



**ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL TEJIDO FORMADO POSTERIOR A
UNA REGENERACIÓN PULPAR, REVISIÓN DE LITERATURA
ENTRE LOS AÑOS 2012 Y 2017**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Especialista en Endodoncia

Alumnas: Camila López B.
Cayetana Solari P.

Docente Guía: Prof. Dra. Alicia Caro
Cátedra de
Endodoncia

Valparaíso – Chile
2018

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO.....	5
I. EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGIA DEL COMPLEJO DENTINO PULPAR.....	5
II. TIPOS DE TRATAMIENTOS ENDODONTICOS PARA DIENTES INMADUROS	16
III. ENDODONCIA REGENERATIVA.....	25
IV. BASES BIOLÓGICAS DE LA REGENERACIÓN.....	30
V. MECANISMO BIOLÓGICO DEL PROCESO DE REGENERACION DENTARIA	45
VI. PROTOCOLOS DE REVASCULARIZACION	46
VII. NUEVAS TENDENCIAS Y ESTUDIOS REALIZADOS EN ANIMALES	50
VIII. INVESTIGACIONES HISTOLÓGICAS EN HUMANOS	53
OBJETIVOS	64
MATERIALES Y MÉTODO.....	65
RESULTADOS.....	69
DISCUSIÓN	80
CONCLUSIONES.....	82
SUGERENCIAS	85
BIBLIOGRAFÍA	86

INTRODUCCIÓN

El uso del término de “revascularización” fue adaptado por Iwaya y cols. Para describir la curación clínica de los abscesos periapicales y el desarrollo de raíces en los dientes inmaduros con pulpa desvitalizada. Autores como el anteriormente nombrado y Banchs y Tropeen²⁰⁰⁴, demostraron las ventajas de esta modalidad de tratamiento, lo que dio lugar a un desarrollo radiográficamente visible de toda la raíz, en comparación con el resultado de la formación de una barrera calcificada en el ápice después del tratamiento convencional con hidróxido de calcio.

Este término ha ido avanzando en conjunto con la ciencia, para pasar a llamarse actualmente Terapias Endodónticas Regenerativas.

Estas técnicas aparecen como respuesta a la necesidad de los dientes permanentes inmaduros que sufrían necrosis pulpar. Estas situaciones ocurren preferentemente en pacientes jóvenes en el grupo anterosuperior, obedeciendo a consecuencias de un traumatismo ocurrido en la etapa escolar. En muchos casos, estas lesiones causan la detención del desarrollo de estas piezas dentarias como consiguiente un ápice incompletamente formado y paredes dentinarias debilitadas.

La ausencia de ápice hace muy dificultoso o imposible el tratamiento endodóntico tradicional, y por otra parte el debilitamiento de las paredes dentinarias, hacen al diente muy susceptible a fracturas. Es por esta razón que el tratamiento de dientes inmaduros no vitales con patología periapical presenta grandes desafíos.

Actualmente el protocolo regenerativo para dientes inmaduros está avalado por la Asociación Americana de Endodoncia. Sin embargo, queda mucho por investigar en relación a qué tipo de tejido se forma, ya que no existen muchos estudios en humanos que lo puedan definir, esto debido a la necesidad de la extracción dentaria posterior a la terapia para poder ejercer los estudios histológicos que determinen el tipo de tejido formado.

Es por esto que este trabajo se basa en la investigación de qué tipo de tejido se origina en el conducto una vez realizada la regeneración y cuáles son los factores claves para realizar el procedimiento de manera predecible en todos los dientes que lo necesiten.

MARCO TEÓRICO

I. EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGIA DEL COMPLEJO DENTINO PULPAR

Según el libro Endodontics del Dr. Arnaldo Castelucci (1), el diente empieza su formación aproximadamente a la 6ta semana de vida intrauterina del embrión, se genera un engrosamiento del ectodermo que cubre la cavidad oral primitiva o estomodeo, este engrosamiento se llama "lámina dental". Estas células tienen una mayor actividad proliferativa que las células epiteliales adyacentes.

En la etapa de brote, que representa la formación del esmalte primitivo, dos tipos de células epiteliales se diferencian, una que cubre la superficie interna (epitelio interno) y las otras que van por la superficie externa (epitelio externo) del órgano del esmalte. En conjunto con este proceso hay células mesenquimales proliferando, adyacentes al epitelio interno del esmalte, que forman la papila dental en un sitio genéticamente determinado para cada diente.

En la fase de caperuza el órgano del esmalte con su epitelio interno y externo se invagina y el mesodermo situado abajo se conforma para ajustarse a este molde ectodérmico, dando origen a la verdadera papila dental.

En conjunto con la diferenciación de los epitelios del esmalte y de la papila dental se forma el saco dental alrededor de estas otras estructuras.

El esmalte deriva del epitelio interno del órgano del esmalte y tiene su origen en el ectoderma, el complejo dentino pulpar se forma a partir de la papila dental y por lo tanto, su origen es mesenquimático. Los tejidos periodontales que incluyen al hueso, ligamento y cemento también tienen origen mesenquimático.

La etapa de campana es la siguiente y corresponde a la invaginación del esmalte que rodea la papila dental, cuando esta profundidad epitelial llega al punto correspondiente a la unión amelo cementaria, se ha delineado la forma del diente y

la unión amelo dentinaria puede ser identificada. Se empieza a formar la dentina y el esmalte, es más, las células del epitelio interno del órgano del esmalte inducen a los odontoblastos a diferenciarse dejando los procesos odontoblásticos atrás mientras migran en dirección centrípeta. A su vez, a medida que los ameloblastos producen el esmalte van migrando en dirección centrífuga.

Las primeras células en diferenciarse son los ameloblastos, sin embargo, el primer tejido calcificado en aparecer es la dentina, una vez que los odontoblastos comienzan su aposición de dentina los ameloblastos secretan la matriz del esmalte.

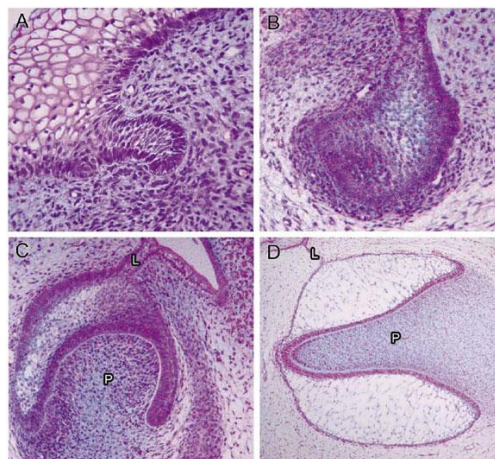


Fig. N°1, etapas de la formación dentaria. A. Fase de brote, B. Fase de caperuza, C. y D. fase campana. (2)

Cohen en Vías de la pulpa indica que la diferenciación de las células epiteliales y mesenquimatosas para transformarse en ameloblastos y odontoblastos, respectivamente ocurre durante la fase de campana del desarrollo dental. Los preameloblastos que revisten la papila dental inducen la diferenciación de los odontoblastos. Por consiguiente, la matriz de dentina secretada por los odontoblastos induce la secreción de esmalte por los ameloblastos. Durante la fase de campana existe todavía actividad mitótica entre las células relativamente inmaduras del epitelio interno del esmalte, en la región del asa cervical. Conforme estas células comienzan a madurar para transformarse en ameloblastos, la

actividad mitótica cesa y las células se alargan y evidencian las características de síntesis proteínica activa (es decir, abundancia de retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi bien desarrollado y numerosas mitocondrias).

Conforme los ameloblastos experimentan una diferenciación, se producen cambios a través de la membrana basal en la papila dental adyacente debido a un intercambio coordinado de factores de crecimiento y de mediadores solubles. Antes de la diferenciación de los odontoblastos, la papila dental se compone de células mesenquimatosas polimórficas poco numerosas, con espacios intercelulares amplios. Al comenzar la diferenciación, una sola capa de células, los futuros odontoblastos (preodontoblastos), se alinean a lo largo de la membrana basal, separando el epitelio interno del esmalte de la papila dental. Estas células dejan de dividirse y se alargan hasta formar células cilíndricas cortas con núcleos en situación basal. Desde cada una de estas células se extienden varias proyecciones citoplásmicas hacia la lámina basal. En esta fase, los preodontoblastos están todavía indiferenciados.

Conforme los odontoblastos se diferencian, progresivamente se alargan y adoptan las características ultra estructurales de las células secretoras de proteínas. Las prolongaciones citoplásmicas de esas células se extienden a través de la membrana basal dental hacia la lámina basal, y cada vez aparecen más fibrillas de colágeno dentro de la matriz extracelular. Las primeras fibras de colágeno pasan entre los preodontoblastos, y se extienden hacia la lámina basal para formar grandes fascículos en forma de abanico, con 100 a 200nm de diámetro, conocidos frecuentemente como fibras de von Korff. Estas fibras se tiñen con los colorantes argénticos y se asocian con un contenido elevado de proteoglicanos.

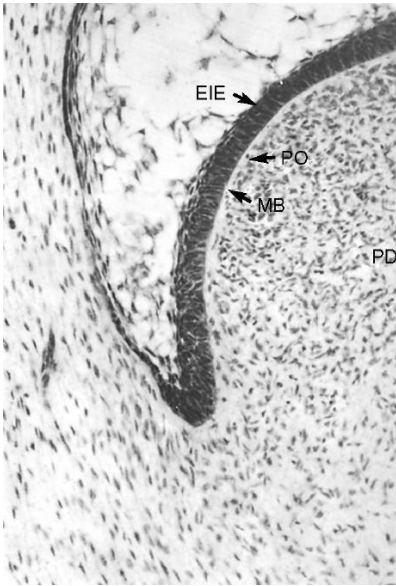


Fig. N°2: La fase de campana evidencia la presencia de preodontoblastos (PO) alineados a lo largo de la membrana basal (MB), que separa el epitelio interno del esmalte (EIE) y la papila dental (PD).

(1)

La producción de la primera matriz de dentina conlleva la formación, la organización y la maduración de las fibrillas de colágeno y los proteoglicanos. Conforme se forma la matriz de predentina, los odontoblastos comienzan a moverse hacia la pulpa central. Dentro de esta matriz, se acentúa una prolongación de cada odontoblasto y forma la prolongación odontoblástica. Los túbulos dentinarios se forman alrededor de estas prolongaciones celulares. Igual que el inicio y la morfogénesis del diente, la dentinogénesis se controla por interacciones mesenquimoepiteliales mediadas por una combinación de la MEC y moléculas de señalización de diferentes familias como BMP y Tgf- 1197.

La formación radicular comienza cuando la dentina y esmalte llegan a la futura unión amelo cementaria. El epitelio interno y externo del esmalte empieza a proliferar y se juntan y forman una suerte de diafragma hacia el futuro conducto radicular. Es en este punto donde se empieza a formar la Vaina epitelial de Hertwig. La vaina no se extiende a lo largo de toda la raíz y su posición se mantiene relativamente estable durante todo este proceso. La proliferación coronal de esta estructura es la

responsable de la formación y crecimiento de las paredes radiculares que originarán la erupción del diente.

La vaina epitelial de Hertwig es capaz de inducir la diferenciación odontoblástica radicular, que generará posteriormente la dentina radicular.

Islas celulares conocidas como los Restos epiteliales de Malassez permanecen en la vaina y pueden encontrarse en el ligamento periodontal; en los adultos estas células persisten al lado de la raíz en el ligamento.

La dentina radicular recién formada es capaz de inducir a células mesenquimales adyacentes a diferenciarse a cementoblastos y producir el cemento de la raíz.

La formación radicular no finaliza en los dientes permanentes hasta dos a tres años después de su erupción.

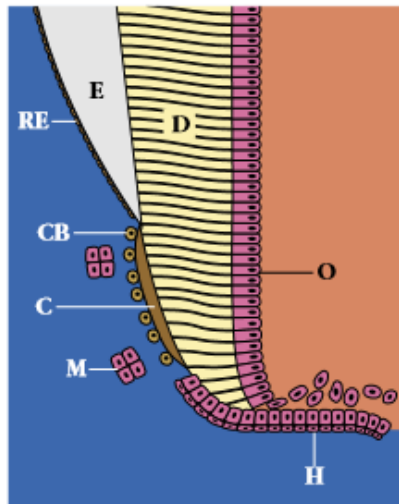


Fig. N°3: Esquema que muestra la Vaina epitelial de Hertwig. Una vez que la dentina radicular se ha formado, la vaina se rompe permitiendo a los cementoblastos depositar cemento sobre la dentina recién formada. Solo los restos epiteliales de Malassez se mantienen sobre los restos de la vaina. A su vez, los ameloblastos, que ya secretaron todo el esmalte, se transforman a células cuboidales sobre el esmalte, que al momento de la erupción dentaria, se fusionan con el epitelio de la cavidad oral. RE: epitelio de esmalte reducido, E; esmalte, D: dentina, O: odontoblastos, C: cemento, CB: cementoblastos, M: restos epiteliales de Malassez, H: vaina epitelial de Hertwig. (1)

La pulpa dental y la dentina funcionan como una unidad y los odontoblastos son un elemento básico del complejo pulpo dentinario. Los odontoblastos se localizan en la periferia del tejido pulpar, con extensiones a la parte interna de la dentina. La dentina no existiría de no ser producida por los odontoblastos y la pulpa dental depende de la protección ofrecida por la dentina y el esmalte. Asimismo, la dinámica integrada del complejo pulpodentinario implica que los impactos en la dentina pueden alterar los componentes pulpares, y las alteraciones de la pulpa pueden, a su vez, alterar la calidad y cantidad de dentina producida.

El estrato celular más externo de la pulpa sana es la capa de odontoblastos. Esta capa se localiza inmediatamente subyacente a la predentina; las proyecciones odontoblásticas, sin embargo, pasan a través de la predentina para llegar a la dentina. En consecuencia, la capa odontoblástica se compone de los cuerpos celulares de los odontoblastos. Además, entre estos últimos se pueden encontrar capilares, fibras nerviosas y células dendríticas.

En la porción coronal de la pulpa joven, que está secretando colágeno activamente, los odontoblastos tienen una forma cilíndrica alta. La altura de los odontoblastos es variable, sus núcleos no se encuentran al mismo nivel, sino que están alineados de forma escalonada, descrito a menudo como una empalizada. Esta organización hace que parezca que las capas tengan de tres a cinco células de grosor, aunque realmente sólo hay una capa de odontoblastos. Los espacios intercelulares entre los odontoblastos son pequeños, de unos 30-40 nm de ancho. Los cuerpos celulares de los odontoblastos están conectados por complejos firmes y uniones comunicantes.

La capa odontoblástica de la pulpa coronal contiene más células por unidad de área que la de la pulpa radicular. Mientras que los odontoblastos de la pulpa coronal madura suelen ser cilíndricos, los de la porción media de la pulpa radicular son más cúbicos. Cerca del foramen apical, los odontoblastos aparecen como una capa escamosa de células planas. Puesto que el número de túbulos dentinarios por unidad de área es menor en la raíz que en la corona del diente, los cuerpos celulares

de los odontoblastos están menos apiñados y se pueden ensanchar en sentido lateral.

Existe una serie de uniones intercelulares especializadas, que incluyen desmosomas (zónulas adherentes), uniones en hendidura (nexos) y uniones estrechas (zónulas ocluyentes) que conectan odontoblastos adyacentes. Los desmosomas en mancha, localizados en la parte apical de los cuerpos celulares odontoblásticos, unen de forma mecánica unos odontoblastos con otros. Las numerosas uniones en hendidura proporcionan vías de baja resistencia, a través de las cuales la estimulación eléctrica puede pasar de unas células a otras para sincronizar la actividad secretora que produce capas de predentina relativamente uniformes. Estas uniones son más numerosas durante la formación de la dentina primaria. Las uniones estrechas se encuentran principalmente en la parte apical de los odontoblastos de los dientes jóvenes. Estas estructuras constan de crestas y surcos lineales que cierran el espacio intercelular.

Bajo la capa odontoblástica en la pulpa coronal, existe con frecuencia una zona estrecha, de un ancho aproximado de 40 μm , relativamente libre de células y por ello recibe el nombre de **zona pobre en células o capa de Weil**. Esa zona está formada por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y las finas prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos. La presencia o ausencia de la zona pobre en células depende del estado funcional de la pulpa. Esta zona puede no ser aparente en las pulpas jóvenes, donde la dentina se forma con rapidez, o en las pulpas viejas, donde se genera dentina reparadora.

En el área subendoblástica existe un estrato que contiene una proporción elevada de fibroblastos, en comparación con la región más central de la pulpa. Esta capa es mucho más prominente en la pulpa coronal que en la radicular. Además de fibroblastos, la **zona rica en células** puede contener un número variable de macrófagos, células dendríticas y células mesenquimatosas indiferenciadas o células madre.

La división celular dentro de la zona rica en células es una ocurrencia rara en pulpas normales, la muerte de los odontoblastos causa un gran aumento en la tasa de mitosis. Puesto que los odontoblastos con lesiones irreversibles se sustituyen por células que emigran desde la zona rica en células hasta la superficie interna de la dentina.

La **pulpa central** es la masa central de la pulpa. Contiene los vasos sanguíneos y los nervios de mayor tamaño. La célula más destacada en esta zona es el fibroblasto.

En la siguiente imagen se observa las capas presentes en la pulpa dental.

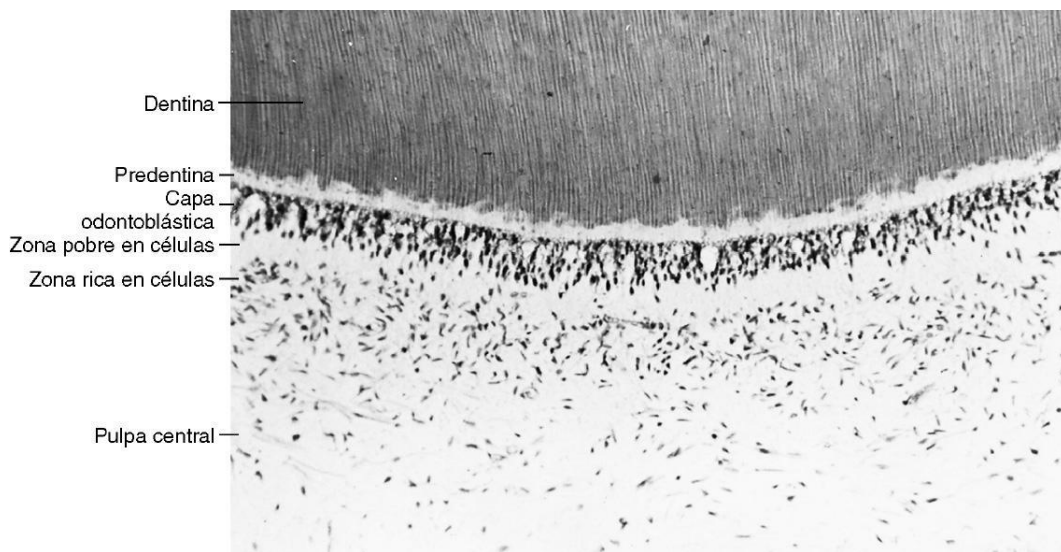


Fig. N°4: Zonas morfológicas de la pulpa madura (2).

Células de la Pulpa Dental

- a) **Odontoblastos:** causante de la dentinogénesis durante el desarrollo dental y en el envejecimiento, se le considera la célula más característica del complejo pulpodentinario. Durante la dentinogénesis, los odontoblastos forman los túbulos dentinarios, y su presencia dentro de los túbulos convierte la dentina en un tejido vivo. Estas células producen una matriz compuesta de

fibras colágenas, proteínas no colágenas y proteoglicanos capaces de mineralizarse. Presentan un retículo endoplasmático rugoso altamente ordenado, un aparato de Golgi bien desarrollado, gránulos secretorios y numerosas mitocondrias. Además, estas células son ricas en ARN, y sus núcleos contienen uno o varios nucléolos prominentes. Estas características generales corresponden a células secretoras de proteínas. Los odontoblastos dejan tras de sí prolongaciones celulares para formar los túbulos dentinarios. Las ramas laterales entre las proyecciones odontoblásticas mayores las interconectan a través de conductos. Esto permite la conexión intercelular y la circulación de fluido y metabolitos a través de la matriz mineralizada. El cuerpo celular del odontoblasto activo tiene un núcleo grande que puede contener hasta cuatro nucléolos. El núcleo está situado en el extremo basal de la célula, contenido dentro de una envoltura nuclear. Un aparato de Golgi bien desarrollado, localizado en el centro del citoplasma supranuclear, está constituido por sistemas de cisternas y vesículas con paredes lisas. Existen numerosas mitocondrias distribuidas de forma uniforme por el cuerpo celular. Al parecer, los odontoblastos sintetizan sobre todo colágeno tipo I aunque se han encontrado pequeñas cantidades de colágeno tipo V en la MEC. Además de proteoglicanos y colágeno, secretan sialoproteína de la dentina y fosfoforina (fosfoproteína intensamente fosforilada que participa en la mineralización extracelular). La fosfoforina es exclusiva de la dentina, y no se encuentra en ningún otro tipo de células mesenquimatosas. El odontoblasto secreta fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina, una enzima íntimamente relacionada con la mineralización. Alrededor de cada una de las prolongaciones mayores de los odontoblastos se forma un túbulo dentinario. La proyección odontoblástica ocupa la mayor parte del espacio dentro del túbulo y de algún modo media la formación de dentina peritubular.

- b) Fibroblastos:** son las células más numerosas en la pulpa. Estas células sintetizan colágeno tipos I y III, así como proteoglicanos y GAG. Producen y

mantiene las proteínas de matriz de la MEC. Puesto que también son capaces de fagocitar y digerir el colágeno, los fibroblastos son los encargados de renovar el colágeno en la pulpa. Se encuentran distribuidos por toda la pulpa, sin embargo, abundan sobre todo en la zona rica en células. Conforme maduran, estas células se convierten en estrelladas, y el aparato de Golgi aumenta de tamaño, el RER prolifera, aparecen las vesículas secretoras, y los fibroblastos adoptan el aspecto característico de células secretoras de proteínas. Además, las fibras de colágeno se acumulan a lo largo de la superficie externa del cuerpo celular. Al aumentar el número de vasos sanguíneos, nervios y fibras, se produce una disminución relativa del número de fibroblastos presentes en la pulpa. Muchos fibroblastos de la pulpa se caracterizan por ser relativamente indiferenciados. Un término más moderno para las células indiferenciadas es células madre. Muchas células pulpares parecen permanecer relativamente indiferenciadas (en comparación con fibroblastos de otros tejidos conjuntivos). Este concepto se ha confirmado con la observación de un gran número de fibras similares a la reticulina en la pulpa, con afinidad por las tinciones de plata y similares a las fibras argirofílicas de la pulpa. Los fibroblastos pulpares parecen tomar parte activa en las vías de señalización en la pulpa dental. Por ejemplo, los neuropéptidos estimulan la síntesis y el crecimiento de fibroblastos; a su vez, los fibroblastos producen crecimiento de factor nervioso (NGF) y citocinas proinflamatorias durante la inflamación. El NGF tiene un papel importante no sólo en el desarrollo, también en la regulación de respuestas neuronales y posiblemente odontoblásticas a la lesión por activación de receptores similares a los de la neurotrofina expresados en ambos tipos de células.

- c) **Macrófagos:** son monocitos que han abandonado el torrente sanguíneo, han entrado en los tejidos y se han diferenciado en varias subpoblaciones. Muchos están muy próximos a los vasos sanguíneos. Una subpoblación importante de macrófagos desempeña funciones activas de endocitosis y fagocitosis. Debido a su movilidad y actividad fagocítica, estos elementos

celulares son capaces de actuar como basureros (scavengers), que eliminan hematíes extravasados, células muertas y sustancias extrañas presentes en los tejidos. El material ingerido por los macrófagos es destruido mediante la acción de enzimas lisosomales. Otro subconjunto de macrófagos participa en reacciones inmunes mediante el procesamiento del antígeno y su presentación posterior a las células T de memoria.

- d) Células dendríticas:** son elementos accesorios del sistema inmune. Las células dendríticas se hallan sobre todo en los tejidos linfoides, pero también están ampliamente distribuidas por los tejidos conectivos, entre ellos el pulpar. Estas células se denominan células presentadoras de antígeno, y se caracterizan por sus prolongaciones citoplásmicas dendríticas y la presencia de complejos del MHC de clase II en su superficie celular. En la pulpa normal, se localizan principalmente en la periferia de la pulpa coronal cerca de la predentina, pero migran centralmente en la pulpa después de un estímulo antigénico.

- e) Linfocitos:** Hahn y cols. comunicaron el hallazgo de linfocitos T en las pulpas de dientes humanos sanos (2).

- f) Mastocitos:** Los mastocitos se encuentran ampliamente distribuidos por los tejidos conectivos, donde forman grupos pequeños en la contigüidad de los vasos sanguíneos. En pocas ocasiones, los mastocitos se hallan en el tejido pulpar normal, mientras que se encuentran de forma sistemática en las pulpas con inflamación crónica. Estas células han sido objeto de una considerable atención debido a su función espectacular en las reacciones inflamatorias. Los gránulos de los mastocitos contienen heparina, un

anticoagulante, e histamina, un importante mediador inflamatorio, así como otros muchos factores químicos.

En el siguiente esquema se observa una representación de las diferentes capas de la pulpa dental, incluyendo células, vasos sanguíneos y terminales nerviosos.

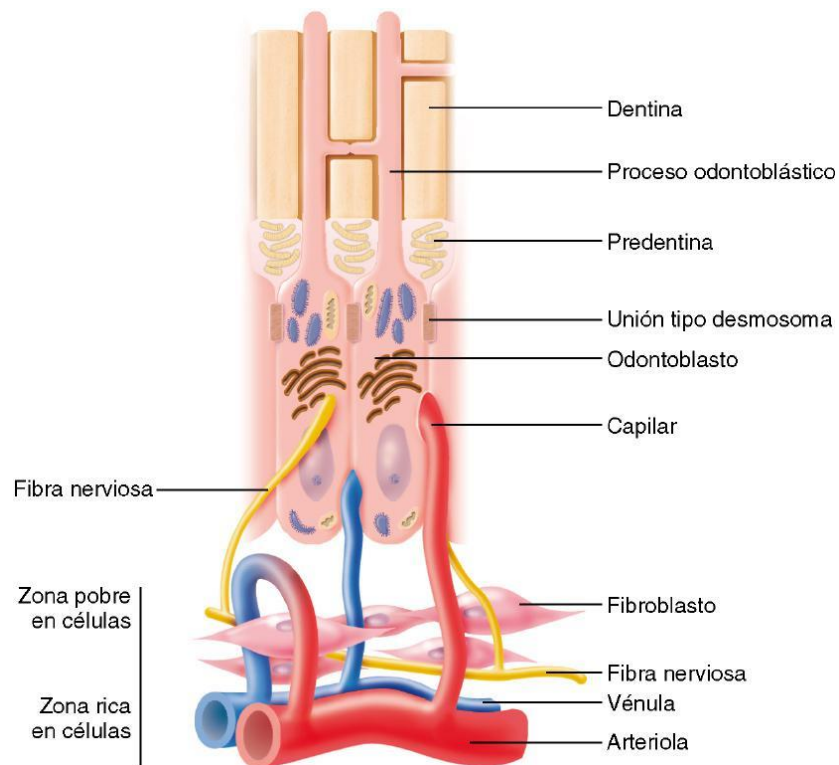


Fig N°5: Representación esquemática de la capa odontoblástica y la región subodontoblástica de la pulpa (2).

II. TIPOS DE TRATAMIENTOS ENDODONTICOS PARA DIENTES INMADUROS

La preparación convencional de los conductos radiculares en los dientes inmaduros con necrosis pulpar y posibles patologías apicales presenta un desafío al clínico

tratante, han existido muchos cambios en los procedimientos como por ejemplo, la instrumentación, la medicación utilizada, los irrigantes y los materiales utilizados para la apicoformación.

En el caso de dientes inmaduros con desarrollo incompleto de su raíz, ya sea causado por trauma, caries dental u otra patología pulpar, la ausencia de una constricción natural hace que el ápice radicular represente un desafío para el profesional al colocar un material de obturación, debido a que un foramen abierto no proporciona una barrera anatómica y el amplio diámetro apical hace imposible generar un tope necesario para el material de obturación (4). En 1966 Alfred L Frank (5) publicó un artículo en el cual describía una técnica clínica que inducía el cierre apical utilizando hidróxido de calcio durante tres a seis meses, con esto demostró que era posible no solo la inducción del cierre del canal sino también la resolución de la patología apical, a esto se le llamó “Apexificación”. En caso que el diente inmaduro presente pulpa vital, ápice abierto y no exista patología apical, la técnica descrita para lograr el cierre apical se conoce como “Apexogénesis”. A continuación se describen ambas técnicas:

APEXOGÉNESIS:

Según la Guía Clínica de Endodoncia de la Asociación Americana de Endodoncia (6), la apexogénesis es una terapia realizada en dientes con pulpa vital (daño reversible) con ápices incompletos o inmaduros. La finalidad de la técnica consiste en permitir la formación y desarrollo fisiológico de la raíz. El procedimiento involucra remover una porción de la pulpa expuesta y aplicar un medicamento con el objetivo de mantener la vitalidad y permitir el desarrollo radicular.

Esta técnica se aplica en dientes inmaduros con pulpa vital, involucra las técnicas de recubrimiento pulpar indirecto y directo, pulpotomía parcial y total. Luego de haber realizado esta terapia se deben realizar controles clínicos y radiográficos a intervalos de 3 a 6 meses para vigilar la vitalidad pulpar y el desarrollo radicular normal (7).

El éxito va de la mano con la ausencia de signos clínicos o radiológicos de enfermedad, presencia de puente dentinario y el desarrollo completo de la raíz (7).

Las indicaciones expuestas en la guía son las siguientes: caries profunda que pudiese desencadenar en una exposición pulpar durante la eliminación de la misma, no deben haber síntomas subjetivos previo al tratamiento, las radiografías previas a la apexogénesis deben excluir patologías perirradiculares, cuando ocurre exposición de una pulpa vital y asintomática por medio de un procedimiento mecánico, además que se pueda controlar la hemorragia en la zona, que esto ocurra cuando el diente esté con aislamiento absoluto, debe existir la posibilidad de realizar y mantener un sellado y obturación coronal adecuada, la exposición pulpar permite llevar el material sellador en contacto directo con la pulpa expuesta y el paciente debe ser informado de que la endodoncia del diente puede ser indicada en un futuro.

Dentro de los objetivos de esta terapia se describe la prevención de síntomas y signos clínicos adversos, prevenir el colapso de los tejidos de soporte perirradicular, permitir/desarrollar el contacto entre el material de recubrimiento radiopaco y el tejido pulpar y por ultimo obtener radiográficamente evidencia de desarrollo radicular.

Procedimiento (8):

1. Anestesia y aislamiento absoluto del diente a trabajar.
2. Eliminación del tejido pulpar inflamado: se extirpan 2 – 4 mm superficiales de la pulpa con una fresa redonda afilada en una pieza de mano refrigerada de alta velocidad o suprimir toda la pulpa coronal para exponer la pulpa radicular, este último con una cuchareta de caries afilada.
3. Control de hemorragia presionando con mota de algodón estéril embebida en suero fisiológico. La imposibilidad de conseguir hemostasia puede indicar que queda tejido inflamado que debe ser extirpado.
4. Se debe enjuagar la pulpa expuesta con hipoclorito de sodio al 2.5% o suero fisiológico.

5. Aplicación del material de recubrimiento: hidróxido de calcio o MTA, en contacto directo con la pulpa.
6. Restauración provisional.

El tiempo total para la consecución de los objetivos de la apexogénesis oscila entre 1 a 2 años, dependiendo del grado de desarrollo del diente en el momento del procedimiento. El paciente debe acudir a sus controles a intervalos de 3 meses con el fin de determinar la vitalidad pulpar y el grado de desarrollo apical. Si se determina que la pulpa ha pasado a un estado irreversiblemente inflamado o necrótico, o si hay una reabsorción interna evidente, la pulpa debe ser extirpada y se deben iniciar terapias inductoras.

APEXIFICACIÓN:

Es un proceso que promueve la formación de una barrera apical que permite alcanzar el cierre de un ápice de un diente inmaduro con pulpa necrótica con el fin de lograr conformar el espacio radicular para la recepción de un material de obturación adecuado (9, 10, 11). No permite el crecimiento y desarrollo de otros tipos celulares, más que la secreción de matriz hipermineralizada, dejando un sellado en la zona apical pero no se logra desarrollar las paredes en mayor grado (12).

Los materiales que han sido utilizados a través de los años para este procedimiento son:

- Hidróxido de Calcio
- Agregado de trióxido mineral (MTA)

Históricamente, por largo tiempo se usó el hidróxido de calcio en estos tratamientos, una vez logrado el cierre apical se obtura con gutapercha los conductos radiculares.

La tasa de éxito de apicoformación usando hidróxido de calcio llegó a ser tan alta como 95%, sin embargo, la asociación americana de endodoncia ha relatado varios problemas:

1. El tiempo requerido para la formación de la barrera calcificada (3-24 meses).
2. Múltiples citas necesarios para re aplicación de hidróxido de calcio.
3. El efecto a largo plazo (varios meses o más) de hidróxido de calcio sobre las propiedades mecánicas de la dentina. Este material posee un efecto proteolítico muy fuerte; por tanto, además de presentar unas paredes radiculares finas propias de los diente en desarrollo, se le suma el efecto adverso del hidróxido de calcio sobre la dentina que es que la hace progresivamente más frágil, mientras mayor tiempo está en contacto la dentina con el hidróxido de calcio mayor es el efecto y se ve aumentada la incidencia de fracturas cervicales (13). Este efecto proteolítico permite disolver los restos pulpares en una semana, pero también afecta la dentina de alrededor, haciéndola con el tiempo (unos meses) más frágil. Es importante conocer la relación entre el tiempo y sus efectos, por lo que el uso del hidróxido de calcio solo deberá limitarse a unas pocas semanas.

Posteriormente el MTA fue planteado como una alternativa para la apexificación, este induce la formación de cemento y ofrece varias ventajas sobre el hidróxido de calcio, teniendo una tasa de éxito de 94% (3). Recientes investigaciones han podido constatar que el agregado de trióxido mineral induce la formación de tejido apical y su uso está asociado con una menor inflamación de la zona en relación a otros materiales probados (3).

A diferencia de las técnicas convencionales de apicoformación, el uso de MTA busca crear una barrera rígida contra la que se pueda compactar el material de obturación sin tener que esperar la formación de la barrera de osteocemento; a su vez induce la formación de dicha barrera después de finalizado el procedimiento.

El mecanismo de formación de cemento sobre el MTA, como material de obturación apical, no está claro. Basado en los resultados de estudios del material en retro obturaciones y en reparación de perforaciones; al parecer el MTA es probablemente capaz de la activación de los cementoblastos al producir la matriz de la formación del cemento. Posiblemente, por su capacidad de sellado su alto pH, o a la liberación

de sustancias que activan los cementoblastos para formar una matriz para la cementogénesis (14).



Fig. N°6: Tratamiento logrado mediante Apexificación.(12)

A) Radiografía periapical que muestra el ápice abierto y lesión apical de dientes 1.1 y 2.1

B) Radiografía periapical luego de la necropulpectomía, irrigación, preparación de los conductos. Se pone dentro del conducto hidróxido de calcio con suero, se sella con un material restaurativo intermedio este procedimiento se repite a los 30 días.

Sin embargo, ninguno de los tratamientos de apicoformación fomenta aún más el desarrollo de la raíz y estos dientes resultan más frágiles siendo más vulnerables a las fracturas radiculares cervicales.

Procedimiento

Existen dos técnicas para realizar este procedimiento. La primera es la técnica de apicoformación con hidróxido de calcio y la segunda corresponde a la barrera con MTA (3).

1. Técnica de Apexificación con hidróxido de calcio:

- Anestesia y aislamiento absoluto del diente en cuestión.
- Apertura cameral de tamaño que permita la instrumentación con limas y correcta irrigación.
- Irrigación con suero fisiológico, secado con motas y puntas de papel estéril.

- Determinación de longitud de trabajo mediante uso de radiografía, ya que al ser diente inmaduro no existe constricción apical por lo que la lectura de los localizadores apicales pueden ser erróneas.
- Debridación del tejido pulpar mediante el uso de limas manuales. Considerar que no se debe desgastar excesivamente la dentina radicular ya que las paredes son delgadas.
- Irrigación con hipoclorito de sodio con ayuda de sistemas ultrasónicos o EndoVac (SybronEndo).
- Una vez que la debridación se encuentra completa, se debe secar el conducto con conos de papel estéril.
- Aplicación de pasta líquida de hidróxido de calcio. Se lleva al conducto con léntulo o con jeringa.
- Sellado coronal con cemento ionómero vítreo y/o resina.
- Control a los 3 meses donde se elimina la restauración coronal y la medicación con hidróxido de calcio. Irrigación con suero fisiológico, secado y nuevamente la aplicación del medicamento en pasta y sellado. Radiográficamente se debe observar la formación de una barrera mineralizada a nivel apical.
- El tratamiento puede durar entre 9 a 24 meses, según la formación de la barrera apical.

2. Técnica de barrera de MTA:

- Anestesia y aislamiento absoluto del diente en cuestión.
- Apertura cameral de tamaño que permita la instrumentación con limas y correcta irrigación.
- Irrigación con suero fisiológico, secado con motas y puntas de papel estéril.
- Determinación de longitud de trabajo mediante uso de radiografía, ya que al ser diente inmaduro no existe constricción apical por lo que la lectura de los localizadores apicales pueden ser erróneas.

- Debridación del tejido pulpar mediante el uso de limas manuales. Considerar que no se debe desgastar excesivamente la dentina radicular ya que las paredes son delgadas.
- Irrigación con hipoclorito de sodio con ayuda de sistemas ultrasónicos o EndoVac (SybronEndo).
- Una vez que la debridación se encuentra completa, se debe secar el conducto con conos de papel estéril.
- Aplicación de pasta líquida de hidróxido de calcio. Se lleva al conducto con léntulo o con jeringa.
- Sellado coronal y control a los 7 días. Esto debido a que se requiere de una semana para que el hidróxido de calcio aumente el pH de la zona perirradicular, ya que se ha observado que esto altera el proceso de hidratación y propiedades finales del MTA.
- Eliminación del sellado coronal y medicación con la ayuda de irrigación ultrasónica de preferencia.
- Secado con motas y conos estériles.
- Preparación de MTA, éste se deposita dentro del conducto con porta MTA o mediante bolitas con un porta amalgama estéril. Se condensa con condensadores previamente medidos o conos de papel invertido hasta lograr una capa que quede 1 a 3 mm por debajo del extremo radicular o un tapón de 4 a 5 mm de grosor. Esto debe ser confirmado mediante radiografía periapical.
- Se deben limpiar los excesos de MTA de las paredes del conducto con conos de papel humedecidos o pequeños cepillos, para que no se vea interferida la adhesión cuando sea necesario realizar la rehabilitación del diente.
- Se introduce una mota de algodón humedecida para ayudar al fraguado de MTA. Esta no debe estar en contacto con el ya que puede quedar restos de algodón en él.
- Sellado con Cavit o CIV.

- Sesión siguiente se eliminar el sellado coronal y con sonda o limas se verifica fraguado de MTA. Si este no fraguó se repite la sesión anterior, de lo contrario se realiza la restauración definitiva.

En la siguiente figura podemos observar la comparación esquemática de las técnicas de apexificación.

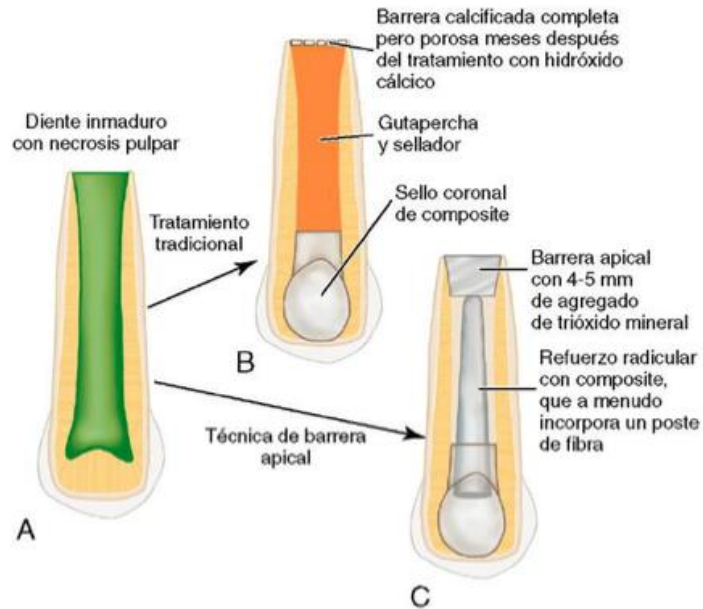


Fig. N°7: Representación esquemática de las técnicas de apexificación. A) diente permanente inmaduro con pulpa no vital. B) Tratamiento tradicional con hidróxido de calcio, con formación de una barrera calcificada en el extremo radicular después del recubrimiento repetido durante meses con hidróxido de calcio. C) Técnica de barrera apical artificial, con colocación de un tapón de 4 a 5 mm de MTA en el extremo radicular. El espacio del conducto posteriormente se restaura con composite de polimerización dual, acompañado con frecuencia de un poste de fibra como soporte mecánico (3).

En contraste a esto, existe un tratamiento recientemente llamado “Terapia Endodóntica Regenerativa”, la cual tiene el potencial de lograr un mayor desarrollo de la raíz, y por lo tanto, puede conferir un mejor pronóstico a largo plazo.

III. ENDODONCIA REGENERATIVA

La agresión a los tejidos tiene como resultado su alteración, respondiendo el organismo con un proceso de restauración del tejido afectado. Dicho proceso comienza siempre con la aparición de un coagulo sanguíneo que rellena el defecto y aporta las proteínas necesarias para lograr un tejido fibroso que termina en cicatricial, que no respeta la arquitectura ni funciones originales ni preexistentes. Este proceso se conoce como *Reparación*. En ocasiones el proceso no lleva a una reparación sino a la creación de un tejido similar al original con una arquitectura y función exactamente iguales, en este caso se habla de *Regeneración*.

La Endodoncia Regenerativa se ha definido como: Procesos basados en la biología designados para reemplazar estructuras dañadas, incluyendo dentina y raíz dental, así como también células del complejo dentino pulpar (16). También se ha definido como el reemplazo de tejido dañado por las mismas células parenquimales, sin embargo, la regeneración es un término histológico que no puede ser determinado radiográficamente. La naturaleza de este nuevo tejido formado hasta hace un par de años era especulativo, ya que no había estudios histológicos suficientes que lo caracterizaran. (17)

El concepto de la regeneración pulpar fue promulgado por los clásicos estudios de Nygaard- Östby (18), quien evaluó los efectos del sangrado provocado a través de la sobre instrumentación en conductos radiculares de humanos o perros, desafortunadamente los análisis histológicos revelaron que una reparación tisular ocurría (fibroblastos, colágeno y escasa vascularidad).

El tejido nuevo blando puede formarse a partir de tejido pulpar o del ligamento periodontal, mientras que el tejido duro puede ser un crecimiento de dentina, cemento o hueso. Estudios histológicos en modelos animales muestran que el tejido duro que se desarrolla dentro del espacio pulpar es tipo cemento o tipo hueso y que el tejido conectivo es tipo ligamento periodontal.

Estudio de casos han demostrado que luego de procedimientos endodónticos regenerativos, hay curación de la periodontitis apical, continúa el desarrollo del ápice de la raíz y aumenta el grosor de la pared del conducto radicular de los dientes inmaduros con necrosis pulpar (Figura N° 8).



Fig. N°8: Resultados post tratamiento de endodoncia regenerativa. (A) Radiografía preoperatoria del diente N#29. (B) Seguimiento del caso luego de 5 años del tratamiento de endodoncia regenerativa. (18)

Los objetivos de la endodoncia regenerativa son:

1. Primera meta: eliminación de los síntomas y signos de daño periapical.
2. Segunda meta: incrementar el espesor y la longitud del conducto radicular.
3. Tercera meta: respuesta positiva al test de sensibilidad.

Los resultados que esperan los científicos de este procedimiento no están relacionados directamente con las manifestaciones clínicas del diente tratado. Estos resultados son igual de importantes, ya que permiten el avance de la técnica.

La evaluación histológica de los dientes tratados con endodoncia regenerativa sugiere que el tejido recién formado no se asemeja al tejido pulpar perdido. Sin embargo, se logran los objetivos de la resolución de la infección y el crecimiento radicular (Figura 9). Se ha generado un debate acerca de utilizar el término de regeneración, ya que estos estudios demuestran que solo ocurre la reparación. Hasta el día de hoy, incluso en modelos animales sofisticados, los tejidos formados

solo se asemejan a un tejido pulpar primitivo sin la presencia de odontoblastos verdaderos, en el lugar de ellos se forman células tipo odontoblastos capaces de secretar una matriz mineralizada. Junto con esto, la capacidad de este nuevo tejido de responder a traumas o infección es nula (19).

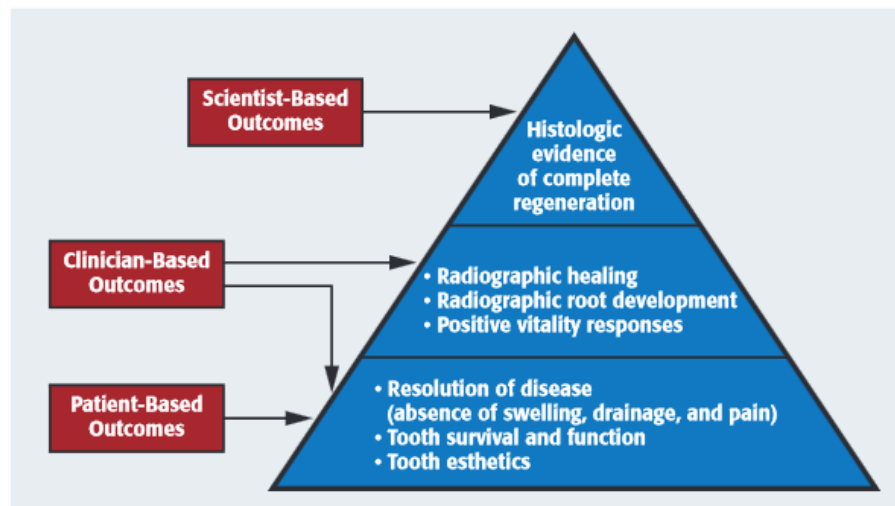


Fig. N°9: Evaluación de resultados en tres niveles. Los procedimientos de regeneración endodóntica deben ser evaluados en una manera sistemática, reconociendo que hay muchas posibilidades de resultados que pueden tener diferentes significados para los pacientes, clínicos y científicos. Los resultados para los pacientes son la base de la pirámide donde se considera de vital importancia lograr la salud, restablecimiento de la función y la satisfacción del paciente (19).

Las consideraciones comunes para todos los protocolos de los procedimientos de endodoncia regenerativa que se deben tomar en cuenta según los autores Hargreaves y Law A, publicados en la Asociación Americana de Endodoncia en el 2013 (6), son:

- Paciente joven con la pulpa necrótica y ápice abierto.
- Nula o mínima instrumentación de las paredes dentinarias.
- Medicación antibiótica intraconducto.
- Generar un coágulo de sangre o un andamiaje protéico en el canal.
- Lograr un sellado coronal efectivo.

Las ventajas de la endodoncia regenerativa son:

- El crecimiento radicular tridimensionalmente logrando el cierre del foramen apical.
- El tejido de reparación se convierte en una parte integral del diente, evitando la micro infiltración bacteriana que implica el uso de sellos artificiales.
- Es un tratamiento más corto que la endodoncia tradicional.
- No existe riesgo de rechazo por parte del sistema inmune (20).

Las principales desventajas son:

- Necesidad de varios controles.
- Limitación en pacientes con complicaciones sistémicas (alteración a la coagulación, disfunción plaquetaria, paciente bajo tratamiento de Antiinflamatorios no esteroideos, entre otras).
- Difícil selección de los casos.

INDICACIONES DE ENDODONCIA REGENERATIVA

La mayor indicación son casos de dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica causada por caries o trauma dentoalveolar (TDA). La edad de los pacientes generalmente va desde los 8 a los 16 años de edad y se requiere que éstos no presenten alergias a los antibióticos utilizados en la terapia (moxifloxacino, metronidazol).

El éxito de la terapia depende de la capacidad reparadora de los tejidos dentarios del paciente (11), esto lo podemos evidenciar a través de diversos parámetros que propone la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) (6):

- Ausencia de dolor e inflamación de los tejidos observada antes de empezar el tratamiento.
- Resolución de la radiolucidez apical (se observa generalmente a los 6 a 12 meses después del tratamiento).

- Aumento en el ancho de las paredes del conducto radicular (generalmente se observa antes del aumento de la longitud de la raíz, esto ocurre entre los 12-24 meses después del tratamiento).
- Aumento de la longitud de la raíz.
- Cierre apical.

Los protocolos actuales de endodoncia regenerativa se basan en (6):

1. Irrigantes para desinfectar el canal y la liberación de factores de crecimiento.
2. Sangramiento de la región apical que permita estimular células y factores de crecimiento hacia el conducto.
3. El coágulo sanguíneo y las paredes de dentina que proveen un andamiaje para la generación de nuevo tejido.

Otros autores definen que las estrategias necesarias para promover el crecimiento de nuevo tejido en el conducto radicular son las siguientes (21):

- Lograr una desinfección efectiva en los conductos
- Reclutamiento de células mesenquimáticas indiferenciadas de la región apical
- Generar una matriz o andamiaje que permita el crecimiento del nuevo tejido
- Un adecuado sello coronal que impida la reinfección

El desafío en esta área es la generación de tejidos iguales a la pulpa original y que la estructura tipo dentina sea mejor dirigida mediante los avances de la ingeniería tisular. Estos avances pueden ser terapias que utilicen células madre autólogas combinadas con andamiajes apropiados para el caso junto con los factores de crecimiento apropiados puestos en el momento adecuado y en la secuencia apropiada (22).

IV. BASES BIOLÓGICAS DE LA REGENERACIÓN

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinario, que integra los principios de la biología y la ingeniería para desarrollar sustitutos biológicos que reemplazan o regeneran células humanas, tejidos u órganos en orden de restaurar o restablecer la función normal, hay tres elementos claves para llevar a cabo la regeneración: células madre, factores de crecimiento y un andamiaje (23, 24).

A. CELULAS MADRE

Son definidas como clonogénicas, auto renovantes y células progenitoras que pueden diferenciarse a linajes más especializados. Se clasifican en tres grupos principales: células madre embrionarias (ESCs), células madre inducidas pluripotentes (iPSCs) y células madre adultas postnatales (ASCs). Su función principal es proveer al tejido su desarrollo, homeostasis y permitir la reparación cuando éste se daña (25).

En la pulpa dental el conjunto de las células indiferenciadas en un diente representa aproximadamente un 1% de la población de células pulpares, éstas son capaces de producir células diferenciadas como respuesta a una señalización específica, esta cantidad se reduce en la medida que envejecemos.

La plasticidad de estas células es su habilidad para diferenciarse en varios tejidos, según esto se dividen en:

- Totipotenciales: con capacidad de formar un organismo completo, incluyendo células embrionarias. Se encuentran en las células embrionarias de 1-3 días.
- Pluripotenciales: puede dar origen a más de 200 tipos celulares pertenecientes al endoderma, mesoderma y ectoderma. Se encuentran en las células del blastocisto de 5-14 días.
- Multipotenciales: célula diferenciada capaz de formar un número limitado de otros tejidos. Se encuentra en el tejido fetal, cordón umbilical y células post natales.

Por otro lado, podemos dividir las células madre en embrionarias y postnatales. Las primeras son pluripotentes capaces de diferenciarse en casi cualquier tipo celular, así como también mantener un estado indiferenciado. Las segundas, han sido identificadas en los tejidos constituyendo de un 1 a un 4 % del total, que incluyen las células progenitoras. Las células postnatales tienen un potencial de diferenciación limitado en comparación a las embrionarias.

En el siguiente esquema se observan los diferentes linajes celulares que se pueden obtener a partir de una célula madre oral multipotencial.

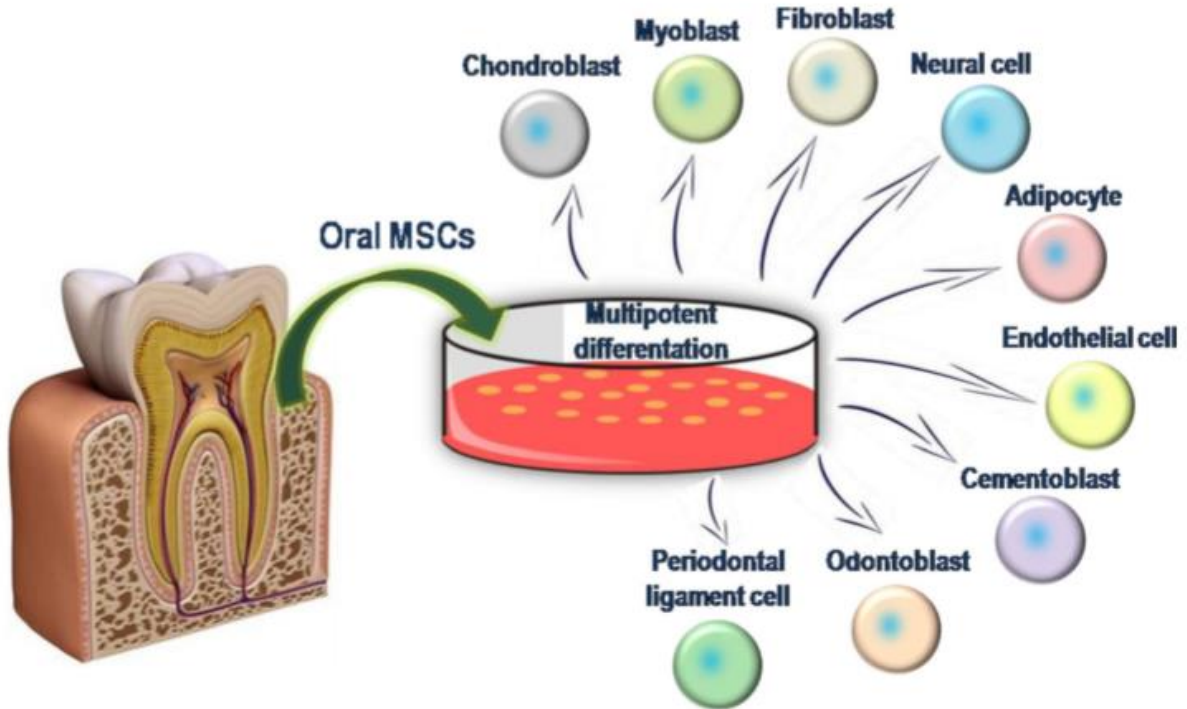


Fig. N°10: Potencial de diferenciación de las células madre orales. Se observa que a partir de ella se pueden obtener condroblastos, mioblastos, fibroblastos, células neurales, adipocitos, células endoteliales, cementoblastos, odontoblastos y células del ligamento periodontal. (26)

CLASIFICACION DE CELULAS MADRE SEGÚN LOCALIZACION

Dentro del organismo podemos encontrar células madre en diferentes tejidos, sin embargo, los tejidos dentales corresponden a una zona rica y de más fácil obtención de este tipo celular. En la cavidad oral podemos encontrar células madre en la pulpa dental (incluso si está inflamada), la papila apical y en el tejido periapical normal o inflamado colectado durante los procedimientos endodónticos (Figura N°11). Estos hallazgos sugieren una oportunidad para obtener células madres durante los procedimientos endodónticos. De hecho el sangramiento provocado durante la terapia endodóntica regenerativa revela un flujo masivo de células madres mesenquimáticas al conducto radicular (24).

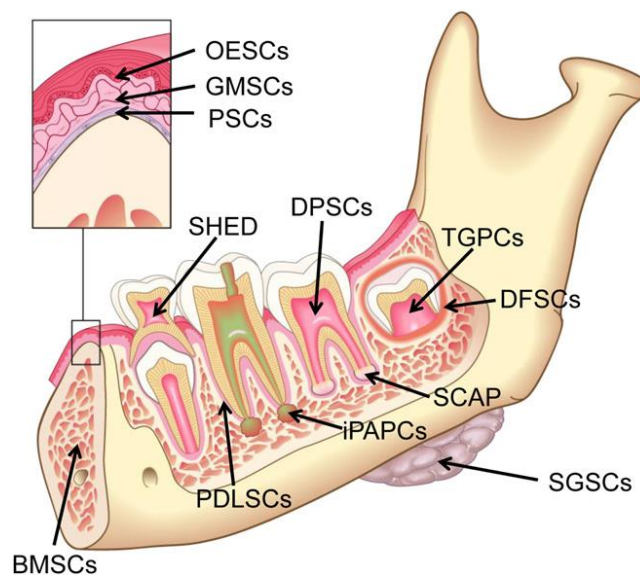


Fig N°11: Esquema que indica la ubicación de las células madre postnatales humanas presentes en tejido dentario, periodontal y óseo (24).

Células madres pulpares (DPSC): son células madres derivadas del ectodermo, que se originan de células migratorias de la cresta neural y que poseen propiedades de células madres mesenquimáticas como una morfología similar a los fibroblastos,

adherencia a superficies plásticas y forman colonias cuando se cultivan in vitro (27), además pueden diferenciarse en múltiples linajes (condrocitos, adipocitos, odontoblastos y células tipo neurales bajo apropiadas condiciones de inducción).

Estas células presentan una tasa de proliferación mayor, mayor potencial clonogénico, más células progenitoras en la población y mayor potencial de mineralización que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (26).

Diferenciación odontogénica de células madres humanas de la pulpa dental (hDPSCs)

Gronthos et al. en el año 2000 (28) demostró la habilidad de DPSCs humanas para diferenciarse a odontoblastos, él reportó que DPSCs trasplantadas a ratones inmuno comprometidos eran capaces de generar una estructura tipo dentina relacionada a células tipo odontoblasto. En el 2001, Shi et al. (29) mostraron que las vías biomecánicas implicadas en el proceso de diferenciación de las DPSCs a odontoblastos son similares a las involucradas en la diferenciación de células madre mesenquimales de la médula ósea a osteoblastos. En el 2006, Huang (30) sembró DPSCs en la superficie de dentina tratada mecánicamente y químicamente, luego realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido y se reveló la formación de una morfología tipo odontoblasto con un proceso citoplasmático extendiéndose dentro del túbulo dentinario. Estos datos demostraron la formación de células con morfología odontoblástica en dentina, sugiriendo que DPSCs aisladas pueden diferenciarse a odontoblastos.

En el 2010, Alongi et al (31) propuso de hipótesis que DPSCs tomadas de la pulpa dental inflamada (IPs) podrían ser utilizadas en regeneración de tejidos dentales. DPSC-IPs aisladas fueron implantadas en modelos animales y formaron complejos tipo pulpa/dentina.

Se destaca la importancia de los componentes de la matriz dentinaria (DMCs) para promover diferenciación dentinogénica. La adición de DMCs aumentó la expresión

relativa de niveles de genes de los marcadores dentinogénicos como la sialofosfoproteína dentinaria y la proteína de matriz de la dentina 1 en hDPSCs (32).

Células madres de la papila apical (SCAP): Son una población de células madres multipotentes aisladas de la papila apical de dientes humanos (31). El tejido blando del exterior del foramen apical expresa marcadores para estas células, los cuales se pierden durante la diferenciación odontogénica. Comparándolas con las DPSC las SCAP proliferan más rápido, son más numerosas y tienen una mayor capacidad para la regeneración de la dentina in vivo. SCAP pueden ser la fuente primaria de odontoblastos que generan la dentina radicular, en contraste con las DPSC, que parecen ser las involucradas en la formación de dentina reparativa (33).

Células madres del ligamento periodontal (PDLSC): El potencial de las PDLSC para desarrollarse en otros linajes celulares y obtener características similares al ligamento periodontal se han establecido a través de la habilidad de éstas para diferenciarse en cementoblastos, adipocitos y células formadoras de colágeno in vitro, y la capacidad de generar estructuras tipo cemento y ligamento periodontal in vivo. Las células madres pulpares y las PDLSC tienen una expresión similar de genes para la proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, receptores, y moléculas de adhesión, sugiriendo la existencia de un origen común y un camino molecular que regula la formación de dentina, cemento y hueso (29).

Se ha investigado y se ha concluido que las células madres de la pulpa y la de papila apical de dientes inmaduros pueden sobrevivir ante una infección o preparación del conducto. Esta es una de las bases que fundamenta la endodoncia regenerativa.

CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE SEGÚN ORIGEN

-Células autólogas: obtenidas del mismo individuo que será intervenido (más prometedoras en endodoncia).

-Células alogénicas: obtenidas a partir de un individuo de la misma especie.

-Células xenogénicas: obtenidas de individuos de otra especie.

B. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son proteínas que se unen a receptores de la membrana celular y actúan como señal para inducir la proliferación celular y/o la diferenciación, por lo tanto, son sustancias que regulan el patrón de desarrollo de los tejidos y en particular, las posiciones de los diversos tipos de células especializadas dentro de un tejido. Éstos se extienden a partir de una fuente localizada y forman un gradiente de concentración a través de los tejidos en desarrollo.

Las plaquetas son una fuente autóloga de factores de crecimiento, entre los más estudiados están: el factor de crecimiento derivados de plaquetas, el factor de crecimiento tipo insulina, el factor de crecimiento transformante beta, el factor de crecimiento vascular y el factor de crecimiento de los fibroblastos.

Los factores de crecimiento presentes en la formación de la pulpa y dentina son los factores de crecimiento transformantes (TGFs), proteína morfogenética ósea (BMPs), factor de crecimiento tipo insulina (IGFs), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFs) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGFs). Estos factores pueden modificar la actividad de las células madre y del tejido pulpar generando por ejemplo, la aposición de una matriz calcificada. El factor de crecimiento tipo insulina es un regulador de la multiplicación, diferenciación y de la apoptosis de varios tipos celulares y tejidos que presentan el receptor para esta proteína; muchos estudios han demostrado que el IGF-1 juega un importante papel en el desarrollo dentario y del hueso, este factor puede estimular la proliferación y expresión de muchos marcadores de osteoblastos in vitro en células madre obtenidas de la papila apical y también aumenta el potencial osteogénico de las mismas in vivo. Los autores demostraron que la IGF-1 puede estimular células madre derivadas de la pulpa in vitro para su diferenciación a odontoblastos y también para que secreten matriz calcificada (34).

Las células madres pueden diferenciarse con esta inducción en otros fenotipos celulares dependiendo de su linaje y la exposición a estímulos ambientales, como los factores de crecimiento, matriz extracelular, hipoxia u otras condiciones (25).

Estudios han revelado que la dentina contiene un gran número de moléculas bioactivas que cuando son liberadas participan en los procesos regenerativos (25).

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) tiene actividad quimiotáctica y efectos mitogénicos sobre las células mesenquimáticas, además posee actividad angiogénica. Utilizar factores que promuevan la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales puede, potencialmente, entregarnos más control sobre el tejido que se forma en la regeneración pulpar y puede proveer una mayor probabilidad de éxito clínico (35).

En la figura N°12 podemos observar un caso de regeneración donde se adiciona el factor de crecimiento derivado de las plaquetas en su homodímero BB (el PDGF presenta 4 homodímeros: AA, BB, CC y DD y un heterodímero AB) luego de generar el sangramiento de la zona apical, posteriormente se posiciona una membrana reabsorbible de colágeno y se sella con MTA. Los resultados del caso revelan la resolución de la patología apical junto con la maduración radicular.

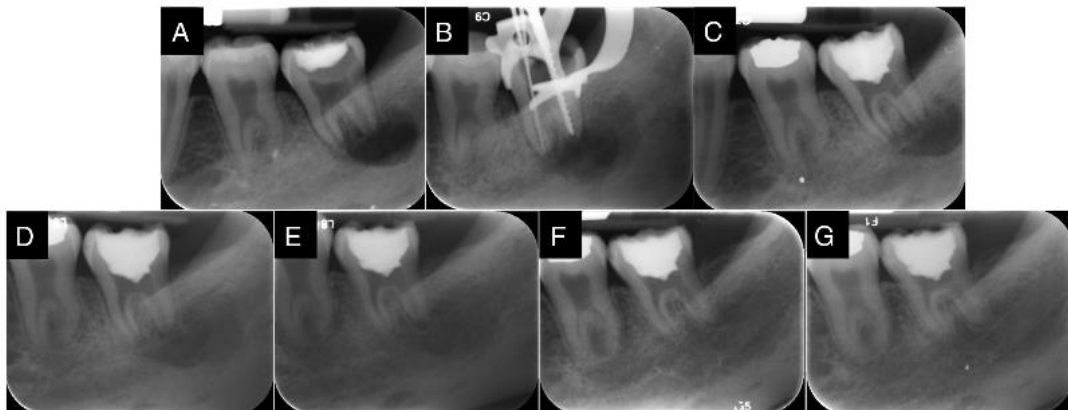


Fig. N° 12: A: RX del preoperatorio del diente 18 con radiolucidez apical. B: longitud de trabajo (se realiza PBM completa y posteriormente la medicación con hidróxido de calcio). C: RX postoperatoria que muestra la restauración bajo el LAC. D: seguimiento al mes. E: RX a los 6 meses ya muestra una disminución de la lesión. F: al año, ya se releva la formación radicular completa y la disminución de la lesión. G: a los 15 meses se demuestra la resolución de la lesión apical (35).

También se ha sugerido el uso de factores que estimulen la angiogénesis. La angiogénesis es un factor clave en la regeneración después de una injuria pulpar, ya que sin el adecuado aporte sanguíneo no se logrará la regeneración y sin esto se volverá a formar tejido necrótico. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es el más potente en angiogénesis y vasculogénesis promoviendo la proliferación, diferenciación y migración endotelial. Se ha demostrado su importancia en la modulación del desarrollo dentario y la formación de dentina (36).

C. ANDAMIAJE

Actúa como guía para el crecimiento celular y diferenciación, da soporte para la organización celular, proliferación y vascularización. Pueden ser implantados solos o en conjunto con células madres y factores de crecimiento; juega un papel clave en regular la diferenciación de células madre a través de la liberación local de factores de crecimiento y de la cascada de señales gatillada por la unión de las células madres a la matriz extracelular.

Estos pueden ser endógenos (colágeno, ácido hialurónico, dentina) o sintéticos (hidrogeles, MTA, ácido poliglicólico, hidroxiapatita, otros). Las matrices endógenas ofrecen buena biocompatibilidad y bioactividad mientras que los sintéticos tienen mejor tasa de degradación y ofrecen mejores propiedades mecánicas (37).

Este material de andamiaje debe ser biocompatible, biodegradable en forma gradual sin dejar residuos tóxicos, poroso (para poder contener en su estructura a las células y factores de crecimiento) y efectivo para el transporte de nutrientes y desechos.

Los andamiajes deben imitar las condiciones del tejido. Dentro de las matrices sintéticas existen diferentes tipos de cerámicos y polímeros que han reportado un buen comportamiento en los estudios. Fosfato de hidroxiapatita tricálcico es una matriz apropiada para permitir a las células madres la regeneración. Los polímeros sintéticos han aumentado su demanda como materiales para andamiajes debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradación y la incorporación de moléculas bioactivas (que estimulen el proceso para optimizar los resultados y su

predictibilidad). Los co-polímeros como el poli L/DL, utilizado en medicina, también puede ser una opción a considerar como matriz.

Para la regeneración pulpar la matriz ideal corresponde a una que soporte la revascularización e inervación de los tejidos. El lograr una buena vascularización rodeada de tejido duro como sellado debiese tener un buen pronóstico (38).

Un protocolo utilizando un coágulo sanguíneo que actúe como andamiaje en la revascularización de dientes inmaduros infectados ha sido sugerido en muchas investigaciones. Se asume que el sangramiento inducido dentro de un conducto radicular desinfectado producirá un coágulo de sangre que no solo sirve como andamiaje sino que también provee los factores que estimulan a las células madres para que migren y se diferencien a células tipo odontoblastos (24).

La Asociación Americana de Endodoncia ha sugerido un protocolo en el que se introduce una lima K File #20 estéril 2 mm pasando el foramen apical para iniciar el sangramiento dentro del canal radicular, se estima que el tiempo necesario para formar un coágulo estable son 15 min. Solo una vez establecido el coágulo puede ser cubierto con MTA.

Hay diferentes tipos de andamiaje, éstos se clasifican en sintéticos y naturales. Dentro de los endógenos encontramos:

Plasma rico en plaquetas (PRP)

Es definido como “concentración autóloga de plaquetas en un volumen pequeño de plasma” (39).

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es una fuente fácilmente accesible de factores de crecimiento, con el fin de coadyuvar a la curación de los tejidos duros y blandos. Esto se da por los métodos en el cual se concentran las plaquetas autólogas y se añaden a las heridas quirúrgicas o a los injertos y otras lesiones con la necesidad de acelerar la curación. El coágulo de sangre es el enfoque central de inicio hacia la curación de los tejidos blandos y la regeneración ósea.

EL PRP difiere de un coágulo sanguíneo normal en la cantidad de elementos que lo forman, ya que contiene un 94% de plaquetas, solo un 5% de glóbulos rojos y un 1% de glóbulos blancos. La composición natural en el lugar de la herida, en cambio supone 95% de células rojas, 4% de plaquetas y un 1% de serie blanca (39).

Este plasma es una fuente rica en plaquetas (de 4 a 6 veces más que los valores normales) y factores de crecimiento, se cree que su aplicación es una forma efectiva para inducir la reparación y regeneración tisular (8). En la suspensión, las plaquetas aparecen viables y en teoría podrían liberar factores de crecimiento hasta aproximadamente 7 días después de su aplicación.

Las propiedades del PRP se basan en la producción y liberación de múltiples factores de crecimiento diferenciados y de la activación de las plaquetas. Estos factores son fundamentales en la regulación del proceso de cicatrización de heridas y juegan un papel importante en la regulación de procesos celulares, tales como mitogénesis, la quimiotaxis, la diferenciación y el metabolismo.

El PRP genera agregados plaquetarios como un núcleo para iniciar la mineralización, mientras que estimula la proliferación y diferenciación celular del ligamento periodontal y la producción de colágeno. El PRP tiene la habilidad de promover la regeneración en sitios de la injuria, induce la formación inmediata de un coagulo de fibrina y junto a eso estimula la adhesión celular y la síntesis de colágeno. En conjunto con las acciones mediadas con fibrinógeno, el PRP puede producir potentes efectos en las células del ligamento periodontal que no solo reflejan una simple combinación con sus factores de crecimiento.

Marx en 1998 observó la presencia de 2 factores de crecimiento: PDGF, TGF- β 1 en los concentrados de plaquetas utilizados. Observó también que las células esponjosas tenían receptores para estos factores de crecimiento, y concluyeron que:

1. La adición de PRP aceleraba la velocidad de formación ósea y el grado de formación ósea durante al menos 6 meses.

2. Era técnicamente posible secuestrar, concentrar y añadir un mayor número de plaquetas (y en consecuencia de factores de crecimiento) a los injertos óseos.

3. Las células madres de la médula esponjosa contenían receptores para los factores de crecimiento. Se hace necesario estudiar por tanto las características del PRP, el procedimiento de aplicación, los periodos de tiempo en su aplicación en conjunción con la naturaleza de las heridas.

Existen diferentes métodos de obtención, los protocolos descritos suelen utilizar una doble centrifugación para aumentar la concentración de plaquetas recogidas y este concentrado de plaquetas se mezcla con la trombina y el cloruro de calcio con el fin de inducir la activación masiva de concentrado de plaquetas y la gelificación de la preparación (figura 13).

El PRP fresco muestra entre un 3 a un 5% de plaquetas activadas, mientras que a las 24 hrs hay un 7-25%. Se logran buenos resultados ante una activación de un 20-30% de plaquetas han sido probados, lo ideal es usarlas dentro de las primeras 6 horas tras su preparación (39).

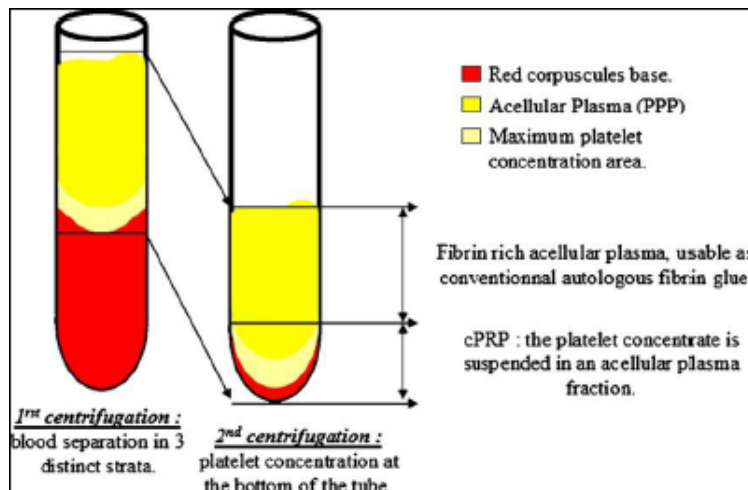


Fig N°13: Procesamiento del PRP. Platelet-rich fibrin (PRF) se muestra el tubo luego de la primera y segunda centrifugación. (39)

Sin embargo, el principal problema es la activación prematura de plaquetas por utilización de trombina bovina (anticoagulante) y la consecuente pérdida de los factores de crecimiento y producción de una matriz de fibrina menos estable, en donde las citocinas (pequeñas moléculas solubles) son liberadas con demasiada rapidez por no estar estrechamente integradas en el interior de la matriz de fibrina durante la polimerización.

Fibrina rica en plaquetas (FRP)

La fibrina rica en plaquetas representa un nuevo paso en el concepto del uso del gel plaquetario como terapéutica. Se conoce como una segunda generación de plaquetas, la cual se define como un biomaterial autógeno compuesto por leucocitos, plaquetas y fibrina (39).

Esta segunda generación de plaquetas elimina los riesgos del uso de trombina bovina, además de no necesitar manejo bioquímico de la sangre. Por lo tanto, para la correcta preparación del FRP, la toma de sangre rápida y centrifugación inmediata, antes de iniciarse la cascada de la coagulación, es absolutamente esencial.

El éxito de la técnica según Dohan, et al. (39), depende de la velocidad en que se obtiene la sangre y su transferencia a la centrifuga. Sin anticoagulantes la muestra sanguínea comienza a coagular casi inmediatamente al contactar el tubo de vidrio, necesita unos pocos minutos de centrifugación para concentrar el fibrinógeno en la parte media del tubo. Un tiempo mayor hará que la fibrina polimerice en una manera difusa dentro del tubo y solo un pequeño coágulo sin consistencia podrá ser obtenido.

El FRP está en la forma de un gel de plaquetas y puede ser utilizado en combinación con otros injertos o como una membrana.

Se considera como un biomaterial regenerativo que actúa mediante una matriz polimerizada de fibrina rica en plaquetas, leucocitos y citoquinas que favorecen la

circulación de las células madres, proliferación de fibroblastos y síntesis de Colágeno tipo I. Se le supone un efecto osteopromotor más que osteoinductor.

Se ha demostrado que posterior a la centrifugación aproximadamente un 97% de plaquetas y un 50% de leucocitos de los del volumen de sangre original se concentran en el FRP.

El interés del empleo de esta fibrina es doble, por un lado aporta estabilidad y una matriz de soporte. Y por otro lado entrega sustancias mediadoras capaces de acelerar o mejorar los procesos regenerativos.

El protocolo de obtención es muy simple y poco costoso: la sangre es colectada en un tubo de vidrio o de plástico y es inmediatamente centrifugada. Se forman tres capas, células rojas en el fondo del tubo, plasma acelular (plasma pobre en plaquetas) en la superficie y un coágulo de fibrina en el medio (Fig N°14), (40).

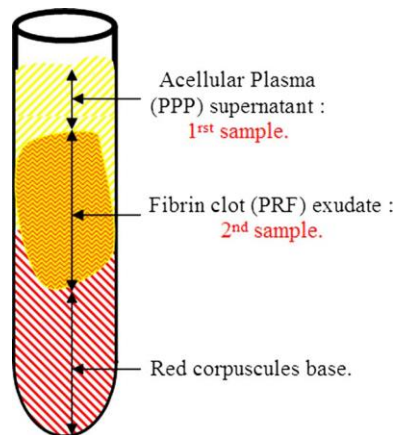


Fig. N°14: representación esquemática de los tres estratos obtenidos después de la centrifugación según el protocolo oficial (40).

La composición del PRF demuestra la utilidad que posee este andamiaje en los procedimientos de regeneración de tejidos (Fig. N°15) Está compuesto por:

- Plaquetas: células anucleares que viven de 7-10 días. Sintetizan activamente factores de crecimiento, sobre todo en respuesta a la coagulación. Dentro de los factores de crecimiento que producen encontramos, factor de crecimiento

derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β 1 y β 2 (TGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y el factor de crecimiento epitelial. Se discute la presencia del factor de crecimiento tipo insulina. El PDGF y TGF β son los responsables de aumentar la velocidad de regeneración y pueden ser separados mediante centrifugación para ser aplicados (Vaishnavi, et al., 2011). Varios estudios han demostrado la participación de estas sustancias en la estimulación de la angiogénesis, inducción de la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células progenitoras y síntesis de colágeno (39).

- Leucocitos: Células cuya función es la defensa del organismo. Cuando los tejidos son invadidos por microorganismos se generan señales químicas que atraen y hacen que se produzca la migración de los leucocitos de los capilares hacia los tejidos a través de las células endoteliales (diapédesis). Participan así en la regeneración celular, activándose cuando existe inflamación. Muchos estudios demuestran que los papeles claves que juegan los leucocitos en este proceso son los de antiinfecciosos y reguladores de la inmunidad así como también poseer factores de crecimiento promovedores de la angiogénesis. Aún no se ha encontrado una reacción inflamatoria descontrolada, por el contrario, la presencia de leucocitos se ha asociado a disminuir el dolor post operatorio y la inflamación (40). Según sus características de tinción específicas, su morfología celular y sus funciones se clasifican en neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos.
- Eritrocitos: Célula especializada en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono unidos a hemoglobina, favorece el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el interior del eritrocito y el plasma sanguíneo.
- Fibrina: Una parte esencial del proceso de curación es la restauración de un suministro de sangre adecuado. Esto se logra mediante la formación de nuevos microvasos de los vasos existentes, un proceso llamado

angiogénesis. Ésta suele ir acompañada de la presencia de células inflamatorias, pérdida de sangre y la deposición de fibrina. La matriz de fibrina actúa no sólo como una matriz de sellado, sino también como un andamiaje para la invasión de leucocitos y las células endoteliales durante la reparación de tejidos. Este proceso es inducido por la adición simultánea de un factor de crecimiento angiogénico (BFGF o VEGF) y la citoquina TNF alfa, y se ve reforzada por la hipoxia. La matriz no sólo facilitan la adhesión celular, sino también la transferencia de señales bioquímicas en de las células como una respuesta a esta interacción. Tiene una alta sensibilidad a las proteasas, tales como plasmina y metaloproteinasas (MMP). La modulación de la estructura de fibrina afecta marcadamente la forma y la estabilidad de la formación de tubo capilar in vitro (40).

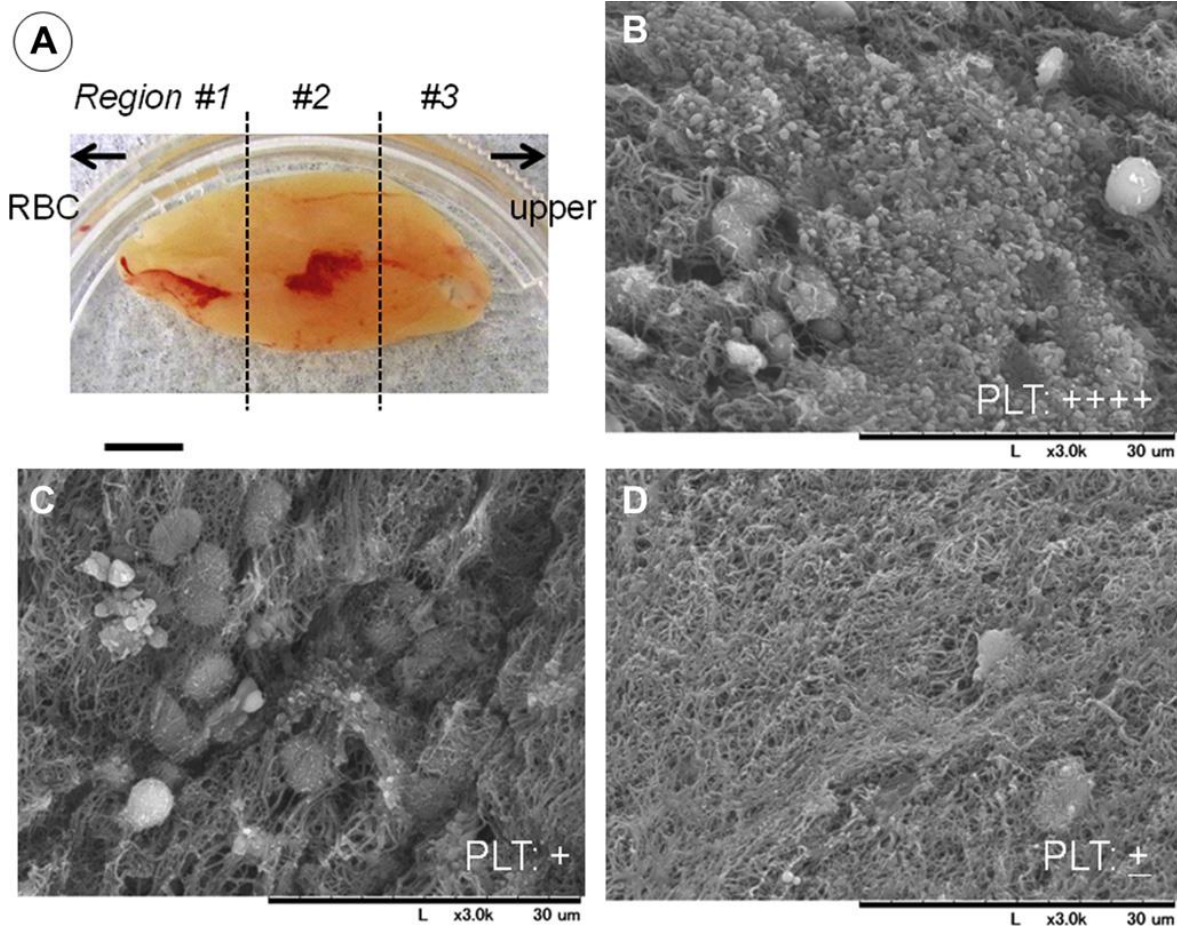


Fig. N° 15: Se observa el coágulo (A) que muestra las diferentes regiones que posteriormente fueron evaluadas en el microscopio electrónico de barrido, la región 1(B) corresponde a la adyacente a la fracción de glóbulos rojos, la región 2 corresponde a la parte central del coágulo (C), la región 3 (D)corresponde a la parte distal. Las plaquetas se encuentran más concentradas en la región 1, la zona que presenta menor concentración plaquetaria es la N° 3 (41).

Dentro de los andamiajes exógenos se ha investigado bastante acerca de la adición de factores de crecimiento a polímeros reabsorbibles que sirven de matrices, estas líneas investigativas apuntan a hacer la regeneración un proceso más predecible en relación al tipo de tejido formado.

V. MECANISMO BIOLÓGICO DEL PROCESO DE REGENERACION DENTARIA

El proceso regenerativo o revascularización dentaria, descrito anteriormente se basa en tres factores; la presencia de células madres, los factores de crecimiento y el andamiaje necesario para que el proceso se lleve a cabo.

Existen diferentes teorías sobre cómo se estimulan las células madres y desde donde migran hacia apical para lograr la diferenciación celular, formando así nuevo tejido que logre terminar con la maduración del diente.

Los orígenes de las células madres que se postulan son:

- Células madres de la pulpa que permanecieron en apical, éstas serían estimuladas por células de la Vaina Epitelial de Hertwig las que son muy resistentes incluso a la inflamación e irritación. Las células madres se diferenciarían en Odontoblastos formando dentina atubular que permite la Apexogenesis y el engrosamiento de las paredes (24).
- Células madres multipotentes de la pulpa presentes en dientes permanentes que pueden estar en abundancia en dientes inmaduros que migran hacia las

paredes dentinarias remanentes y se diferencian en odontoblastos depositando dentina atubular.

- Células madres del ligamento periodontal que son estimuladas y migran hacia apical diferenciándose a odontoblastos.
- Células madres de la papila apical y de la medula ósea, estas últimas llegan al canal radicular cuando la instrumentación sobrepasa la longitud de trabajo induciendo el sangramiento, de esta forma migran células mesenquimáticas de la medula ósea, que pueden formar hueso o dentina.

El estímulo de estas células para que migren y se diferencien lo otorgan una serie de factores de crecimiento, que se obtienen de un andamiaje externo introducido dentro del conducto radicular o dentro del mismo organismo en el proceso de sangramiento del ápice.

Para permitir este proceso es necesario un andamiaje que les otorgue una matriz física donde las células puedan migrar y diferenciarse; la diferenciación da lugar a diferentes tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos, células endoteliales y del ligamento periodontal.

VI. PROTOCOLOS DE REVASCULARIZACION

Dentro de los protocolos utilizados actualmente para terapias de regeneración o revascularización endodóntica de dientes inmaduros necróticos, encontramos el realizado por la Asociación Americana de Endodoncia (6), siendo uno de los más aceptados.

Protocolo Asociación Americana de Endodoncia:

1. Selección del caso:

- Dientes inmaduros con necrosis pulpar.
- Dientes que no requerirán pernos o núcleos como restauración final.

- Pacientes o cuidadores comprometidos con el tratamiento y que sigan las indicaciones.
- Pacientes que no presenten alergia a los medicamentos o antibióticos utilizados en este procedimiento (ASA 1 o 2).

2. Consentimiento informado debe contener información en relación a:

- 2 o más citas durante la terapia.
- Uso de antimicrobianos, según sea el caso: hidróxido de calcio, tripasta antibiótica (ciprofloxacino, metronidazol y minociclina) o bipasta (ciprofloxacino y metronidazol).
- Posibles efectos adversos: tinción de corona y raíz, poca respuesta al tratamiento, dolor o infección.
- Tratamientos alternativos: Apexificación con MTA, no realizar ningún tratamiento o exodoncia.
- Permiso para ingresar la información a la base de datos de la AAE (opcional).

3. Primera sesión:

- Anestesia local, aislamiento absoluto con goma dique y se realiza el acceso cameral.
- Irrigación abundante por 5 minutos con 1,5% de NaOCl utilizando un sistema que minimice la posibilidad de extrusión del irrigante al periápice (Sistema EndoVac, agujas de corte lateral con tope). Continuar con 20 ml de solución salina o EDTA al 17% por 5 minutos. Considerar que durante la irrigación la aguja debe estar posicionada a 1 mm del ápice para minimizar la citotoxicidad a las células madre del tejido periapical.
- Secado de los conductos con conos de papel.

- Aplicar CaOH₂ o Triple pasta antibiótica en baja concentración. Si se utiliza esta última sellar la cámara pulpar con un agente que se una a la dentina para minimizar el riesgo de tinción, causada por la minociclina.
 - **Tripasta antibiótica:** Mezclar ciprofloxacino, metronidazol y minociclina en relación 1:1:1, para obtener una concentración final entre 0.1 y 1 mg/ml. Pasta en desuso por alta incidencia de tinción.
 - **Bipasta antibiótica (sin minociclina):** Mezclar ciprofloxacino y metronidazol en relación 1:1. Obtención de una concentración entre 0.1 y 1 mg/ml.
 - **Tripasta antibiótica (sustitución minociclina):** En reemplazo de la minociclina se utiliza clindamicina o amoxicilina, junto con los antibióticos anteriormente nombrados, manteniendo proporción y concentración final.
- Llevar la medicación al conducto con una jeringa. Si se aplica triple pasta antibiótica colocarla bajo el LAC.
- Sellar con 3 a 4 mm de un material de restauración temporal como Cavit, CIV, entre otros.
- Citar al paciente entre 1 a 4 semanas posterior a la primera citación. Esto dependerá de los signos y síntomas de infección que pueda presentar el paciente durante el tiempo de espera.

4. Segunda sesión (1 a 4 semanas después de la primera visita):

- Verificar respuesta al tratamiento. Si hay signos o síntomas de infección persistente considerar dejar por más tiempo las alternativas antimicrobianas.
- Anestesia mepivacaína al 3% sin vasoconstrictor, aislamiento absoluto.
- Irrigación gentil y abundante con 20 ml de EDTA al 17%. Secar con puntas de papel.

- Provocar el sangramiento apical mediante una sobre instrumentación. Introducir una lima K pre curvada a 2 mm pasado el foramen apical para llenar el conducto radicular con sangre hasta el LAC. Una alternativa es usar un coagulo de sangre, plasma rico en plaquetas, plasma rico en fibrina o una matriz de fibrina autóloga.
- Detener el sangrado a un nivel que permita los 3 a 4 mm de material restaurador.
- Se puede colocar una matriz reabsorbible como sobre el coagulo si es necesario y se sella con MTA. Sobre este colocar 3 a 4 mm de ionómero vítreo de resina y fotopolimerizarlo por 40 segundos. Considerar reemplazar el MTA con biocerámicos o cementos de silicato tricalcio, si es importante la estética.

5. Seguimiento:

- Examen clínico y radiográfico:
 - No deben existir dolor, tejidos blandos inflamados o tractos sinuosos, al examen clínico. Estos se observan con frecuencia entre la primera y segunda citación.
 - Radiográficamente se debe observar una resolución de la radiolucidez apical. Esto entre 6 a 12 meses posterior al tratamiento.
 - Aumento del grosor de las paredes del conducto. Esto ocurre previo a observar alargamiento de la raíz y ocurre entre 12 a 24 meses posterior al tratamiento.
 - Observar respuesta pulpar positiva a los test.

El seguimiento es cada 3 meses, y luego una vez al año por 5 años. Nosrat y cols, 2012 (42) sugiere que se efectúen seguimientos por lo menos hasta los primeros 16 meses posteriores a la terapia para observar resultados más precisos en cuanto al

engrosamiento de las paredes y la posible revascularización y reinervación de tejido de tipo pulpar dentro del diente tratado.

VII. NUEVAS TENDENCIAS Y ESTUDIOS REALIZADOS EN ANIMALES

Debido a razones éticas, se han realizado múltiples estudios histológicos posteriores a la terapia de revascularización en animales como ratones y perros para poder ir definiendo el éxito de las terapias y hacerlas más predecibles.

El año 2011 Iohara y sus colaboradores (43) idearon la forma de realizar un trasplante in vitro de células madre pulpares en un modelo animal de un diente de un canino con un foramen apical de 0,7 mm, el resultado fue una regeneración exitosa, este trasplante generó un **mayor volumen de tejido tipo pulpar con una mayor densidad capilar.**

También se han realizado estudios donde se imprime tridimensionalmente un andamiaje de hidroxiapatita que sea biocompatible al que se le insertan células madre pulpares (las cuales se comercializan dentro de un hidrogel) que se trasplantan al tejido subcutáneo de un ratón inmunocomprometido. Después de 12 semanas se muestran signos claros de crecimiento vascular (figura 16 a, flechas). Los análisis histológicos realizados revelaron la formación de tejido vascularizado tipo pulpar y en algunas zonas la formación de osteodentina (figura 16 c) que indica el potencial osteogénico y odontogénico de las células madre de origen pulpar. Para asegurar el mayor potencial de vascularización de las hDPSCs sin alterar su capacidad de generar tejido duro ni viceversa, se debe recrear el microambiente adecuado en el momento de la regeneración, ya que esto juega un rol determinante en la diferenciación celular. Específicamente, se debe combinar el andamiaje adecuado con las células madre específicas en el momento preciso para que pueda haber un balance entre las propiedades inherentes a las hDPSCs y así generar el microambiente estable para la regeneración (44).

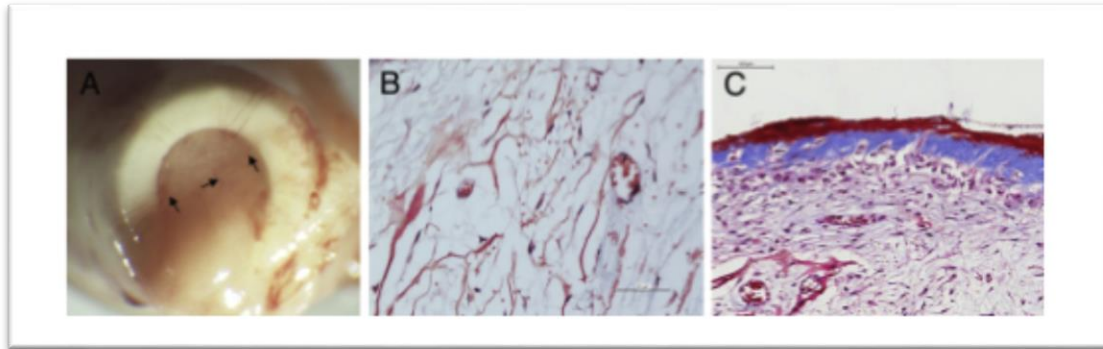


Fig. N° 16: Regeneración pulpar en un modelo de trasplante ectópico 12 semanas después del tratamiento, (A) vasos sanguíneos crecieron en la zona “apical” del andamiaje, los cuales son macroscópicamente visibles (flechas). (B) Formación de tejido pulpar tipo el cual está vascularizado. (C) Se observa osteodentina. Barras de escala = (B) 50 micrones y (C) 100 micrones (44).

Hasta el momento, estudios animales y humanos no han podido demostrar la formación de tejido tipo pulpar con presencia de odontoblastos que puedan secretar pre dentina en las paredes radiculares. Las investigaciones hechas en estas especies con posteriores análisis histológicos de los tejidos, muestran que no hay una inducción de células mesenquimáticas que se diferencien en odontoblastos a través de la utilización de MTA e inducción de sangrado. La mayoría de los hallazgos de los estudios experimentales y de reporte de casos fueron tejidos tipo cemento, tejido tipo óseo y tejido conectivo (45).

La siguiente tabla resume los resultados de algunas de las publicaciones que analizaron histológicamente el tejido formado tras la regeneración pulpar. En 3 de los 6 casos se encontró tejido tipo pulpar dentro del conducto. Sin embargo, se encontró mayoritariamente calcificaciones intracanal (45).

first author (year)	Infected (I)/ non-infected (NI)	PRP	REP follow-up	Blood vessels (HE)	Nervous tissue	HERS (HE)	Pulp-like tissue	Intracanal calcification
Shimizu et al. (2012) [10]	NI	-	3.5 weeks	+	n.s.	+	+	-
Torabinejad et al. (2012) [8]	I	+	14 months	+	n.s.	n.a.	+	-
Martin et al. (2013) [12]	I	+	25 months	+	n.s.	-	-	+
Shimizu et al. (2013) [13]	I	-	26 months	-	-	+	-	+
Becerra et al. (2014) [14]	I	-	24 months	+	n.s.	+	+	+
Lin et al. (2014) [11]	I	-	16 months	-	n.s.	-	-	+

Tabla I: todos los estudios reportaron la histología del diente posterior a la terapia de regeneración pulpar. HE: tinción hematoxilina-eosina. PRP: plasma rico en plaquetas. HERS: vaina epitelial de

Hertwig. N.S: sin tinción realizada. N.A: no aplicable debido a que solo se investigó el conducto y no todo el diente (45).

Esto se encuentra corroborado por el estudio de Xiaofei Zhu y colaboradores el año 2012 (46). En el cual se realizó técnica de regeneración pulpar a 16 premolares superiores sanos de perros Beagle, los cuales fueron divididos en 4 grupos según la el andamiaje a utilizar. La técnica de preparación fue la misma para los especímenes, primero se les aplicó anestesia general, luego aplicación de anestesia local con articaína al 4% con 1:100,000 de epinefrina. La apertura cameral se realizó con fresa carbide número 2 de alta velocidad y la permeabilización del conducto hasta el ápice con lima K #15, lo cual era confirmado mediante la toma de radiografías periapicales. Una vez en el ápice, éste es ensanchado con una lima K #80, irrigado con NaOCl 5,25%, seguido con EDTA al 17%. La irrigación final es con 5 ml de suero fisiológico y secado finalmente con puntas de papel estériles. Los dientes son divididos en 4 grupo: **Grupo control o llamado BC**, al cual se le estimula el sangrado con la lima K# 80 para formar un coágulo (blood clot), **grupo DPSC** el cual se le inyectan células madre pulpares caninas autólogas (extraídas de incisivos centrales exodonciados recientemente) combinadas con 20 uml de sangre venosa. Al **grupo PRP** se le aplica 20 uml de plasma rico en plaquetas, obtenido de la sangre de los mismos individuos y procesada por doble centrifugación minutos previos a la aplicación intracanal dental. Por último, el **grupo DPSC+PRP**, el cual recibió tanto células madre pulpares caninas y plasma rico en plaquetas. En todos los grupos el sellado coronario se realiza con MTA y composite. Los registros radiográficos se realizan preoperatorios y post 3 meses del tratamiento. Luego del análisis histológico se concluye que independiente del grupo estudiado no es posible observar tejido pulpar odontoblástico normal, sino que existe predominio de “tejido tipo”. Además que existe gran cantidad de tejido mineralizado de origen osteoide, cementoide, a nivel de los 3 tercios radiculares y gran cantidad de fibroblastos en la porción media y apical de la raíz.

Una de las razones que plantea Felipe Gómez en su publicación del 2016 (47) de por qué se genera tejido tipo periodontal dentro del conducto, se podría deber al

sangramiento del tejido periapical donde se estimulan células mesenquimáticas propias de los tejidos periodontales, éstas son originarias del saco dental, el que da origen a los tejidos como el cemento, ligamento y hueso. Una diferencia importante que hay que entender es que los odontoblastos derivan de la papila dental.

VIII. INVESTIGACIONES HISTOLÓGICAS EN HUMANOS

En este capítulo se expondrá los hallazgos histológicos encontrados sobre el tejido formado posterior a la terapia de regeneración endodóntica en humanos.

En el estudio de Emi Shimizu y colaboradores (48) se realiza el procedimiento de regeneración en el diente 2.1, en el cual los resultados evidencian crecimiento radicular tanto en largo como grosor de la misma (figura 17), así como también disminución del tamaño de la lesión periapical, presentada inicialmente por el diente. En este caso la técnica de revascularización se realizó con NaOCl 2,6%, sin preparación mecánica y medicación con hidróxido de calcio. Para la estimulación de las células madres se realiza sangramiento apical y el sellado coronario es con MTA. Sin embargo, el diente tuvo que ser extraído por sufrir una fractura coronaria con imposibilidad de rehabilitar.

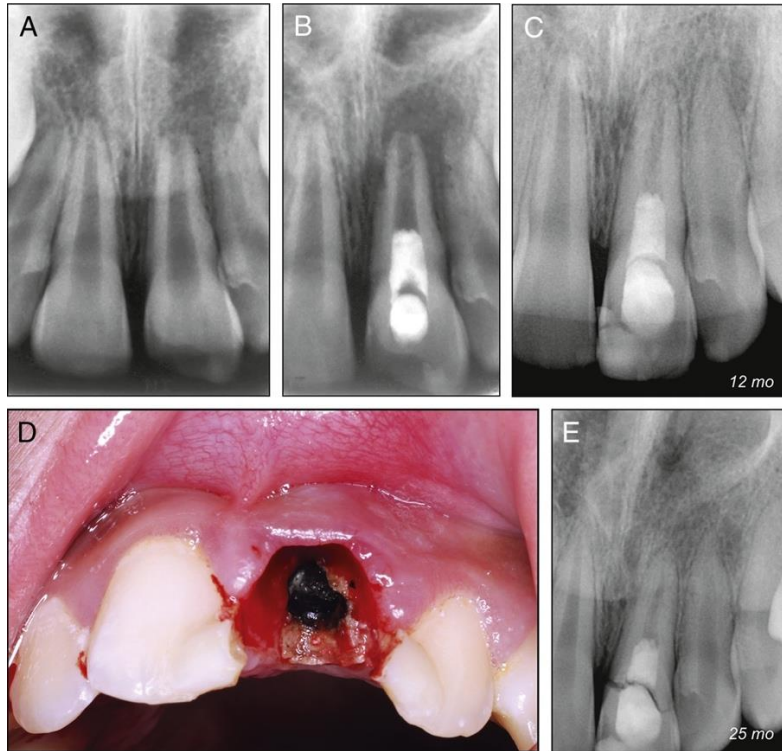


Fig. N° 17: (A) Radiografía preoperatoria: Diente 9 muestra formación radicular incompleta. Se observa un radio lucidez periapical. (B) Radiografía postoperatoria: el área radio lúcida aparenta ser de mayor tamaño que la preoperatoria, con márgenes definidos. (C) Las radiografías de seguimiento fueron tomadas 12 meses después de la revascularización: la radio lucidez periapical se encuentra resuelta y solo se observa un leve engrosamiento del ligamento periodontal alrededor del ápice. El espacio del conducto se encuentra reducido tanto en tamaño y el grosor de las paredes aumento. (D) El paciente se presentó 25 meses después del tratamiento, debido a movilidad de la corona. Se diagnostica fractura completa de corona y el diente no puede ser restaurado. Visión clínica, luego de la remocion de la corona fracturada. (E) La radiografía tomada antes de la remoción de corona fracturada. Mayor engrosamiento de las paredes del canal. Lesión periapical resulta completamente. (48)

En la siguiente imagen se observan los cortes histológicos obtenidos post extracción dental.

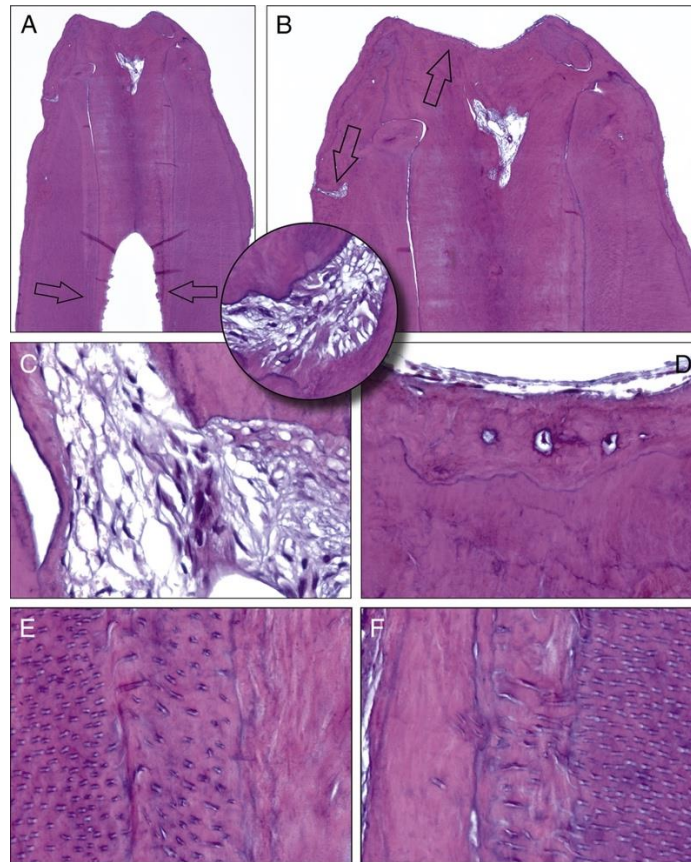


Fig. N° 18: (A) Sección pasa aproximadamente por el centro del conducto radicular. Tejido mineralizados rellena la porción apical del canal (hematoxilina-eosina: magnificación original 16). (B) Detalle de la porción apical en A. Una isla de tejido blando se evidencia en la porción apical del tejido calcificado (magnificación original de 25). El recuadro muestra aumento de la ramificación indicado por la flecha inferior. Su lumen contiene tejido conectivo no inflamado (magnificación original 400). (C) Una vista de alta potencia del tejido blando apical en B. Tejido conectivo vital con fibroblastos y abundancia de fibras de colágenas. La ausencia de células inflamatorias (aumento original 400). (D) La ampliación de la zona está indicada por la flecha superior en B. El tejido calcificado llenando el canal apical es irregular y está demarcado apicalmente por un tejido tipo cemento, con algunas lagunas similares a osteoblastos. Mayor longitud de raíz es causada por la aposición de tejido tipo cemento (aumento original 400). (E) Una vista de alta potencia de la superficie de la pared del conducto radicular indicado por la flecha izquierda en A. De izquierda a derecha: zona con alta concentración de los túbulos dentinarios, zona con menos túbulos y tejido calcificado sin túbulos dentinarios (aumento original 400). (F) Vista de alta potencia de la superficie de la pared del conducto radicular indicado por la flecha derecha en A. De derecha a izquierda: zona con alta concentración de túbulos dentinarios, zona con pocos túbulos y tejido calcificado sin túbulos dentinarios (aumento original 400). (48)

El estudio de Lishan y colaboradores del año 2015 (49), el cual corresponde a un reporte de caso de una paciente de 10 años con necrosis del diente 29. En este caso realizan el procedimiento de endodoncia regenerativa, basado en la irrigación

abundante con hipoclorito de sodio al 1%, mínima instrumentación con lima K#35, medicación con tripasta de 100 mg de ciprofloxacino, metronidazol y cefaclor, posteriormente irrigación con 10 ml de EDTA 17%, sangramiento apical y membrana de colágeno Collaplug, sellado del tercio coronal radicular con MTA y reconstrucción coronaria con cemento de vidrio ionomero y resina. Los controles se realizan a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses. En la figura 19 se puede observar la evolución del caso.

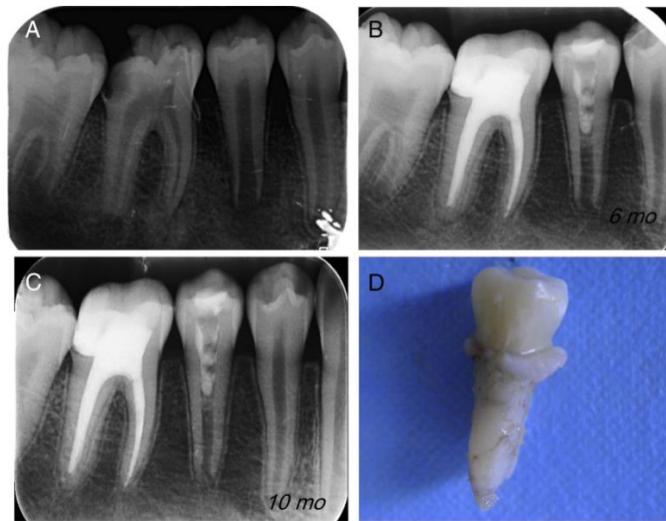


Fig. N°19: (A) radiografía preoperatoria, muestra el diente 29 en etapa de formación radicular. (B) Radiografía tomada 6 meses post operatoria, se puede observar un ligero aumento en el grosor de las paredes y estrechamiento del foramen apical. (C) RX 10 meses post operatoria que muestra un engrosamiento más marcado de las paredes, estrechamiento del foramen apical y leve aumento del largo radicular. (D) Diente 29 tras ser extraído por motivos de ortodoncia. (49)

Al realizar el estudio histológico, las secciones longitudinales muestran que el nuevo tejido presente en el canal radicular, desde el foramen hasta el tope con MTA, consistía en tejido calcificado y tejido conectivo fibroso que contiene vasos sanguíneos (fig. 20 A-C). El tejido mineralizado que estaba en las paredes del conducto era tipo cemento acelular y celular (Fig. 20 D) con muchas células tipo cementocitos. El límite entre la dentina y el tejido tipo cemento era fácilmente reconocible debido a la ausencia de túbulos dentinarios en el cemento (Fig. 20 D). Tejido tipo hueso con células tipo osteocitos y osteoblastos formaba islas en la

porción media del conducto (Fig. 20 A y B). El tejido conectivo fibroso en apical del conducto parecía ser una extensión del ligamento periodontal (Fig. 20 L). Se observaron neuronas y fibras nerviosas en el nuevo tejido (Fig. 20 H) y esto fue confirmado por la inmunoreactividad con el marcador PGP 9.5. No se observaron células tipo odontoblastos.

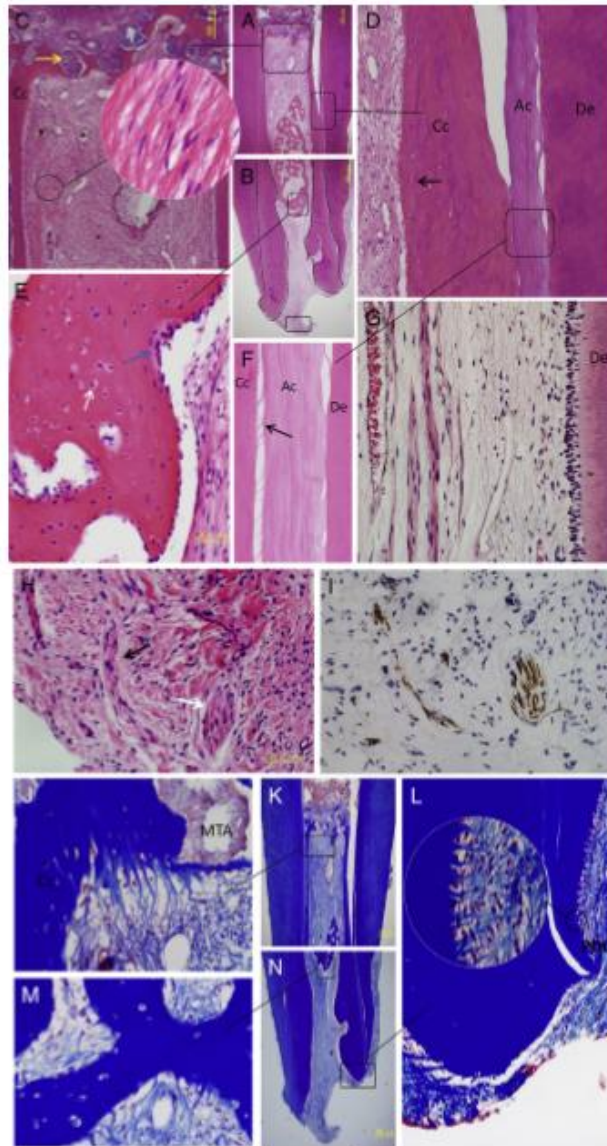


Fig. N° 20: (A y B) El corte pasa aproximadamente al centro del conducto del diente 29, el nuevo tejido formado consiste en tejido conectivo, tejido mineralizado depositado en las paredes del canal y tejido mineralizado organizado en islas en el espacio del conducto (H-E, magnificación x40). (C) Vista detallada del rectángulo superior en A, el tejido blando regenerado es fibras no inflamadas de tejido conectivo que se caracterizan por fibroblastos con forma de huso y por fibras de colágeno intercaladas con vasos sanguíneos. Este tejido rellena el conducto hasta el tope de MTA (flecha amarilla) (magnificación original x100 y x400). (D) Vista detallada del rectángulo inferior en A, el tejido

duro regenerado en las paredes del conducto es tejido tipo cemento celular y acelular. Muchas células tipo cementocitos (flecha negra) están presentes en el cemento tipo celular (magnificación x200), (E) Una mayor magnificación de las islas de tejido mineralizado en el conducto, éstas son tejido tipo hueso con células tipo osteocitos (flecha blanca) y tipo osteoblastos (flecha azul). (F) Mayor magnificación del cuadrado en D; la dentina del canal pareciera tener una unión directa con el tejido tipo cemento. Tejido fibroso que se parece el ligamento periodontal (flecha negra) se observa transversalmente en el conducto entre el cemento tipo celular y acelular (magnificación x400). (G) Vista detallada de una sección similar en el diente control (diente 20), este corte presenta una capa odontoblástica alineada y normal, túbulos dentinarios reconocibles y una pulpa central rica en estructuras neurovasculares (magnificación x200). Ac: cemento acelular, Cc: cemento celular; De: dentina. (H) Mayor magnificación del rectángulo inferior en B, se identifican neuronas (flecha blanca) y fibras nerviosas (flecha negra) (magnificación x400). (I) Mayor magnificación de la sección similar a H; se confirma la presencia de neuronas y fibras nerviosas (tinción inmunohistoquímica, magnificación x400). (J) Mayor magnificación del rectángulo superior en K, las fibras de colágeno se insertan en el tejido tipo cemento en ángulos rectos (magnificación x400). K-N cortes similares a 2 A y 2 B (tinción tricrómica Mason, magnificación x40). (L) Vista detallada del rectángulo derecho en N, el tejido conectivo fibroso en la parte apical del canal parece ser una extensión del ligamento periodontal. Las fibras del ligamento se insertan perpendiculares al cemento. (M) mayor magnificación del rectángulo superior en N, el colágeno se inserta en el tejido tipo óseo en los ángulos correctos. (49)

Otro artículo en el que se obtienen resultados inmunohistoquímicos positivos corresponde al realizado por Emi Shimizu y colaboradores en el 2012 (50). En este caso el diente acude con pulpitis irreversible sintomático y dentro del procedimiento de regeneración se realiza irrigación de NaOCl al 5,25%, sin preparación mecánica, medicado con hidróxido de calcio. Para estimular el periápice se realiza un sangramiento apical y posterior sellado coronal con MTA. El diente sufre fractura coronaria bajo el margen óseo, imposible de rehabilitar por lo que debe ser extraído. Dentro de los resultados histológicos se encuentra un tejido conectivo laxo con pocas fibras colágenas, fibroblastos y células mesenquimales. En la siguiente imagen se observan los hallazgos histológicos.

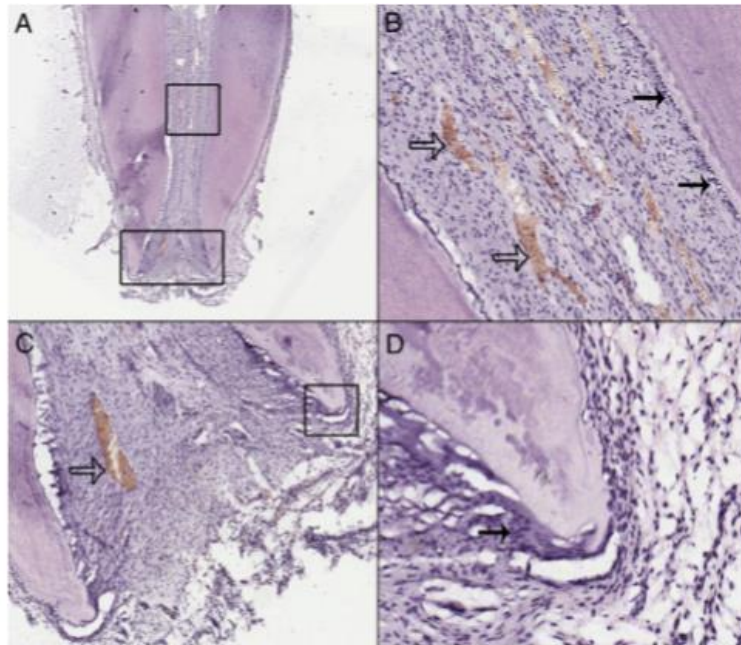


Fig. N°21: (A) Cortes histológicos del diente 9. Un tejido conectivo laxo con pocas fibras colágenas llenó el canal hasta el tope coronal de MTA (H-E., magnificación x200). El tope de MTA fue removido antes del procesamiento histológico de la muestra. (B) Mayor magnificación del cuadrado en A (tercio apical del conducto). Células tipo odontoblastos planos alineados a lo largo de la predentina (flechas rellenas). Muchos vasos sanguíneos con glóbulos rojos (flechas sin relleno). No se observan fibras nerviosas junto a los vasos sanguíneos. La mayoría de las células tiene forma de huso. (C) Mayor magnificación del rectángulo en A (foramen apical). Hay menor cantidad de vasos sanguíneos y componentes celulares en el foramen apical que los encontrados en el canal. (D) Mayor magnificación del cuadrado en C (parte del ápice). Capas de células epiteliales tipo las de la vaina epitelial de Hertwig (flecha) rodeando el ápice. Los espacios en el tejido son artefactos causados por la preparación histológica. (50)

En el estudio Nasratan y colaboradores del 2015 (45) es importante destacar que posterior a la terapia de regeneración endodóntica se obtiene tejido similar al pulpar, junto con fibras nerviosas. Esto se mostrará en las siguientes imágenes (Figuras 22, 23, 24, 25 y 26).

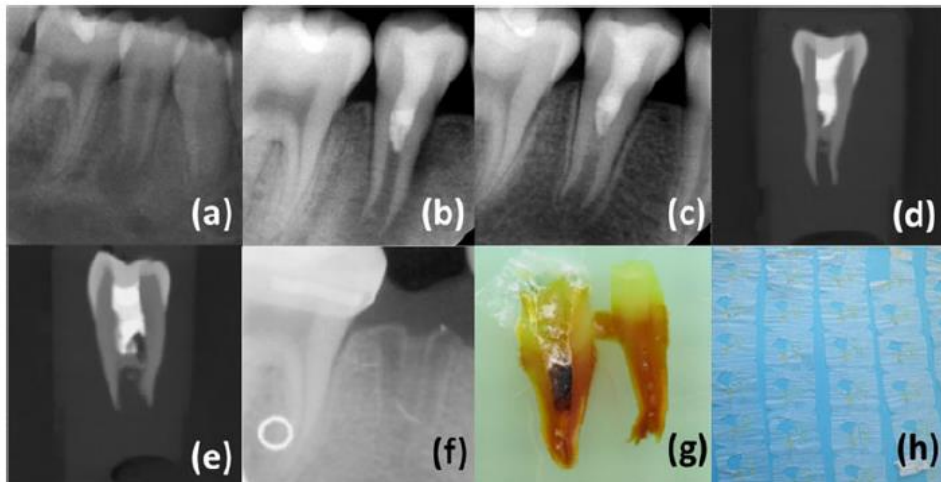


Fig. N° 22: (a) Vista parcial de la radiografía panorámica donde se muestra el 4.5 con lesión apical. (b) radiografía periapical posterior a la terapia de regeneración. (c) radiografía periapical del control de los 11 meses. (d) vista sagital post extracción obtenida de un CBCT. (e) radiografía periapical que muestra el alvéolo dos meses después de la exodoncia. (f) diente partido longitudinalmente, embebido en parafina después de haber removido las restauraciones coronales. (g) secciones seriadas (45).

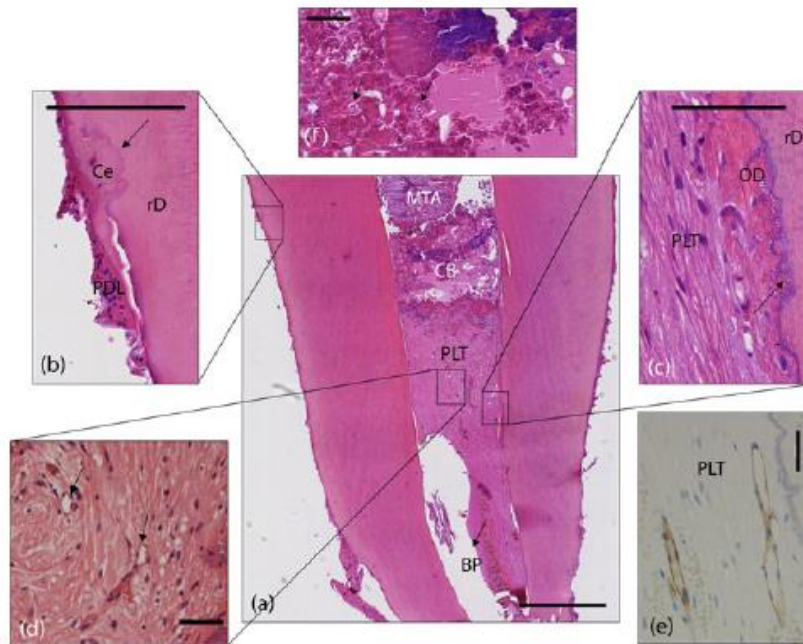


Fig. N°23: Tinciones de hematoxilina-eosina y de CD34 de las secciones longitudinales del diente. (a) Vista del diente desde coronal hasta apical; MTA, puente calcificado (CB), tejido tipo pulpar (PLT), plasma sanguíneo (BP). (b) en la zona externa de la superficie radicular hay cemento (Ce) bajo el ligamento periodontal (PDL), la flecha apunta a una zona de reabsorción externa y el consecuente aposición de cemento. (c) aposición de osteodentina (OD) en la zona interna de la dentina radicular (rD), la flecha apunta a la reabsorción interna. (d) las flechas apuntan a vasos sanguíneos en el PLT. (e) vasos sanguíneos se tiñen café con CD 34. (f) magnificación de CB con inclusiones de células (ver flechas). Figuras a, b, c y f fueron seleccionadas de imágenes escaneadas con Mirax Desk (Zeiss). Las otras figuras fueron seleccionadas durante la inspección con el microscopio. Barras de escala: a: 1000 μ m, b: 200 μ m, e: 100 μ m, d=f: 50 μ m (45).

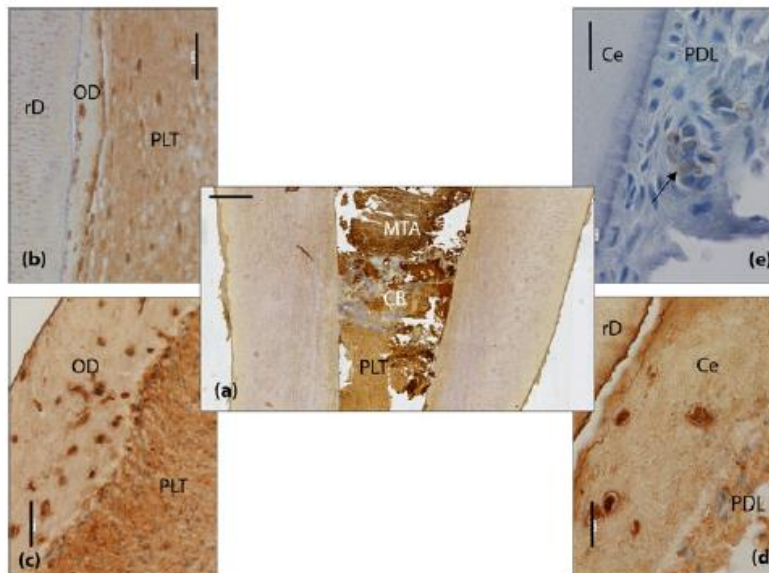


Fig. N° 24: Tinciones inmunohistoquímicas de osteocalcina (OC) (a-d) del diente revascularizado y pan citoqueratina (PK) (e). (A) Vista de la tinción OC, se muestra tejido tipo pulpar (PLT) y un puente calcificado (CB) bajo el MTA. (B y C) el PLT y la osteodentina (OD) son OC, (C) restos epiteliales de Malassez en el ligamento periodontal (PDL) son PK (Ver flecha). La figura A está seleccionada de imágenes obtenidas por Mirax Desk (Zeiss), las otras figuras fueron seleccionadas con el microscopio de inspección. Barras de escalas: a: 500 μ m, b: 50 μ m, d y e: 20 μ m (45).

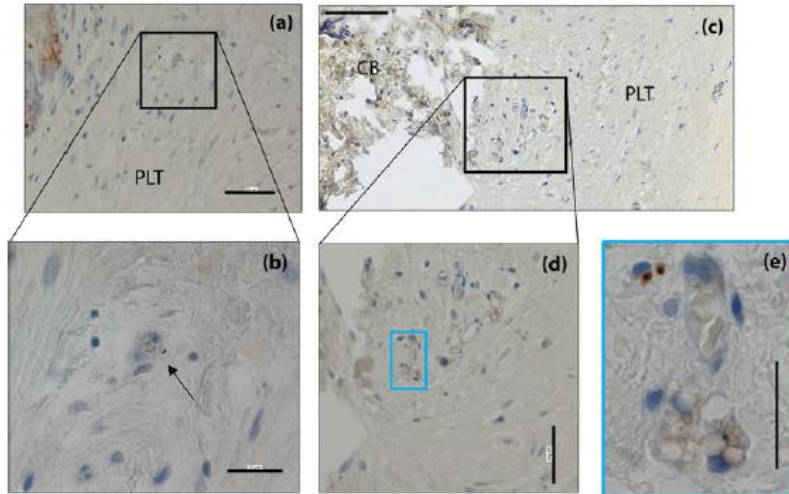


Fig. N° 25: cortes con tinción inmunohistoquímica del diente para neurofilamento (NF). (a) neurona simpática (adherida a un vaso sanguíneo, ver flecha en la fig b) en el tejido tipo pulpar (PLT). (b) vista magnificada de A. (c) vista de un haz neurovascular (NVB) en el PLT (CB: puente calcificado). (d) magnificación del NVB de la figura anterior. (e) magnificación del área seleccionada en azul. Escalas: a, d: 50 μ m, b, e: 20 μ m, c: 100 μ m (45).

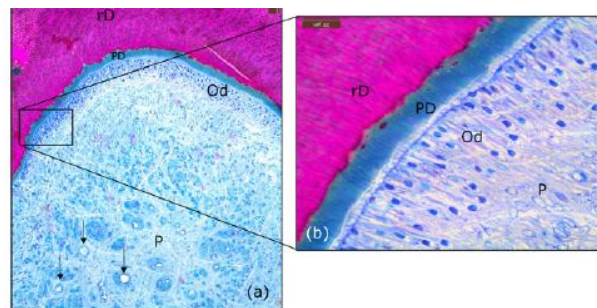


Fig. N°26: Secciones histológicas de cortes axiales del diente 11 con "pulpa normal". A y b: OD odontoblastos, PD predentina, rD dentina radicular, P pulpa. Las flechas apuntan a los vasos sanguíneos en la pulpa. Escalas: a 100 μ m, b 20 μ m (45).

Una investigación realizada por Chufang Peng y colaboradores el 2017 (51) expone los resultados luego de realizar terapia regenerativa el diente 29. Estos hallazgos son similares a los entrados por otras investigaciones, en donde el tejido obtenido es “tipo” o similar al normal. Las siguientes imágenes muestran la formación de tejido tipo pulpar y tipo dentina.

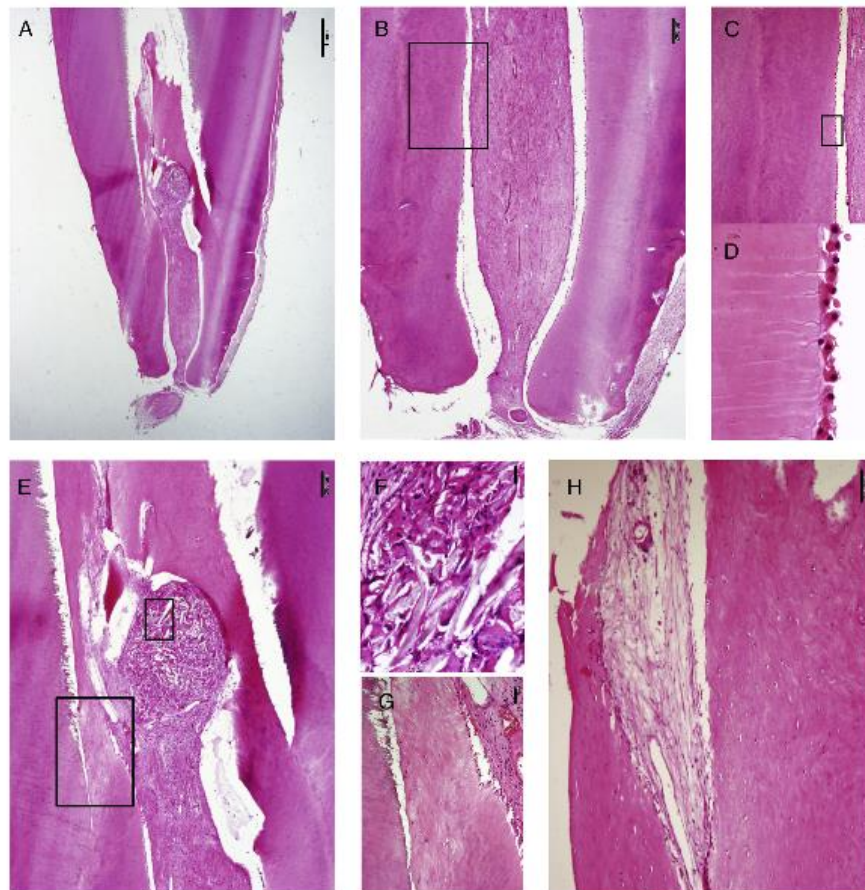


Fig. N° 27: (A) Tinción hematoxilina/eosina del tejido encontrado posterior a la revascularización del diente 29. (B) Vista detallada del tercio apical radicular. El canal contiene tejido tipo dentina y tipo pulpa recién formado. Bar: 200 μ m. (C) Mayor magnificación del rectángulo en B. se observa una clara línea compuesta por dentina reparativa entre el nuevo tejido tipo dentina y la dentina previa. Bar: 100 μ m. (D) Mayor magnificación del rectángulo en C. Células tipo odontoblastos achatados se alinean junto a la formación de tejido tipo dentina. Bar: 10 μ m. (E) Una vista detallada del tercio medio radicular de A. Bar: 200 μ m. (F) Magnificación de la pequeña área rectangular de E. Tejido amorfo y fagocitos. Bar: 25 μ m. (G) Magnificación del área del rectángulo más grande de E. La nueva dentina formada va cambiando gradualmente hacia tejido tipo cemento. Bar: 50 μ m. (H) Vista detallada del tercio coronal radicular de A. El tejido mineralizado se parece al cemento, se observó tejido conectivo laxo en la parte más superior del canal. Bar 100 μ m (51).

OBJETIVOS

Objetivo General:

Realizar una revisión sistemática de la literatura actualmente publicada, entre los años 2012 y 2017, con el fin de conocer el estado del arte en relación a los resultados encontrados en los tejidos pulpares obtenidos a partir de las terapias de regeneración pulpar guiada.

Objetivos Específicos:

- Identificar el o los protocolos de regeneración en endodoncia utilizados en los diferentes estudios.
- Comparar las diferentes técnicas de regeneración en relación al tipo de tejido obtenido.
- Determinar la causa de la exodoncia del o los dientes a los cuales se les hizo el estudio histológico.
- Dar bases para realizar el análisis histológico de un diente revascularizado que posteriormente presente signos y síntomas que sugieran la realización terapia endodóntica tradicional en la Cátedra de Endodoncia de la Universidad de Valparaíso; o bien que determinen su extracción.

MATERIALES Y MÉTODO

Tipo de investigación:

Revisión sistemática de la literatura.

Determinación de la muestra:

Investigaciones de dientes inmaduros sometidos a terapias de regeneración pulpar, los cuales sufrieron la extirpación pulpar o la extracción completa y que hayan sido luego analizados mediante técnicas histológicas, dentro de los últimos 5 años y 10 meses.

Palabras clave para la búsqueda de la bibliografía:

- Regenerative endodontics / Endodoncia regenerativa.
- Histological analysis / Análisis histológico.
- Immunohistochemical análisis / Análisis inmunohistoquímico.
- Pulp necrosis / Necrosis pulpar.
- Apical periodontitis / Periodontitis apical.
- Immature teeth / Diente inmaduro.
- Open Apex / Ápice abierto.

Criterios de inclusión

- Estudios publicados en las bases de datos Medline, PubMed, EBSCO y Web of Science y en la biblioteca científica electrónica Scielo.
- Reportes de casos publicados entre Enero del 2012 y Octubre del 2017.
- Estudios realizados en humanos sin importar sexo ni edad.

- Dientes con ápice abierto que hayan sido regenerados independiente de la patología pulpar previa y la técnica utilizada.
- Extracción del tejido regenerado o dientes completamente extraídos y sometidos a pruebas histológicas.

Criterios de exclusión

- Estudios que no se encuentren en idioma inglés o español.

Muestreo

En cada base de datos se aplican los siguientes filtros:

- Año de publicación: 01-01-2012 al 31-10-2017.
- Tipos de estudios: Reporte de casos, Revisiones de literatura.
- Especie a estudiar: Humanos.

Para la búsqueda en las **bases de datos PubMed y Medline**, se realiza de la siguiente forma:

- Immature teeth AND regenerative endodontics.
- Regenerative endodontics AND histological analysis.
- Histological findings AND regenerative endodontics.
- Pulp necrosis AND regenerative endodontics.
- Case report immature teeth.

En las **bases EBSCO y Web of Science**, la técnica empleada fue la siguiente:

Para EBSCO se selecciona el servicio EBSCOhost que muestra las diferentes bases de datos, las que se utilizaron fueron las siguientes:

- Master FILE Premier
- Academic Search Ultimate

Se utilizan los mismos conectores y las mismas palabras que en PubMed.

En Web of Science se utilizan los siguientes filtros en la búsqueda básica en todas las bases de datos que contiene menos Scielo:

- Fecha: de Enero del 2012 al 31 de Agosto del 2017.
- Se busca por tema (regenerative endodontics o endodoncia regenerativa).
- En idiomas de inglés y español.

En el caso de la **biblioteca científica Scielo Chile**, no se aplican filtros, solo el uso de palabras claves:

- Regeneración dentaria.
- Regeneración endodóntica.
- Dientes inmaduros y regeneración.
- Análisis histológico de diente regenerado endodónticamente.

Además una vez obtenidos los estudios a través de la técnica descrita previamente, se revisará la bibliografía consultada en los mismos. Con esto se pretende encontrar la mayor cantidad de publicaciones relevantes para nuestra investigación y que no hayan sido localizadas previamente en el muestreo.

Recolección de Datos

Basándose en el estudio "***Histologic and Immunohistochemical Findings of a Human Immature Permanent Tooth with Apical Periodontitis after Regenerative Endodontic Treatment***" de Lishan Lei y colaboradores del año 2015 (48), se utilizarán las siguientes variables descritas:

- Diagnostico pulpar y periapical (cuando corresponda).
- Andamiaje utilizado para la regeneración.
- Respuesta de vitalidad pulpar post tratamiento.
- Descubrimientos histológicos.
- Descubrimientos inmunohistológicos.

Las variables obtenidas en los diferentes estudios analizados serán tabuladas de manera similar a la investigación modelo (48).

Además se incorporarán las siguientes:

- Edad y sexo del paciente.
- Técnica de regeneración donde se evaluará la concentración y tipo de irrigante utilizado así como la medicación.
- Determinación del tiempo desde que se realiza el tratamiento hasta que se hace el estudio.
- Tipo de diente: si corresponde a un central, lateral, canino, primer o segundo premolar, primer/ segundo/ tercer molar; ya sea superior o inferior.

En el caso que algún estudio no califique en alguna de las variables será rellenada con N/O, lo que indica que no fue observada en el estudio, ya sea porque no se realizó o no fue mencionada.

RESULTADOS

Luego de la búsqueda bibliográfica, utilizando los filtros descritos anteriormente, se obtuvo:

1) Base PubMed:

Palabras Claves	Número de estudios encontrados
<i>Immature teeth AND regenerative endodontics</i>	74
<i>Regenerative endodontics AND histological analysis</i>	4
<i>Histological findings AND regenerative endodontics</i>	6
<i>Pulp necrosis AND regenerative endodontics</i>	49
<i>Case report immature teeth</i>	106
	Total 239 artículos

2) EBSCO:

Palabras Claves	Número de estudios encontrados
<i>Immature teeth AND regenerative endodontics</i>	23
<i>Regenerative endodontics AND histological analysis</i>	3
<i>Histological findings AND regenerative endodontics</i>	426
<i>Pulp necrosis AND regenerative endodontics</i>	3
<i>Case report immature teeth</i>	5
	Total 457 artículos

3) Web of Science:

Palabras Claves	Número de estudios encontrados
<i>Immature teeth AND regenerative endodontics</i>	120

<i>Regenerative endodontics AND histological analysis</i>	5
<i>Histological findings AND regenerative endodontics</i>	5
<i>Pulp necrosis AND regenerative endodontics</i>	43
<i>Case report immature teeth</i>	164
	Total 339 artículos

4) Scielo:

Palabras Claves	Número de estudios encontrados
<i>Regeneración dental</i>	867
<i>Regeneración endodóntica</i>	185
<i>Dientes inmaduros y regeneración</i>	119
<i>Análisis histológico de diente regenerado endodónticamente</i>	5
	Total 1176 artículos

Se obtuvieron en total 2.211 artículos relacionados con el tema. Sin embargo, este número es reducido siguiendo los siguientes parámetros:

- Eliminación de artículos repetidos en diferentes base de datos.
- Aplicación de criterios de inclusión y exclusión.

Por lo que el total de estudios relacionados con el tema corresponden a **10 artículos relevantes para fines de estudios**. A estos se agrega un estudio relevante obtenido de la bibliografía referida en uno de los artículos seleccionados (total **11 estudios**). Esto queda resumido en la tabla I, en donde se ordenan según base de datos, autores, nombre del estudio, año de publicación y código. Este último fue otorgado por las investigadoras con fines de ordenamiento de información.

Estudios encontrados en diferentes bases de datos

Buscador	Autores	Nombre	Año de publicación	Código
<i>Pubmed</i>	Ali Nosrat, Negar Homayounfar, Kaveh Oloomi	Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case (52)	2012	1
<i>Pubmed</i>	Emi Shimizu, George Jong, Nicola Partridge, Paul A. Rosenberg, Louis M. Lin	Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure (50)	2012	2
<i>Pubmed</i>	Mahmoud Torabinejad, Hadi Faras	A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet rich plasma (53)	2012	3
<i>Pubmed</i>	Emi Shimizu, Domenico Ricucci, Jeffrey Albert, Adel S. Alobaid, Jennifer L. Gibbs, George T-J. Huang, Louis M. Lin	Clinical, Radiographic, and Histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment (48)	2013	4
<i>Pubmed</i>	Gabriela Martin, Domenico Ricucci, Jennifer L. Gibbs, Louis M. Lin	Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet rich plasma (54)	2013	5
<i>Obtenido de bibliografía paper anterior (CODIGO 10)</i>	Louis M. Lin, Emi Shimizu, Jennifer L. Gibbs, Simona Loghin, and Domenico Ricucci	Histologic and Histobacteriologic Observations of Failed Revascularization/Revitalization Therapy: A Case Report (55)	2014	6
<i>Pubmed</i>	Patricia Becerra, Domenico Ricucci, Simona Loghin, Jennifer L. Gibbs, Louis M. Lin	Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization (56)	2014	7

<i>Pubmed</i>	Ali Nosrat, Alireza Kolahdouzan, Farzaneh Hosseini, Ehsan A. Mehrizi, Prashant Verma, Mahmoud Torabinejad	Histologic outcomes of uninfected human immature teeth treated with regenerative endodontics: 2 case reports (57)	2015	8a y 8b
<i>Pubmed</i>	Lishan Lei, Yuemin Chen, Ronghui Zhou, Xiaojing Huang, Zhiyu Cai	Histologic and immunohistochemical findings of a human immature permanent tooth with apical periodontitis after regenerative endodontic treatment (49)	2015	9
<i>EBSCO (Academic Search ultimate)</i>	Nastaran Meschi, Petra Hilken, Ivo Lambrichts, Kathleen Van den Eynde, Athina Mavridou, Olaf Strijbos, Marieke De Ketelaere, Gertrude Van Gorp, Paul Lambrechts.	Regenerative endodontic procedure of an infected immature permanent human tooth: an immunohistological study (45)	2015	10
<i>EBSCO (Academic Search ultimate)</i>	Chufang Peng, DDS, Yuming Zhao, PhD, DDS, Wenjun Wang, PhD, Yuan Yang, DDDS, Man Qin, PhD, DDS, and Lihong Ge, PhD, DDS	Histologic Findings of a Human Immature Revascularized/Regenerated Tooth with Symptomatic Irreversible Pulpitis (51)	2017	11

Tabla II. Tabulación de estudios objeto de investigación.

Posterior a la selección de los estudios se procedió a comparar la edad del paciente, el diente y diagnóstico pulpar y periapical de los diferentes casos. Como se observa en la siguiente tabla.

Código	Edad	Diente	Diagnostico Pulpar y Periapical
1	14 años	1.1 – 2.1	Necrosis pulpar – Periodontitis apical sintomática
2	10 años	2.1	Pulpitis irreversible con periodonto normal
3	12 años	1.5	Pulpitis reversible posterior a terapia de revascularización
4	9 años	2.1	Necrosis pulpar – Absceso apical crónico
5	9 años	3.6	Necrosis pulpar – Periodontitis apical sintomática
6	6 años	2.1	Necrosis pulpar - Periodontitis apical asintomática
7	11 años	4.5	Necrosis pulpar – Absceso apical crónico
8a	9 años	1.4	Pulpa normal – Indicación de exodoncia por ortodoncia
8b	10 años	1.4	Pulpa normal – Indicación de exodoncia por ortodoncia
9	10 años	3.5	Necrosis pulpar – Periodontitis apical sintomática
10	10 años	4.5	Necrosis pulpar- Absceso apical agudo
11	11 años	3.5	Pulpitis irreversible – Periodontitis apical sintomática

Tabla III. Comparación de diente con diagnostico pulpar.

En la siguiente tabla se observa cómo se comparan los protocolos de revascularización utilizados en los diferentes estudios según el diente y diagnostico pulpar inicial, además del tipo de andamiaje y sellado coronal.

Código	Diente	Diagnostico Pulpar/Periapical	Irrigación	PBM	Medicación	Andamiaje	Sellado coronal
1	1.1	NP	NaOCl 5,25%	Sin preparación mecánica	Metronidazol, ciprofloxacino y minociclina	Sangramiento apical	MTA
	2.1	PAS					
2	2.1	PI	NaOCl 5,25%	Sin preparación mecánica	Hidróxido de calcio con suero	Sangramiento apical	MTA
		PS					
3	1.5	PR	N/A	N/A	N/A	PRP	N/A
		PS					
4	2.1	NP	NaOCl 2,6%	Sin preparación mecánica	Hidróxido de calcio con suero	Sangramiento apical	MTA
		AAC					
5	3.6	NP	NaOCl 5.25%	Distal K#40	Pasta de 200 mg ciprofloxacino, 500 mg metronidazol, 100 mg minociclina	Sangramiento apical y PRP (con clorhidrato de calcio)	MTA
		PAS		Mesiales K#30			
6	2.1	NP	NaOCl 5,25%	K#80	Hidróxido de calcio con suero (1ª), metronidazol 500 mg, ciprofloxacino 500 mg, minociclina 200 mg (2ª)	Sangramiento apical	MTA
		PAA					
7	4.5	NP	NaOCl 5,25%, CHX 2%	Sin preparación mecánica	Pasta de 200 mg ciprofloxacino, 500 mg metronidazol, 100 mg minociclina	Sangramiento apical	MTA
		AAC					
8a	1.4	PN	NaOCl 1,25% - EDTA 17%	GG – K#90	Sin medicación	Sangramiento apical	MTA
		PS					
8b	1.4	PN	NaOCl 1,25% - EDTA 17%	GG – K#60	Sin medicación	Sangramiento apical	MTA
		PS					
9	3.5	NP	NaOCl 1% - EDTA 17%	Sin preparación mecánica	Ciprofloxacino 100 mg, metronidazol 100 mg, cefaclor 100 mg	Sangramiento apical	MTA
		PAS					

10	4.5	NP	NaOCl 1% - EDTA 17%	Sin preparación mecánica	Ciprofloxacino 200 mg, metronidazol 500 mg	Sangramiento apical, Hemocol	MTA
		AAA					
11	3.5	PI	NaOCl 5,25%	Sin preparación mecánica	Ciprofloxacino, metronidazol y minociclina (pasta 3 Mix)	Sangramiento apical	Fuji IX (ionómero) y resina Z250
		PAS					

Tabla IV. Diferentes protocolos utilizados.

*Códigos: PN: pulpa normal PR: pulpitis reversible, PI: pulpitis irreversible, NP: necrosis pulpar. PS: periodonto sano, PAS: periodontitis apical sintomática, PAA: pulpitis apical asintomática, AAC: absceso apical crónico, AAA: absceso apical agudo. N/A: no aplica

Una vez conocido los diagnósticos y protocolos empleados por los diferentes estudios, se ordenan los datos según el tiempo transcurrido post tratamiento de revascularización, la sensibilidad del diente (medido a través de test pulpar eléctrico y/o aplicación de frío) previo a la exodoncia, el motivo de esta y los resultados encontrados en el tejido dentro de los conductos, ya sea mediante estudios histológicos y/o inmunohistoquímicos (tabla V).

Cabe destacar que no se realizará la comparación de los diferentes procesamientos histológicos e inmunohistoquímicos. Esto debido a que existe gran variabilidad entre los mismos y/o no se encuentran descritos dentro del reporte.

Código	Tiempo	Test de Sensibilidad	Causa de exodoncia-falla	Histología	Inmunohistológicos
1	72 meses	Negativo	Tinciones coronarias	N/A	N/A
2	24 días	N/A	Diente irrestaurable por fractura bajo margen oseo	Tejido conectivo: laxo con pocas fibras colágenas, mayoritariamente fibroblastos y células mesenquimales, sin células	Células STROL 1 positivo (evalua presencia de células madre mesenquimales)

				<p>inflamatorias ni fibras nerviosas.</p> <p>No hay presencia de tejido mineralizado.</p>	
3	14 meses	Positivo (eléctrico y frío)	Endodoncia solicitada por el guardador del menor	<p>Tejido conectivo fibroso, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfocitos, material granular irregular basófilo rodeado por células aplanadas multinucleares tipo células gigantes.</p>	N/A
4	26 meses	N/A	Fractura cervical horizontal	<p>Tejido mineralizado: células tipo cemento, lagunas tipo osteocitos.</p> <p>Tejido conectivo: tejido vital no inflamado con zonas de tejido necrótico.</p> <p>No hay presencia de células pulpares ni de células tipo odontoblastos.</p>	Positivo para BSP (sialoproteína de hueso humano)
5	25 meses	N/A	Fractura corono radicular	<p>Tejido mineralizado: tipo cemento que contiene células tipo cementocitos y osteocitos.</p> <p>Tejido conectivo: vasos sanguíneos, fibroblastos, macrófagos, células multinucleares.</p> <p>No se observan células tipo odontoblastos.</p>	N/A
6	16 meses	N/A	Nuevo cuadro de absceso apical agudo y	Tejido duro: algunas áreas con tejido tipo	N/A

			decoloración de la corona. El diente no mostró crecimiento radicular radiográfico	<p>cemento asociado a fragmentos de ligamento periodontal. Zonas de tejido calcificado con estructura laminillar.</p> <p>Zonas de reabsorción de dentina.</p> <p>Tejido blando: zonas de tejido necrótico y asociaciones bacterianas cubriendo las paredes.</p>	
7	24 meses	N/A	Motivos de ortodoncia	<p>Tejido mineralizado: zona de calcificación distrófica, tejido de las paredes es tejido tipo cemento celular y acelular.</p> <p>Tejido conectivo: fibroblastos, fibras colágenas. Leve infiltrado inflamatorio crónico.</p> <p>No hay células tipo odontoblastos ni estructura mineralizada tubular.</p>	N/A
8a	4 meses	N/A	Motivos de ortodoncia	<p>Tejido duro consistente con osteocemento, osteodentina.</p> <p>Tejido conectivo: fibras colágenas, vasos sanguíneos, restos epiteliales. Sin células inflamatorias. Tejido histológico similar al fibroma</p>	N/A

				odontogénico PDL.	
8b	4 meses	N/A	Motivos de ortodoncia	Tejido duro: cemento mal formado, calcificaciones distróficas, tejido osteoide, cemento de reparación. Tejido conectivo: De características similares a las estructuras periodontales. No se encuentran restos epiteliales ni células inflamatorias.	N/A
9	10 meses	Positivo (eléctrico y frío)	Motivos de ortodoncia	Tejido mineralizado: células tipo cementocitos, tipo osteocitos, tipo osteoblastos. Tejido tipo cemento acelular. Tejido conectivo: vasos sanguíneos, tejido conectivo fibroso inflamado, fibroblastos, fibras colágenas, fibras nerviosas y neuronas. No presenta células tipo odontoblastos	Positivo al marcador PGP9,5 (marcador de tejido nervioso)
10	11 meses	N/A	Motivos de ortodoncia	Tejido conectivo pulpar, vasos sanguíneos, plasma sanguíneo.	Vasos sanguíneos, células estromales, cementoblastos, restos epiteliales de Malassez, conexiones neurovasculares y fibras de nervios simpáticos.
11	12 meses	Negativo (térmico y eléctrico)	Motivos de ortodoncia	Tejido blando: en apical tejido tipo pulpar con una diferencia entre la dentina y tipo-dentina. Células tipo odontoblasto,	N/A

**tejido vascular,
macrófagos y
fibras
colágenas.**

**Tejido duro:
tejido tipo
dentina (con
túbulos
dentinarios)
hacia la zona
apical, en
coronal tejido
tipo cemento
con células tipo
cementocitos
distribuidas en
lagunas.**

Tabla V. Comparación de los tejidos obtenidos de las muestras.

DISCUSIÓN

De los 11 estudios analizados podemos indicar que uno de ellos no especifica la técnica de regeneración pulpar. Esto es importante, ya que existe gran variabilidad en esta etapa del proceso y es de vital importancia conocer los diferentes protocolos utilizados en relación a los resultados de los mismos, ya sea éxito o fracaso, con el fin de poder a futuro determinar cuál es la mejor manera de realizar la terapia y que nos lleve a generar tejido pulpar normal dentro del canal radicular.

Cabe destacar que todas las investigaciones utilizaron diferentes protocolos de regeneración. Sin embargo, la técnica de obtención y procesamiento de la muestra puede tener incidencia en los resultados; y este procedimiento no se encuentra descrito en todos los estudios.

En relación al tipo de irrigación utilizada por los estudios, se observa que 6 investigaciones utilizaron NaOCl en concentración de 5,25%, 2 estudios la utilizaron al 1%, un estudio al 1,25% y 1 estudio al 2,6%. En 4 de estos estudios el NaOCl se utilizó combinado con otro irrigante como clorhexidina (1 caso) y EDTA al 17% en 3 casos. Estas concentraciones difieren de lo sugerido por la Sociedad Americana de Endodoncia, en donde se debiera utilizar al 1,5% y en combinación con EDTA al 17% (6).

La preparación biomecánica fue realizada en solo 3 estudios, los cuales utilizaron principalmente fresas Gates Glidden para realizar el acceso radicular y limas K para la preparación del conducto. En los otros 7 no hubo intervención del canal. Si bien el protocolo de la Sociedad Americana de Endodoncia no indica realizar una preparación del conducto, si utiliza una lima K pre curvada con el fin de sobre instrumentar el ápice para estimular el sangrado (6).

La medicación se realizó en 9 de los 10 estudios. 6 estudios medicaron con tripasta de antibióticos, en donde se combinan el ciprofloxacino, metronidazol y minociclina. Solo en uno de los estudios se utiliza la tripasta, utilizando cefaclor en reemplazo de la minociclina (para evitar tinción de la corona). 2 estudios realizaron la

medicación con hidróxido de calcio y 1 estudio con bipasta, donde se combina el metronidazol con el ciprofloxacino.

En relación al andamiaje utilizado los 11 estudios lo especifican. La mayoría de ellos utiliza el sangramiento apical, lo cual coincide con el protocolo mundialmente aceptado (6). Un estudio combina el sangramiento con plasma rico en plaquetas y otro con Hemocol. Un estudio sólo utiliza plasma rico en plaquetas sin sangramiento apical. Sin embargo, este último no especifica ni detalla el procedimiento de regeneración.

Para el sellado coronal se utiliza preferentemente agregado de trióxido mineral (MTA) y en una menor proporción se utilizó el cemento de vidrio ionómero más resina coronal.

En relación al tiempo transcurrido desde que se realizó la terapia hasta la exodoncia del diente va desde los 4 hasta los 72 meses. Esto depende del motivo de exodoncia, siendo en 5 estudios por ortodoncia, 3 por fractura dentaria imposible de restaurar, 1 caso por tinciones coronarias (las que se pudieron generar por el sellado coronal con MTA), 1 caso mostró nuevamente signos de infección siendo diagnosticado con un cuadro de absceso apical agudo; y el último caso fue debido a que el diente generó una pulpitis reversible y el tutor del paciente decidió que hicieran el tratamiento de endodoncia tradicional.

En ninguno de los estudios analizados histológicamente se observaron odontoblastos. El nuevo tejido blando está conformado principalmente por células tipo odontoblasto, macrófagos, tejido vascular y fibras colágenas. Este tejido conectivo tiene más características de ser tejido periodontal y no presenta la organización clásica del tejido pulpar.

Histológicamente el tejido duro formado tiene células tipo cementocitos, tipo osteocitos, tipo osteoblastos los que forman una matriz similar al cemento acelular, tejido osteoide y zonas de calcificaciones distróficas.

CONCLUSIONES

De los 11 artículos obtenidos se puede concluir que en ninguno de los casos se logró una regeneración del tejido pulpar normal. Es decir, no hay formación de odontoblastos y por ende tampoco se observa dentina. Las nuevas células tampoco presentan la distribución espacial celular previamente conocida en los cortes histológicos de dientes sanos.

Dentro del tejido conectivo obtenido, los análisis mostraron presencia de vasos sanguíneos, fibroblastos, macrófagos, células “tipo odontoblasto” (que no secretan dentina ni tampoco tienen la estructura polarizada típica), colágeno y un infiltrado celular que se corresponde con elementos de la inflamación crónica.

La zona más celular en todos los casos se encontró hacia apical y este tejido presenta características más similares a un tejido periodontal. En los tercios medios y coronales de los dientes estudiados, se encontró un tejido más mineralizado. En relación a este último, los análisis concluyen que se genera a partir de un tejido similar al cemento, el cual es secretado por células tipo cementocitos y que además, hay zonas de calcificaciones distróficas, células tipo osteocitos y osteoblastos. La matriz mineralizada de las paredes dentinarias era más bien un tejido similar al cemento acelular, esto se logra diferenciar de la dentina secretada anteriormente por los odontoblastos vitales.

En resumen, la regeneración endodóntica tiene como resultado la formación de un tejido que posee más similitudes con lo periodontal que endodóntico.

También podemos concluir que en la actualidad existen diferentes técnicas para realizar la regeneración pulpar, en las que varía tanto la concentración del irrigante a utilizar como también la preparación biomecánica y la medicación.

En relación al irrigante en todos los casos utilizaron NaOCl, solo varían sus concentraciones (desde 1% a 5.25%). Los estudios que utilizan la mayor concentración del NaOCl son porque fundamentan el concepto de limpieza del

conducto solo en la parte química dejando de lado la mecánica. En muy pocos casos se realiza preparación mecánica completa y solo en dos casos se utilizaron andamiajes externos. Esto se corresponde con los protocolos internacionales entregados por la Asociación Americana de Endodoncia, la cual indica que debe haber una mínima preparación mecánica del canal y solo a través del sangramiento apical se logra la formación de una matriz adecuada que favorezca el proceso de regeneración.

Dentro de este capítulo debemos agregar que la causa de exodoncia más frecuente fue por motivos de ortodoncia, por lo tanto, en ninguno de esos casos hubo problemas asociados al proceso de regeneración, en relación a los dientes anteriores regenerados, el fracaso y la causa de la exodoncia fue por fractura coronal radicular que dieron como resultado dientes que no se podían rehabilitar y/o por tinción (esta última pudo haberse evitado si es que no hubieran utilizado el MTA como tope coronal). En el menor de los casos la falla fue por infección y absceso, donde realizaron como tratamiento la endodoncia tradicional. Por lo tanto, podemos concluir que es un proceso con altas probabilidades de éxito.

Finalmente, los dientes que sea necesario extraer y que hayan sido regenerados por la Cátedra de Endodoncia de la Universidad de Valparaíso debieran ser sometidos a análisis histológicos dentro del mismo establecimiento según el protocolo de procesamiento de muestras de la Universidad. Esta información es muy útil para seguir investigando ya que son muy pocos los casos en que el resultado final es la exodoncia o endodoncia tradicional.

En el caso de que un diente regenerado tenga la necesidad de realizarse una endodoncia convencional, por ejemplo, en casos de pulpitis, abscesos o fracturas coronarias con restauraciones que necesiten de anclaje al conducto; se debe realizar la pulpectomía completa cuidadosamente con un instrumento manual y fijarlo inmediatamente en formalina al 10%. Posterior a esto se debe embeber en parafina para después realizar los cortes histológicos, que pueden ser de 5 micrones cada uno. La tinción más utilizada en estos casos fue de hematoxilina eosina.

En las situaciones donde se necesite la exodoncia del diente el procedimiento a realizar es bastante similar. El diente recién extraído debe ser inmediatamente fijado (glutaraldehído, formaldehído, etc), luego debe ser desmineralizado y deshidratado para ser embebido en la parafina. Una vez que esté la muestra en el bloque de parafina sólida se deben programar los cortes, que serán teñidos con tinción de hematoxilina eosina.

SUGERENCIAS

Tras finalizar la investigación, podemos sugerir que se debiera incluir en el consentimiento informado que firma el paciente o su apoderado, la posibilidad de acudir a la Universidad de Valparaíso para realizar la endodoncia o exodoncia (según corresponda) y el posterior análisis histológico del diente.

Se debería capacitar a los alumnos de la Especialidad de Endodoncia que, en el caso de recibir pacientes con tratamientos de regeneración fallidos, puedan realizar la pulpectomía y fijación inmediata del tejido para su análisis histológico. Para esto último es necesario mantener un stock de líquido fijador (formalina al 10%) en clínica C para poder realizar todos estos procedimientos.

Se sugiere coordinar las acciones de procesamiento y análisis de muestras con la cátedra de Patología de la Universidad de Valparaíso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castelucci Arnaldo, MD, DDS, Endodontics. Vol 1. Embriology. 2004. Editorial II Tridente.
2. Kenneth M Hargreaves, Stephen Cohen. Vías de la Pulpa, 10° edición. 2011. Elsevier.
3. Manuel Meruan, Carolina Smok, Mariana Rojas. (2012): Face and Neck Development in Vertebrates. Int. J. Morphol.,30(4):1373-1388.
4. Chala S, Abouqal R, Rida S. Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: systematic review and meta-analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 112: e36-e42.
5. John I. Ingle, Leif, K. Bakland, J. Craig Baumgartner. Endodontics 6. 2008, BC Decker.
6. American association endodontics.2013. AAE Position Statement. Obtenida el 3 Nov. 2013.
http://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/newsletters/endodontics_colleagues_for_excellence_newsletter/ecfespring2013.pdf
7. Lasala A. Endodoncia. 4ta Edición. Editorial Salvat.1992.
8. Torabinejad M, Walton R. Endodoncia: Principios y Práctica. 4° edición. 2010. Elsevier.
9. Huang G (2009): Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. Regen Med; 4(5):697-707.
- 10.Zhu X, Zhang C, Huang GT, Cheung GS, Dissanayaka WL, Zhu W. Transplantation of dental pulp stem cells and platelet-rich plasma for pulp regeneration. J Endod. 2012 Dec;38(12).
- 11.García-Godoy F, Murray P (2012): Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. Dental Traumatology 2012, 28:33-41.

12. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF (2009): Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis. *Journal of Endod*; 35(5):745-749.
13. Cvek, M. (1972): Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature. *Odontol. Revy.*, v.23, p. 27-44. 1972.
14. Torabinejad M, Chivian N. (1999): Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*;25(3):197-205.
15. KG. Vellore. (2008): Calcium hydroxide induced apical barrier in fractured nonvital immature permanent incisors. *Journal of Indian society of periodontics and preventive dentistry*, Volume: 28, Issue: 2, Page: 110-112.
16. Murray P, García- Godoy F, Hargreaves K. (2007): Regenerative endodontics: a review of current status and call for action. *J endod*; 33;377-390.
17. Emi Shimizu DDS, PhD, George Jong DDS, Nicola Partridge PhD, Paul A. Rosenberg DDS and Louis M Lin BDS, DMD, PhD. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *JOE*, vol 38, n°9, Sept, 2012.
18. Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y. (2008): Regeneration Potential of the Young Permanent Tooth: What Does the Future Hold? *J Endod* ;34:S51-S6.
19. Anibal Diogenes, DDS, MS, PhD; Nikita B. Ruparel, DDS, MS, PhD; Yoav Shiloah, DDS, MBA; Kenneth M. Hargreaves, DDS, PhD. Regenerative Endodontics: A way forward. *JADA* 2016;147(5):372-380.
20. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007 Apr;33(4):377-90.
21. Palma PJ, Ramos JC, Martins JB, Diogenes A, Figueiredo MH, Ferreira P, Viegas C, Santos JM. Histologic Evaluation of Regenerative Endodontic Procedures with the Use of Chitosan Scaffolds in Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod*. 2017 Aug;43(8):1279-1287.
22. Galler KM1, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*. 2011 Jul;23(3):333-9.

23. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am.* 2012 Jul;56(3):549-61
24. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. (2013): Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod.* Mar; 39 (3 Suppl) :S30-43.
25. Nuti C, Corallo B, M. F. Chan M, Ferrari B, Gerami-Naini. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev and Rep* DOI 10.1007/s12015-016-9661-9, May 2016.
26. Alge, D. L., et al. (2010). Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 4(1), 73–81.
27. Martens, W., et al. (2013). Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clinical Oral Investigations*, 17(9), 1969–1983
28. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5;97(25):13625-30.
29. Shi, S., Robey, P. G., & Gronthos, S. (2001). Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*, 29(6), 532–539
30. Huang, G. T., Shagaramanova, K., & Chan, S. W. (2006). Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *Journal of Endodontics*, 32(11), 1066–1073.
31. Alongi, D. J., et al. (2010). Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regenerative Medicine*, 5(4), 617–631.
32. Davies, O. G., et al. (2015). A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 33(4), 371–382.
33. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J.* 2009 Nov;42(11):955-62.

34. Lv Taohong, Wu Yongzheng, Mu Chao, Liu Genxia, Yan Ming, Xu Xiangking, Wu Huaying, Du Yinjin, Yu Jinhua, Mu Jinquan. Insulin-like growth factor 1 promotes the proliferation and committed differentiation of human dental pulp stem cells through MAPK pathways. *Arch Oral Biol.* 2016 Dec;72:116-123.
35. Annie Zhujiang, DMD, and Sahng G. Kim, DDS, MS. Regenerative Endodontic Treatment of an Immature Necrotic Molar with Arrested Root Development by Using Recombinant Human Platelet-derived Growth Factor: A Case Report. *JOE.* Volume 42, Number 1, January 2016
36. Yadlapati M, Bigueti C, Cavalla F, Nieves F, Bessey C, Bohluli P, Garlet GP, Letra A, Fakhouri WD, Silva RM. Characterization of a Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Bioresorbable Delivery System for Pulp Regeneration. *J Endod.* 2017 Jan;43(1):77-83
37. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. (2008): In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod;* Apr;34(4):421-6. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.005.
38. Zhang W1, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent.* 2010;2010:856087
39. David M. Dohan Ehrenfest, Lars Rasmusson and Tomas Albrektsson. (2008): Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Elsevier, doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.009.
40. David M. Dohan, Choukroun J, Diss A. (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod;*101:e51-e55.
41. M. Kobayashi, Kawase T, Horimizu M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. (2012): A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals.* Sep;40(5):323-9.

42. Nosrat Ali, Negar Homayounfar, Kaveh Oloomi. Drawbacks and Unfavorable Outcomes of Regenerative Endodontic Treatments of Necrotic Immature Teeth: A Literature Review and Report of a Case. *Journal of Endodontics* , Volume 38, Issue 10 , 1428 – 1434. 2012.
43. Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A*. 2011 Aug;17(15-16):1911-20.
44. Ivo Lambrichts, Ronald B. Driesen, Yorg Dillen, Pascal Gervois, Jessica Ratajczak, Tim Vangansewinkel, Esther Wolfs, Annelies Bronckaers and Petra Hilkens. Dental Pulp Stem Cells: Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds. *JOE* —2017.
45. Nastaran Meschi, Petra Hilkens, Ivo Lambrichts, Kathleen Van den Eynde, Athina Mavridou, Olaf Strijbos, Marieke De Ketelaere, Gertrude Van Gorp, Paul Lambrechts. Regenerative endodontic procedure of an infected immature permanent human tooth: an immunohistological study *Clin Oral Invest* (2015) 20:807–814.
46. Xiaofei Zhu, Chengfei Zhang, George T.-J. Huang, Gary S.P. Cheung, Waruna Lakmal Dissanayaka and Wenhao Zhu. Transplantation of Dental Pulp Stem Cells and Platelet-rich Plasma for Pulp Regeneration. *JOE* — Volume 38, Number 12, December 2012.
47. Felipe Gómez Estol. Update on Histological Evidence of Tissue Formed by Guided Pulp Tissue Regeneration. *Int. J. Med. Surg. Sci*, 3(2):881-888, 2016.
48. Emi Shimizu, Domenico Ricucci, Jeffrey Albert, Adel S. Alobaid, Jennifer L. Gibbs, George T-J. Huang, Louis M. Lin. Clinical, Radiographic, and Histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. *JOE* — Volume 39, Number 8, August 2013.
49. Lishan Lei, Yuemin Chen, Ronghui Zhou, BDS, Xiaojing Huang and Zhiyu Cai, MDS. Histologic and Immunohistochemical Findings of a Human Immature Permanent Tooth with Apical Periodontitis after Regenerative Endodontic Treatment. *JOE* — Volume 41, Number 7, July 2015.

50. Emi Shimizu, George Jong, Nicola Partridge, Paul A. Rosenberg and Louis M. Lin. Histologic Observation of a Human Immature Permanent Tooth with Irreversible Pulpitis after Revascularization/Regeneration Procedure. JOE — Volume 38, Number 9, September 2012.
51. Chufang Peng, Yuming Zhao, Wenjun Wang, Yuan Yang, Man Qin and Lihong Ge. Histologic Findings of a Human Immature Revascularized/Regenerated Tooth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. JOE — Volume 43, Number 6, June 2017.
52. Ali Nosrat, Negar Homayounfar, Kaveh Oloomi. Drawbacks and Unfavorable Outcomes of Regenerative Endodontic Treatments of Necrotic Immature Teeth: A Literature Review and Report of a Case. JOE — Volume 38, Number 10, October 2012.
53. Mahmoud Torabinejad and Hadi Faras. A Clinical and Histological Report of a Tooth with an Open Apex Treated with Regenerative Endodontics Using Platelet-rich Plasma. JOE — Volume 38, Number 6, June 2012.
54. Gabriela Martin, Domenico Ricucci, Jennifer L. Gibbs and Louis M. Lin. Histological Findings of Revascularized/Revitalized Immature Permanent Molar with Apical Periodontitis Using Platelet-rich Plasma. JOE — Volume 39, Number 1, January 2013.
55. Louis M. Lin, Emi Shimizu, Jennifer L. Gibbs, Simona Loghin and Domenico Ricucci. Histologic and Histobacteriologic Observations of Failed Revascularization/Revitalization Therapy: A Case Report. JOE — Volume 40, Number 2, February 2014.
56. Patricia Becerra, Domenico Ricucci, Simona Loghin, Jennifer L. Gibbs, and Louis M. Lin. Histologic Study of a Human Immature Permanent Premolar with Chronic Apical Abscess after Revascularization/ Revitalization. JOE — Volume 40, Number 1, January 2014.
57. Ali Nosrat, Alireza Kolahehdouzan, Farzaneh Hosseini, Ehsan A. Mehrizi, Prashant Verma, and Mahmoud Torabinejad. Histologic Outcomes of Uninfected Human Immature Teeth Treated with Regenerative Endodontics: 2 Case Reports. JOE — Volume 41, Number 10, October 2015.

