes jóvenes están acoplados eléctricamente entre sí a través de gap junctions, formando una empalizada, lo que sugiere que existe una coordinación de la función celular entre estas células, sobre todo en relación a la secreción de dentina (Ikeda and Suda, 2013).

En la dentinogénesis podemos observar tres grandes etapas de secreción:

1.1.1 Secreción de dentina primaria

1.1.2 Secreción de dentina secundaria o fisiológica

1.1.3 Secreción de dentina terciaria (reaccional y/o reparativa)

1.1.1 Secreción de dentina primaria: la diferenciación de pre-odontoblasto a odontoblasto secretor se caracteriza por iniciar la formación de dentina del manto. La aposición y mineralización de la dentina del manto, corresponde a los primeros 50-100µm de dentina adyacente al límite amelo-dentinario. En las raíces se observa una

capa superficial similar, denominada capa granular de Tomes (Linde and Goldberg, 1993). La transición entre la dentina del manto y la dentina primaria circumpulpar es imperceptible clínicamente. Toda la dentina primaria tiene un carácter tubular (ortodentina). La dentina primaria se puede dividir en dentina intertubular y peritubular, la primera es el producto principal de secreción de los odontoblastos durante la dentinogénesis, constituyendo el mayor volumen de dentina primaria; mientras que la dentina peritubular que se encuentra en la periferia de los túbulos dentales forma una capa menos voluminosa de tejido mineralizado.

1.1.2 Secreción de dentina secundaria o fisiológica: se establece después de la finalización de la formación de las raíces y se produce a una velocidad mucho más lenta a lo largo de la vida (Baume, 1980). Ésta posee una estructura similar a la dentina primaria. Estudios demuestran que la tasa de secreción de dentina primaria es aproximadamente de $4\mu\text{m}/\text{día}$; en cambio durante la secreción de la dentina secundaria los odontoblastos reducen drásticamente su función, disminuyendo aproximadamente 10 veces la cantidad de dentina que secretan (Schour I. and Hoffman M., 1939).

1.2.3 Secreción de dentina terciaria (reaccional y/o reparativa): es secretada en respuesta a variados estímulos externos, tales como irritantes químicos, caries, restauraciones, atrición u otros como trauma. La formación de dentina terciaria puede llevarse a cabo durante toda la vida del diente. Esta dentina terciaria puede ser reaccional o reparativa, dependiendo de qué células están a cargo de su secreción (Smith et al., 1995). Esto será revisado extensamente en el punto 1.3 (Mecanismos de defensa del CDP).

Antes de la mineralización de la dentina en cualquiera de sus etapas, es necesario que el odontoblasto secrete la preentina, la que se encuentra entre el tejido mineralizado y el tejido conectivo laxo sobre la pulpa dental. La capa de preentina se compone principalmente de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Esta capa mide alrededor de 10 a $30\mu\text{m}$ de ancho, y la matriz orgánica es reorganizada antes de su posterior mineralización. Los componentes de la matriz orgánica se producen en los cuerpos celulares, pero pueden ser secretados a través de exocitosis ya sea por el cuerpo celular o por los procesos odontoblásticos. Durante el proceso de la agregación de la molécula de colágeno inicial en la preentina por parte de los odontoblastos, la matriz extracelular es modificada antes de su mineralización, adicionando iones minerales y otros componentes relacionados con el frente de mineralización (Leo Tjäderhane and Haapasalo, 2012).

Para que los odontoblastos puedan llevar a cabo la mineralización de la matriz de colágeno deben ocurrir varios eventos simultáneamente (Boskey, 2003):

- * Síntesis de moléculas de matriz extracelular, incluyendo colágeno tipo I y proteínas no colágenas.
- * Acumulación de iones minerales.
- * Modificación de la matriz para permitir mineralización precisa y controlada.
- * Deposición inicial de cristales minerales.
- * Crecimiento regulado y acumulación de hidroxiapatita; todo esto tal vez acompañado por la remodelación adicional de la matriz.

La tasa de formación de la dentina es dependiente de la edad, de la función del diente y del sitio en el que la célula se encuentre (Kawasaki et al., 1977). Los odontoblastos jóvenes poseen una tasa de secreción más activa que los odontoblastos viejos, sin embargo, la secreción de dentina nunca cesará realmente mientras el odontoblasto se encuentre con vida (Tjäderhane and Haapasalo, 2012).

Por su modo de formación, la dentina es un tejido altamente permeable, lo que facilita la invasión microbiana debido a los numerosos túbulos dentinarios que posee. Éstos tienen un diámetro aproximado de 1 - 3µm y describen una curvatura en forma de "S". Se puede calcular que hay aproximadamente 15.000/mm² de túbulos en la dentina periférica, 25.000/mm² en la parte central y 55.000/mm² cercanos a la pulpa (Linde and Goldberg, 1993). Las estimaciones de la densidad tubular varía desde 18.000/mm² a 83.000/mm², con un promedio de 21.000/mm² en zonas más profundas y 18.800/mm² en las zonas medias de la dentina (Schilke et al., 2000).

1.2 Inervación de la pulpa dental y sensibilidad dentinaria

El tejido pulpar se caracteriza por tener una doble inervación:

1.2.1 Inervación sensitiva

1.2.2 Inervación autónoma

1.2.1 Inervación sensitiva: corresponde a fibras aferentes sensoriales del nervio trigémino. Son fibras miélicas tipo A δ y A β ; y también fibras amielínicas tipo

C. Las fibras tipo A se distribuyen principalmente en la zona periférica de la pulpa dental y responden a estímulos hidrodinámicos, osmóticos o térmicos que transmiten la sensación de un dolor agudo y bien localizado.

1.2.2 Inervación autónoma: corresponde a fibras amielínicas tipo C provenientes del ganglio cervical superior y llegan a la pulpa apical para dirigirse a la túnica muscular de las arteriolas, por lo que intervienen en la función vaso motora (calibre arteriolar). Estas fibras se distribuyen en la zona central de la pulpa dental.

Las terminaciones nerviosas miélicas en la pulpa coronaria se ramifican considerablemente con respecto a la región radicular. Dichas ramificaciones constituyen el plexo nervioso sub-odontoblástico de Raschkow. Con microscopía electrónica de transmisión (MET) se ha demostrado que algunas fibras de este plexo continúan su recorrido entre los espacios de los procesos odontoblásticos en los túbulos dentinarios, donde pierden su vaina de mielina formando impresionantes ramificaciones.

Frente a una lesión, la pulpa responde de manera bifásica, es decir, hay una vasoconstricción inicial, seguida de una vasodilatación y de un aumento de la permeabilidad vascular. Esto conlleva a que por ejemplo, durante un estímulo nocivo como lo es la preparación de una cavidad, pasen fluidos desde el espacio extracelular de la pulpa, de los vasos sanguíneos o de ambos hacia la dentina, como una respuesta fisiológica al trauma (Turner, 1992, Chiego, 1992, Vongsavan and Matthews, 1992); debido a que la barrera funcional formada por los odontoblastos que principalmente restringe el paso de fluidos, iones y otras moléculas a lo largo de la vía extracelular puede verse afectada por estos sucesos. Esta observación puede relacionarse con la teoría hidrodinámica de fluidos propuesta por Brannstrom para explicar la sensibilidad dental. En esta teoría la ausencia del proceso odontoblástico en la parte externa de los túbulos, sugiere que los mecanismos de transducción para la sensibilidad dentinaria no involucran directamente a los odontoblastos, y que el dolor dentinario es generado por movimientos hidrodinámicos de fluidos en donde ocurren diferencias de presiones dentro de los conductos dentinarios. Esto activa a las terminaciones nerviosas provenientes desde la pulpa, interpretando estos estímulos siempre como dolor (Brannstrom, 1986).

Además de la teoría hidrodinámica clásica en cuanto a la causa del dolor, existe una teoría que plantea que el odontoblasto puede ser parcialmente responsable de la sensación de dolor debido a la membrana polarizada que posee. Canales mecanosensitivos de Na^+ , K^+ y Cl^- se han observado en la membrana plasmática de odontoblastos y en adición a estos canales, estudios realizados por Magloire y colaboradores evidenciaron que existen canales de calcio, los que poseen un rol central en el comportamiento del odontoblasto, tanto a nivel fisiológico como

fisiopatológico (Allard et al., 2000, Magloire et al., 2003). El canal TREK⁻¹ K⁺ también se ha podido observar en membranas de odontoblastos de dientes humanos in vivo, éste se localiza específicamente en la red terminal donde los odontoblastos están conectados unos con otros, ubicación que se encuentra cercana a la distribución de los nervios de la pulpa dental, por lo que se asume que el canal TREK⁻¹ K⁺ participa en la percepción del dolor (Magloire et al., 2003). Estudios realizados por Allard y colaboradores han podido demostrar in vitro que los odontoblastos son células excitables, que generan potenciales de acción cuando son estimulados eléctricamente, lo que lleva a suponer que estas células serían capaces de responder frente a estímulos externos formando potenciales de acción a través de estos canales y transmitiéndolos a las terminaciones nerviosas adyacentes, tal cual lo hacen las células neuronales (Allard et al., 2000).

Otro mecanismo posible propuesto para la función sensorial de los odontoblastos es la expresión de los cilios primarios. Los cilios primarios son organelos flagelares individuales, no móviles, presentes en casi todas las células de vertebrados, que en conjunto realizan diversas funciones de señalización. Éstos poseen una estructura polarizada y en un estudio realizado por Gerdes en dientes de rata, se sugiere que existe un vínculo entre el cilio primario y el mantenimiento de la polaridad celular. En este estudio, se pudo observar que la falta de ciliogénesis conlleva a una falta en la diferenciación de los odontoblastos, produciendo formación de cúspides desorganizadas, y marcados defectos en la producción de dentina. Con estos datos se puede pensar que los cilios primarios responden a estímulos mecánicos, tales como movimientos de fluidos dentinarios u otras señales provenientes de la pulpa; y que tienen una marcada relación con la diferenciación celular y le confieren polaridad a la membrana plasmática de la célula (Gerdes et al., 2009).

En cuanto a este último punto, estudios recientes han señalado que la membrana plasmática del odontoblasto se encuentra polarizada igual que la célula (Tjäderhane et al., 2009), lo que confirma que el odontoblasto es una célula polarizada. Además ésta polarización de membrana, que podría formarse durante la diferenciación del odontoblasto, puede relacionarse con la actividad secretora polarizada de esta célula, con los roles de nutrición desde la pulpa dental o también estar relacionada con la función sensorial del odontoblasto. Por todas estas características mencionadas se considera al tejido pulpar y dentinario en su conjunto como una sola unidad, que conforman estructural, embriológica y funcionalmente una verdadera unidad biológica conocida como CDP.

1.3 Mecanismos de defensa del CDP

Los odontoblastos son las primeras células que responden frente a los estímulos nocivos provenientes del medio externo, por lo que éstos deben estar listos y preparados para responder frente a patógenos bacterianos que puedan ingresar a través de los túbulos dentinarios u otros agentes irritantes que puedan afectar al diente. Esta respuesta por parte de los odontoblastos es la secreción de dentina terciaria que se forma adyacente a los túbulos dentinarios afectados por noxas. También puede ocurrir que depósitos de dentina terciaria se encuentren entre la dentina primaria y la dentina secundaria. Por lo tanto, cualquier consideración de dentinogénesis terciaria en áreas peritubulares se complica por el fenómeno de la dentinogénesis fisiológica, sea esta primaria o secundaria, ya que la última es característica de una secreción normal del proceso de envejecimiento. Sólo es realmente fiable en la interfase dentino-pulpar en donde puede existir una distinción entre dentina terciaria y otras (Smith et al., 1995). La estructura de la dentina terciaria puede ser muy variable, con un aspecto de apariencia que va desde una matriz tubular, la cual es prácticamente indistinguible de la dentina primaria, a una matriz muy distrófica atubular que contiene posiblemente células atrapadas dentro de ellas.

Smith ha propuesto que existen dos tipos de dentina terciaria (Smith et al., 1994):

1.3.1 Dentina reaccional

1.3.2 Dentina reparativa

1.3.1 Dentina reaccional: se define como una matriz de dentina terciaria secretada por células odontoblásticas sobrevivientes, en respuesta a un estímulo de leve a moderado.

1.3.2 Dentina reparativa: se define como una matriz de dentina terciaria secretada por una nueva generación de células odontoblásticas en respuesta a un estímulo severo. Esta secreción ocurre después de la muerte de los odontoblastos post-mitóticos originales, que son los responsables de la secreción fisiológica de dentina primaria y secundaria.

El punto fundamental de estas propuestas es que la dentina terciaria surge como un mecanismo defensivo o reparativo, que se origina de células precursoras que se encuentran en la pulpa. La interfase entre la dentina formada por los odontoblastos reaccionales y la formada por las células reparativas tipo-odontoblastos es particularmente importante debido a que los túbulos de ambas dentinas no se comunican directamente entre sí, esto puede actuar como barrera

para la entrada de patógenos bacterianos hacia la pulpa. Este efecto barrera es un mecanismo muy importante de defensa en la odontología restauradora (Mjor, 2001).

En un estudio realizado en dientes de hurón en donde se les realizaron cavidades y luego se implantaron componentes de matriz extra celular (MEC) de la dentina, se pudo observar una secreción de dentinogénesis reaccional resultante de la interacción existente entre odontoblastos y estímulos moleculares apropiados que condujeron a un aumento de la actividad sintética y secretora de los odontoblastos. En este estudio no se pudo observar muerte celular (Smith et al., 1994). Esto contrasta marcadamente con la dentinogénesis reparativa, en donde se produce la muerte de los odontoblastos, y células precursoras de la pulpa son inducidas a diferenciarse en una nueva población de células odontoblásticas (Smith et al., 1990).

Es posible que las moléculas involucradas en la iniciación de la dentinogénesis reaccional y reparativa sean similares, ya que la misma fracción de aislados de componentes de la MEC de la dentina pueden dar a lugar a dos procesos diferentes. Sin embargo, los eventos biológicos en que se basan estos procesos son diferentes. En la dentinogénesis reaccional se requiere sólo la interacción entre el estímulo molecular y odontoblastos para que ocurra la estimulación de la secreción de la matriz, en cambio, en la dentinogénesis reparativa, una cascada de eventos que incluyen la división celular, quimiotaxis, migración celular, adhesión celular y citodiferenciación celular deben ocurrir antes de que la secreción de la matriz tenga lugar. Por lo tanto, los cambios en la actividad del odontoblasto a lo largo de su vida, la estimulación de su síntesis y la actividad secretora en respuesta a estímulos adecuados indican que el odontoblasto es una célula muy versátil.

Finkelman y colaboradores han demostrado la presencia de factores de crecimiento en la dentina, incluyendo el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), y han sugerido que la respuesta de los odontoblastos a la caries dental puede estar mediada por la liberación de estos factores de crecimiento desde la dentina durante la desmineralización por los ácidos bacterianos (Finkelman et al., 1990). Estudios realizados en la línea de la investigación de las moléculas implicadas en la iniciación de la dentinogénesis reaccional, evaluaron la capacidad del TGF- β para iniciar este proceso. Luego de 14 días de implantación del TGF- β , pudieron observar que el TGF- β estimula la secreción de una matriz tubular de dentina reaccional inmediatamente debajo de la cavidad, en la interfase dentino-pulpar. La interfase entre la dentina reaccional y odontoblastos fue irregular y, en general, la dentina reaccional tenía la apariencia de penachos, sugiriendo que los odontoblastos respondieron de diferente manera al estímulo desde el material implantado. La deposición de dentina reaccional sólo se observó en aquellas áreas en donde los túbulos dentinarios estaban en comunicación con las cavidades, lo que indica el

papel de difusión que tienen las moléculas a través de los túbulos dentinarios (Smith et al., 1995).

2. Caries Dental y Complejo Dentino-Pulpar

La caries dental es una enfermedad bucodental de origen infeccioso y de alta prevalencia, encontrándose en Chile cerca 98% - 100% de los adultos afectados por éstas (Gamonal et al., 1998) (Badenier and cols. 2007). Las bacterias que invaden la dentina durante la progresión de la caries, generan respuestas defensivas a nivel de la capa odontoblástica, caracterizadas por esclerosis dentinaria y secreción de dentina reaccional, la que es producida cuando existen noxas de estímulos moderados (Smith et al., 1995).

El proceso de caries origina lesiones que pueden afectar el esmalte, la dentina, la pulpa y el cemento. Se caracteriza por la desmineralización de los tejidos duros del diente, acompañado por cambios en la dentina y en ocasiones inflamación pulpar. El factor clave en el desarrollo de la caries es la presencia de bacterias y el ácido que produce el biofilm en la superficie del diente.

La caries se inicia como una lesión primaria de esmalte, en donde se puede observar una zona de color blanco opaco, que es el primer signo de desmineralización. Cuando esta lesión es vista histológicamente, una lesión superficial bien mineralizada se observa cubriendo una desmineralización sub-superficial. Todas las lesiones de caries iniciales tienen la característica de que progresan como lesiones sub-superficiales, independientemente de que si comienzan en esmalte, dentina coronaria o cemento (Bjorndal and Mjor, 2001).

Se pueden observar cambios en la dentina en etapas tempranas de lesiones de esmalte, antes de que alcance la superficie dentinaria y antes de que ocurra la invasión bacteriana. Evidencia histológica demuestra que la primera alteración de la dentina es la presencia de una zona de hipermineralización que se desarrolla antes de que la lesión alcance la unión amelodentinaria (Bjorndal and Mjor, 2001). La desmineralización subsecuente de la dentina comienza una vez que la lesión ha alcanzado la unión amelodentinaria.

Las reacciones de la dentina frente a la progresión de la caries, reflejan los cambios que ocurren en el esmalte, dando lugar a dos alteraciones principales:

- * Cuando la desmineralización del esmalte involucra el 1/3 interior de este y progresa hacia la unión amelodentinaria, se pueden detectar alteraciones minerales en la dentina intratubular.

- * Cuando la desmineralización del esmalte alcanza la unión amelodentinaria, comienza la desmineralización dentinaria y algunos de los minerales disueltos por el ácido de las bacterias comienzan a precipitar.

Aunque el proceso de desmineralización afecta tanto a la dentina intratubular como intertubular, el frente de desmineralización sigue la dirección de la dentina tubular, esto es la ruta primaria para la disolución del tejido dentinario (Fuks, 2000). Por consiguiente, la zona de desmineralización de dentina subyacente a lesiones no cavitadas se estrecha a medida que progresa hacia la pulpa. Notablemente, la secuencia inicial de desmineralización dentinaria ocurre sin la presencia de bacterias en la dentina, ya que la bacteria es demasiado grande para penetrar los prismas desmineralizados del esmalte, pero cuando la capa de esmalte se derrumba, la invasión bacteriana ocurre.

2.1 Lesiones de progresión lenta

Frente a estímulos externos suaves o moderados, la dentina primaria experimenta cambios estructurales antes que la desmineralización del esmalte por parte de los ácidos bacterianos se lleve a cabo. Estos cambios implican la secreción de dentina peritubular altamente mineralizada, lo que reduce el diámetro de los túbulos. A este tipo de reacción se le conoce como esclerosis dentinaria. Este es un mecanismo defensivo que disminuye las posibilidades de que bacterias o productos de éstas lleguen a causar reacción pulpar inflamatoria.

La estructura de esta dentina terciaria está relacionada con la actividad de la lesión; entre más crónica la lesión más regular será su estructura.

2.2 Lesiones de progresión rápida

Este tipo de lesión aparece cuando estímulos externos severos afectan a la estructura dental. Aquí puede ocurrir la muerte del odontoblasto y la formación de una nueva forma celular llamada célula reparativa tipo-odontoblasto, la que secretará dentina reparativa caracterizada por ser atubular.

Según Fuks son varios los factores importantes en la descripción de la caries de progresión rápida (Fuks, 2000):

- * Exposición clínica de la dentina.

- * Invasión e infección de la dentina por bacterias.
- * Un número creciente de células reclutadas por la vigilancia inmune, que tarde o temprano conducen a respuestas inflamatorias.
- * La cavitación del esmalte por la desmineralización de la dentina infectada a lo largo de la unión amelo-dentinaria

2.3 Caries Dental y Dentinogénesis terciaria

Bjorndal ha sugerido que en lesiones de progresión rápida la dentinogénesis terciaria puede estar ausente, por el contrario, bajo lesiones cavitadas de mayor antigüedad se ha encontrado una variedad de dentina terciaria (Bjorndal, 2001). Karjalainen y colaboradores también han reportado que los estados avanzados de caries no son necesariamente acompañados por dentina terciaria en formación (Karjalainen and Le Bell, 1987).

Bjorndal define el proceso de caries según sus características clínicas:

- * Lesión Activa: reducción funcional debido al desgaste del diente o por ausencia de diente antagonista.; grandes acumulaciones de placa que recubren la lesión, sangrado gingival al sondaje.
- * Lesión detenida/progresión lenta: signos de desgaste natural del diente, acumulación delgada de placa, no hay presencia de sangrado gingival al sondaje.

En lesiones de esmalte activas no cavitadas, la presencia de dentina tubular reaccional fue observada en los sitios laterales de lesiones más jóvenes, en cambio la dentina atubular, también definida como fibrodentina por Baume, se encontró en el sitio central de la lesión más antigua (Baume, 1980).

La ausencia de dentina terciaria en lesiones de edades similares pero con cavitaciones de esmalte y de progresión más rápida, fueron relacionadas a una alta permeabilidad de la dentina desmineralizada, y también evidencian el deterioro de la región odontoblástica de predentina. En este aspecto, es razonable asumir que el proceso inflamatorio resultante destruye los odontoblastos primarios.

La principal diferencia es que la dentina terciaria producida por los odontoblastos reaccionales, podría interpretarse como un crecimiento local y fisiológico, en cambio la dentina secretada por células reparativas tipo-odontoblasto no es fisiológica ni posee una estructura ordenada.

En conclusión, durante la progresión de la lesión, la ausencia de dentina terciaria puede ser esperada. Sin embargo en lesiones cavitadas dentinarias antiguas, se ha observado una variación de dentina terciaria, y esto puede ser el resultado de los cambios del medio ambiente externo de la lesión a través del tiempo.

2.4 Dentina Reaccional e Inmuno-defensa a la progresión de patógenos

El comportamiento que experimenta el CDP en respuesta a una caries dental es un proceso dinámico, que depende tanto de la invasión de bacterias como de la respuesta del hospedero frente a ellas.

Cuando la integridad del diente se ha visto afectado por el proceso de caries, y las bacterias logran invadir la dentina, la primera línea de defensa con la que se encuentran es con los procesos odontoblásticos de las células odontoblásticas. Los odontoblastos una vez expuestos a los componentes bacterianos son capaces de detectarlos tempranamente, desencadenando una respuesta inmune innata, principalmente por la secreción de citocinas y quimiocinas. Las citocinas y quimiocinas son mediadoras entre odontoblastos y células del sistema inmune innato, tales como neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, y células asesinas naturales (NK). Estas proteínas son secretadas por odontoblastos y células inmunes en respuesta a estímulos bacterianos, y así atraer a células inmunes adicionales, secretar fluido dentinario e iniciar y modular las respuestas inflamatorias (Horst et al., 2011).

En el momento que la caries invade el CDP, ocurre una inflamación que se manifiesta con dolor y con hipersensibilidad, esto debido a los productos metabólicos de las bacterias y los componentes de la pared celular, como el ácido lipoteicoico (LTA) en bacterias Gram-positivas y lipopolisacáridos (LPS) en bacterias Gram-negativas.

El odontoblasto humano responde a estos metabolitos bacterianos expresando receptores tipo Toll (TLRs), que son un grupo de glicoproteínas transmembrana capaces de reconocer las partículas bacterianas y virales (Takeuchi and Akira, 2010). De esta manera activan tempranamente a los macrófagos para que produzcan citocinas y quimiocinas que actúan en la regulación de la inflamación. Estas citoquinas además inician la producción de péptidos antimicrobianos y ayudan a la maduración de las CD4 (Farges et al., 2009) (Fig. 3).

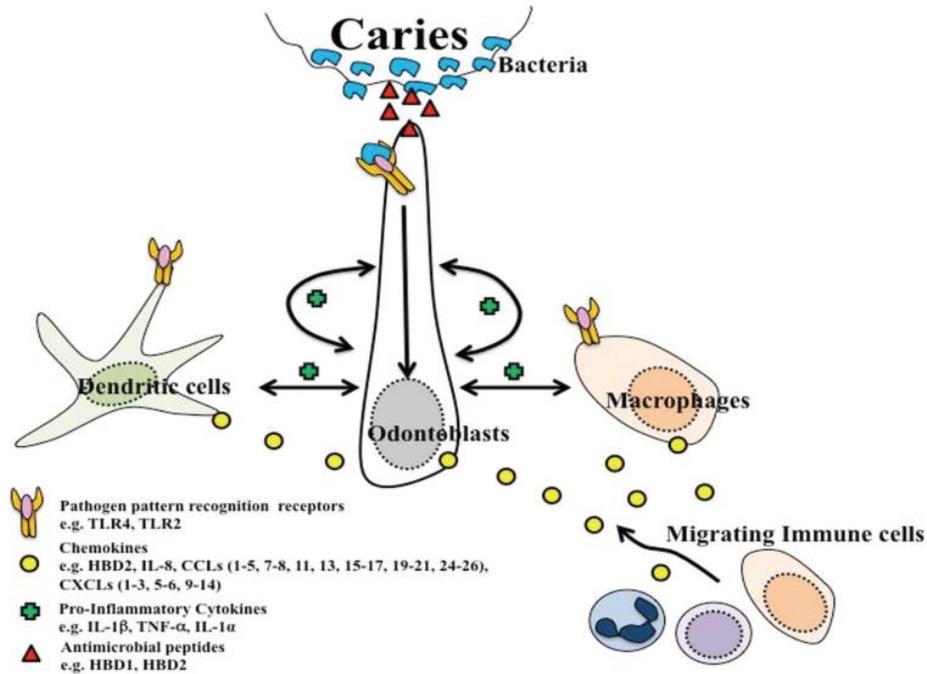


Figura 3 Esquema que muestra los componentes bacterianos de la caries que activan la liberación de citocinas y quimiocinas desde odontoblastos, CDs y macrófagos residentes a través de TLRs. Las citocinas proinflamatorias liberadas desde éstas células actúan como señales autocrinias y paracrinias para amplificar la respuesta de las citocinas, incluyendo péptido antimicrobiano, citocinas y producción de quimiocinas. La liberación de quimiocinas crea un gradiente de migración de las células inmunes hacia la capa odontoblástica, mientras que los péptidos antimicrobianos reducen la carga bacteriana. Extraído de (Horst et al., 2011).

Los TLRs más conocidos en odontoblastos son TLR2 y TLR4. TLR2 participa en el reconocimiento de LTA y otros componentes bacterianos Gram-positivos. El receptor TLR4, reconoce los LPS provenientes de la membrana de bacterias Gram-negativas (Veerayutthwilai et al., 2007). Una vez que el odontoblasto ha reconocido los antígenos bacterianos, las células que expresan la molécula clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC clase II) responden de manera rápida, iniciando la respuesta inmune (Hahn and Liewehr, 2007b). Las células que poseen la molécula MHC clase II están compuestas por CDs y macrófagos residentes, que conjuntamente se denominan células dendríticas pulpares.

La respuesta pulpar inicial, se caracteriza por la acumulación localizada de células dendríticas en la interfase dentino-pulpar que está en relación a los túbulos dentinarios comprometidos con la lesión cariosa. La acumulación en este dominio, indica que estas células responden rápidamente a los antígenos bacterianos que difunden a través de los túbulos dentinarios. Cuando aumenta la densidad de células dendríticas adyacentes a los túbulos afectados por caries, no se evidencia dentinogénesis reparativa, esto puede deberse a la disminución de antígenos

bacterianos. Sin embargo, cuando la dentina reparativa es invadida por caries, las células dendríticas se acumulan rápidamente (Hahn and Liewehr, 2007b, Trowbridge and Daniels, 1977, Bergenholtz, 1981). Estos hallazgos apoyan la idea de que la respuesta inmune, no necesariamente está determinada por la profundidad de la lesión, sino más bien puede estar asociada con la calidad y el estado del proceso reparativo dentinario.

En cuanto a los macrófagos podemos decir que durante el proceso inflamatorio tienen 3 funciones principales:

- * La presentación del antígeno, como se mencionó anteriormente
- * La fagocitosis de patógenos
- * La inmunomodulación, a través de la producción de citoquinas y factores de crecimiento

Dentro de las ILs sintetizadas por macrófagos activados podemos encontrar a la IL-1, proteína que induce la producción del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) desde las células no neuronales (Lindholm et al., 1988, Lindholm et al., 1987). Debido a que en varios estudios se ha sugerido la presencia de este factor junto con su receptor (NGFR) (Naftel et al., 1992, Maeda et al., 1992, Byers et al., 1992), es que se puede especular que las CDs pulpares tienen un papel en el control de la arborización de los nervios intrapulpares en respuesta a la caries y otros estímulos mediados a través del mecanismo de la IL-1. La IL-6 también tiene el potencial de facilitar el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de la fibra nerviosa (Reichert et al., 1996, Hama et al., 1991).

Dentro de los factores de crecimiento secretados por los macrófagos podemos encontrar el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), que es un importante inductor de la angiogénesis y de la permeabilidad vascular (Ferrara, 2004). Se estima que la capacidad del VEGF es 50.000 veces mejor que la histamina induciendo la permeabilidad vascular. Además, el VEGF es expresado en la matriz dentinaria, y su velocidad de liberación desde la matriz después de la lesión se relaciona cercanamente con la capacidad de curación del tejido pulpar. Un incremento rápido de la expresión de VEGF puede provocar un aumento agudo de la presión del tejido intersticial del espacio pulpar, lo que conduciría a necrosis pulpar (Senger et al., 1983).

Otro factor es el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) que aumenta su expresión en casos de pulpitis irreversible (Takahashi et al., 1997, Panopoulos, 1992). Este factor es importante en la dentinogénesis y en la reparación ya que promueve la secreción de la matriz de metaloproteinasas (MMP) y la

mineralización dentinaria. El TGF- β posee una función proinflamatoria durante el estado inicial de la inflamación; actúa reclutando células inmunes tal como DCs inmaduras (Gomes et al., 2004). Durante los últimos estados de inflamación, el TGF- β_1 tiene efectos anti-inflamatorios reprimiendo la proliferación de linfocitos, la inhibición de la expresión de TLR2 y TLR4 y la activación de DCs junto con macrófagos, para así mantener la homeostasis dentro del diente infectado por el proceso de caries (Ohshima et al., 2003, Nakanishi et al., 1995, Hahn and Liewehr, 2007a).

Por último cabe mencionar al Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) que tiene cierta actividad sobre las MMP, motivo por el cual se cree que este factor actúa sobre algunos sistemas de degradación pulpar (Ueda and Matsushima, 2001).

En la respuesta inmune pulpar inicial, además de la participación de las CDs pulpares, se ha evidenciado un rol fundamental de los linfocitos T. Estos participan en las primeras etapas de la respuesta inmune contra la caries dental, después de la presentación antigénica por parte de las CDs. La interacción de los linfocitos T con las CDs supone que facilitaría la infiltración celular, debido a la generación de citocinas que regulan el incremento de las moléculas de adhesión de las células endoteliales (Jontell et al., 1998). También se ha observado un aumento de linfocitos B, aunque sólo se han detectado en dientes con lesiones cariosas profundas.

La inflamación neurogénica acompaña a la respuesta inmune pulpar, en donde los agentes neurales son señales importantes para la estimulación, reparación y regulación de las funciones homeostáticas de la pulpa. Los neuropéptidos son neurotransmisores peptídicos sintetizados y liberados por neuronas. Presentan efectos biológicos por la activación de receptores localizados en las membranas plasmáticas de las células blanco (Artese et al., 2002).

Los neuropéptidos más frecuentemente encontrados en la pulpa dental son:

- * Péptido regulador del Gen de Calcitonina (CGRP): participa en la vasodilatación, extravasación de plasma, quimiotaxis, supresión de linfocitos T, formación de tejido duro, reparación, dolor y control del proceso resortivo (Rodd and Boissonade, 2000, Killough et al., 2009, Caviedes-Bucheli et al., 2008, Caviedes-Bucheli et al., 2004).
- * Sustancia P (SP): su efecto biológico consiste en la vasodilatación, extravasación de plasma, estimulación del sistema inmune, quimiotaxis, aumento de la actividad de macrófagos, participación en la formación de tejidos duros y reparación tisular (Artese et al., 2002, Ohshima et al., 2003).

- * Neuropeptido Y (NPY): participa en la vasoconstricción, en el dolor y en los procesos de reparación (Fehrenbacher et al., 2009, Artese et al., 2002).
- * Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP): participa en la vasodilatación y en la regulación de la inflamación (Artese et al., 2002).

El aumento en la producción y liberación de neuropeptidos, cumple una importante función en la iniciación y propagación de la inflamación pulpar, dado que tienen la habilidad de interactuar con las células inmunocompetentes (Calland et al., 1997).

En conclusión podemos decir que la pulpa dental está equipada para iniciar una respuesta innata frente a la invasión bacteriana, si ésta respuesta no es suficiente para detener el daño que producen los metabolitos de las bacterias, se produce la activación de la inmunidad adaptativa, la inflamación y la presencia de edema, que es el resultado del aumento de la presión pulpar.

PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS/OBJETIVOS

La dentina reaccional es una respuesta de defensa caracterizada por la secreción de matriz dentinaria frente a un estímulo como la caries, mediada por odontoblastos que reactivan su actividad secretora.

El presente trabajo, plantea como hipótesis:

“La formación de dentina reaccional durante la progresión de la caries dental constituye una respuesta de defensa contra patógenos y un mecanismo fundamental en el proceso reparativo dentino-pulpar”.

Objetivo general

Evaluar los cambios que comprometen al CDP durante el proceso de respuesta dentinogénica reaccional frente a la progresión de la caries dental.

Objetivos específicos

1. Comparar el CDP de dientes sanos con dientes afectados por caries dentinaria.
2. Caracterizar la presencia de CDs en relación a la formación de dentina reaccional durante la progresión de la caries dental.
3. Caracterizar la respuesta neurogénica asociada a la formación de dentina reaccional durante la progresión de la caries dental.

Tipo de estudio

La Clasificación de la HRCS (Health Research Classification System), desarrollada por la Colaboración de Investigación Clínica del Reino Unido (UKCRC); se caracteriza por ser un sistema hecho a medida para la clasificación de todo el espectro de la investigación biomédica y de la salud; incluye todos los ámbitos de la salud y la enfermedad que van desde básico a aplicado (<http://www.hrcsonline.net/>).

Según esta clasificación, nuestro tipo de estudio se encuentra dentro de la categoría 1.- “Underpinning Research”, sub-clasificación 1.1.- “Normal Biological development and functioning” específicamente el estudio “molecular, cellular and physiological structures and function”.

Universo

Terceros molares de pacientes adultos jóvenes (20 - 30 años), extraídos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso durante el segundo semestre del año 2012 y el primer semestre del año 2013. De acuerdo a los criterios de inclusión se seleccionaron molares sanos y molares que presentaban caries dentinaria con distinta actividad cariogénica. Los molares una vez seccionados fueron clasificados de acuerdo al índice ICDAS (International Caries Detection and Assessment System) (Pitts and Ekstrand, 2012).

Criterios de inclusión/exclusión

* Inclusión:

- Molares Sanos: molares con su corona intacta y sin evidencia de lesiones en superficie y surcos de esmalte.
- Molares Afectados por lesión: Caries activas o crónicas que comprometan tercio externo o interno de la superficie dentinaria.

* Exclusión:

- Dientes con pulpitis irreversible, necrosis pulpar, obturaciones, caries secundaria y restos radiculares.

Muestra (tamaño y forma de selección)

- * Tamaño: 10 molares; 3 sanos y 7 afectados por lesión.
Promedio de edad: 23.5 años con una desviación estándar de 2.17

- * Forma de selección: Muestreo no probabilístico. Los dientes fueron recolectados en las dependencias de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso de acuerdo a los protocolos aprobados por el comité de ética de ésta escuela. Las muestras se obtuvieron en las cátedras de Cirugía, Pabellón, Clínica Integral y UCEOT de acuerdo con los criterios de inclusión/exclusión. Estos fueron recolectados a medida que se fueron extrayendo durante el segundo semestre del año 2012 y primer semestre del año 2013, hasta llegar a un número de 10 dientes seleccionados idóneamente para realizar el estudio. Los dientes fueron donados mediante previo consentimiento informado firmado por el paciente.

Unidad de estudio

Complejo Dentino-Pulpar, específicamente dentina reaccional.

Definición de variables a evaluar

1. Complejo Dentino-Pulpar: variable cualitativa. Determinado por los núcleos de los odontoblastos, que serán marcados con DAPI (fluorocromo) y observados mediante contraste diferencial.

2. Dentina reaccional: variable cualitativa. Será determinada por el cambio de dirección de los túbulos dentinarios.

3. Células presentadoras de antígeno: variable cualitativa. Se identificarán debido a su perfil dendrítico y debido a la inmuno-reactividad que poseen frente al anticuerpo llamado anti-HLA-DR.

4. Fibras nerviosas: variable cualitativa. Se identificarán mediante el anticuerpo NF-200 (neurofilamentos) y Tubulina Beta III (marcador neuronal).

Forma de recolección de información

En las dependencias de las clínicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso y en el momento de la extracción se preguntó al clínico las características del diente y la razón de la indicación de exodoncia. Aplicando los criterios de selección de inclusión/ exclusión y posterior a la autorización del paciente mediante firma del consentimiento informado, se procede a lavar el diente con un chorro de suero, eliminando restos de sangre y otros desechos que puedan quedar de la extracción, a continuación se secciona la corona de la raíz con un disco de carborundo o turbina con fresa extralarga 4mm bajo el cuello del diente, con mucha irrigación y se procede a fijar en paraformaldehído (PFA) al 4% con ácido pícrico al 0,5% (en una solución de PBS a un PH de 7.4) durante 2 Hrs. Posteriormente, las muestras son seccionadas en sentido mesio-distal con un Isomed a velocidad lenta (Buehler, Lake Bluff, IL, USA).

Las muestras son desmineralizadas en solución de EDTA al 4,13%, la cual se debe cambiar una vez a la semana, repitiendo este proceso durante 3 meses, para luego poder iniciar con todos los procesos necesarios para ensayos inmunohistoquímicos y microscopia confocal.

Una vez que las muestras se encuentran desmineralizadas, se someten a un procedimiento llamado crioprotección, en donde se les aplica una gradiente de sacarosa, primero al 15 % durante 1 Hr y luego al 30% durante 23 Hrs; todo esto en solución de PBS con PH de 7.4. (PBS: NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) Finalizado este proceso, a las muestras se les agregó un líquido congelante de tejido frío (Tissue-Tek OCT Compound, SakuraFinetek, Torrance, CA, USA). Luego son cortadas en el criostato (Leica CM-1900) a una temperatura que va desde los -20°C a los -25°C.

Los cortes son montados en los porta objetos, que previamente tienen que estar recubiertos con poly-L-lysina (esto para que las muestras se adhieran al porta objeto) y se dejan reposar durante 1 Hr. Posterior a esto, las muestras son hidratadas, que se realiza con PBS; 3 lavados de 5 minutos cada uno. Luego, las muestras son incubadas durante una Hr en una solución de bloqueo, la que contiene 1% de suero de albúmina bovina (BSA), 1% de suero de caballo y 0,3% de Triton X-100 (detergente).

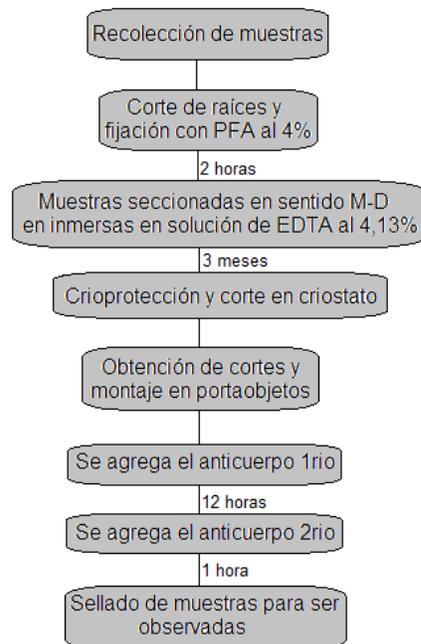
Anticuerpo Primario	Catálogo	Dilución	Anticuerpo Secundario *	Marcación
NF-200	Abcam	1:200	DyLight488	Neurofilamentos de Neuronas
Tubulina Beta III	Promega	1:200	DyLight488 Cy4	Marcador neuronal
HLA-DR Antígeno de Superficie	Abcam	1:50	Cy4	Células presentadoras de antígenos

*Fluorocromo asociado al anticuerpo secundario

Tabla I Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el presente estudio

Posteriormente se agregan los anticuerpos primarios, que están preparados en solución de bloqueo y se dejan actuar durante 12 Hrs a una temperatura de 4°C. Las muestras pasan por 3 lavados de PBS de 5 minutos cada una, esto con el fin de retirar los excesos de anticuerpos. Después se agregan los anticuerpos secundarios que también están preparados en una solución de bloqueo (buffer), y se dejan actuar 1Hr a temperatura ambiente; se vuelve a lavar con PBS para retirar los excesos.

Finalmente se sella la muestra con una gota de medio de montaje fluorescente (Dako Industries, Carpinteria, CA, USA) y se cubren con un porta objetos hasta que se seque la muestra a temperatura ambiente. Para mantener las muestras, estas se guardan en cajas a 4°C.



- Microscopía Óptica y Confocal:

Las muestras procesadas fueron observadas y analizadas con un microscopio óptico Nikon D-Eclipse C1, equipado con tecnología confocal. El equipo utiliza tres laser de distintas longitudes de onda de emisión (405, 488, 543nm) y permite la captura de señales en RGB. Los fluorocromos asociados a anticuerpos secundarios fueron Cy4 y DyLight488. Los núcleos fueron contrastados con DAPI. Registros digitales fueron obtenidos en resolución 1024x1024 píxeles y analizadas digitalmente mediante dos programas: Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) y Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, USA). Imágenes representativas de los distintos casos analizados son incluidas en los resultados.

Limitaciones del estudio

- * Los estrictos criterios de inclusión/exclusión limitaron la cantidad de muestras obtenidas para el estudio.
- * La dificultad de conseguir muestras, limitaron el estudio fundamentalmente a terceros molares sanos o cariados extraídos por indicación ortodóncica o quirúrgica

El presente estudio centra su análisis en dientes permanentes sanos y con lesiones dentinarias en distintos grados de progresión. En la Fig. 4, se muestran las secciones de cuatro molares, tres con caries dentinaria que compromete el tercio externo (A, B y C) y uno con caries dentinaria que compromete el tercio interno (D). El análisis de secciones desmineralizadas en lesiones superficiales evidencian patógenos bacterianos acumulados en la interfase amelo-dentinaria invadiendo túbulos dentinarios adyacentes (Fig. 5B).

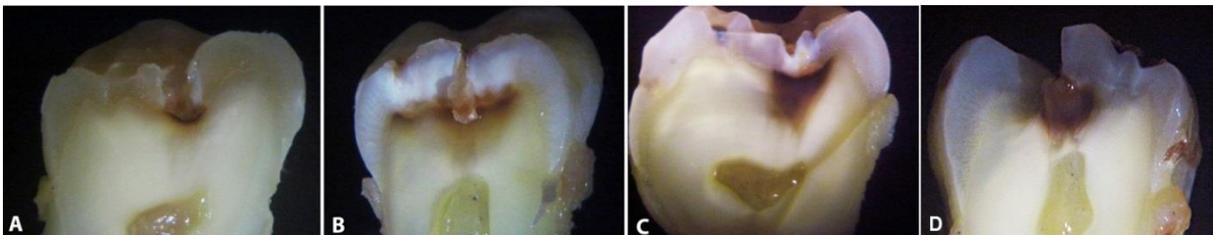


Figura 4 Imágenes macroscópicas de molares con caries dentinarias utilizados en el presente trabajo. Los molares fueron seccionados en el eje mesio-distal y posteriormente desmineralizados en EDTA. **A** y **B** Lesión de esmalte cavitado con exposición cariosa de dentina superficial; índice ICDAS 3, **C**. Lesión de caries dentinaria comprometiéndolo tercio externo de la dentina; índice ICDAS 4. **D** Lesión de caries dentinaria que compromete tercio interno de la dentina; índice ICDAS 5.

Complejo Dentino-Pulpar y dentina reaccional

El Complejo Dentino-Pulpar en dientes sanos evidencia una organización regular en donde la empalizada odontoblástica se encuentra organizada y con el núcleo de la célula odontoblástica polarizada hacia la pulpa dental.

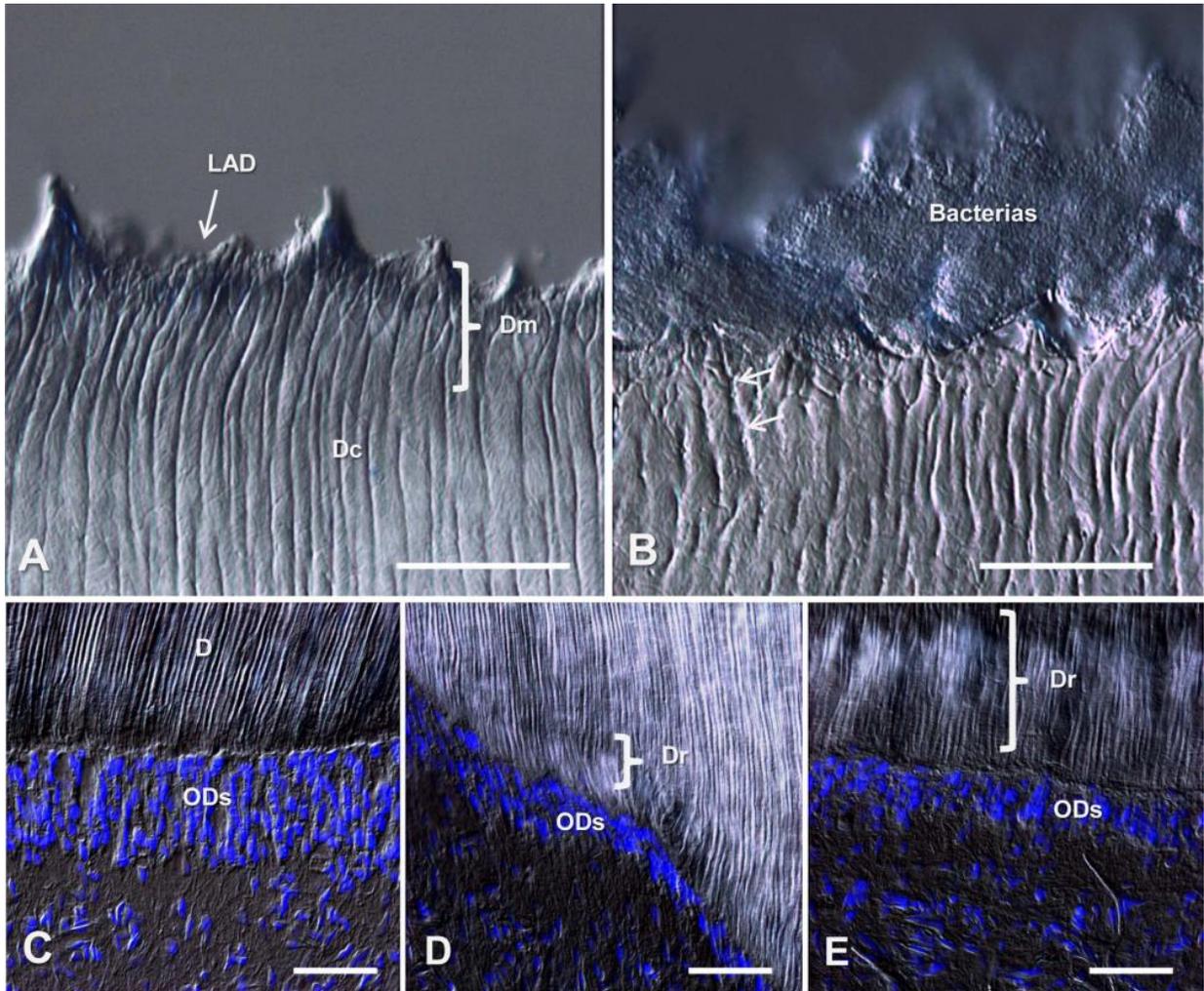


Figura 5 Microscopía óptica y fluorescencia de diente sano v/s diente con lesión inicial. **A.** Porción coronal de dentina primaria de diente sano, en donde se puede diferenciar: dentina del manto (Dm); dentina circumpulpar (Dc) y límite amelo-dentinario (LAD), **B.** porción coronal de dentina primaria en donde se puede observar la colonización de bacterias en el límite amelo-dentinario y la invasión de bacterias a través de los túbulos dentinarios (fechas). **C.** Organización del CDP en dientes sanos en donde se puede observar la Dentina (D) y los núcleos de odontoblastos (ODs) mediante tinción DAPI y fluorescencia. **D y E.** Organización del CDP en dientes con lesión superficial; se puede observar la formación de dentina reaccional (Dr) y la desorganización de la capa de ODs.

Análisis de los cambios que comprometen al Complejo Dentino-Pulpar durante el proceso de respuesta dentinogénica reaccional frente a la progresión de la caries dental.

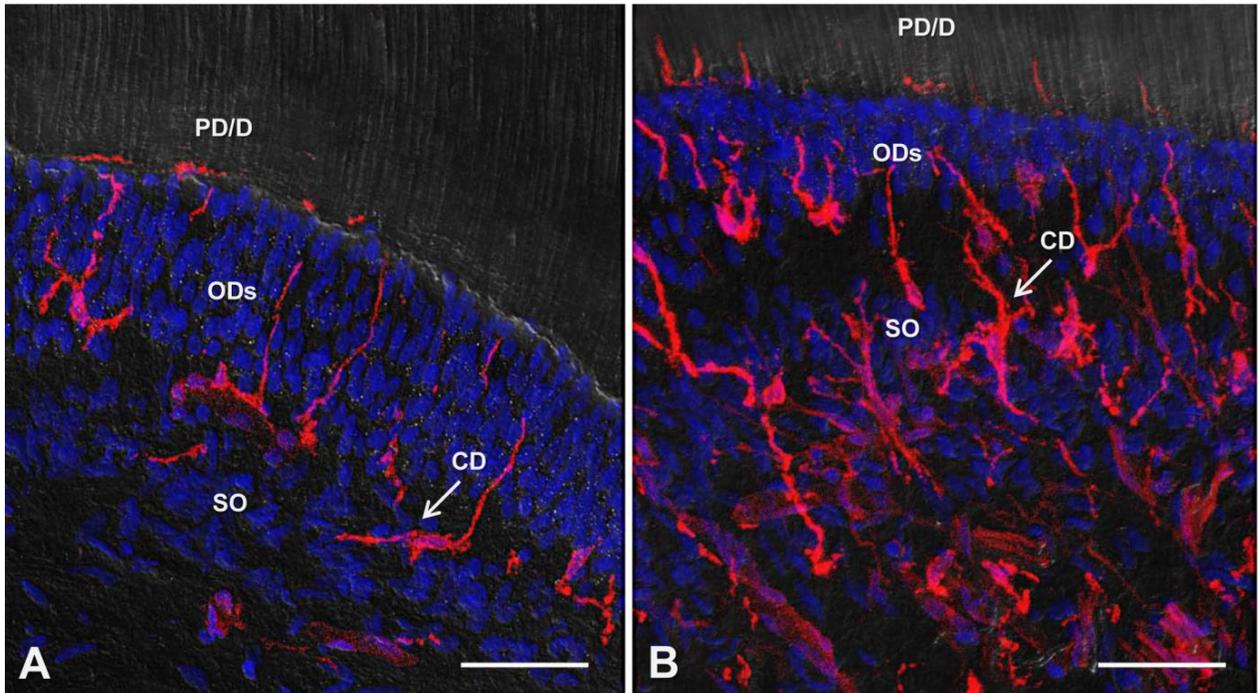


Figura 6 Microscopía confocal de células dendríticas (CDs) marcadas con anti HLA-DR. **A.** Sección del CDP de un diente sano, evidenciando CDs (flecha) localizadas en la región paraodontoblástica y con proyecciones que atraviesan la capa odontoblástica (ODs) alcanzando la interfase predentina/dentina (PD/D). **B.** Sección de CDP de un diente con caries dentinaria inicial evidenciando una fuerte reacción en el marcaje de CDs (flecha). SO, capa sub-odontoblástica. Los núcleos han sido marcados con DAPI. Barras= 50µm.

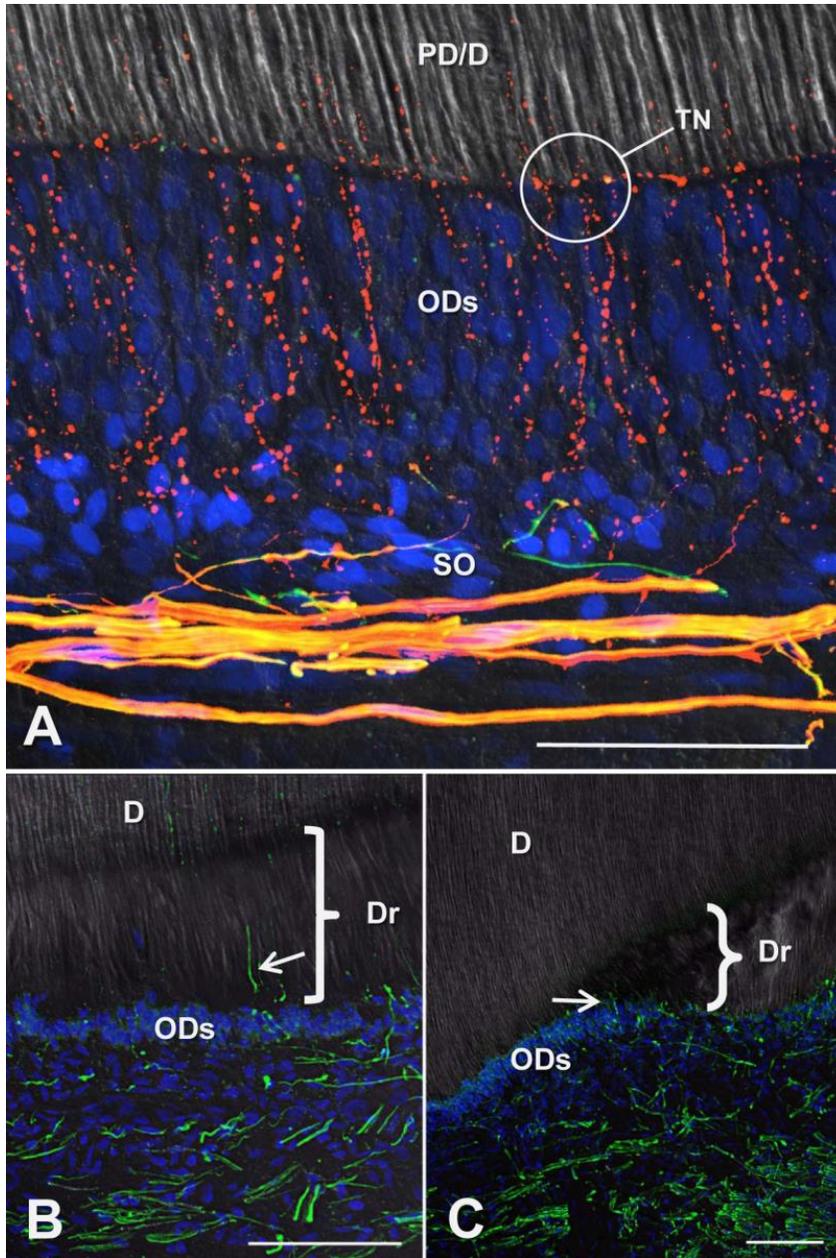


Figura 7 Microscopía confocal con marcaje de fibras nerviosas contra neurofilamentos NF-200 (verde) y tubulina β III (rojo). **A.** Sección de CDP de diente sano con doble marcaje anti NF-200 y Tub β III. Se evidencian axones bajo la capa sub-odontoblástica (SO) pertenecientes al plexo de Raschkow y terminales nerviosos (TN) fuertemente reactivos a Tub β III se proyectan a través de la capa odontoblástica (ODs) formando una compleja red terminal a nivel de la interfase predentina-dentina (PD/D). B y C. Fibras nerviosas marcadas con anti NF-200 en secciones de dos molares con caries dentinaria (B) superficial y (C) tercio externo. Las fibras nerviosas se evidencian proyectadas (flechas) a través de la dentina reaccional (Dr). Núcleos marcados con DAPI. Barras= 50 μ m.

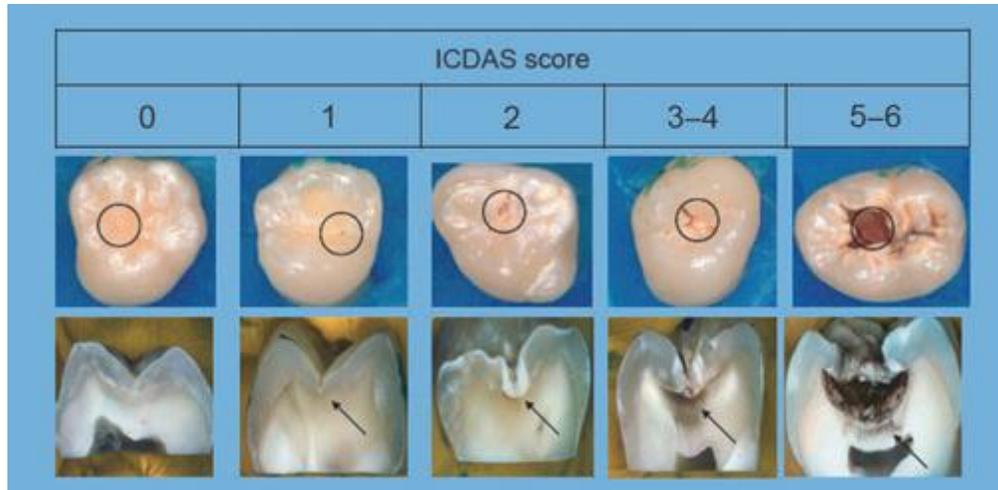


Figura 8 Código ICDAS visual clínico, con la evidencia histopatológica de la extensión de las lesiones cariosas (tomada de Pitts and Ekstrand, 2012).

	DIENTE			CAPA ODONTOBLÁSTICA		
	Nº	Edad	Índice ICDAS	Dentina reaccional	Células dendríticas	Fibras nerviosas
S A N O	1	24	0	-	+	+
	2	22	0	-	+	+
	3	25	0	-	+	+
1/3 E X T	4	25	3	+	+++	+++
	5	27	3	+	+++	+++
	6	24	4	+	+++	+++
	7	21	4	+	+++	+++
1/3 I N T	8	25	5	++*	++	++
	9	22	6	++*	++	++
	10	20	6	++*	++	++

* Dentina reparativa

Tabla II Tabla donde se resumen los resultados obtenidos. En la capa odontoblástica se observa la presencia de dentina reaccional, células dendríticas y fibras nerviosas. De acuerdo a la localización de la caries es donde se puede observar la mayor o menor presencia de células dendríticas y fibras nerviosas, mostrando un claro aumento cuando la caries se encuentra en el tercio externo de la dentina.

La unidad funcional de la pulpa dental compromete fundamentalmente el Complejo Dentino-Pulpar, una compleja organización celular dispuesta en toda la periferia pulpar. Esta sorprendente organización realiza variadas funciones, entre éstas, la capacidad de respuesta inmuno-defensiva frente a determinados estímulos como patógenos asociados a la caries dental modulando (reactivando) la secreción de dentina terciaria. Esta respuesta inmune está mediada principalmente por células presentadoras de antígenos las que inician una cascada de eventos mediante la participación de mensajeros químicos (citocinas). Éstos inducen un aumento en la densidad de células y fibras nerviosas adyacentes al sitio de la lesión, ayudando a la defensa, reparación y mantención de la vitalidad pulpar.

Dentro de la población celular que integra el CDP, las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos siendo cruciales en iniciar la respuesta inmune a nivel pulpar, estas células se localizan principalmente en la región peri-vascular y para-odontoblástica del CDP (Fig.1 y 6).

Una vez iniciada la respuesta inmune, el odontoblasto, célula dentinogénica del CDP, responde a los estímulos nocivos provenientes del medio externo mediante la secreción de dentina reaccional, la que se forma adyacente a los túbulos dentinarios afectados y que surge como un mecanismo defensivo fundamental a la progresión de los patógenos de la caries. La formación de dentina reaccional mediada por odontoblastos y la dentina reparativa mediada por células reparativas tipo-odontoblasto en conjunto constituyen los mecanismos de protección pulpar que caracterizan la dentina terciaria. La dentina reaccional a diferencia de la dentina reparativa, es secretada por células que sobrevivieron al estímulo, en cambio en la dentina reparativa, la magnitud o persistencia del estímulo produce la muerte celular, y una nueva generación de células son las encargadas de la formación de fibrodentina reparativa (Smith et al., 1995). Otra diferencia radica en que la dentina terciaria producto de los odontoblastos reaccionales, posee un crecimiento local y fisiopatológico, en cambio la dentina secretada por células reparativas tipo-odontoblasto no posee una estructura ordenada, es principalmente atubular y cumple un rol cicatricial.

En el CDP de dientes sanos podemos observar claramente las 5 zonas que lo conforman (Fig. 1B): la interfase predentina/dentina, la capa odontoblástica, la zona acelular de Weil, la capa sub-odontoblástica y la zona central de la pulpa. La empalizada odontoblástica se caracteriza por poseer un aspecto regular en donde los cuerpos celulares se localizan bajo la interfase dentino-pulpar adoptando una forma cilíndrica alta de unos 50 μm , y sus prolongaciones llamadas procesos

odontoblásticos se proyectan en los túbulos dentinarios (Mjor et al., 2001). En otros estudios de dientes sanos, se ha podido observar la presencia de CDs, ubicadas predominantemente en la zona peri-vascular y en la región para-odontoblástica. Estas células frecuentemente extienden sus procesos citoplasmáticos a través de la capa odontoblástica y de túbulos dentinarios (Sakurai et al., 1999). Estas características también fueron observadas en nuestro estudio mediante fotografías obtenidas con MET, en donde se evidenció la presencia de un empalizado odontoblástico con una conformación regular y ordenada. En el presente estudio hemos evidenciado la presencia de CDs marcadas mediante anti HLA-DR, que de acuerdo a su localización estarían actuando como células centinelas, las que en presencia de antígenos bacterianos serían capaces de iniciar la respuesta inmune (Fig. 6).

En lesiones iniciales de esmalte, antes de ocurran alteraciones en la dentina se ha podido observar una reducción de la capa odontoblástica, lo que correspondería a la primera respuesta defensiva del CDP. Por otra parte la región sub-odontoblástica disminuye su tamaño debido a la proliferación celular que ocurre en la zona acelular de Weil en respuesta a la lesión cariosa. La hipermineralización dentinaria que ocurre junto con las alteraciones celulares en la capa odontoblástica, puede ser comparada con un proceso localizado y acelerado de esclerosis dentinaria, la que se produce normalmente en el envejecimiento fisiológico del diente (Bjorndal, 2002). Cuando la lesión alcanza la unión amelo-dentinaria, recién comienza la desmineralización de la dentina. Ésta se lleva a cabo sin la presencia de bacterias en los túbulos dentinarios (Pashley, 1985), sin embargo una vez que el esmalte es cavitado, las bacterias y componentes bacterianos logran invadir la dentina. Esta invasión bacteriana produce un cambio drástico en la ubicación y densidad de las CDs (Sakurai et al., 1999) La respuesta temprana a la progresión de caries también evidencia cambios en la organización y distribución de las fibras nerviosas. Tanto en caries moderadas como en caries profundas, las CDs y las fibras nerviosas aumentan su concentración en la zona adyacente a los túbulos dentinarios afectados (Yoshida et al., 1996); sin embargo en caries iniciales este aumento de CDs y fibras nerviosas sería mucho más evidente (Sakurai et al., 1999). Esta información la hemos podido corroborar al observar las muestras que presentan lesión inicial de caries, en donde se observó un marcado aumento en la densidad de CDs (anti HLA-DR) y de fibras nerviosas (Tubulina Beta III y NF-200) adyacentes a los túbulos infectados (Fig. 6, 7 y 9).

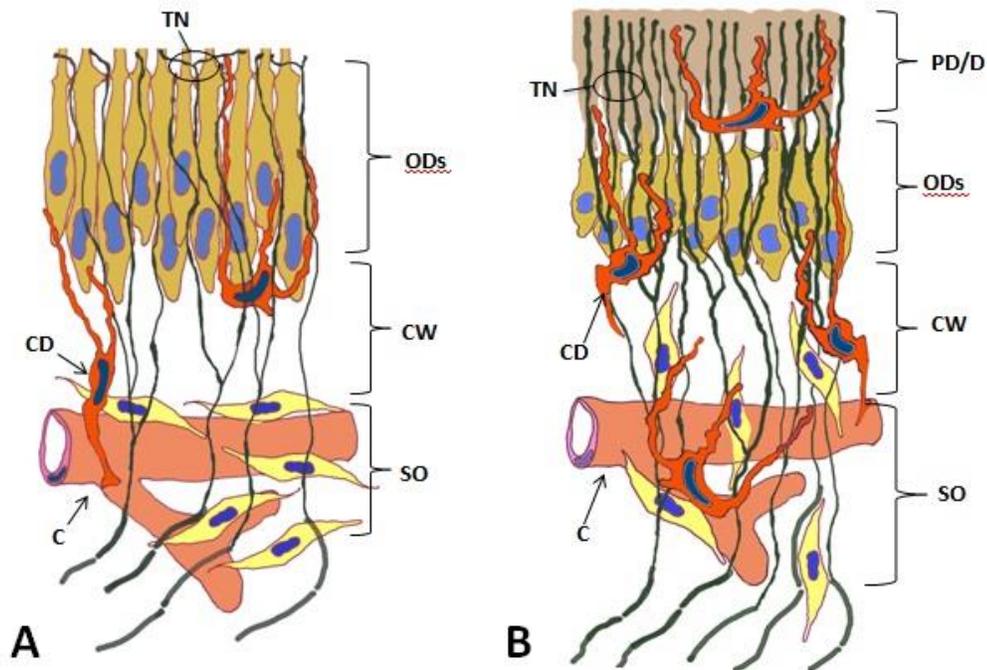


Figura 9 Esquema representativo del CDP, en donde se ilustra la ubicación de las células dendríticas y terminales nerviosos en un diente sano y en uno afectado por lesión. **A.** Diente sano; las células dendríticas inmaduras (CDs) proyectan sus procesos a través de la capa odontoblástica (ODs) en donde también se observan los terminales nerviosos (TN). A nivel de la capa subodontoblástica (SO) encontramos capilares sanguíneos. **B.** Diente con lesión dentinaria; en donde terminales nerviosos (TN) junto con células dendríticas maduras (CD) se encuentran localizados en la zona de la preentina/dentina (PD/D) adyacente a los túbulos infectados, aumentadas en número y en densidad.

En lesiones activas más avanzadas además del aumento de la densidad de CDs y de fibras nerviosas hemos podido observar la formación de dentina reaccional, que se caracteriza por tener una apariencia irregular de penachos de colágeno y una marcada desorganización de la capa odontoblástica (Fig. 5). Además sus túbulos dentinarios son irregulares y hay presencia de distintos focos de mineralización. Esta dentinogénesis reaccional podría ser secretada por los odontoblastos en respuesta a la liberación del TGF- β desde la matriz dentinaria durante la desmineralización (Finkelman et al., 1990). Estudios realizados por Sakurai y colaboradores (Sakurai et al., 1999) mostraron que caries profundas son frecuentemente acompañadas con la formación de dentina reparativa, la que al parecer influye en la densidad, cantidad y calidad de fibras nerviosas y en la distribución de CDs. En lesiones cariosas, los elementos neuronales exhiben generalmente una mayor densidad a lo largo de la interfase dentino-pulpar que se encuentra en relación a la lesión, incluso cuando ya se ha formado una importante cantidad de dentina reparativa. Se ha observado rara vez la presencia de fibras nerviosas en la zona mineralizada de la dentina reparativa,

sin embargo en la zona de la predentina subyacente a la lesión, numerosas fibras nerviosas han podido ser observadas (Sakurai et al., 1999).

En cuanto a las CDs, podemos decir que están localizadas en la mayoría de los tejidos, y que son capaces de capturar y procesar antígenos mediante el MHC clase II que se encuentra en su superficie. Según Banchereau y Steinman (1998), las CDs en el proceso de inmunidad cumplen las siguientes funciones:

- * Son Centinelas in vivo: su distribución en la capa odontoblástica optimiza la captura del antígeno. Luego migran hacia los órganos linfáticos activando la selección clonal de células T CD4⁺ y CD8⁺.
- * Iniciadoras de la respuesta inmune: por medio de la estimulación de linfocitos B y T.
- * Potencial para estimular células T: un pequeño número de CDs y bajos niveles de antígenos tienen la capacidad de inducir fuertes respuestas de células T.
- * Inductores de tolerancia: supresión de timocitos autoreactivos y anergia de las células T maduras.

Dentro de las funciones de las CDs, dos son las más relevantes: la primera es ser presentadora de antígeno, y la segunda, cuando ya es una célula madura, es estimular las células T. Son necesarias solo un poco de CDs para provocar una fuerte respuesta de las células T; de hecho es necesaria sólo una CD para activar de 100 a 3000 células T; ésta observación introduce la noción de que las CDs son especialistas en iniciar la respuesta inmune (Banchereau and Steinman, 1998). De hecho las CDs son capaces de reconocer antígenos en concentraciones de nanopartículas, por lo que podemos recalcar que son las células presentadoras de antígenos por naturaleza.

Es obvio que la cantidad de información aún es insuficiente para comprender como el sistema inmune del CDP logra comunicarse para montar una defensa, evitar grandes daños y lograr una reparación del mismo. La mayoría de los informes en esta área son descriptivos, y la información sobre los mecanismos de regulación moleculares en cuanto a las respuestas celulares es limitada.

En conclusión podemos decir que la pulpa dental está fuertemente equipada para lograr una respuesta inmune innata frente a la invasión bacteriana; si ésta respuesta no es suficiente para detener el daño que producen los metabolitos bacterianos, se produce la activación de la inmunidad adaptativa, la inflamación y la presencia de edema, que es el resultado del aumento de la presión pulpar. Por otra parte, la

experiencia clínica indica que la inflamación pulpar puede detenerse y volver a condiciones normales si los antígenos son eliminados antes de que invadan la zona pulpar, por lo que el conocimiento de los mecanismos inmunológicos que ocurren en la pulpa es fundamental para el diagnóstico de patologías pulpares y periapicales, y así realizar tratamientos efectivos y duraderos.

En conclusión, el presente estudio demostró que la formación de dentina reaccional durante la progresión de la caries dental, constituye una respuesta de inmuno-defensa contra patógenos, y es un mecanismo fundamental en el proceso reparativo dentino-pulpar.

La morfología del Complejo Dentino-Pulpar en dientes sanos, se caracteriza por poseer una estructura regular y ordenada. Las células odontoblásticas que lo conforman, están unidas entre sí mediante complejos de unión y distribuidos en una empalizada odontoblástica de carácter regular. Además posee células dendríticas en la región para-odontoblástica, en donde éstas extienden sus prolongaciones hacia la predentina, esto con el fin de poder actuar como células centinelas y así detectar antígenos e iniciar una respuesta inmune contra ellos. En contraste, pudimos observar que el Complejo Dentino-Pulpar de dientes con lesión dentinaria, presenta una desorganización de la empalizada odontoblástica en respuesta a los patógenos bacterianos. Esta respuesta es la secreción de dentina reaccional que se caracteriza por poseer forma de penachos de fibras colágenas. Los túbulos dentinarios tienen una conformación irregular y las células odontoblásticas se observan más separadas entre sí.

La formación de dentina reaccional se acompaña de un aumento de la densidad de las células dendríticas en donde éstas extienden sus prolongaciones citoplasmáticas más allá de la empalizada odontoblástica, llegando a la interfase predentina/dentina. Esta respuesta confirma el rol de las células dendríticas en el reconocimiento de antígenos y como mediadoras de la respuesta inmuno-defensiva.

Junto con el aumento de células dendríticas ocurre una respuesta neurogénica, en donde hay un incremento significativo de terminales nerviosos que se localizan adyacentes a los túbulos dentinarios afectados. Esta interacción nos permite sugerir que la respuesta neuro-inmune tiene un rol fundamental en la modulación de la respuesta inmuno-defensiva del Complejo Dentino-Pulpar durante los eventos tempranos de la caries dentinaria.

Es obvio que aún falta mucha información para poder llegar a comprender cómo realmente ocurre la interacción de células dendríticas e inflamación neurogénica y cómo son capaces de mediar una respuesta tan elaborada como es la secreción de dentina reaccional a nivel del Complejo Dentino-Pulpar. Es por esto que sugerimos que se realicen más estudios en esta línea de investigación.

Para próximos estudios sugerimos complementar la obtención de muestras con un registro radiográfico y sintomatológico del diente, con el fin de obtener una visión global de la relación existente entre la clínica, la histopatología y el examen radiográfico. Además sugerimos realizar este tipo de investigación con otro grupo etario y así poder comparar la respuesta inmuno-defensiva del Complejo Dentino-Pulpar a distintas edades del individuo.

Finalmente podemos sugerir a la universidad la creación de un protocolo de donación de muestras, ya que éstas poseen una fuente importante de información que no es aprovechada.

La caries dentinaria constituye un proceso bacteriano invasivo y de avance progresivo a través de los túbulos dentinarios. Las bacterias que invaden la dentina son capaces de generar respuestas defensivas a nivel del Complejo Dentino-Pulpar (CDP), donde odontoblastos, células dendríticas (CDs) y terminales nerviosos son capaces de reconocer componentes bacterianos desencadenando una respuesta inmune-inflamatoria, fenómeno que ocurre a nivel de la dentina reaccional. En el presente estudio se propuso analizar la respuesta defensiva del CDP en dientes con caries dentinaria con distintos índices de progresión. Para éste propósito 10 terceros molares obtenidos de pacientes adultos jóvenes con un promedio de edad de 23.5 años (3 molares sanos y 7 con distinta actividad cariogénica, fueron fijados, desmineralizados y crio-secciones coronarias de las muestras fueron marcadas mediante inmunohistoquímica para CDs (anti HLA-DR) y dos marcadores para fibras nerviosas (anti-neurofilamentos NF-200 y anti-tubulina BIII), las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal. La respuesta temprana a la progresión de caries evidencia cambios en componentes del CDP, evidenciando un aumento de CDs e inflamación neurogénica. Las CDs aumentan su presencia en la zona adyacente a los túbulos dentinarios afectados en lesiones tempranas y en lesiones avanzadas. Junto al aumento de células dendríticas ocurre una respuesta neurogénica, en donde hay un incremento significativo de terminales nerviosos que se localizan adyacentes a los túbulos dentinarios afectados. Esta interacción nos permite sugerir que la respuesta neuro-inmune tiene un rol fundamental en la modulación de la respuesta inmuno-defensiva del CDP durante los eventos tempranos de la caries dentinaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, B., COUBLE, M. L., MAGLOIRE, H. & BLEICHER, F. 2000. Characterization and gene expression of high conductance calcium-activated potassium channels displaying mechanosensitivity in human odontoblasts. *J Biol Chem*, 275, 25556-61.
- ARANA-CHAVEZ, V. E. & MASSA, L. F. 2004. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 1367-73.
- ARTESE, L., RUBINI, C., FERRERO, G., FIORONI, M., SANTINELLI, A. & PIATTELLI, A. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod*, 28, 20-3.
- BAUME, L. J. 1980. The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monogr Oral Sci*, 8, 1-220.
- BERGENHOLTZ, G. 1981. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod*, 7, 100-4.
- BJORN DAL, L. 2001. Presence or absence of tertiary dentinogenesis in relation to caries progression. *Adv Dent Res*, 15, 80-3.
- BJORN DAL, L. & MJOR, I. A. 2001. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. *Quintessence Int*, 32, 717-36.
- BOSKEY, A. L. 2003. Biomineralization: an overview. *Connect Tissue Res*, 44 Suppl 1, 5-9.
- BRANNSTROM, M. 1986. The hydrodynamic theory of dentinal pain: sensation in preparations, caries, and the dentinal crack syndrome. *J Endod*, 12, 453-7.
- BYERS, M. R., WHEELER, E. F. & BOTHWELL, M. 1992. Altered expression of NGF and P75 NGF-receptor by fibroblasts of injured teeth precedes sensory nerve sprouting. *Growth Factors*, 6, 41-52.
- CALLAND, J. W., HARRIS, S. E. & CARNES, D. L., JR. 1997. Human pulp cells respond to calcitonin gene-related peptide in vitro. *J Endod*, 23, 485-9.
- CAVIEDES-BUCHELI, J., CAMARGO-BELTRAN, C., GOMEZ-LA-ROTTA, A. M., MORENO, S. C., ABELLO, G. C. & GONZALEZ-ESCOBAR, J. M. 2004. Expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in irreversible acute pulpitis. *J Endod*, 30, 201-4.
- CAVIEDES-BUCHELI, J., MUNOZ, H. R., AZUERO-HOLGUIN, M. M. & ULATE, E. 2008. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*, 34, 773-88.
- COUVE, E. 1986. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol*, 31, 643-51.
- COUVE, E., OSORIO, R. & SCHMACHTENBERG, O. 2013. The Amazing Odontoblast: Activity, Autophagy, and Aging. *J Dent Res*.
- COUVE, E. & SCHMACHTENBERG, O. 2011. Autophagic activity and aging in human odontoblasts. *J Dent Res*, 90, 523-8.
- CHIEGO, D. J., JR. 1992. An ultrastructural and autoradiographic analysis of primary and replacement odontoblasts following cavity preparation and wound healing in the rat molar. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1, 243-56.

- FARGES, J. C., KELLER, J. F., CARROUEL, F., DURAND, S. H., ROMEAS, A., BLEICHER, F., LEBECQUE, S. & STAQUET, M. J. 2009. Odontoblasts in the dental pulp immune response. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 312B, 425-36.
- FEHRENBACHER, J. C., SUN, X. X., LOCKE, E. E., HENRY, M. A. & HARGREAVES, K. M. 2009. Capsaicin-evoked iCGRP release from human dental pulp: a model system for the study of peripheral neuropeptide secretion in normal healthy tissue. *Pain*, 144, 253-61.
- FERRARA, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611.
- FINKELMAN, R. D., MOHAN, S., JENNINGS, J. C., TAYLOR, A. K., JEPSEN, S. & BAYLINK, D. J. 1990. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res*, 5, 717-23.
- FUKS, A. B. 2000. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. *Dent Clin North Am*, 44, 571-96, vii.
- GAMONAL, J. A., LOPEZ, N. J. & ARANDA, W. 1998. Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. *Int Dent J*, 48, 96-103.
- GERDES, J. M., DAVIS, E. E. & KATSANIS, N. 2009. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*, 137, 32-45.
- GOLDBERG, M. & SMITH, A. J. 2004. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 13-27.
- GOMES, B. P., PINHEIRO, E. T., GADE-NETO, C. R., SOUSA, E. L., FERRAZ, C. C., ZAIA, A. A., TEIXEIRA, F. B. & SOUZA-FILHO, F. J. 2004. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*, 19, 71-6.
- HAHN, C. L. & LIEWEHR, F. R. 2007a. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod*, 33, 643-51.
- HAHN, C. L. & LIEWEHR, F. R. 2007b. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod*, 33, 213-9.
- HAMA, T., KUSHIMA, Y., MIYAMOTO, M., KUBOTA, M., TAKEI, N. & HATANAKA, H. 1991. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. *Neuroscience*, 40, 445-52.
- HEALTH RESEARCH CLASSIFICATION SYSTEM, <http://www.hrcsonline.net/>
- HORST, O. V., HORST, J. A., SAMUDRALA, R. & DALE, B. A. 2011. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunol*, 12, 9.
- IKEDA, H. & SUDA, H. 2013. Odontoblastic syncytium through electrical coupling in the human dental pulp. *J Dent Res*, 92, 371-5.
- JONTELL, M., OKIJI, T., DAHLGREN, U. & BERGENHOLTZ, G. 1998. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 179-200.
- KAWASAKI, K., TANAKA, S. & ISHIKAWA, T. 1977. On the incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labeling. *J Anat*, 123, 427-36.
- KEYES, P. H. 1960. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol*, 1, 304-20.
- KILLOUGH, S. A., LUNDY, F. T. & IRWIN, C. R. 2009. Substance P expression by human dental pulp fibroblasts: a potential role in neurogenic inflammation. *J Endod*, 35, 73-7.

- LINDE, A. 1989. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec*, 224, 154-66.
- LINDE, A. & GOLDBERG, M. 1993. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4, 679-728.
- LINDHOLM, D., HEUMANN, R., HENGERER, B. & THOENEN, H. 1988. Interleukin 1 increases stability and transcription of mRNA encoding nerve growth factor in cultured rat fibroblasts. *J Biol Chem*, 263, 16348-51.
- LINDHOLM, D., HEUMANN, R., MEYER, M. & THOENEN, H. 1987. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*, 330, 658-9.
- MAEDA, T., SATO, O., IWANAGA, T. & TAKANO, Y. 1992. Immunocytochemical localization of nerve growth factor receptor (NGFR) in human teeth. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1, 557-62.
- MAGLOIRE, H., LESAGE, F., COUBLE, M. L., LAZDUNSKI, M. & BLEICHER, F. 2003. Expression and localization of TREK-1 K⁺ channels in human odontoblasts. *J Dent Res*, 82, 542-5.
- MARSH, P. D. 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, 8, 263-71.
- MJOR, I. A. 2001. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 5: Clinical management and tissue changes associated with wear and trauma. *Quintessence Int*, 32, 771-88.
- MJOR, I. A., SVEEN, O. B. & HEYERAAS, K. J. 2001. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int*, 32, 427-46.
- NAFTEL, J. P., SHAMSSOOLARI, A. & THUESON, R. K. 1992. Immunoassay evidence for a role of nerve growth factor in development of dental innervation. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1, 543-9.
- NAKANISHI, T., MATSUO, T. & EBISU, S. 1995. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod*, 21, 131-6.
- OHSHIMA, H., NAKAKURA-OHSHIMA, K., TAKEUCHI, K., HOSHINO, M., TAKANO, Y. & MAEDA, T. 2003. Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells. *Microsc Res Tech*, 60, 483-90.
- PANOPOULOS, P. 1992. Factors influencing the occurrence of pain in carious teeth. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1, 155-60.
- PASHLEY, D. H. 1985. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res*, 64 Spec No, 613-20.
- PITTS, NB., & EKSTRAND, KR. 2012. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) – methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2013; 41: e41–e52.
- REICHERT, F., LEVITZKY, R. & ROTSHENKER, S. 1996. Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. *Eur J Neurosci*, 8, 530-5.
- RODD, H. D. & BOISSONADE, F. M. 2000. Substance P expression in human tooth pulp in relation to caries and pain experience. *Eur J Oral Sci*, 108, 467-74.

- SAKURAI, K., OKIJI, T. & SUDA, H. 1999. Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: an immunohistochemical study. *J Dent Res*, 78, 1596-608.
- SCHILKE, R., LISSON, J. A., BAUSS, O. & GEURTSSEN, W. 2000. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*, 45, 355-61.
- SENGER, D. R., GALLI, S. J., DVORAK, A. M., PERRUZZI, C. A., HARVEY, V. S. & DVORAK, H. F. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983-5.
- SMITH, A. J., CASSIDY, N., PERRY, H., BEGUE-KIRN, C., RUCH, J. V. & LESOT, H. 1995. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*, 39, 273-80.
- SMITH, A. J., TOBIAS, R. S., CASSIDY, N., PLANT, C. G., BROWNE, R. M., BEGUE-KIRN, C., RUCH, J. V. & LESOT, H. 1994. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch Oral Biol*, 39, 13-22.
- TAKAHASHI, N., SAITO, K., SCHACHTELE, C. F. & YAMADA, T. 1997. Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol*, 12, 323-8.
- TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-20.
- TJÄDERHANE, L., MESTERTON & ILVESARO, J. 2009. Cell membrane polarity of mature human odontoblasts. *Int Endod J*.
- TROWBRIDGE, H. & DANIELS, T. 1977. Abnormal immune response to infection of the dental pulp. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 43, 902-9.
- TSAKOS, G. 2011. Inequalities in oral health of the elderly: rising to the public health challenge? *J Dent Res*, 90, 689-90.
- TURNER, D. F. 1992. Immediate physiological response of odontoblasts. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1, 55-63.
- UEDA, L. & MATSUSHIMA, K. 2001. Stimulation of plasminogen activator activity and matrix metalloproteinases of human dental pulp-derived cells by tumor necrosis factor-alpha. *J Endod*, 27, 175-9.
- VEERAYUTTHWILAI, O., BYERS, M. R., PHAM, T. T., DARVEAU, R. P. & DALE, B. A. 2007. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol*, 22, 5-13.
- VONGSAVAN, N. & MATTHEWS, B. 1992. Fluid flow through cat dentine in vivo. *Arch Oral Biol*, 37, 175-85.
- YOSHIBA, N., YOSHIBA, K., NAKAMURA, H., IWAKU, M. & OZAWA, H. 1996. Immunohistochemical localization of HLA-DR-positive cells in unerupted and erupted normal and carious human teeth. *J Dent Res*, 75, 1585-9.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONACIÓN DE DIENTE

Donación al Banco de Muestras del LabME

(BM-LabME)

El Laboratorio de Microscopía Electrónica (LabME), Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, realiza estudios en dientes sanos y dañados, con el propósito de alcanzar una mejor comprensión de la biología dental normal y patológica. Los estudios están orientados a entender funciones celulares normales y capacidades de respuesta celular en condiciones de lesiones de caries.

Para estos propósitos el LabME mantiene un Banco de Muestras (BM-LabME) de dientes extraídos por indicaciones clínicas y aportados voluntariamente. Todas las muestras recepcionadas requieren del Consentimiento Informado escrito u oral del donante.

Las muestras recibidas en el BM-LabME son procesadas en forma anónima, conservando registros de: N° de Muestra, Fecha, Edad y Sexo del Donante. Además de señalar indicaciones de carácter clínico relevante, como sintomatología y diagnóstico consignados por el profesional responsable tratante. Toda la información es confidencial. Las muestras se conservan fijadas y forman parte de estudio de biología dental.

Investigador Responsable del BM-LabME
Eduardo Couve Montané (Cirujano-Dentista)
Profesor Titular
Laboratorio de Microscopía Electrónica (LabME)
Departamento de Biología y Cs. Ambientales
Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso
32-250-8077
Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONACIÓN DE DIENTE

Manifiesto haber sido informado y comprendo que el (los) diente (s) que he aceptado donar al banco de muestras LabME de la Universidad de Valparaíso, será(n) utilizado(s) en estudios que ayudarán a comprender mejor cómo funcionan las células de dientes sanos y dañados. Acepto que se registre mi edad y sexo, entendiéndolo que son datos confidenciales e importantes para la investigación:

Fecha:

N° Muestra

Diente:

Edad:

Información Clínica Relevante:

Nombre del Donante:

RUT:

Firma: