



CAMBIOS VASCULARES EN PULPA DENTAL DE DIENTES
TEMPORALES HUMANOS ASOCIADOS AL PROCESO DE
REABSORCIÓN RADICULAR FISIOLÓGICO

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Daniela Encalada
Diego Escudero
Macarena Orellana

Docente Guía: Dr. Eduardo Couve
Facultad de Ciencias

Valparaíso, Chile

2018

Quiero agradecer a mi familia, en particular a mis padres, quienes estuvieron apoyándome en todo momento, no dejando que me rindiera nunca. A mis amigas, Ita, Coni, Pati y Pau, que han estado conmigo los últimos años compartiendo alegrías y situaciones difíciles. Al Dr Couve y la Dra Suzuki, quienes nos ayudaron y entregaron las herramientas necesarias para llevar a cabo nuestra tesis. Y para finalizar, a cada persona que estuvo presente de alguna manera durante este proceso, ya sea con una palabra de aliento, un abrazo o una risa.

Daniela Encalada Guerrero.

En esta Tesis que marca el fin de mi carrera universitaria, quiero agradecer a toda mi familia, principalmente a mis padres Luisa y Ricardo, que compartieron conmigo los mejores momentos e hicieron todo lo posible (y lo imposible) para que yo saliera adelante en los peores; a mis Tíos Juan y Marcela, mis primos y mis hermanos que me apoyaron siempre con su compañía, un favor, una palabra de aliento, un consejo o un abrazo.

A mis amigos y personas especiales que vivieron el día a día a mi lado y que junto a mi familia hicieron de estos años los mejores de mi vida.

Y por último al estupendo grupo que hizo posible este trabajo, mis amigas Macarena y Daniela; la Dra. Kiyoko Suzuki que con su disposición, simpatía y capacidad nos apoyó en todas, y el Dr. Eduardo Couve, por ser nuestro gran guía, compartir su sabiduría, su tiempo, su café, sus galletas y principalmente su amabilidad, la cual estuvo presente desde el primer momento.

Diego Escudero Burgos.

A mi madre, quien estuvo en cada momento difícil, cada momento que fue necesario para llegar hasta acá

A mi padre, quien se ha esmerado en que pueda cumplir todos mis sueños

A mí querido amigo Marco, por sus consejos y apoyo incondicional

A nuestro mentor Dr. Eduardo Couve y Dra. Kiyoko Suzuki por su enorme colaboración

Y por último, a mi hermosa Pate por escuchar cada palabra con mucha atención.

Macarena Orellana Vásquez.

Índice

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	2
2.1. Dientes temporales	2
2.1.1. Generalidades	2
2.1.2. Odontogénesis y formación Complejo Dentino-Pulpar	2
2.2 Pulpa Dental	5
2.2.1. Componente Vascular	6
2.2.2. Inervación pulpar.....	12
2.2.3. Células inmunocompetentes.....	14
2.3 Reabsorción Radicular Fisiológica	15
2.3.1. Teorías de Reabsorción	15
2.3.2. Relación entre reabsorción fisiológica y células de la pulpa	16
3. Objetivos	18
4. Hipótesis	18
5. Materiales y Métodos	19
5.1 Tipo de Estudio	19
5.2 Universo	19
5.3 Criterios de Inclusión y Exclusión de Paciente	19
5.4 Criterios de Inclusión y Exclusión de las Muestras	20
5.5 Muestras	20
5.6 Definición de las variables a estudiar	21
5.7 Proceso de Recolección y Procesamiento de la Información	22
5.8 Cortes, Inmunohistoquímica y Microscopía Confocal	23
5.9 Determinación de Etapas de RRF	24
6. Resultados	26
7. Discusión	32
8. Conclusión	33
9. Sugerencias	34
10. Resumen	35
11. Referencias	36

Introducción

La dentición humana presenta un carácter difiodonte, donde los dientes temporales (transicionales) son reemplazados por dientes permanentes, permitiendo consolidar una dentición de larga duración en el adulto. Los dientes temporales sufren un proceso de reabsorción radicular fisiológica (RRF), generando un espacio para permitir que el germen del diente definitivo se desarrolle y tome lugar para su posterior erupción.

Los mecanismos y factores involucrados en la RRF de la dentición temporal aún no están del todo comprendidos. En los últimos años el conocimiento respecto a la biología de la reabsorción dental ha aumentado y lo que se ha descrito es que existen interacciones entre Osteoclastos, Osteoblastos, Folículo dental y células del retículo estrellado demostrando una interacción compleja entre genes reguladores del proceso^{1, 2}.

Existen una serie de cambios histológicos pulpares que ocurren en el diente temporal a raíz de este fenómeno. Los cambios asociados a la inervación e infiltrado inflamatorio se encuentran descritos^{3, 4} pero, con respecto a vasculatura pulpar, tanto sanguínea como linfática, no existe suficiente información que permita crear una visión general de lo que ocurre durante este proceso.

Se ha descrito previamente a la pulpa dental de dientes temporales sanos con numerosos capilares distribuidos equitativamente en las regiones periféricas con pequeñas arteriolas en la zona central. Estas arteriolas también se distribuyen de forma paralela al plexo de Raschkow. En la zona coronal media de la pulpa, hay numerosas arteriolas de calibre medio y vénulas de paredes delgadas. Hacia la región radicular de la pulpa se observa en general un aumento en el calibre de los vasos⁵. Otro estudio habla de que existen cambios vasculares profundos en dientes con más de un tercio de reabsorción en sus raíces. Estos cambios corresponderían a un aumento en el calibre de vasos tanto pequeños como grandes, a la vez que hay un aumento en el número de capilares⁶.

El objetivo de este estudio es caracterizar los cambios vasculares mediante análisis inmunohistoquímico comparativo y microscopía confocal con el propósito de lograr una mejor comprensión del proceso de RRF en dientes humanos temporales, lo cual permite interpretar el fenómeno reabsortivo y extrapolar sus factores a escenarios patológicos que afecten la dentición primaria.

Marco teórico

2.1 Dientes temporales

2.1.1 Generalidades

Los seres humanos se caracterizan por tener dos tipos de denticiones, una temporal y una permanente. La primera dentición consta de 20 piezas, llamadas dientes temporales o deciduos. El desarrollo de estos dientes comienza desde la etapa gestacional y su erupción ocurre entre el primer y segundo año de vida. Son de menor tamaño y raíces más cortas que los permanentes, de corona redondeada y forma acintada, con una cámara pulpar de gran tamaño y conductos radiculares más amplios. La pulpa dental de dientes temporales presenta zonas topográficas idénticas a los dientes permanentes, pero estas no se encuentran claramente diferenciadas⁷.

2.1.2 Odontogénesis y formación Complejo Dentino-Pulpar

Odontogénesis

El desarrollo de ambas denticiones, temporal y permanente, compromete el proceso de odontogénesis⁷. Durante el proceso de formación dental, la interacción epitelio-mesenquimática determinan que el componente epitelial (ectoderma) dé origen a ameloblastos y el ectomesénquima da origen a odontoblastos y pulpa dental⁸.

La primera manifestación corresponde a la diferenciación a partir del ectoderma de la lámina dental, la cual presenta una actividad proliferativa que lleva a la formación de crecimientos epiteliales (epitelio odontogénico) que darán lugar a la formación de los dientes⁹.

Etapas de la formación dental

La formación de los dientes ha sido caracterizada a través de diversas etapas que comprometen cambios morfogénicos y de desarrollo relevantes (Fig. 1).

A. Brote o yema dentaria

Se caracteriza por la invaginación del epitelio en el ectomesénquima¹⁰ subyacente, en el que las células se agrupan estrechamente alrededor del botón epitelial⁸ proceso llamado condensación del ectomesénquima⁹.

B. Casquete

Esta etapa se caracteriza por una concavidad del epitelio que envuelve parcialmente al mesénquima subyacente⁸. De esta forma se originan dos estructuras, la papila dental, que dará origen al complejo dentino-pulpar; y el órgano del esmalte, que se encuentra encerrando a la papila dental, dando origen al esmalte. Esta se divide en epitelio dental externo, epitelio dental interno y retículo estrellado⁷.

- a) Epitelio externo: ubicado en la periferia del casquete, en contacto con el mesénquima peridental⁸. Se encuentra unido a la lámina dental por una porción de epitelio llamada pedículo epitelial.
- b) Epitelio interno: formado por células que son precursoras de los ameloblastos y que se encuentran separadas de la futura pulpa dental por una membrana basal.
- c) Retículo estrellado: capa intermedia del órgano del esmalte presente en el transporte transcelular e intercelular de precursores de proteínas del esmalte, y en la provisión de energía⁹.

Existe la formación de una cuarta estructura llamada nudo del esmalte, este corresponde a una estructura transitoria situada en el centro del órgano del esmalte que es el encargado de controlar la morfogénesis de las cúspides dentales y determinará la forma final del diente. Los nudos del esmalte dentro del epitelio se describen como centros organizadores compuestos por grupos de células que secretan señales de morfogénesis. Además presentan un papel en la regulación del tamaño y la forma de los dientes⁸.

C. Campana

Durante esta etapa la corona logrará su morfología final. Las células encargadas de la formación de tejido duro adquieren su fenotipo distintivo. En la unión del epitelio interno con el externo se describe una zona llamada unión cervical.

Algunas células entre en epitelio interno y retículo estrellado, forman el llamado estrato intermedio⁸ que se encuentra involucrado, al igual que el retículo estrellado, en el transporte de proteínas precursoras del esmalte.

En la etapa de campana avanzada, se produce un cambio de polaridad, donde ocurre la diferenciación de ameloblastos jóvenes a ameloblastos maduros o secretores. La diferenciación de odontoblastos se realiza a partir de células de la papila dental situadas frente al epitelio interno, estas comienzan a sintetizar fibras colágenas y proteínas propias de la dentina. Una vez formada la dentina, la porción central de la papila se transforma en la pulpa dental. Es aquí donde se fija la forma final de la corona¹¹.

D. Folículo dentario

Esta etapa comienza cuando se identifica las zonas de las futuras cúspides o bordes incisales⁷. El folículo dental, da lugar a los tejidos dentales de soporte como el cemento radicular, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Por esta razón, es que está involucrado en la formación de la raíz y la erupción de los dientes⁸.

El órgano del esmalte, la papila dental y el folículo dental forman el órgano dental o germen dental¹².

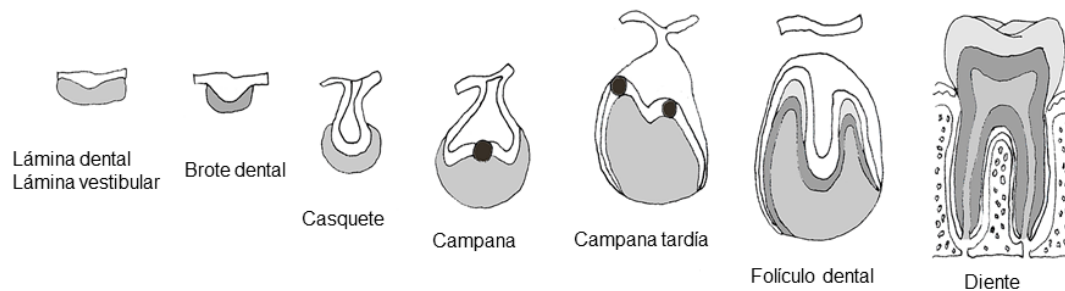


Fig. 1. Modelo Clásico de Odontogénesis¹¹.

Complejo Dentino-Pulpar

Se habla de una sola estructura morfofuncional, en donde la dentina y la pulpa se relacionan como tejidos interconectados, en el cual existe una interacción funcional entre los componentes estructurales¹³.

La composición de la dentina puede describirse de dos maneras; la dentina extracelular consiste en una matriz extracelular mineralizada y la dentina funcional, que incluye predentina¹⁴ y túbulos dentinarios, que contienen prolongaciones de odontoblastos, fluidos y ocasionalmente terminaciones nerviosas^{11, 13}.

A lo largo de la vida del diente, existe más de un tipo de dentina presente. La dentina primaria, que constituye a la mayor parte de la masa de dentina y corresponde a la producida durante la formación del diente. Una vez que el diente se vuelve funcional, los odontoblastos continúan formando dentina secundaria en la zona cercana a la pulpa de la dentina existente, a un ritmo más reducido. Puede existir la formación de una dentina terciaria en respuesta a estímulos externos variables, como irritantes químicos, caries, procedimientos de restauración, atrición u otro trauma^{15, 16}.

La pulpa dental se encuentra dividida topográficamente en 4 zonas:

- 1.- **Zona odontoblástica:** constituida principalmente por Odontoblastos, algunos axones amielínicos terminales y capilares sanguíneos.
- 2.- **Zona acelular de Weil:** Área con pocos elementos celulares, se encuentra el plexo subodontoblástico de Raschkow.
- 3.- **Zona rica en células o Subodontoblástica:** Bajo la zona acelular de Weil, rica en fibroblastos y células mesenquimáticas.
- 4.- **Zona central:** Tejido conectivo laxo, tronco nervioso y vascular^{7, 17}.

2.2 Pulpa Dental

La pulpa dental es un tejido conectivo laxo no mineralizado prácticamente confinado a una cámara formada por paredes dentinarias rígidas, tanto en la parte coronaria como en la raíz. Es un tejido ampliamente vascularizado e innervado, que contiene además componentes de matriz extracelular y una gran diversidad de tipos celulares, como fibroblastos, células secretoras, células inmunocompetentes y células progenitoras; funcionando conjuntamente en un sistema autorregulado y con funciones altamente específicas.

Se relaciona con la dentina embriológica, histológica y funcionalmente, siendo sus principales funciones:

- 1.- **Formativa:** Produce la dentina que rodea el tejido pulpar.
- 2.- **Protectora:** Se compone de estructuras nerviosas que le otorgan sensibilidad a la dentina, además de estimular reacciones inflamatorias por medio de los odontoblastos frente a la invasión de patógenos a través de los túbulos dentinarios¹⁸.
- 3.- **Nutritiva:** Manteniendo la función de los tejidos y células que la componen.
- 4.- **Reparativa:** En la que es capaz de producir nueva dentina cuando es requerido.

A continuación se describen en profundidad su componente vascular, nervioso e inmunológico.

2.2.1 Componente Vascular

Como se indicó anteriormente, el sistema circulatorio de la pulpa está inserto en tejido conectivo laxo, confinado a su vez por una cámara de tejido rígido mineralizado. La falta de un circuito de circulación colateral y la imposibilidad de expansión tisular exigen implicaciones especiales para su correcta función¹⁹. Las funciones de aporte nutricional, de oxígeno y transporte de moléculas de señalización están a cargo de los vasos sanguíneos; mientras las de drenaje y compensación de los cambios de presión tisular interna están a cargo de los vasos linfáticos pulpares. Sobre todo en la región donde se concentran vasos capilares, ambos funcionan en conjunto para mantener la homeostasis.

Vasos Sanguíneos

La unidad morfológica del sistema vascular es la célula endotelial, que forma el recubrimiento interno de los vasos sanguíneos. Estas células son derivadas desde células troncales del mesodermo que dan forma a células precursoras de hemangioblastos, las que a su vez originan las células troncales hematopoyéticas y los angioblastos, los progenitores de las células endoteliales. Las células sanguíneas y las endoteliales comparten un origen común y se mantienen fuertemente relacionadas entre sí durante la vida adulta.

Las células endoteliales se conectan entre sí y se organizan en estructuras primarias tubulares que derivan en la formación de los vasos sanguíneos del diente en un proceso llamado vasculogénesis. La señalización molecular a cargo del factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF) juega un rol crucial en la vasculogénesis, a través de la inducción de los angioblastos a agruparse en forma de “clusters” y a su migración hacia las estructuras inmaduras para formar los primeros plexos vasculares²⁰. Luego de la organización de estas estructuras primarias, a través de distintas vías de señalización molecular comienza la construcción y organización de la matriz extracelular y la proliferación, migración y reclutamiento de células murales (Pericitos, células de músculo liso, fibroblastos) las cuales contribuyen a un proceso de remodelación y especialización que determina la formación de los distintos tipos vasculares²¹. Si bien la vasculogénesis se describe como un proceso que ocurre en etapas tempranas de formación dentaria, se ha demostrado que permanece por largo tiempo y continúa desarrollándose hasta la vida adulta²². En un estado más avanzado de desarrollo, las células endoteliales comienzan a formar vasos sanguíneos mediante otro proceso llamado angiogénesis.

La angiogénesis aparece en el desarrollo y reparación de tejidos, inflamación crónica y crecimiento de tumores, es un proceso complejo y altamente regulado, donde están envueltos episodios de migración y proliferación de células endoteliales, diferenciación de capilares, secreción de componentes de matriz extracelular y enzimas proteolíticas para degradar tejidos a remodelar, además de la anastomosis (unión) de las nuevas ramas vasculares.

El principal modelo de angiogénesis describe el “brote” de nuevos vasos a partir de otros ya existentes en lo que se denomina “Sprouting” (arborización) (Fig. 2). También se ha desarrollado otro modelo de neo-formación vascular que se conoce como angiogénesis intususceptiva o “no-sprouting”, que consiste en la división de un vaso grande en otros más pequeños²³.

La primera descripción de angiogénesis por brote fue reportada por Ausprunk y Folkman, en 1977²⁴ en investigaciones sobre desarrollo tumoral, donde describían las siguientes etapas: 1.- La membrana basal se degrada localmente en el lado de la vénula post-capilar adyacente al estímulo angiogénico; 2.- La unión entre células endoteliales se debilita y comienza la migración de las mismas hacia el tejido conectivo; 3.- Formación de un cordón sólido de células endoteliales; 4.- Formación del lumen proximal al lugar de migración, los nuevos brotes tubulares se anastomosan para formar loops capilares funcionales, paralelo a la formación de nueva membrana basal y reclutamiento de pericitos. Este fenómeno podía ocurrir inicialmente sin necesidad de división celular, sin embargo el brote vascular sostenido y el crecimiento a gran escala requerían de proliferación.

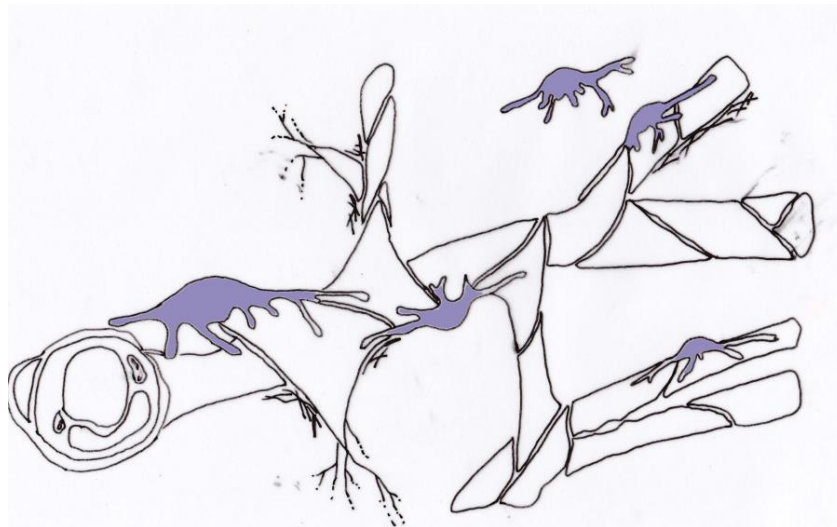


Fig. 2. Angiogénesis por brote, desde el vaso sanguíneo predecesor (izquierda), a los procesos de sprouting (derecha)²⁴.

La estructura de los vasos sanguíneos es morfológicamente diversa, tanto en la red vascular de un solo tejido como entre distintas redes vasculares. Los vasos en general se componen de tres láminas tisulares concéntricas: la túnica íntima, la túnica media, y la túnica adventicia; las cuales se encuentran separadas entre sí por dos barreras formadas por proteínas de matriz extracelular: la membrana limitante interna (separa túnica íntima de media) y la limitante externa (separa túnica media de adventicia). La túnica íntima contiene una capa simple de células endoteliales que constituyen la capa interna de todo vaso. La túnica media usualmente es la más gruesa de las tres en arterias, es la que contiene las células murales, que son células de músculo liso presentes en gran cantidad en vasos de alto calibre y pericitos en capilares. La túnica adventicia, generalmente la más gruesa en venas, conecta el vaso sanguíneo con el tejido conectivo exterior. Se caracteriza por presentar el denominado “*vasa-vasorum*”, un circuito de capilares externos que otorga soporte nutricional y de oxígeno a la capa vascular más distante del lumen.

Esta estructura genérica cambia en los distintos tipos de vasos sanguíneos para cumplir a cabalidad sus roles necesarios para preservar la homeostasis²⁵. El endotelio de arterias y venas forma una monocapa continua, mientras que en capilares puede ser continua, fenestrada o discontinua, dependiendo de las funciones que requiera. El endotelio fenestrado se encuentra en tejidos involucrados con secreción y filtración, incluyendo glándulas exocrinas y endocrinas, glomérulo renal y mucosa intestinal. El endotelio discontinuo es característico de lechos vasculares sinusoides encontrados en hígado y médula ósea, permitiendo el contacto directo del flujo sanguíneo con estructuras subendoteliales²⁶.

La pulpa dental es un tejido altamente vascularizado que comprende arteriolas pre-capilares, capilares, vénulas post-capilares y vénulas musculares. Arteriolas de mayor diámetro entran al diente a través del foramen apical y de las foraminas, subiendo hasta la región coronal, ramificándose continuamente en su ruta y termina en un denso plexo capilar subodontoblástico, donde los capilares periféricos pueden acercarse a los odontoblastos y alterar el endotelio a su forma fenestrada satisfaciendo los requerimientos nutricionales de los odontoblastos, y alejándose de ellos hasta el plexo capilar cuando la actividad odontoblástica disminuye²⁷. En pulpa dental de dientes temporales, también se observa una distribución vascular donde los capilares se ubican periféricamente, mientras que pequeñas arteriolas se ubican en una porción más central, situándose algunas de manera paralela al plexo nervioso subodontoblástico. La diferencia más evidente entre la arquitectura vascular de dientes temporales frente a la de dientes definitivos es la mayor cantidad y densidad de pequeños vasos sanguíneos, definiendo la pulpa dental decidua como un tejido aún más vascularizado⁵.

Células murales: La heterogeneidad en morfología se asocia a diversidad en función. Las células murales son esenciales en la maduración de las estructuras tubulares formadas por células endoteliales a vasos sanguíneos, y determinan funciones para determinados tipos celulares. Las células murales presentes en los vasos de la pulpa dental son principalmente las células de músculo liso (vSMC) y los pericitos.

Las paredes de los vasos sanguíneos de alto calibre contienen mayormente vSMCs, esenciales para la estabilidad vascular, la mantención de su tono muscular y la regulación del flujo sanguíneo²⁸.

Los capilares, arteriolas precapilares, vénulas postcapilares están recubiertas en mayor cantidad por pericitos. Estos hacen contacto con el endotelio a través de procesos citoplasmáticos, comparten y co-producen una membrana basal con las células endoteliales. Juegan un rol importante para regular la estabilidad del vaso, el transporte transendotelial de metabolitos, la mantención del tono basal vascular, regulación del flujo sanguíneo a través de su función contráctil y control de la proliferación y diferenciación de los tipos vasculares²⁹⁻³¹. Además, existe evidencia que relaciona fuertemente los pericitos con células troncales de origen mesenquimático, debido a su localización perivascular y capacidad de diferenciación a otros tipos celulares, como adipocitos y células musculares^{31, 32}. Se han realizado múltiples estudios in vivo para generar un tipo celular a partir del otro con resultados satisfactorios, sin embargo, los autores indican que aún se le puede dar mayor validez y reproductibilidad a estos estudios³³.

La función principal de la vasculatura en la pulpa es llevar a través del flujo sanguíneo un aporte nutricional y de oxígeno a tejidos no perfundidos, lo que permite que realicen su función biológica normal y así mantener la homeostasis interna del diente. Se ha mencionado que la pulpa es un tejido vascularizado, con una densidad capilar superior a gran parte de los otros tejidos gracias a los procesos de vasculogénesis y angiogénesis³⁴, llevando un flujo sanguíneo también superior a la media, alrededor de 50 ml/min/100g de tejido pulpar³⁵.

Ya que la pulpa dental está encerrada por las paredes dentinarias, la presión tisular intrapulpar adquiere una gran importancia en su fisiología. Durante procesos inflamatorios agudos, la dilatación de los capilares ocasiona una tumefacción pulpar que aumenta la presión sanguínea local que estimula a los nervios adyacentes causando una sensación dolorosa. Este aumento de presión local del tejido causa un colapso de los vasos de pared más delgada (capilares y vénulas post-capilares) en el área afectada, lo que lleva a un estancamiento del flujo sanguíneo, lo que lleva a isquemia y muerte celular³⁶.

Mientras que un aumento de la vasodilatación conlleva un mayor flujo sanguíneo al tejido inflamado, el aumento de la densidad capilar vía angiogénesis por brote aumenta la superficie de perfusión hacia los tejidos hipóxicos para restablecer el aporte nutricional y de oxígeno. La angiogénesis es un requerimiento natural frente a los estímulos de hipoxia. La evidencia actual indica que bajo condiciones de hipoxia, las células pulpares incrementan la secreción del factor 1 de transcripción inducido por hipoxia (HIF-1)³⁷, el cual incrementa la función de factores proangiogénicos (VEGF) que actúan sobre las células endoteliales vecinas para inducir la formación de nuevos vasos. Al restablecerse el aporte de oxígeno, la expresión de HIF-1 disminuye, limitando consigo el proceso angiogénico³⁸.

Este proceso de regulación paracrina de la angiogénesis también es la base para describir la forma de regeneración y reparación pulpar luego de una exposición por trauma o caries; donde el estímulo hipóxico es producido por el recubrimiento pulpar con un material externo, activando el ciclo del factor HIF-1 hasta llevar al tejido a una situación de normoxia, donde éste factor es regulado negativamente y detiene la neo-formación de capilares⁸.

Las células troncales presentes en el tejido pulpar tienen un potencial de diferenciación y proliferación amplio, también influyendo en la función vascular a través de su diferenciación a células endoteliales bajo estímulos angiogénicos³⁹ o mediante una acción trófica paracrina secretando factores de angiogénesis que inducen este fenómeno a partir de células endoteliales pre-existentes⁴⁰.

Su aplicación actual entra directamente en el campo de la ingeniería de tejidos, donde la angiogénesis juega un rol clave ya que si el aporte nutricional y de oxígeno no llega a los tejidos trasplantados, lleva a necrosis y fracaso del tratamiento. Cuando la formación de nuevos vasos sanguíneos ocurre y hay un aporte nutricional suficiente, nuevos tratamientos como la regeneración pulpar posterior a una pulpectomía pueden ser posibles en un futuro cercano^{41, 42}.

Vasos linfáticos

El desarrollo de los vasos linfáticos comienza únicamente después de que la circulación sanguínea se ha establecido. Los vasos linfáticos tienen su origen en mesénquima y se desarrollan a partir de evaginaciones, en forma de sacos de vasos sanguíneos en desarrollo, específicamente de venas.

El crecimiento y desarrollo de la vasculatura está íntimamente ligado con las necesidades homeostáticas del tejido que soporta. Una disminución en el porcentaje de oxígeno disponible corresponde al primer estímulo para formar vasos sanguíneos, como un aumento en la presión del líquido intersticial de un tejido es el impulso necesario para formar vasos linfáticos⁴³.

Los vasos linfáticos tienen por función remover el fluido intersticial y productos metabólicos de desecho hacia la circulación sanguínea para mantener la presión intrapulpar dentro de los límites normales.

Los vasos linfáticos pulpares corresponden a capilares linfáticos de aproximadamente 8 μm de diámetro, de extremos ciegos y de paredes delgadas que se encuentran en la región coronal de la pulpa y también, en menor proporción, en la zona periférica próxima a la capa subodontoblástica.

Los vasos linfáticos se diferencian de vénulas de calibre menor por la presencia de pequeñas fenestraciones en su estructura, discontinuidades en su membrana basal o la ausencia de ella, y por la ausencia de glóbulos rojos en su lumen (Fig. 3), también se puede observar numerosas uniones intercelulares entre células endoteliales y escasos o nulos pericitos envolviendo la estructura del vaso⁸.

Los vasos linfáticos eferentes tienen un diámetro aproximado de 100 μm , estos vasos abandonan la región pulpar en conjunto con los nervios y los vasos sanguíneos dirigiéndose hacia el foramen apical para drenar en los vasos linfáticos mayores del ligamento periodontal^{21, 23}.

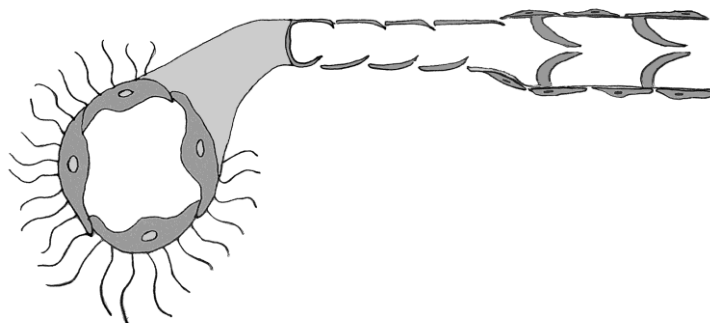


Fig. 3. Estructura básica de un vaso linfático²¹.

2.2.2 Inervación Pulpar

La inervación de la pulpa dental se inicia a través de axones pioneros derivados del ganglio trigémino que se aproximan tempranamente al diente en desarrollo, entre las etapas de brote y casquete. Distintos factores neurotróficos inducen el desarrollo y la arborización de los terminales nerviosos y son producidos desde antes de la formación de la inervación pulpar como tal⁴⁴. Los axones no entran a la pulpa dental hasta un estado relativamente avanzado de desarrollo del diente, lo que sugiere que la papila dental secreta factores inhibidores de desarrollo axonal en estados tempranos⁴⁵. Cuando ya ha comenzado la formación de tejido mineralizado, las fibras nerviosas primarias invaden la pulpa dental, debido a un cambio en la secreción de factores, en un principio neuro-repelentes, a neurotróficos, siendo el factor de crecimiento nervioso (NGF) el principal responsable en la formación de la inervación pulpar.

La pulpa dental desarrollada presenta una importante inervación sensorial a nivel coronario, compuesta principalmente de aferentes sensoriales del nervio trigémino y fibras eferentes simpáticas provenientes del ganglio cervical superior que se han descrito como reguladoras del flujo sanguíneo⁴⁶. En la interfase dentino-pulpar una red sensorial densa forma el plexo subodontoblástico de Raschkow, el cual proyecta en su mayoría terminales libres a nivel de la capa odontoblástica, predentina, y los 0.1 milímetros más internos de la dentina, los terminales nerviosos son especialmente densos en los cuernos pulpares, donde se presenta también la mayor sensibilidad⁴⁷.

La inervación decrece gradualmente desde la corona hacia la raíz, con mucha menor cantidad de terminales nerviosos en la periferia de la pulpa radicular. Las fibras nerviosas son diversas y están distribuidas en patrones específicos para enfocarse en regiones particulares de vasos sanguíneos, tejido pulpar y dentina.

Los grandes grupos de fibras nerviosas sensoriales en la pulpa son fibras A mielinizadas (A-beta, A-delta) y las fibras C no mielinizadas. 90% de las fibras A corresponden a fibras A-delta, y están principalmente localizadas en la interfase dentino-pulpar en la parte coronal de la pulpa, su principal característica es la rápida velocidad de conducción de 12 a 30 m/s. Las fibras C están localizadas en el centro de la pulpa, y se extienden hacia la zona acelular bajo la capa odontoblástica; su velocidad de conducción va de 2 a 10 m/s⁴⁸ (Tabla I).

Fibra	Mielinización	Localización de terminales	Características del dolor	Umbral de estimulación
A δ	Si	Principalmente región límite pulpo-dentinario	Agudo, punzante	Relativamente bajo
C	No	Distribuidas a través de la pulpa	Ardor, en general menos tolerable que el generado por fibras A- δ	Relativamente alto, usualmente asociado a daño tisular

Tabla I. Características de fibras nerviosas en un diente normal⁴⁹.

La principal función de las fibras nerviosas de la pulpa es otorgar sensibilidad al diente frente a distintos estímulos, como calor, frío, trauma e instrumentación mecánica. Los estudios describen que las fibras nerviosas sensoriales responden básicamente frente a la lesión dentinaria y pulpitis mediante el “brote” (sprouting) de sus ramas terminales en la pulpa intacta y la alteración citoquímica de su fenotipo⁴⁹.

Se han propuesto tres mecanismos para explicar sensibilidad dentinaria⁵⁰:

1.- Teoría Neuronal: establece que la dentina contiene terminales nerviosos que responden cuando son estimulados. Esta teoría proviene desde la lógica de que algunos terminales se extienden a través de los túbulos dentinarios y son los responsables de la respuesta dolorosa.

2.- Teoría Odontoblasto Sensorial: establece al Odontoblasto como célula receptora. Este concepto ha sido considerado, dado el hecho de que los odontoblastos poseen procesos que se extienden a través de los túbulos dentinarios. Para confirmar este rol, 3 criterios son necesarios: expresión funcional de receptores frente a ciertos estímulos, habilidad para transmitir señales luego de la activación de los receptores, y una estructura sináptica entre odontoblastos y nervios. Para el primer criterio existen estudios en odontoblastos humanos que han identificado la expresión de canales TRP con capacidad de transducción mecánica, dándole un rol sensorial⁵¹. Además de esto, la existencia de canales mecanosensitivos de potasio y calcio encontrados en odontoblastos en cooperación con los canales TRP participan en la percepción de temperatura⁵². Un mecanismo de señalización entre los odontoblastos y los nervios aferentes pulpares fue sugerido a partir de su cercana localización y de la expresión de receptores específicos en aferentes nociceptivos, indicando que el

ATP podría actuar como un promotor de señalización para estimular respuestas de dolor⁵³.

3.- Teoría Hidrodinámica: La sensibilidad dentaria involucra al movimiento de fluidos a través de los túbulos dentinarios. Se plantea a partir de la suposición de que el dolor intenso y pulsátil relacionado a la pulpitis es inducido por la presión hidrostática ejercida por un tejido inflamado encerrado por una estructura rígida. El movimiento de líquido hacia el exterior como respuesta a estímulos fríos es rápidamente detectado por la fibras A-delta causando un dolor agudo en la pulpitis temprana; a medida que avanza la pulpitis, el movimiento de fluido hacia el interior como respuesta al calor activa a las fibras C se percibe como dolor sordo. Los canales TRP estarían involucrados en la transducción de los estímulos⁵⁰.

2.2.3 Células inmunocompetentes en pulpa dental

La pulpa dental está equipada con una red de células nativas. Cuando existe una injuria se produce un reclutamiento de células inmunocompetentes que juegan un rol crucial en la mantención del equilibrio de este tejido⁵⁴. En una pulpa dental sana encontramos tipos celulares como Macrófagos, células dendríticas y algunos Linfocitos T⁴. La cantidad de células dendríticas y macrófagos corresponde aproximadamente a un 8% del total de células de pulpa dental.

Macrófagos: células provenientes de monocitos, abandonan la circulación sanguínea para entrar en los diversos tejidos y de esta forma diferenciarse en subtipos de macrófagos según diversas necesidades. Dentro de los subtipos de macrófagos existen tipos que tienen por función la endocitosis y la fagocitosis; otro tipo participa en el procesamiento de antígenos y presentación de estos, a los Linfocitos T de memoria⁵⁵.

Células dendríticas: células que presentan procesos o prolongaciones citoplasmáticas dendríticas y la presencia de complejos de histocompatibilidad clase II (MHC II) en su superficie celular. En pulpa dental se encuentran distribuidas en la periferia del sector coronal de la pulpa, adyacente a la predentina.

Su rol principal corresponde a la fagocitosis de proteínas para luego presentarlas, de esta forma juegan un rol primordial en la inducción de la inmunidad dependiente de Linfocitos T ⁵⁵.

Linfocitos T: Son las células con menor presencia en pulpa dental sana. Tienen la función de responder en forma específica contra microorganismos e injurias y permiten la activación de otras células defensivas como Linfocitos B, Macrófagos y otros Linfocitos T⁵⁵.

2.3 Reabsorción radicular fisiológica

2.3.1 Teorías de reabsorción

La reabsorción de la raíz de dientes temporales es un proceso clave para la erupción de dientes definitivos. El proceso por el cual este ocurre no se encuentra bien definido, pero existen distintas teorías que podrían explicarlo.

Teoría del Folículo dental

Se cree que el folículo dental del diente permanente está estrechamente relacionado con el inicio de la reabsorción fisiológica de la raíz del diente temporal y se infiere que la presión ejercida por este, iniciaría la diferenciación y activación de odontoclastos.

Antes del inicio de esta reabsorción de raíz, células mononucleares que se encuentran en la región apical del folículo dental del diente permanente migran a la superficie de la raíz del diente temporal cercano, donde se fusionan para formar odontoclastos y osteoclastos multinucleados activos que reabsorben la raíz y proporcionan una vía de erupción. Se demostró que las células del folículo dental secretan diversas moléculas que inducen la erupción dental, como el factor epidérmico de crecimiento (EGF), factor estimulante de colonias de Monocitos (CSF-1) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Se sugirió que estas moléculas atraen monocitos al folículo dental, dirigiendo así a las células mononucleares de las superficies óseas como precursores de los osteoclastos necesarios para el proceso de erupción⁵⁶.

Teoría de RANK/ RANK-L

La osteoclastogénesis y su diferenciación celular es regulada por el sistema RANK/ RANK-L / OPG. Donde RANK (El receptor activador de factor nuclear κ B) corresponde al receptor ubicado en la membrana del Osteoclasto. RANK-L

corresponde al ligando que se une a este receptor, ubicado en la membrana de osteoblastos y otras células. Osteoprotegerina (OPG) corresponde al factor inhibidor de la osteoclastogénesis. La unión de RANK-L con su receptor promueve la diferenciación de los pre-osteoclastos en Osteoclastos maduros, facilitando la resorción de hueso. OPG se une a RANK-L evitando esta diferenciación y de esta forma inhibiendo la osteoclastogénesis.

En el diente ocurre algo similar con los Odontoblastos, encargados de la reabsorción de la raíz de este. RANK es expresado por Odontoclastos; RANK-L por Odontoblastos, pulpa, ligamento periodontal, Fibroblastos y Cementoblastos; OPG por Odontoblastos, Ameloblastos y células de la pulpa dental.

Durante la formación del diente definitivo, células del retículo estrellado liberan Paratohormona (PTH), molécula reguladora de la erupción dental. Esta hormona aumenta la expresión de RANK-L y disminuye la de OPG. Los cementoblastos suelen expresar mayor cantidad de OPG, es por esto que el cemento protege al diente de la reabsorción. Pero en presencia de la PTH, esta expresión disminuye y aumenta la de RANK-L^{11, 49}.

2.3.2 Relación entre reabsorción fisiológica y células de la pulpa

Durante el proceso reabsortivo la pulpa conserva su estructura normal. Sin embargo, una vez que este proceso llega a sus etapas finales, los Odontoblastos comienzan a degenerarse, células inflamatorias comienzan a infiltrarse en los tejidos, junto con Odontoclastos. La actividad de estos últimos, comienza en la zona cervical de la corona, para luego alcanzar la zona de la cámara pulpar⁵⁶.

A nivel de sistema nervioso, después de una lesión de la fibra nerviosa, los axones distales a la lesión experimentan una secuencia degenerativa temporal, caracterizada por la degradación inicial del citoesqueleto axonal y la activación de las células de Schwann, las cuales se desdiferencian, eliminando la mielina y estimulando el reclutamiento de Macrófagos y Linfocitos³.

La pulpa dental mantiene su capacidad de defensa y cicatrización durante el proceso reabsortivo, gracias a la organización y función de células inmunocompetentes. Estas células aumentan en cantidad a medida que avanza el proceso. Se puede encontrar Linfocitos B, T, CD3+, CD4+, Natural killers en las diferentes etapas de reabsorción^{4, 57}.

En etapas tempranas de reabsorción existe un aumento de macrófagos, linfocitos T y células dendríticas. Durante etapas finales, las células inmunocompetentes se localizan junto a Odontoclastos y sus precursores, cubriendo la dentina expuesta atacada por estos, indicando de esta forma, que las células inflamatorias podrían tener un papel inductor en la diferenciación clásica.

Además del proceso reabsortivo, puede existir un aumento en el número de células inmunocompetentes e inflamatorias producto de la atrición presente en los dientes temporales.

Objetivos

General

Caracterizar componentes vasculares durante el proceso de Reabsorción Radicular Fisiológico en dientes temporales humanos en función de tres etapas establecidas (inicial, media, avanzada).

Específicos

- Determinar los cambios de los componentes vasculares durante la progresión de la Reabsorción Radicular Fisiológica en sus tres etapas.
- Comparar cambios de los componentes vasculares en dos zonas seleccionadas para cada diente según su estado (Zona de reabsorción y zona coronaria)
- Establecer una relación entre los cambios vasculares e inervación pulpar durante las etapas de Reabsorción Radicular Fisiológica.

Hipótesis

Existen cambios vasculares asociados a la progresión del proceso de reabsorción radicular fisiológica de dientes temporales humanos en sus tres etapas (inicial, medio y final).

Materiales y Métodos

5.1 Tipo de Estudio

Estudio descriptivo observacional de los cambios vasculares en la pulpa dental de caninos temporales durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica.

5.2 Universo

Caninos temporales con indicación de exodoncia, en pacientes atendidos en la clínica de Odontología Integral Infantil de pregrado, en la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, donados mediante consentimiento informado escrito y asentimiento verbal del paciente, entre los meses de Agosto de 2017 y Enero de 2018.

5.3 Criterios de Inclusión y Exclusión de Pacientes

Inclusión:

- Pacientes sistémicamente sanos
- Pacientes con dentición temporal o mixta y cronología normal
- Pacientes con dientes temporales con indicación de exodoncia por ortodoncia
- Pacientes con dientes temporales sanos, con su corona intacta y sin evidencia de lesiones superficiales
- Pacientes cuyos apoderados firmen el consentimiento informado y que deseen participar

Exclusión:

- Dientes con necrosis pulpar, pulpitis irreversible y restos radiculares.
- Pacientes con dientes temporales que hayan presentado trauma dentoalveolar o avulsionados
- Pacientes con dientes afectados por lesión tanto caries activas como detenidas
- Caninos anquilosados, con cronología de recambio alterada

5.4 Criterios de Inclusión y Exclusión de las Muestras:

Inclusión

- Reabsorción radicular fisiológica restringida fundamentalmente desde apical
- Dientes con al menos 1 mm de remanente radicular

Exclusión:

- Reabsorción radicular fisiológica oblicua u horizontal
- Muestras que posterior al procesamiento y chequeo presenten una fijación deficiente.
- Dientes que evidencien pérdida del tejido pulpar

5.5 Muestras

Aprobación del estudio y Consentimiento informado:

El presente proyecto ha sido aprobado de acuerdo a los protocolos del Comité Institucional de Bioética de la Investigación en Seres Humanos de la Universidad de Valparaíso. Las muestras procesadas en este trabajo han sido donadas en forma voluntaria mediante asentimiento verbal del paciente y consentimiento informado escrito firmado por el adulto responsable del paciente.

Tamaño Muestral: 21 muestras cumplieron los criterios de inclusión

Forma de Selección:

Muestreo no probabilístico. Los dientes fueron recolectados en las dependencias de la Clínica de Odontología Integral Infantil de pregrado, en la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Las muestras se obtuvieron de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión. Los dientes fueron recolectados a medida que se fueron extrayendo durante los meses de Agosto de 2017 y Enero de 2018, hasta llegar a un número de 21 dientes seleccionados para realizar el estudio. Los dientes fueron donados como se señaló anteriormente mediante el asentimiento verbal del niño y consentimiento firmado por el adulto responsable del paciente.

Unidad de estudio: Cambios en la estructura vascular de la pulpa dental de dientes temporales.

5.6 Definición de las variables a estudiar

Tipo de diente: Dientes temporales, variable cualitativa, escala nominal. Dientes que erupcionan entre los 8 a 30 meses de edad aproximadamente, que tras sufrir el proceso de exfoliación fisiológica son sustituidos por los dientes definitivos.

Grado de Reabsorción Radicular: Variable cualitativa, escala ordinal. Identificación de la etapa de reabsorción radicular fisiológica en los dientes temporales, establecida en base a tres grados (inicial, medio y avanzada) (Fig.4).

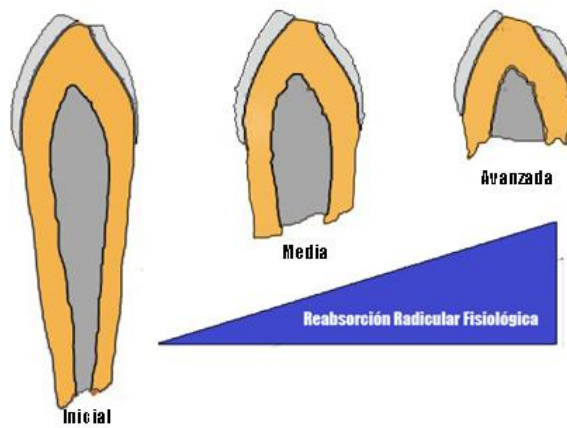


Fig. 4. Esquematación de las tres etapas de reabsorción que se tomarán en cuenta para la clasificación de las muestras. Basada en los estados descritos por Moorrees en 1963⁵⁸.

Marcadores Vasculares: Variable cualitativa. Se identificarán mediante los anticuerpos CD31, CD34, vWF, CD105 (Tabla II).

Marcadores de componentes nerviosos: Variable cualitativa, identificable debido a la inmuno-reactividad de las Células de Schwann (CS) frente al marcador S100 (Tabla II).

5.7 Proceso de Recolección y Procesamiento de la Información

Los pacientes con indicación de exodoncia que decidieron participar en el estudio, fueron atendidos en los box de la clínica A y clínica B de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, por parte de los alumnos de la Escuela de Pregrado en su asignatura clínica de Odontología Integral Infantil I y II.

Luego de indicarse la extracción dentaria, y la aplicación de los criterios de inclusión/exclusión se le explicó al apoderado del paciente en qué consistía la participación de su hijo(a) o pupilo(a) en este estudio por medio de una hoja informativa, en la cual se especificó el objetivo, características e implicancias de la investigación. Se procede a resolver todas las dudas del apoderado si es que se presentan, y se le entrega un Consentimiento Informado, el cual debió ser firmado para llevar a cabo el procedimiento.

Ya recepcionado el paciente, en conjunto con su alumno tratante, se le explicó de forma personalizada y con un lenguaje adecuado a su edad la manera de participar en la investigación. En caso de dar su asentimiento verbal, se le entregó un premio al paciente y se procedió a identificar la pieza a extraer para comenzar el procedimiento.

El (la) alumno(a) tratante procedió a la aplicación de EMLA® como anestésico tópico en el lugar de la punción y luego a anestesiar el diente a extraer con solución anestésica de Lidocaína al 2% utilizando la técnica apropiada para cada caso (Técnica de Spix para dientes del maxilar inferior y técnica infiltrativa para dientes del maxilar superior); se obtuvo la muestra mediante exodoncia del diente utilizando el instrumental correspondiente al caso. El investigador presente en el procedimiento separó el diente para su examinación en busca de exposición pulpar. Sólo en los casos en que no se observaba exposición se procedió a realizar un corte transversal con una piedra de diamante de alta velocidad a nivel medio de la corona.

Luego se depositó con la pinza en un tubo cónico que contiene 20ml de paraformaldehído al 4% más ácido pícrico al 0.5% para su fijación durante 6 hrs., los tubos fueron identificados mediante un código alfanumérico (e.g., A1, A2,...).

Una vez cumplido el tiempo de fijación, las muestras fueron desmineralizadas en solución de EDTA al 4,13%, la cual se cambió una vez por semana, repitiendo este proceso durante 3 meses, para luego iniciar con los procesos necesarios para ensayos de corte, inmunohistoquímica y microscopía confocal.

5.8 Cortes, Inmunohistoquímica y Microscopía Confocal

Las muestras ya desmineralizadas fueron lavadas con solución buffer fosfato-salina (PBS) y crioprotegidas en solución de PBS con sacarosa al 15% por 2 horas, para luego repetir esta etapa en igual solución al 30% durante 24 horas. Las muestras embebidas en solución criopreservante se montaron en un medio de congelación para tejidos (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) y congeladas a -25°C. Se realizaron cortes de 25 µm en un criostato (Leica CM-1900) operado a -25°C y luego fueron montadas en portaobjetos previamente cargados positivamente con poli-lisina; estas secciones fueron rehidratadas en PBS e incubadas por 1 hora en una solución de bloqueo compuesta por 1 % de albúmina de suero bovino (BSA), 1 % suero de caballo, y 0,3% Triton X-100.

Luego se agregaron los anticuerpos primarios, que fueron diluidos en solución de bloqueo y se dejaron actuar durante 12 horas a una temperatura de 4°C. Las muestras pasaron por 3 lavados de PBS de 10 minutos cada una. Después se agregan los anticuerpos secundarios también diluidos en una solución de bloqueo (1:500) y se dejan actuar 1 hora a temperatura ambiente; se vuelve a lavar con PBS para retirar los excesos.

Posteriormente se procede a marcar los núcleos con DAPI (0.25µg/ml) durante 10 minutos, finalmente las muestras se lavan y se cubren con medio de montaje (Dako Industries, Carpinteria, CA, USA). Para su mantención las muestras se guardaron en cajas plásticas a 4°C.

Las muestras procesadas fueron observadas y analizadas con un microscopio confocal Nikon C1 Plus. El equipo emplea tres laser de distintas longitudes de onda de emisión (405, 488 y 555nm). Los fluorocromos asociados a los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (en verde), Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (en rojo) y DAPI (405nm). Los registros digitales fueron procesados mediante los programas: Ez-C1 3,90 (Nikon Corporation) e Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) para proyecciones de máxima intensidad. Para ajustes de brillo y contraste se utilizó el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

Para un análisis estandarizado se decidió utilizar dos zonas base de 400 x 400 µm, la zona 1 corresponde a pulpa coronal, ubicada en el sector de la porción subodontoblástica superior al límite amelo-cementario; mientras que la zona 2 corresponde a un área de igual tamaño en la parte más apical del diente, relacionada con la zona de reabsorción radicular propiamente tal.

Anticuerpo primario	Gen	Host	Fabricante	Dilución	Marcación
CD 31	PECAM1	Ms/m	DAKO M0823	1:100	Células endoteliales
CD 34	CD 34	Ms/m	B5B – 5228	1:100	Células endoteliales/ células precursoras hematopoyéticas
CD105	ENG	Ms/m	DAKO M352701	1:100 (10µl en 1ml)	Dominio extracelular de Endoglina,. Células endoteliales.
vWF	VWF	Rb	DAKO A0082	1:100	Células endoteliales / granulomas de Weibel-Palade
S100	S100B	Ms/m	DAKO	1:200	Células gliales, Células de Schwann, Melanocitos, Condrocitos, Adipocitos

Tabla II. Anticuerpos utilizados en el estudio. */m: monoclonal. *Anticuerpos secundarios: los anticuerpos secundarios utilizados corresponden a anti-mouse y anti-rabbit, producidos en cabra (goat) de Invitrogen (Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 555), y empleados en dilución 1:500.

5.9 Determinación de Etapas de RRF

En el presente estudio se definieron tres etapas de reabsorción radicular (Inicial, Media, Avanzada). Para cada una de las muestras, se midieron los remanentes radiculares de estas. De las mediciones del remanente radicular se obtuvo un máximo de 13,25 mm y un mínimo de 1,5 mm. Con estos valores se aplicó la siguiente fórmula $(13,25 - 1,5)/3$; dando un resultado aproximado de 4 mm de variación para cada estado.

Por lo tanto, la Etapa Inicial se encuentra compuesto por muestras de 13,25 mm a 9,25 mm; Etapa Media por muestras de 9,24 mm a 5,24 mm; y Etapa Avanzada por muestras con remanentes radiculares inferiores a 5,24 mm. (Fig. 5).

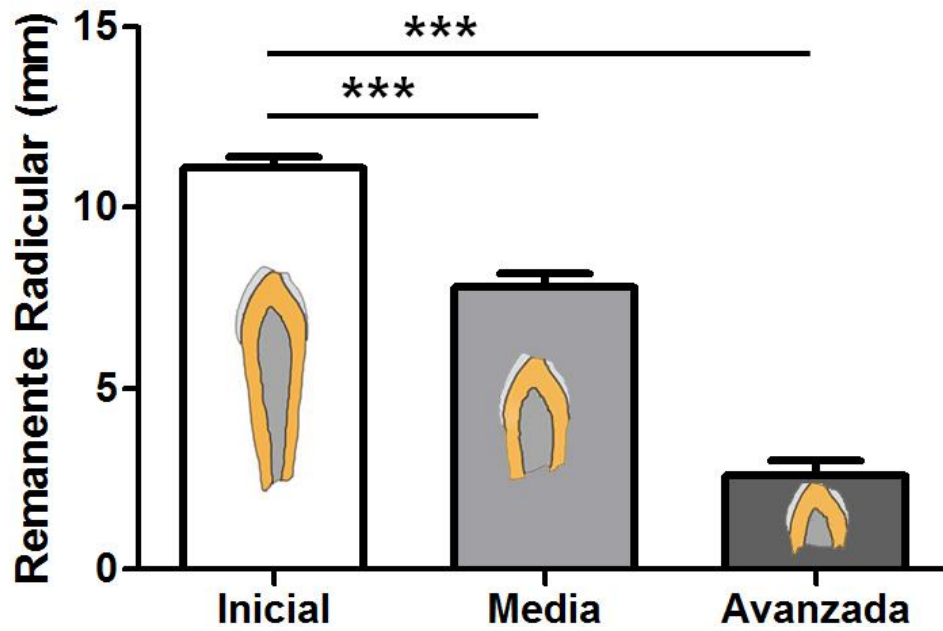


Fig. 5. Gráfico de remanentes radiculares de las muestras utilizadas en el estudio (Esquema de etapas de RRF modificado de Suzuki et al., 2015)³.

Resultados

La caracterización de componentes vasculares evidencia importantes cambios durante la progresión del proceso de RRF al comparar las tres etapas (Fig. 6).

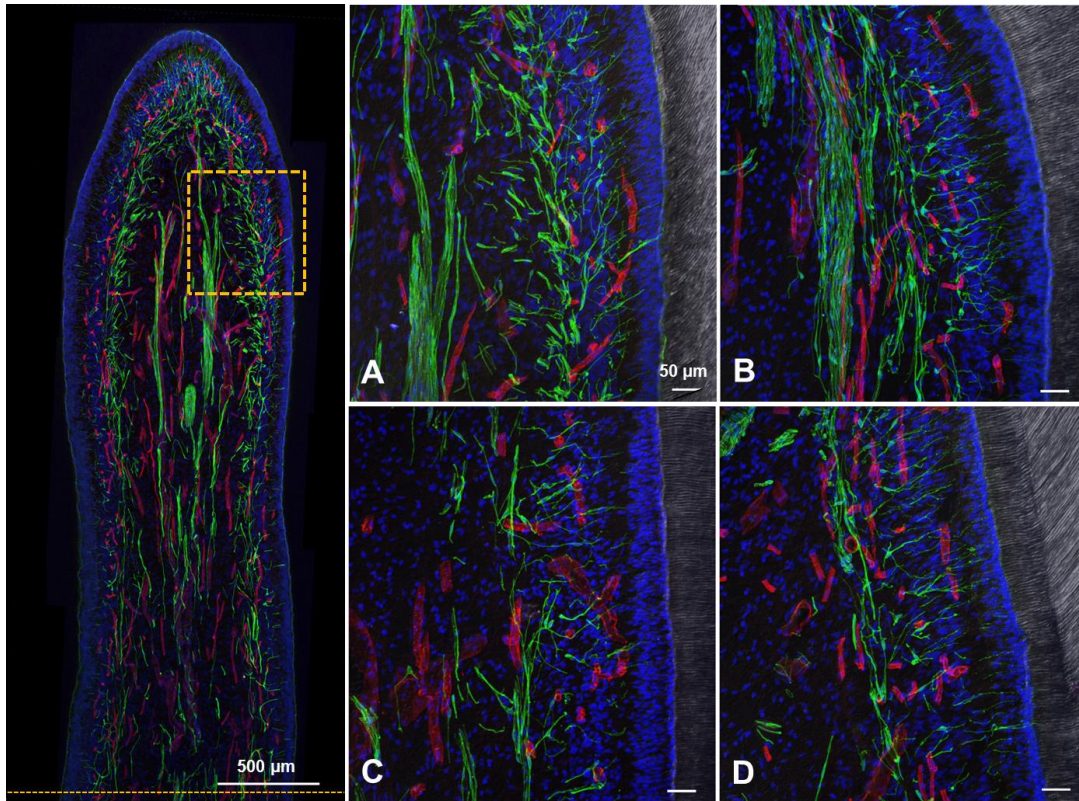


Figura 6: Microscopía confocal mediante inmunomarcaje para células endoteliales (CD34, rojo) y células de Schwann (S100, verde). En primer lugar se muestra la zona de análisis sobre el límite amelo-cementario utilizada para el análisis de este estudio. En el estado de reabsorción más temprano se observa una red vascular presente desde la zona subodontoblástica hacia el interior de la pulpa, mientras que las células de Schwann (CS) se disponen en fascículos de manera compacta y organizada (A). La desintegración fascicular de las CS comienza de forma tardía en la etapa inicial de reabsorción (B) acompañada de una mayor presencia de vasos a su alrededor. La degradación de los fascículos y la disgregación de los componentes nerviosos conllevan un aumento del calibre vascular en la etapa media de la RRF (C). En etapa avanzada (D) las CS recuperan parcialmente su organización en fibras y hay un aumento notorio en el número de vasos sanguíneos en torno a esta nueva disposición. Barras de escala: A-D 50 μ m.

Los cambios vasculares se observan significativamente incrementados en la zona próxima a la reabsorción (Fig. 7).

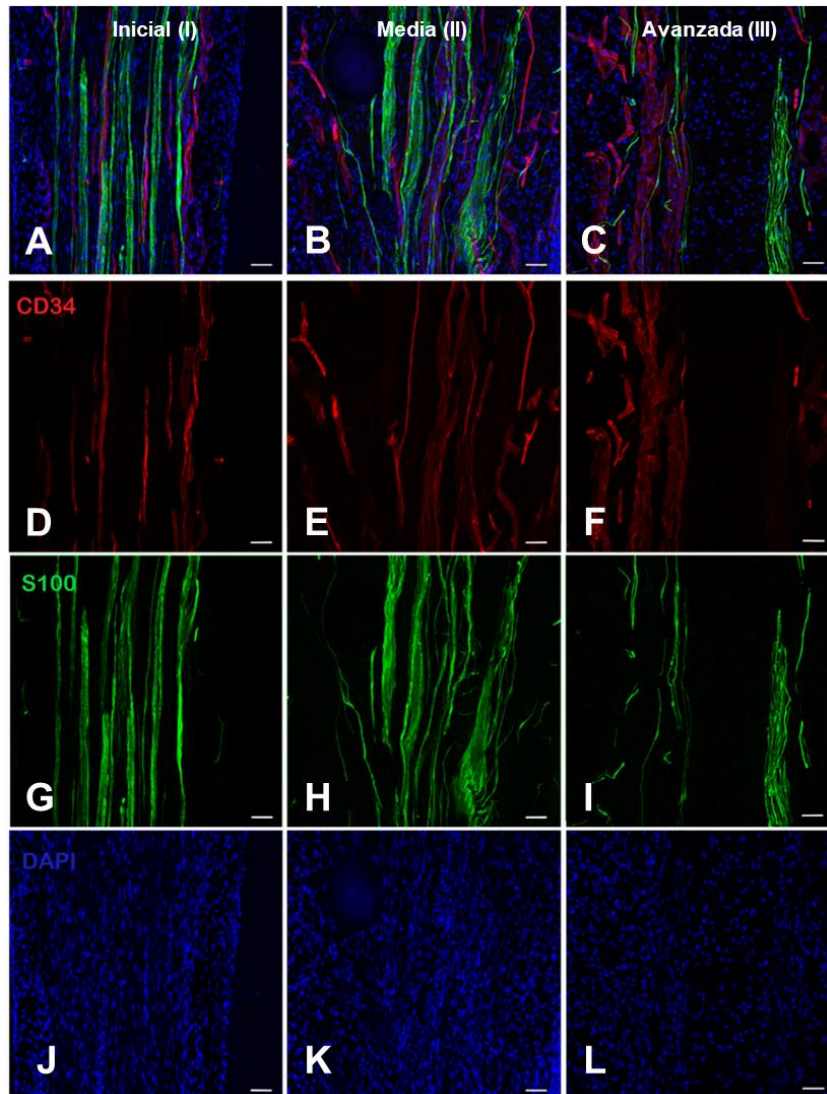


Figura 7: Caracterización del avance de RRF en la zona de reabsorción y diferenciación de componentes celulares de la pulpa dental: componente vascular (CD34, rojo), células de Schwann (S100, verde) y marcador de núcleos (DAPI, azul). Se observa el proceso de degeneración fascicular del componente nervioso a medida que avanza el proceso reabsortivo, pasando de una disposición lineal y ordenada (A, G) a una fragmentada (I). La diferenciación de marcapos muestra el aumento del calibre vascular en etapa media (E), y principalmente el cambio del patrón vascular en torno a las zonas de degeneración axonal (F). La tinción nuclear muestra una mayor concentración de células en etapa media y su agrupación en torno a la zona de degeneración en etapa avanzada, lo que podría deberse a células inmunocompetentes (L). Barras de escala: 50 μ m.

La actividad angiogénica caracterizada mediante el marcador CD105, muestra un importante incremento durante la progresión de las etapas de RRF (Fig. 8, 9). En las imágenes se observan los cambios en la estructura vascular de la pulpa en conjunto con proliferación de nuevas células endoteliales, principalmente en pulpa radicular. Este cambio en el patrón del componente vascular no se expresa de mayor manera en la porción coronal de la pulpa.

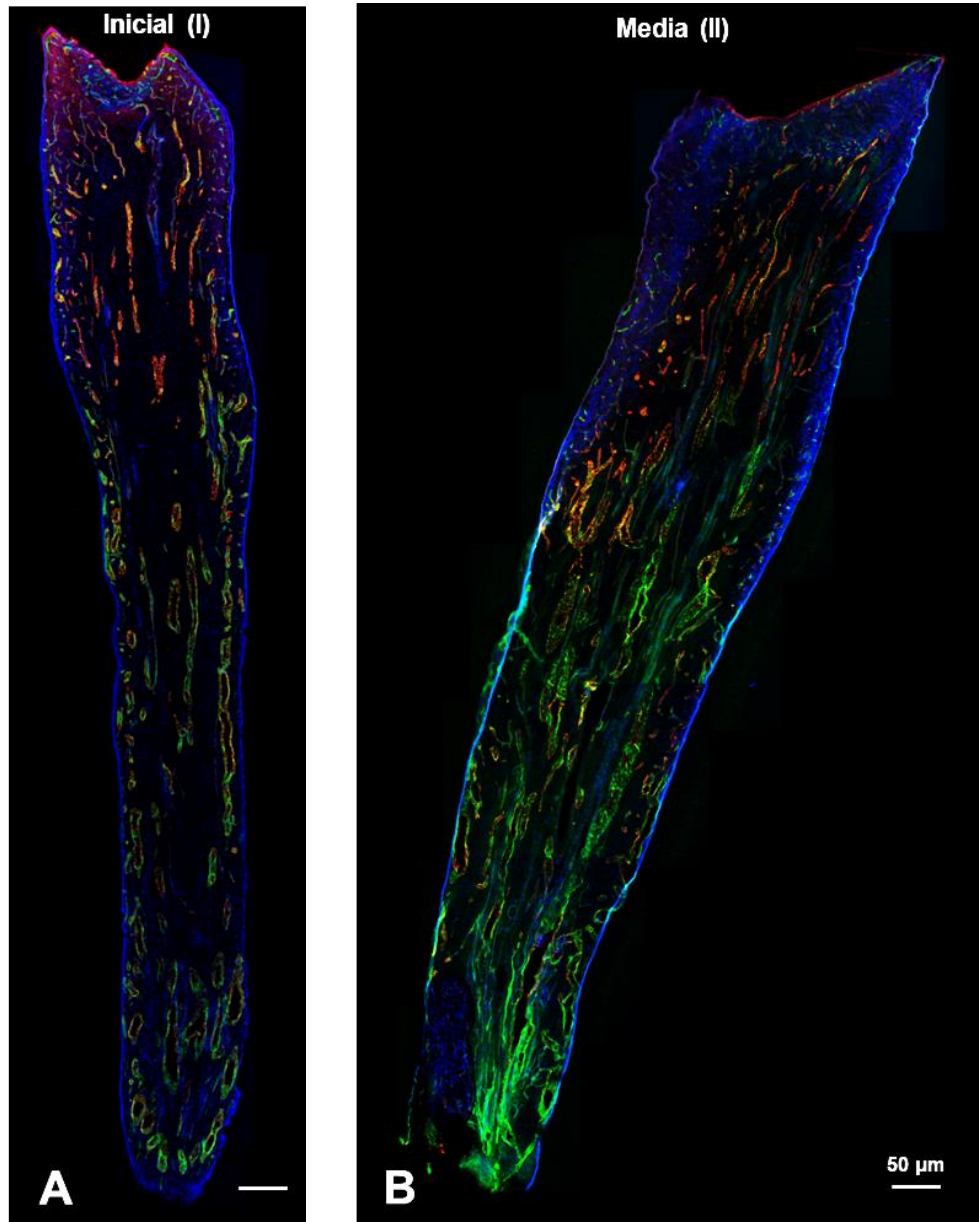


Figura 8: Reconstrucción fotográfica de pulpa completa de diente en etapa inicial y diente en etapa media. Inmunomarcaje para células endoteliales (vWF, rojo) y endogлина (CD105, verde), que aumenta su expresión en zonas de angiogénesis. Barras de escala: 50 µm.

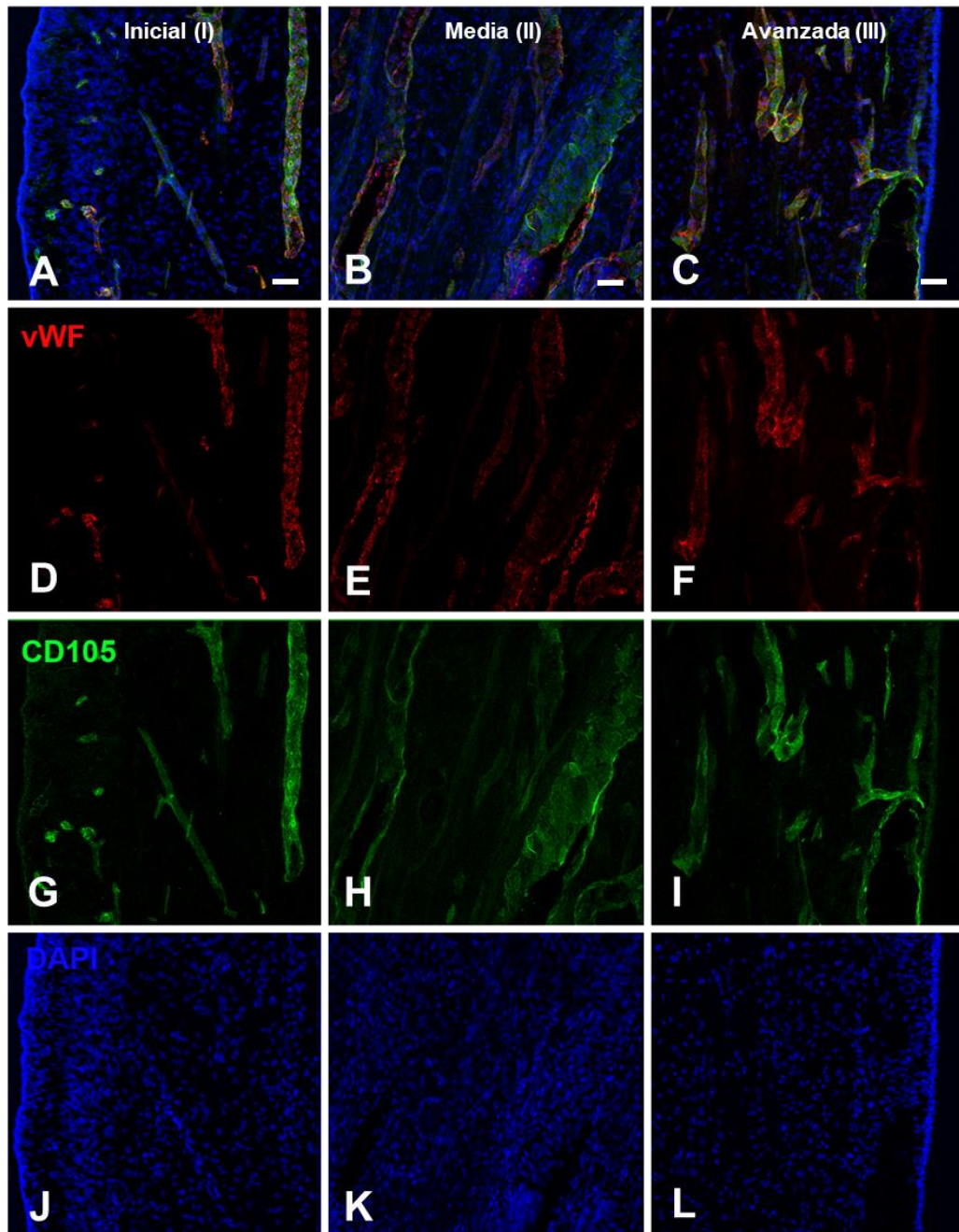


Figura 9: Caracterización del avance de RRF en pulpa coronal sobre el límite amelo-cementario. Doble marcaje para células endoteliales (vWF, rojo; CD105, verde) e inmunomarcaje para núcleos (DAPI, azul). En la etapa media de RRF se muestra el mayor aumento del diámetro vascular (E), acompañado de proliferación de células endoteliales, el cual también se presenta en etapa avanzada (H, I). En relación al marcador nuclear no se observan diferencias notorias en el número de células de acuerdo a la progresión del proceso reabsortivo. Barras de escala: 50 μ m.

Mediante análisis comparativo de imágenes con doble marcaje para células endoteliales (CD31) y células de Schwann, se observan cambios relevantes para ambos componentes pulpares durante el proceso de RRF (Fig. 10, 11).

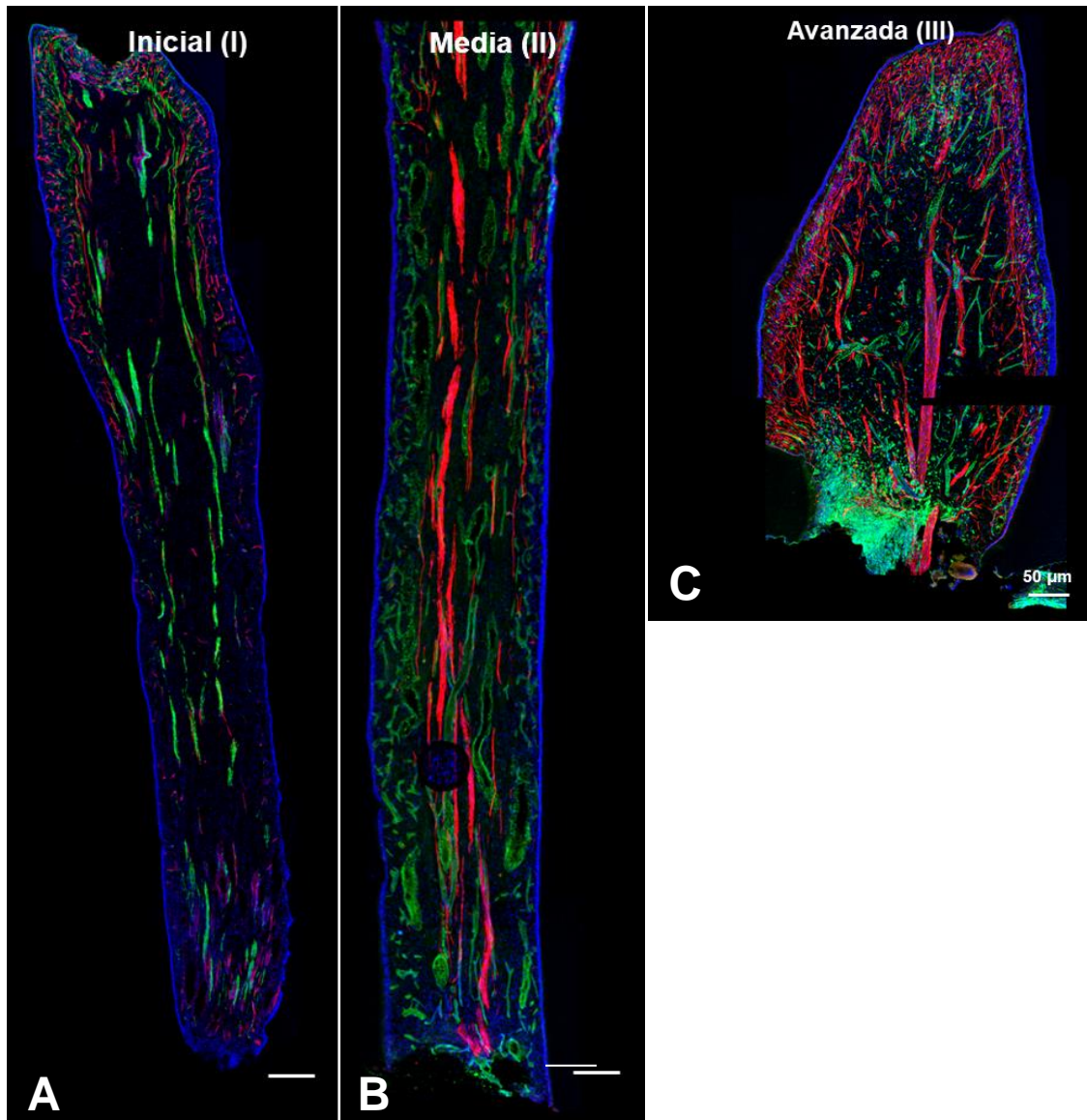


Figura 10: Reconstrucciones fotográficas de pulpa dental con marcadores representativos de componente vascular (CD31, verde) y células de Schwann (S100, rojo) durante la progresión de la RRF en sus etapas inicial, media y avanzada. Etapa inicial muestra distribución y tamaño normal del componente vascular y nervioso (A). La vasodilatación y neoformación vascular caracterizan el paso a la etapa media de RRF en conjunto con el inicio de la degradación de los fascículos de axones mielínicos (B). En etapa avanzada (C) existe un fuerte foco angiogénico en la zona de reabsorción, y la pérdida de la estructura de las CS debido a la degeneración axonal es evidente tanto en el centro como en la periferia de la pulpa dental. Barras de escala 50 µm.

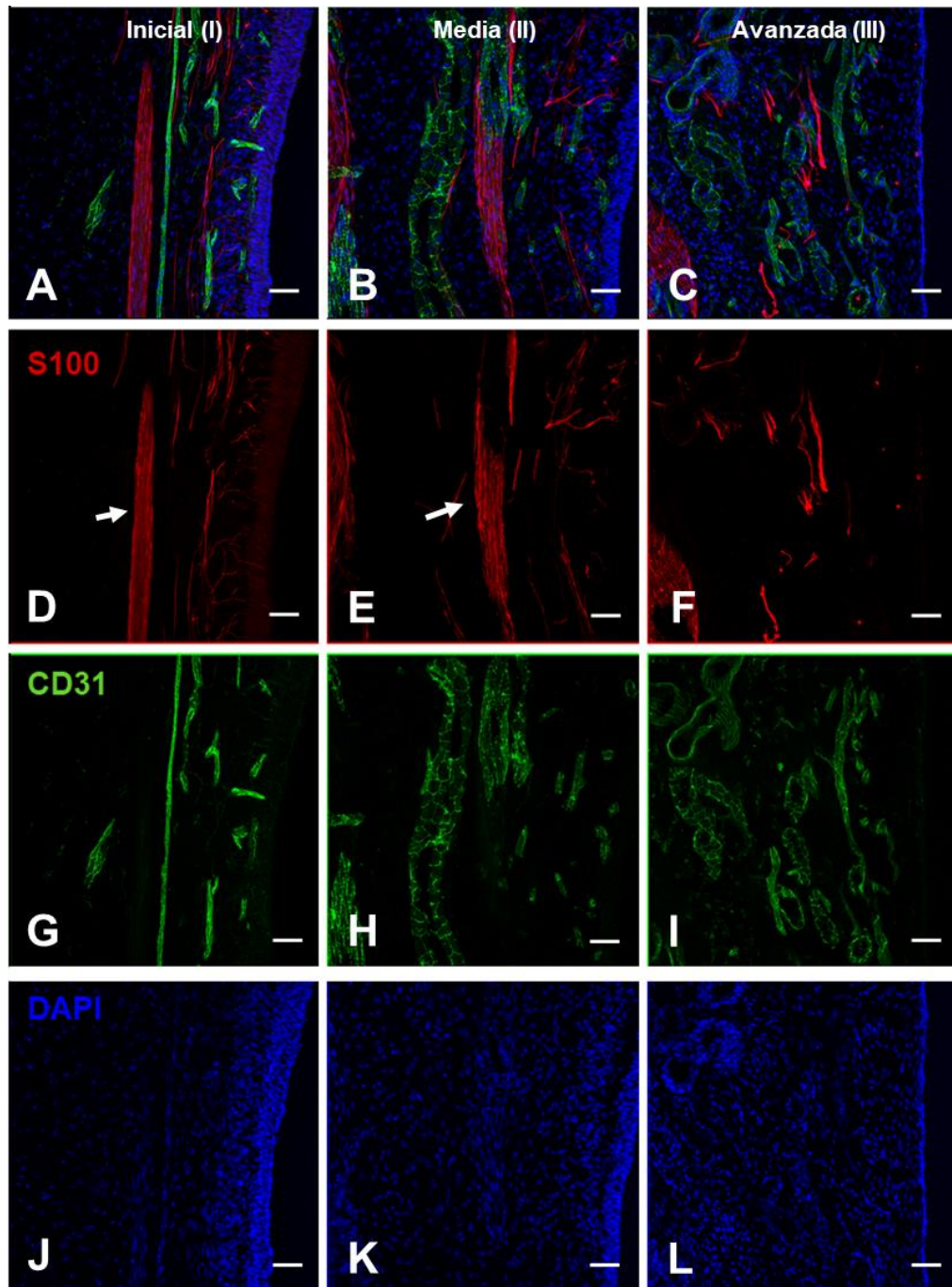


Figura 11: Caracterización de componentes vasculares (CD31, verde) y células de Schwann (S100, rojo) en pulpa coronal sobre el límite amelo-cementario durante el proceso de RRF. Las bandas de axones mielínicos se disgregan en la etapa media (B, flecha), para luego degenerarse perdiendo su estructura. El patrón vascular cambia mediante procesos de vasodilatación y angiogénesis para agruparse en torno a las zonas de daño axonal (H, I). Un aumento en el número celular se evidencia en la tinción DAPI (nuclear) a medida que se desarrolla la reabsorción. Barras de escala 50 μ m.

Discusión

El proceso de reabsorción radicular fisiológica es un fenómeno progresivo, en el cual hay una inflamación persistente que afecta a las células de la pulpa debido al estímulo compresivo por parte del diente permanente en desarrollo sobre la región más apical de los dientes temporales⁵⁹. Esta compresión causa una respuesta conjunta por parte del complejo dentino-pulpar donde nervios y vasculatura reaccionan como si se tratara de una injuria, primero a través de la degeneración axonal que lleva a la fragmentación de la mielina, como muestran los resultados con el marcador S100, para que luego comience un proceso regenerativo a cargo de las células de Schwann, las cuales se des-diferencian y estimulan a su vez la angiogénesis mediante factores moleculares, siendo el principal el Vascular endotelial growth factor (VEGF), lo cual se ve reflejado en los resultados con el marcador CD105. Las células de Schwann exhiben una alta plasticidad al desdiferenciarse⁶⁰, ya que para responder de forma adaptativa a la injuria se transforman en células con fenotipo reparativo que apoyan la reparación de nervios⁶¹.

En un estudio realizado por Cattin en 2015, quien, a diferencia del presente estudio, realizó cortes transversales en nervios de ratas, concluyó que una injuria a estos desencadena el proceso angiogénico producto de la generación de un ambiente hipóxico detectado por macrófagos⁶¹. Estos macrófagos serían los principales agentes liberadores de VEGF, el cual a su vez permitiría el reclutamiento de células endoteliales para la formación angiogénica. Aquí los nuevos vasos sirven como vías de transporte para las células encargadas de los procesos regenerativos nerviosos. Un proceso similar ocurre en RRF, en donde se observa una gran actividad angiogénica acompañado con un reordenamiento de los vasos sanguíneos en relación a las SC. Esto se encuentra fuertemente concentrado en la zona de reabsorción radicular hacia apical del diente.

La recuperación de fibras nerviosas está regulada además a través del aumento del factor neurotrófico (Nerve Growth Factor, NGF), el cual a su vez se encuentra regulado por las células del endotelio vascular, por lo tanto el aumento de la vasculatura incrementa las posibilidades de regeneración nerviosa. Lo anterior fue descrito por Peleshok y Ribeiro-da-Silva, quienes midieron la respuesta nerviosa ante un estímulo compresivo, situación semejante a la RRF⁶².

Los cambios vasculares sin embargo, ocurren en todos los sectores de la pulpa en mayor o menor grado, asociados al proceso degenerativo nervioso presente mejorar.

Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, el cual tiene como propósito caracterizar los componentes vasculares durante la progresión del proceso de Reabsorción Radicular Fisiológico, se puede concluir que:

Con respecto a las características de los componentes de la vasculatura, podemos decir que el proceso de RRF conlleva cambios vasculares, los cuales son asociados al proceso de compresión neurovascular que ocurre en el dominio de reabsorción (hipoxia). Sus principales manifestaciones son una marcada vasodilatación en conjunto con un aumento en la proliferación de células endoteliales y nuevos vasos principalmente en la etapa media de la RRF.

En las etapas media y avanzada la angiogénesis se evidencia en la pulpa radicular, de mayor manera en la zona de reabsorción propiamente tal. Sin embargo, en la pulpa coronal se observa en menor grado. Este cambio en el patrón vascular es observable en los distintos marcajes pero no necesariamente se deja ver de la misma manera en todas las muestras.

Los cambios vasculares ocurren asociados al proceso de degeneración tipo Walleriana que sufren los componentes nerviosos, los procesos angiogénicos otorgan un soporte a los axones aislados donde los nuevos vasos actúan como vías para la transmisión de factores tróficos contribuyentes a la regeneración de los fascículos de axones mielínicos.

El conocimiento de la biología pulpar durante el proceso fisiológico, presente en todos los pacientes pediátricos, tiene un valor fundamental para la toma de decisiones terapéuticas en terapias de dientes temporales. La pulpa de estos dientes mantiene su capacidad sensorial, reparativa y defensiva durante la progresión de la reabsorción hasta etapas avanzadas, lo que podría ayudar al clínico a seguir un plan de tratamiento adecuado para conservar el diente según su etapa de desarrollo.

Sugerencias

Como sugerencias para futuras investigaciones se aconseja aumentar el tamaño muestral de manera que los resultados sean extrapolables a cualquier otro tipo de estudio. Otro factor importante a considerar es el estudio de otro componente vascular como lo son los vasos linfáticos, esto a través del uso de otros marcadores como marcador de Podoplanina (PDPN).

Finalmente, extender la recolección de muestras hacia dientes que cursen procesos patológicos como Caries o Reabsorciones radiculares patológicas, sería beneficioso para que a través de la comparación de resultados entre fenómenos fisiológicos y no fisiológicos, se logre contribuir a la comprensión de la biología pulpar y la respuesta de todos sus componentes celulares frente a distintos estímulos aplicables a la práctica clínica habitual.

Resumen

Introducción: Los dientes temporales sufren un proceso de reabsorción radicular fisiológica. Los mecanismos y factores involucrados en la RRF de la dentición temporal aún no están del todo comprendidos. Existen cambios histológicos a nivel pulpar, en donde la vasculatura no se encuentra del todo comprendida.

Objetivo: Caracterizar componentes vasculares durante el proceso de RRF en dientes temporales humanos en función de tres etapas establecidas.

Materiales y Métodos: Caninos temporales con indicación de exodoncia, fueron fijados por 6 horas y desmineralizados en EDTA por 3 meses. Las muestras fueron lavadas con solución buffer y crioprotegidas. Estas se montaron en un medio de congelación para tejidos y congeladas a -25°C . Se realizaron cortes de $25\ \mu\text{m}$ en un operado a -25°C y luego fueron montadas en portaobjetos; éstas secciones fueron rehidratadas en PBS e incubadas en una solución de bloqueo. Luego se agregaron los anticuerpos primarios, se dejaron actuar durante 12 horas a una temperatura de 4°C . Después se agregan los anticuerpos secundarios y se dejan actuar 1 hora a temperatura ambiente; se vuelve a lavar con PBS para retirar los excesos. Las muestras procesadas fueron observadas y analizadas con un microscopio confocal.

Resultados: En el estado de reabsorción más temprano se observa una red vascular presente, mientras que las células de Schwann se disponen de manera compacta y organizada. La desintegración fascicular de estas comienza de forma tardía en la etapa inicial, acompañada de una mayor presencia de vasos a su alrededor. La degradación de los fascículos de nervios conlleva un aumento del calibre vascular en la etapa media. En etapa avanzada las CS recuperan parcialmente su organización en fibras y hay un aumento en el número de vasos sanguíneos en torno.

Discusión: Durante proceso de reabsorción radicular fisiológica existe una inflamación persistente que afecta a las células de la pulpa debido al estímulo compresivo por parte del diente permanente en desarrollo. Esta compresión causa una respuesta conjunta por parte del complejo dentino-pulpar donde nervios y vasculatura reaccionan como si se tratara de una injuria, primero a través de la degeneración axonal que lleva a la fragmentación de la mielina, para que luego comience un proceso regenerativo a cargo de las células de Schwann, las cuales se des-diferencian y estimulan a su vez la angiogénesis.

Referencias

1. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(4):323-334.
2. Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J Oral Sci*. 2007; 49(1):1-12.
3. Suzuki K, Lovera M, Schmachtenberg O, Couve E. Axonal Degeneration in Dental Pulp Precedes Human Primary Teeth Exfoliation. *J Dent Res*. 2015; 94(10):1446-1453.
4. Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. 2004; 49(1):29-36.
5. Rodd HD, Boissonade FM. Vascular status in human primary and permanent teeth in health and disease. *Eur J Oral Sci*. 2005; 113(2):128-134.
6. Monteiro J, Day P, Duggal M, Morgan C, Rodd H. Pulpal status of human primary teeth with physiological root resorption. *Int J Paediatr Dent*. 2009; 19(1):16-25.
7. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Titular Bucodental*. 3ª Edición ed. México D.F: Editorial Médica panamericana; 2009. 454 p.
8. Michel G. *The Dental Pulp. Biology, Pathology and Regenerative Therapies*. Paris, France. 2014. p. 281.
9. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology. Development, Structure, and Function* St. Louis, Missouri: Elsevier; 2013. 379
10. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*. 2004; 5(7):499-508.
11. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 9):1647-1648.
12. Salazar-Ciudad I, Jernvall J. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(12):8116-8120.
13. Abreu Correa JM, Marbán González R. Complejo dentino pulpar. Estructura y diagnóstico REMIJ. 2011; 12:82-99.

14. Tjäderhane L, Carrilho M. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endodontic Topics*. 2012; 20:3-29.
15. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*,. 1993; 4:679-728.
16. Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog*. 1996; 12(6):865-868
17. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*. 2007; 13(2):151-157.
18. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res*. 2013; 92(9):765-772.
19. Berggreen E, Bletsa A, Heyeraas K. Circulation in normal and inflamed dental pulp. *Endodontic Topics*. 2010. 17 (1): 2-11.
20. Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res*. 2007; 101(2):125-136.
21. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003; 9(6):685-693.
22. Trubiani O, Tripodi D, Delle Fratte T, Caputi S, Di Primio R. Human dental pulp vasculogenesis evaluated by CD34 antigen expression and morphological arrangement. *J Dent Res*. 2003; 82(9):742-747.
23. Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis*. 2009; 12(2):113-123.
24. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*. 1977; 14(1):53-65.
25. Eble JA, Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(12):1385-1400.
26. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(1):a006429.
27. Yoshida S, Ohshima H. Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts. *Anat Rec*. 1996; 245(2):313-326.
28. Majesky MW, Dong XR, Hognlund V, Daum G, Mahoney WM, Jr. The adventitia: a progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells Tissues Organs*. 2012; 195(1-2):73-81.

29. Geevarghese A, Herman IM. Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. *Transl Res.* 2014; 163(4):296-306.
30. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011; 21(2):193-215.
31. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008; 3(3):301-313.
32. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell.* 2008; 3(3):229-230.
33. Xu J, Gong T, Heng BC, Zhang CF. A systematic review: differentiation of stem cells into functional pericytes. *FASEB J.* 2017; 31(5):1775-1786.
34. Vongsavan N, Matthews B. The vascularity of dental pulp in cats. *J Dent Res.* 1992; 71(12):1913-1915.
35. Kim S. Microcirculation of the dental pulp in health and disease. *J Endod.* 1985; 11(11):465-471.
36. Tønder KJ. Vascular reactions in the dental pulp during inflammation. *Acta Odontol Scand.* 1983; 41(4):247-256.
37. Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J, Nör JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod.* 2010; 36(10):1633-1637.
38. Rombouts C, Giraud T, Jeanneau C, About I. Pulp Vascularization during Tooth Development, Regeneration, and Therapy. *J Dent Res.* 2017; 96(2):137-144.
39. Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, et al. Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2009; 22(3):699-706.
40. Sieveking DP, Ng MK. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med.* 2009; 14(2):153-166.
41. Nakashima M, Iohara K. Regeneration of dental pulp by stem cells. *Adv Dent Res.* 2011; 23(3):313-319.
42. Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, Katata C, Hayashi M, Imazato S. Pulp Regeneration by 3-dimensional Dental Pulp Stem Cell Constructs. *J Dent Res.* 2018; 97(10):1137-1143.
43. Potente M, Makinen T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017; 18(8):477-494.

44. Luukko K, Kettunen P. Integration of tooth morphogenesis and innervation by local tissue interactions, signaling networks, and semaphorin 3A. *Cell Adh Migr.* 2016; 10(6):618-626.
45. Fried K, Nosrat C, Lillesaar C, Hildebrand C. Molecular signaling and pulpal nerve development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(3):318-332.
46. Ikeda, H, Suda, H. Circulation of the pulp. Editors, Hargreaves et al. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Quintessence Publishing Co, Inc., Chicago. 2012; p. 109–131.
47. Lilja J. Innervation of different parts of the predentin and dentin in young human premolars. *Acta Odontol Scand.* 1979; 37(6):339-346.
48. Bender IB. Pulpal pain diagnosis--a review. *J Endod.* 2000; 26(3):175-179.
49. Byers MR, Suzuki H, Maeda T. Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc Res Tech.* 2003; 60(5):503-515.
50. Chung G, Jung SJ, Oh SB. Cellular and molecular mechanisms of dental nociception. *J Dent Res.* 2013; 92(11):948-955.
51. Gibbs JL, Melnyk JL, Basbaum AI. Differential TRPV1 and TRPV2 channel expression in dental pulp. *J Dent Res.* 2011; 90(6):765-770.
52. Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, et al. The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 2009; 28(9):1308-1318.
53. Lim JC, Mitchell CH. Inflammation, pain, and pressure--purinergic signaling in oral tissues. *J Dent Res.* 2012; 91(12):1103-1109.
54. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(2):179-200.
55. Luukko K, Kettunen P. Coordination of tooth morphogenesis and neuronal development through tissue interactions: lessons from mouse models. *Exp Cell Res.* 2014; 325(2):72-77.
56. Sahara N. Cellular events at the onset of physiological root resorption in rabbit deciduous teeth. *Anat Rec.* 2001; 264(4):387-396.
57. Simsek S, Duruturk L. A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(5):461-468.

58. Moorrees C, Fanning E, Hunt E. Formation and resorption of three deciduous teeth in children. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1963; 21:205-213.
59. Couve E, Schmachtenberg O. Schwann Cell Responses and Plasticity in Different Dental Pulp Scenarios. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12:299.
60. Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(7):a020487.
61. Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, Mackenzie FE, Hoving JJ, Garcia Calavia N, et al. Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell.* 2015; 162(5):1127-1139.
62. Peleshok JC, Ribeiro-da-Silva A. Neurotrophic factor changes in the rat thick skin following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Mol Pain.* 2012; 8:1.

Anexos



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)
Proyecto Fondecyt N° 1141281
Instituto de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso
32-250-8077
Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso

(del Paciente)

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 Responsable _____

(del BM-LabME)

Anexo 1. Consentimiento informado de donación de diente para el Banco de muestras del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Valparaíso (BM-LabME), el cual fue utilizado para la recolección de muestras.