



**Facultad de Odontología
Escuela de Graduados
Especialidad de Endodoncia**

REPORTE DE CASO: Regeneración pulpar Dens Invaginatus, según protocolo UV.

**Residentes: Dr. Andrés Devoto Olguín
Dra. Constanza Ross Guerrero**

Directora de programa: Dra. Alicia Caro Molina

Docente guía: Dra. Alicia Caro Molina

Agradecimientos

Agradecemos y dedicamos este proyecto de tesis a nuestra familia, por su comprensión, motivación y apoyo incondicional durante estos años, logrando todas y cada una de nuestras metas, siendo a su vez grandes impulsores de nuestros sueños y anhelos.

A nuestros docentes, Dra. Alicia Caro, Dra. Ema Fuenzalida y Dr. Marcelo Gandarillas por confiar en nosotros, además con su sabiduría, conocimiento, apoyo y motivación nos entregaron herramientas necesarias para ser un profesional íntegro. También agradecer sus consejos y enseñanzas, pero sobre todo la amistad brindada.

A nuestros compañeros, hoy convertidos en grandes amigos, por la ayuda incondicional y desinteresada en este largo camino, por compartir enriquecedores momentos, crecer juntos profesionalmente y emocionalmente.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO.....	2
DENS INVAGINATUS.....	3
- Etiología.....	3
- Clasificación.....	4
- Diagnóstico.....	7
- Prevalencia.....	8
REVASCULARIZACION Y ENDODONCIA REGENERATIVA.....	9
- Objetivos de la endodoncia regenerativa en diente permanente con ápice inmaduro.....	10
- Ventaja de la endodoncia regenerativa.....	10
- Ingeniería de tejidos.....	11
- Regeneración de tejido pulpar.....	12
o Células Madre.....	12
o Factores de crecimiento.....	17
o Andamios.....	20
- Obtención matrices de andamiaje en base a plaquetas.....	24
RESULTADOS ESPERADOS EN REPs.....	25
PROTOCOLO EN REPs.....	28
PROTOCOLO DE REGENERACIÓN DENTARIA PARA DIENTE INMADURO DRA. A CARO Y COLS, UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO, 2019.....	32
CASO CLINICO.....	34
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIÓN.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

INTRODUCCION

En endodoncia es muy importante el conocimiento de la anatomía del sistema de conductos radiculares, así como de sus posibles alteraciones anatómicas con la finalidad de llegar al éxito en el tratamiento. El dens in dente, también conocido como diente invaginado, es una alteración dentaria que se presenta como consecuencia de la invaginación del órgano del esmalte en la papila dental antes de que ocurra la mineralización. La incidencia del dens in dente va del 0.04 al 10%, siendo más recurrentes en incisivos superiores, con una predilección por el género masculino (1-2). La etiología de este tipo de malformación dentaria es idiopática; sin embargo, algunos autores la han asociado al aumento de presión externa localizada, retraso en el crecimiento fetal, traumatismos, proliferación rápida y agresiva del epitelio interno del órgano del esmalte, procesos infecciosos y factores genéticos (3-4) . El tratamiento de estos dientes varía según el diagnóstico clínico y radiográfico; si el hallazgo se hace de manera oportuna, el tratamiento podrá ser de carácter preventivo, endodóntico, y en circunstancias más complejas el tratamiento a elegir será quirúrgico o como última alternativa, la extracción de la pieza dentaria (79). Por lo general, en el caso de que estos dientes presenten alguna patología pulpar o periapical se recurre a un tratamiento endodóntico convencional o una inducción de cierre apical con MTA en piezas que no han completado su desarrollo apical (80). Actualmente surge una nueva terapia basada en la ingeniería de tejidos, cuyo objetivo es favorecer la formación de un nuevo tejido de cicatrización en la zona apical logrando incluso en muchos casos estimular el cierre apical y controlar las lesiones osteolíticas apicales. Es por esta razón que este tipo de terapias de revascularización se han estado utilizando en diferentes patologías pulpares o periapicales, en este trabajo se presenta como una nueva opción de tratamiento en anomalías dentarias específicamente en Dens in dente.

OBJETIVO

El objetivo principal de este artículo es describir la anomalía Dens invaginatus y además presentar caso clínico de un incisivo lateral superior con esta anomalía, aplicando el tratamiento de revascularización pulpar según protocolo U. de Valparaíso.

MARCO TEORICO

DENS INVAGINATUS (DI).-

Es una malformación de un único folículo dental, lo que da como resultado un diente anómalo dentro del complemento normal de los dientes. Este botón en un intento de separación del diente por completo, desarrolla surcos o depresiones que delinearán dos dientes (1).

Radiográficamente, parece haber solo una cámara de pulpa actuando en este diente como uno solo, a diferencia de la fusión donde generalmente existe agenesia de algún diente (2).

Etiología

De etiología desconocida, pero existen diversas teorías (10):

1. Invaginación de las células del órgano de esmalte dentro de la papila dental durante el desarrollo embriológico (Rushton, 1937).
2. Aplicación de fuerzas externas sobre el germen dentario en formación, trauma e infección (Atkinson, 1943).
3. Alteración en el sistema de señales ectomesenquimatosas que ocurre entre la papila dental y el epitelio interno del esmalte, lo que afecta la morfogénesis dental (Ohazama et al., 2004).
4. Factores genéticos, debido a la ausencia de ciertas moléculas que influyen en el desarrollo morfológico normal de la pieza (Dassule et al., 2000).

Los autores han analizado los factores genéticos que podrían ser responsables de Dens invaginatus. Durante el desarrollo de los dientes, se ha demostrado que las moléculas de crecimiento regulan el plegamiento y el desarrollo del órgano del esmalte (11). Si estos factores de crecimiento genéticamente determinados están ausentes o alterados, la morfología de los dientes en desarrollo puede verse alterada (12).

Clasificación

Hülsmann nombra lo que es aparentemente la primera clasificación de dens invaginatus que fue publicada por Hallet en 1953 (57). Posteriormente Oehlers, en 1958, menciona que existen dos variedades principales del desarrollo anormal del dens invaginatus, ellas son la coronaria y la radicular (58).

La diferencia que existe entre las dos variaciones está en el sitio donde se origina la invaginación la cual constituye la parte esencial de la anomalía. En la variación coronaria, la invaginación resulta de un doblez del órgano del esmalte. Esta se comunica con la cavidad oral a través de una fosa o ranura en la corona que usualmente se manifiesta muy poco. Por otra parte en la variación radicular, el proceso de invaginación resulta de un doblez de la vaina epitelial de Hertwig el cual comienza dentro de la raíz después que se ha completado el desarrollo coronario (58).

Oehlers, 1957, desarrolló un sistema que clasifica las variaciones de las invaginaciones coronarias que ocurren en esta anomalía, la cual es la más utilizada en la actualidad. Estas clasificaciones son basadas en la extensión de la estructura del tejido dentario involucrado (5).

Los tipos son los siguientes:

- Clase I: esta es una invaginación parcial que se limita a la corona del diente. Estas lesiones involucran dentina y esmalte, pero no se extienden más allá de la unión cemento-esmalte (CEJ) y no involucran tejido pulpar.
- Clase II: esta invaginación parcial se extiende más allá de la corona del diente y hacia la raíz, más allá del CEJ. Estas lesiones pueden o no afectar tejido pulpar, pero permanecen dentro de la anatomía de la raíz. No hay comunicación con el ligamento periodontal.
- Clase IIIa: esta invaginación completa se extiende a través de la raíz. Se comunica con el ligamento periodontal a través de un segundo agujero en la cara lateral del diente. Por lo general, no hay afectación de la pulpa en sí, pero causa una malformación anatómica significativa.
- Clase IIIb: esta invaginación completa se extiende a través de la raíz y se comunica con el ligamento periodontal en el agujero apical. Nuevamente, a menudo no hay una afectación directa de la anatomía pulpar, pero la lesión causa una interrupción significativa en la anatomía (5).

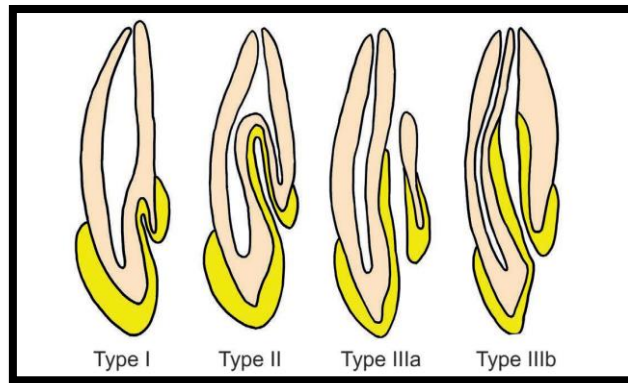


Fig 1. Clasificación según Oehler's et al.

Posteriormente en el año 1958, Oehlers presentó invaginaciones radiculares; la variedad radicular del dens invaginatus es discutida y, de los casos reportados en la literatura, se han identificado dos tipos:

a- El primer tipo es representado como un pliegue interno axial de una pared de la raíz e indica un intento incompleto en la bifurcación radicular. Este tipo no muestra las características clínicas y morfológicas comunes de otras formas de dens invaginatus esta condición ocurre comúnmente en el segundo molar inferior.

b- El segundo tipo es considerado como una verdadera forma de "dens invaginatus". Es extremadamente raro y se presenta como una invaginación cubierta de esmalte dentro de la raíz, originándose una abertura en la misma raíz. Esta formación es comparada con el de una perla de esmalte (58).

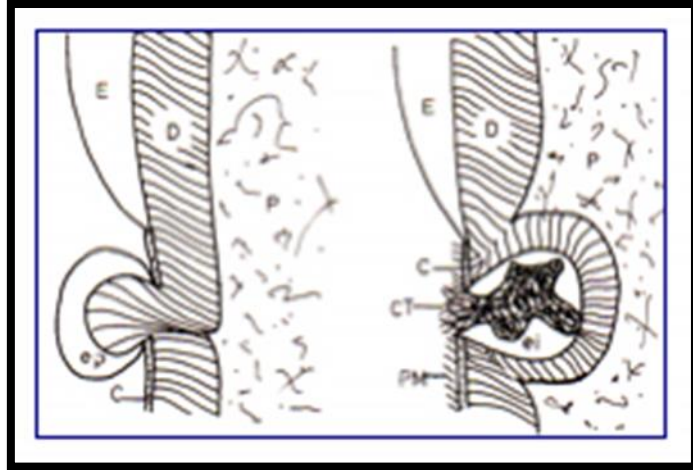


Fig. 2 Izquierda: Perla de esmalte. Derecha: Dens invaginatus radicular tipo 2. E. Esmalte; D. Dentina; C. Cemento; CT. Tej. Conjuntivo; ei. Esmalte de la invaginación; ep. Esmalte de la perla de esmalte; MP. Membrana periodontal. Tomado de Oehlers F, 1958

Además Oehlers agregó que un diente puede poseer más de un tipo de invaginación (5) .

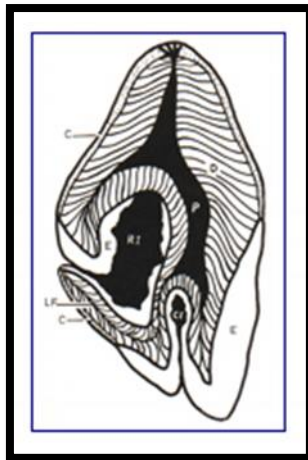


Fig. 3. Dens invaginatus compuesto. E. Esmalte; D. Dentina; C. Cemento; P. Pulpa; CI. Invaginación coronaria; RI. Invaginación radicular; LF. Línea de fusión de dentina. Tomado de Oehlers F, 1958

Schulze y Brand (1972) propusieron una clasificación más detallada, incluyendo invaginaciones que comienzan desde el borde incisal e incluyen configuraciones radiculares dismórficas (59).

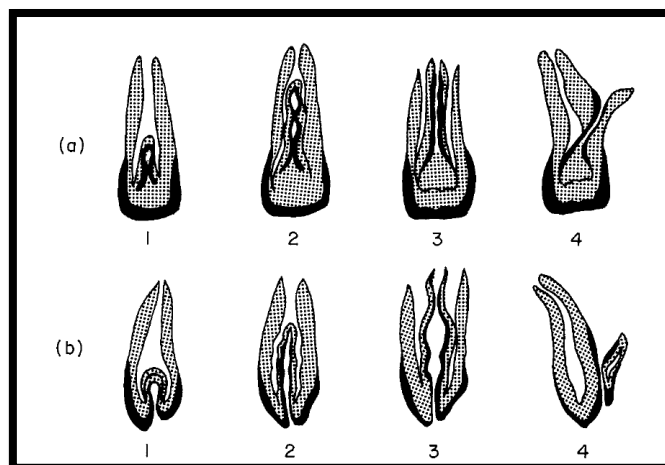


Fig 4 Clasificación de dens invaginatus por Schulze & Brand (1972)

Diagnostico

A menudo son asintomáticos y las coronas de los dientes afectados pueden mostrar muy poca deformidad externa. Las malformaciones extensas tienen más probabilidades de dar como resultado una anatomía anormal de la corona. En la mayoría de los casos el dens in dente se diagnostica por hallazgo radiográfico en controles de rutina. Sin embargo, la radiografía convencional no provee toda la información estructural detallada de esta malformación. (13)

Actualmente el uso de cone beam (CBCT) supera las limitaciones inherentes de la radiografía convencional, permite observar la pieza dentaria en múltiples planos, proporcionando una imagen detallada de la anatomía radicular, es una herramienta útil para el diagnóstico y tratamiento de estas piezas, ya que entrega información aproximada de las variaciones anatómicas del o los conductos (60).

Durante la anamnesis se puede describir un diente más ancho en sentido mesio/distal y vestibulo/palatino, un tubérculo palatino pronunciado, un borde incisal puntiagudo e incluso una forma cónica, en resumen, una morfología de la corona inusual ("dilatada", "en forma de clavija", "en forma de barril") o un foramen coecum, los dientes afectados también pueden no mostrar signos clínicos de la malformación (59), por lo tanto si no hay un diagnóstico oportuno es muy factible el desarrollo de caries y patología periapical. Si al examen se evidencia un tubérculo palatino pronunciado y una grieta incisal se debe realizar un examen radiográfico para descartar, también se debe considerar en casos de pulpitis o periodontitis apical sin causa aparente (34).

Clínicamente puede presentar una invaginación que permite la entrada de irritantes en un área que está separada del tejido pulpar o se encuentra solo una capa delgada de esmalte-dentina y presenta una predisposición para el desarrollo de caries dental. En algunos casos, el revestimiento del esmalte está incompleto. También pueden existir canales entre la invaginación y la pulpa. Por lo tanto, la necrosis pulpar a menudo ocurre bastante temprano, dentro de unos pocos años de la erupción, a veces incluso antes del cierre apical. Otras secuelas informadas de invaginaciones coronales, no diagnosticadas y no tratadas, son la formación de abscesos, quistes, y reabsorción interna (59).

Los defectos en la radiografía aparecen como bolsas bajo el cíngulo, rodeadas por esmalte, pueden estar confinados a la corona o afectar a la pulpa. Las lesiones más extensas pueden aparecer como fisuras, con o sin bordes radiopacos. Estas fisuras pueden afectar a la pulpa y la anatomía del conducto radicular. Las comunicaciones entre las invaginaciones y el ligamento periodontal pueden ser evidentes en las caras laterales del diente o su ápice. Si tales comunicaciones están presentes y un paciente desarrolla una patología pulpar, se puede observar una radiolucidez periapical similar a la de una mariposa, que corresponde a dos fuentes de inflamación (59). Estas características se pueden recoger como hallazgos radiográficos en las radiografías periapicales, y estas suelen ser la técnica de elección para identificar las lesiones DI, sin embargo, se necesitarían dos imágenes en diferentes angulaciones horizontales para asegurar que la lesión no esté enmascarada en una sola vista (60). Debido a que puede afectar a la dentición en todo su desarrollo, radiográficamente se observan lesiones apicales asociados a dientes permanente joven, con ápice abierto (forma de trabuco) (34).

Prevalencia

Se ha informado que la incidencia de dens invaginatus está en el rango de 0.04%–10% (14,15). Esta anomalía es más frecuente en piezas maxilares permanentes, especialmente en incisivos laterales. Con menos frecuencia se presenta en incisivos centrales, premolares, caninos y molares (16).

Generalmente es unilateral, pudiendo afectar a la pieza contralateral. Es más frecuente en hombres que en mujeres, en una relación de 3:1, no habiendo relación con la raza (17).

REVASCULARIZACIÓN Y ENDODONCIA REGENERATIVA

El concepto de revascularización no es nuevo. Por más de 50 años, los clínicos han evaluado métodos basados en la biología para restaurar el tejido dentino-pulpar dañado de dientes que presentan diagnóstico de necrosis provocado por traumatismo dentoalveolar o caries.

El término "revascularización" ha sido utilizado justificando la posibilidad de una neoformación de vasos sanguíneos y tejido nervioso a nivel periapical y dentro del sistema de conductos radiculares, favoreciendo la respuesta de las células pulpares vitales remanentes en la porción apical del conducto radicular, capaces de migrar en el interior de éste, restableciendo un tejido pulpar funcional y llevando a la progresión de la formación radicular. Se define como un proceso basado en la biología, destinado a reemplazar estructuras dañadas, incluyendo dentina y raíz dental, así como también células del complejo dentino-pulpar (18).

Para precisar aún más estos procedimientos y llegar a un consenso general, se ha decidido nombrarlas a todas éstas como terapias de regeneración, indistintamente de la técnica utilizada, ya que todas apuntan a lograr lo anteriormente detallado.

Estas terapias de regeneración son procedimientos endodónticos aprobados por la AAE (Asociación Americana de Endodoncia), publicado y aceptado dentro de la práctica de la endodoncia a nivel mundial para dientes inmaduros (19), quedando obsoletas las antiguas terapias de apexificación y apexogénesis con MTA o hidróxido de calcio (20).

Tomando en cuenta lo anterior, en la actualidad la endodoncia regenerativa podría ser aplicada a dientes permanentes maduros, restableciendo cemento, ligamento periodontal, dentina, e incluso, nuevo tejido pulpar, mejorando el pronóstico y permanencia del diente afectado antes de realizar una intervención endodóntica convencional que pudiese reducir las posibilidades de mantención del diente a largo plazo.

Si bien el objetivo final de la revascularización es restablecer la vitalidad en dientes no vitales, la preocupación principal es reparar y regenerar los tejidos para mejorar el pronóstico, mediante la obtención de una matriz estéril en la cual

las nuevas células puedan crecer, restableciendo la vitalidad pulpar y logrando un crecimiento espacial completo y controlado del complejo dentino-pulpar con un tamaño, morfología y funcionalidad apropiada. (21)

Los objetivos de la endodoncia regenerativa en diente permanente con ápice inmaduro son:

Las consideraciones clínicas de la Asociación Americana de Endodoncia para los procedimientos de endodoncia regenerativa definen el éxito mediante tres medidas:

- Objetivo principal (esencial): la eliminación de los síntomas y la evidencia de curación ósea.
- Objetivo secundario (deseable): aumento del grosor de la pared de la raíz y / o aumento de la longitud de la raíz.
- Objetivo terciario: respuesta positiva a las pruebas de vitalidad.

El objetivo principal de la resolución del signo / síntoma de la infección y la curación ósea son generalmente alcanzables y los casos fallidos se han atribuido a los protocolos de desinfección mínima (29).

Ventajas de la endodoncia regenerativa (20):

- La obtención de un tejido que se convierte en parte integral del diente, restableciendo la función y estructura de éste, actuando como un sello natural y retardando así el uso de sellantes artificiales.
- Es un tratamiento más corto y menos invasivo.
- Al ser autólogo no existe rechazo por parte del sistema inmune.
- Permite la correcta formación del cierre apical
- Se utilizan injertos del mismo paciente, no hay cuerpos extraños, no hay rechazo, no hay respuesta inflamatoria crónica como la que produce la endodoncia convencional.

- No hay riesgo de transmisión de enfermedades
- Sellado biológico entre tejido nuevo y remanente
- Terapia de bajo costo. Poco más que una convencional

Ingeniería de tejidos

Es un área multidisciplinaria que aplica los principios de la ingeniería y ciencias de la salud para el desarrollo de estructuras biológicas, con el fin de generar tejidos que permitan restaurar, mantener o mejorar la función de un tejido u órgano primitivo (61). Para lograr este fin, la ingeniería tisular debe combinar armoniosamente materiales y componentes celulares con el objetivo de utilizarlos en tratamientos específicos que garanticen el éxito terapéutico (62).

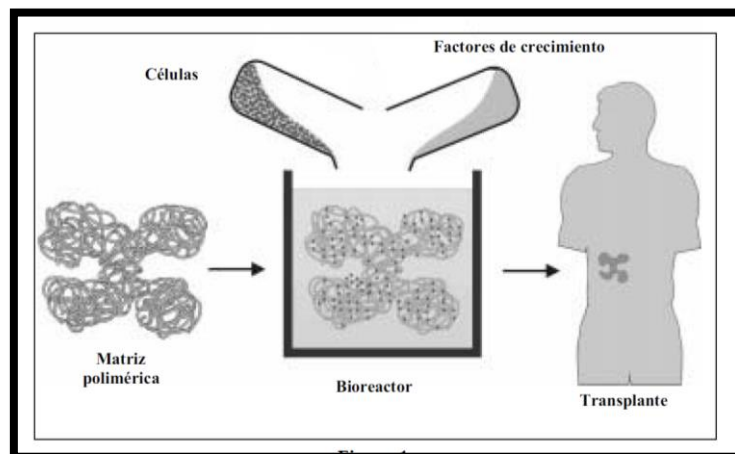


Fig 5. Esquema de ingeniería tisular

La endodoncia regenerativa busca dos objetivos principales: seleccionar el tratamiento más conservador para cada caso y avanzar en las tecnologías de ingeniería tisular para la regeneración de tejidos como dentina, pulpa, cemento y ligamento periodontal, que de momento se encuentra en estudios in vitro o en animales. (70)

Regeneración de tejido pulpar

Como ya se ha descrito el concepto clásico de ingeniería de tejidos, la regeneración de la pulpa se basa en la participación de tres factores esenciales:

1. Células madre
2. Factores de crecimiento: Moléculas bioactivas
3. Andamios

Células Madre

Las células madre se pueden obtener del mismo receptor (autólogo) o de un donante (origen alogénico). La óptima compatibilidad se obtiene con injertos autólogos, pero requiere células disponibles en cantidad suficiente. Por lo tanto, se han considerado células de fuentes alogénicas alternativas, in vitro e in vivo. De hecho, el papel crucial de las células madre / progenitoras se ha estudiado extensamente in vivo para el desarrollo de la ingeniería tisular de la pulpa, pero su papel sigue siendo cuestionable, ya que las células progenitoras locales pueden ser reclutadas directamente durante la curación / revascularización de la pulpa (63). En general, se describen cuatro fuentes principales de células madre para la terapia celular en medicina regenerativa:

- I. Células madre mesenquimales adultas (MSC)
- II. Células madre embrionarias (ESC)
- III. Células madre neonatales del cordón umbilical
- IV. Células madre pluripotentes inducidas (iPS)

Las células mesenquimales adultas (MSC) han sido, la fuente más explorada para la regeneración del complejo de pulpa dentina.

Células madre mesenquimales adultas

La presencia de células progenitoras en la pulpa dental se ha descrito hace muchos años. En caso de lesión, pueden proliferar y proporcionar células pulpares diferenciadas, especialmente odontoblastos, las células especializadas que producen dentina. Las células madre dentales se describen como una población de células madre mesenquimales (MSC), ya que siguen la definición (amplia) dada por la sociedad internacional para las células madre mesenquimales. Se han usado muchos marcadores de superficie celular, correspondientes a marcadores MSC, para describir y definir células madre dentales (63).

Teniendo en cuenta que existen células madres dentales que participan en la formación de dientes, se han descrito cinco tipos de células (64):

- a) Células madre de pulpa dental (DPSC)
- b) Células madre de dientes deciduos exfoliados humanos (SHED)
- c) Células madre de la parte apical del diente. Papila (SCAP)
- d) Células madre del ligamento periodontal (PDLSC)
- e) Células madre del folículo dental (DFSC)

Las células madre de la pulpa dental (DPSC) fueron las primeras en aislarse de los dientes humanos y siguen siendo la fuente más común de células madre dentales. También se han aislado células madre de dientes deciduos exfoliados humanos (SHED). SHED tiene una mayor tasa de proliferación. Las células madre de la parte apical de la papila dental (SCAP) derivan de la raíz del ápice de los dientes en desarrollo. Son altamente proliferativas y exhiben un mayor potencial migratorio y regenerativo. Las células madre del ligamento periodontal (PDLSC) se aíslan de la región periodontal y contribuyen a la regeneración del periodonto dando lugar a los tejidos del cemento y del ligamento periodontal. Las células madre del folículo dental (DFSC) se recuperan del saco que contiene el diente en desarrollo y su órgano odontogénico,

normalmente dan lugar al ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento (65).

Se ha demostrado que las células madre dentales pueden formar zonas del complejo pulpa / dentina in vitro. Por lo tanto, las células madre derivadas de los dientes representan las fuentes de células más adecuadas para la regeneración de la pulpa dental y la dentina, especialmente DPSC, SHED y SCAP, porque se derivan del tejido pulpar o del tejido pulpar precursor. Se ha demostrado que DPSC, SHED y SCAP forman un complejo de pulpa-dentina cuando se trasplantan in vivo en modelos animales. Otras fuentes de MSC también se han estudiado por su capacidad para regenerar pulpa dental. Entre estos, MSC de médula ósea (Células madre mesenquimales de médula ósea - BMSC) y MSC de tejido adiposo (Células madre derivadas de tejido adiposo - ASC) se han presentado como posibles fuentes celulares alternativas para la regeneración de la pulpa. Sin embargo, sigue siendo cuestionable si el MSC que no son "dentales", como el BMSC, puede diferenciarse en odontoblastos y regenerar el complejo dentina-pulpa. El MSC no dentales pueden ser una fuente de células de dentina / pulpa cuando se guía por un entorno apropiado, pero su uso para regenerar el complejo de pulpa / dentina parece ser menos obvio que el uso de DPSC, SCAP o SHED (66).

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (ESC) son células madre pluripotentes obtenidas antes de las primeras 2 semanas de desarrollo, en embriones preimplantados. ESC de Rata son ampliamente utilizados en la investigación, pero, para aplicaciones clínicas, tienen que ser de origen humano, lo que conduce a problemas éticos. La ESC humana se obtiene a partir de embriones por fertilización in vitro y puede proliferar manteniendo un estado indiferenciado. Sus amplias capacidades de diferenciación han generado interesantes

perspectivas para aplicaciones biomédicas y para la medicina regenerativa. Pero, sus grandes capacidades para la terapia celular y la ingeniería de tejidos crean un delicado debate ético, ya que inducen la destrucción de embriones humanos. La formación de tumores iatrogénicos es una limitación del uso de células madre pluripotentes embrionarias: ya que la persistencia de células madre embrionarias en poblaciones de células diferenciadas representa un riesgo de formación de teratoma. Hasta ahora, estas células se han utilizado para aplicaciones dentales solo en una etapa temprana de resultados experimentales y se utilizan principalmente como modelo de células madre pluripotentes (67).

Células madre neonatales del cordón umbilical

Los tejidos neonatales formados por el cordón umbilical se pueden recuperar justo después del nacimiento con técnicas no invasivas. Las células madre neonatales se pueden recolectar de la sangre del cordón umbilical y de la matriz mesenquimática que rodea los vasos sanguíneos (jalea de Wharton). La sangre del cordón permite la recuperación de células madre hematopoyéticas, mientras que la gelatina de Wharton contiene una cantidad importante de MSC. Como el cordón umbilical podría considerarse un desperdicio médico, representa una fuente prometedora y no invasiva de MSC. Además, varios estudios ya han informado de que el MSC desde umbilical son más primitivos, proliferativa, e inmunosupresora de MSC adulto. Estas células madre específicas se han considerado in vitro por su capacidad para diferenciarse en células similares a odontoblastos. Sin embargo, no han sido, consideradas hasta ahora por la difícil aplicación in vivo, lo correcto para un buen uso sería tener disponibilidad en biobancos alogénicos, en un futuro cercano (68) .

Células madre pluripotentes inducidas

Las células madre pluripotentes inducidas, son un tipo de célula madre capaz de generar la mayoría de los tejidos, estas derivan artificialmente de una célula que inicialmente no era pluripotencial (célula diferenciada), estas **células** no se regeneran a partir de ellas mismas sino a partir de **células** madre **indiferenciadas** utilizando la introducción retroviral de los genes del factor de transcripción Oct3 / 4, Sox2, c-Myc y Klf4. Estas células madre pluripotentes inducidas (iPS) son similares a las células madre embrionarias en cuanto a capacidades de proliferación y diferenciación. Proliferan ampliamente y se diferencian virtualmente en cualquier tipo de célula deseada, proporcionando una fuente ilimitada de células de reemplazo para la terapia humana. Algunos experimentos han intentado usar iPS para diferenciarse en células similares a odontoblastos y formar estructuras similares a gérmenes dentales, cuando se cultivan en condiciones apropiadas. Se ha demostrado que iPS podría diferenciarse en odontoblasto mediante la interacción recíproca con el epitelio dental, o mediante BMP-4 y las vías de ácido retinoico. Hasta la fecha, los iPS se han considerado solo en la etapa temprana de la experimentación, principalmente hacia el concepto de regeneración de dientes completos, que está lejos de cualquier aplicación clínica. Como células madre pluripotentes, su uso clínico requiere una etapa obligatoria de pre-diferenciación y un control estricto antes del injerto humano para prevenir el riesgo de formación de teratoma después del trasplante de células no diferenciadas. Es interesante observar que varias fuentes celulares se han considerado para la regeneración endodóntica, siguiendo la base de la ingeniería de tejidos (Células - Andamios - Moléculas bioactivas), pero hasta ahora se han intentado muy pocas aplicaciones clínicas (69).

Factores de crecimiento

Corresponden a proteínas que se unen a los receptores celulares con el fin de inducir y/o diferenciar. Por lo general, tienen una expresión temporal y espacial específica durante la regeneración y reparación del tejido. Varios factores de crecimiento pueden tener una célula diana y un factor de crecimiento puede tener varias células diana (72). Los factores de crecimiento determinan el destino de las células madre / progenitoras y, a menudo, se inmovilizan en andamios para ayudar a promover la regeneración de tejidos en la ingeniería de tejidos (71).

Para lograr la regeneración funcional de la pulpa, que incluye tejido pulpar vascularizado e innervado con una capa de odontoblastos que produce dentina, el papel de las moléculas bioactivas es esencial. Una variedad de factores de crecimiento demostraron su importancia en la ingeniería de tejidos dentales, como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) en la diferenciación y mineralización de odontoblastos; factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en eventos de localización celular, angiogénesis, neurales y antiapoptóticos; factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en la inducción de la formación de vasos sanguíneos; y factor de crecimiento nervioso (NGF) en alargamiento y supervivencia nerviosa. Con frecuencia, el uso de factores de crecimiento recombinantes incluidos en diversos biomateriales se aplica en la revitalización y reparación del tejido pulpar (73).

Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP)

Los factores de crecimiento de BMP parecen estar implicados en el desarrollo dental, principalmente en la señalización entre el epitelio y el mesénquima, pero también en la retención del nudo de esmalte y en la definición del patrón de corona dental. Varios estudios sostienen que BMP-2, BMP-4 y BMP-7 también contribuyen a la proliferación y diferenciación de varias células hacia osteo u odontoblastos. Además, en las pulpas amputadas, induce la

formación de dentina reparadora en diversas afecciones, pero su aplicación en la terapia de regeneración de pulpa de dientes necróticos no está bien desarrollada (22).

Factor de crecimiento transformante-Beta (TGF- β)

Al ser una gran familia de proteínas de señalización, están involucradas en muchos eventos celulares que incluyen respuesta inmune, quimiotaxis, diferenciación de odontoblastos, proliferación y diferenciación de DPSC, así como producción y secreción de matriz de dentina. TGF- β 1 al enviar señales al complejo de pulpa dentina, regula las vías celulares que conducen a la regeneración (22).

Factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF, FGF-2)

El factor de crecimiento de fibroblastos puede influir en el destino de varias células mesodérmicas y neural-ectodérmicas. FGF-2 ayuda a la proliferación, migración y mejora el potencial de diferenciación odontoblástica de DPSC por sí mismo o junto con TGF- β 1. El FGF-2, incorporado en diversos andamios, puede desempeñar un papel en la reparación / regeneración del complejo de pulpa dentina, mediante la formación de puentes de dentina y la síntesis de tejidos tipo pulpar (22).

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

La importancia de la formación de vasos sanguíneos durante la regeneración de tejidos para soportar el oxígeno, la nutrición, la biomolécula y el transporte celular es bien conocida. El VEGF es una proteína de señal producida por las células de la pulpa y liberada en la matriz de la dentina que promueve la angiogénesis y la vasculogénesis. Se ha demostrado que VEGF media la diferenciación de SHED en endotelio angiogénico tanto in vitro como in vivo.

Factor de crecimiento derivado de células estromales (SDF-1)

SDF-1, como miembro de la familia de moléculas bioactivas CXC, participa principalmente en la quimiotaxis y la diferenciación de varias células madre mesenquimales y hematopoyéticas. Además, se ha implicado en procesos inmunes, angiogénesis y neurogénesis. La aplicación potencial de SDF-1 en la ingeniería del tejido pulpar es debida a su papel en la migración, diferenciación y regeneración del tejido pulpar con DPSC con vascularización, innervación y deposición de la matriz de dentina en varios modelos in vivo (22).

Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)

G-CSF tiene la capacidad de movilizar no sólo células madre hematopoyéticas, sino que también es capaz de reclutar células madre de pulpa dental humana con alta tasa de proliferar y controlar su liberación continua. Sin embargo, es evidente que tanto la matriz de dentina como las células de la pulpa dental producen una gran cantidad de moléculas bioactivas involucradas en los procesos de reparación. Las DPSC movilizadas expresan propiedades angiogénicas y una rápida regeneración de la pulpa en función de la edad. Al comparar los efectos de GCS-F con bFGF tanto en condiciones in vitro (proliferación, migración, diferenciación, características apoptóticas y características vasculogénicas / neurogénicas) e in vivo (regeneración de la pulpa, deposición de tejido mineralizado), no se observó diferencias significativas.

Los factores de crecimiento pueden activar las células madre autólogas en la pulpa lesionada al inducir la orientación de las células y también están involucrados en los procesos celulares de las células madre alogénicas inyectadas con un andamio adecuado al espacio vacío del canal de la raíz. (22)

Andamios

Corresponde al componente de la triada que actúa como una guía para el crecimiento celular, diferenciación y organización en un sitio específico otorgando estabilidad química y resistencia mecánica al tejido, además de permitir la adherencia de las células imitando las condiciones in vivo. Para lograr lo anterior, debe ser poroso, siendo a la vez biocompatible con el tejido receptor. Debe ser biodegradable y debe hacerlo en forma gradual para que sea reemplazado paulatinamente por el tejido regenerado. Debe ser efectivo para el transporte de nutrientes y desechos (74).

Se supone que los andamios cumplen varias propiedades (23):

- ✓ Soporte de la correcta localización de las células.
- ✓ Promoción de interacciones célula-biomaterial (adhesión celular y deposición de MEC).
- ✓ Tener un tamaño, forma y volumen de poros adecuados que ayuden al transporte de oxígeno, nutrientes, factores bioactivos y productos de desecho, contribuyendo a la supervivencia, proliferación y diferenciación celular.
- ✓ Tener una tasa de biodegradabilidad consistente con la formación de tejido reparado.
- ✓ Tener una adecuada resistencia física y mecánica.
- ✓ Ser antiinflamatorio y no tóxico para el tejido circundante.

Tipos de Andamio

En la literatura científica se puede encontrar una amplia gama de biomateriales propuestos como un andamio para la regeneración y reparación de la pulpa. El andamio ideal debe poseer las características complejas de la matriz extracelular de la pulpa dental que participa en los diferentes procesos celulares.

Pueden clasificarse según diversos criterios, como su origen, composición química, presencia celular, composición física y modo de aplicación (75).

- Origen: se pueden distinguir los naturales (fibrina, colágeno, quitosano, glicosaminoglicano, matriz de dentina, etc.) y las matrices artificiales (ácido poliglicólico (PGA), poli-L-ácido láctico (PLLA), ácido polilactido-glicólico (PLGA), etc.).
- Presencia celular: incorporación de factores de crecimiento, agentes antibacterianos y terapéuticos; Pueden contener células madre o pueden estar libres de células.
- Composición: Debido a la avanzada tecnología, los andamios con fines terapéuticos pueden fabricarse como micropartículas, hidrogeles, macroporos y materiales nanofibrosos (autoensamblaje, separación de fases, electrospinning).
- Método de aplicación, el andamio podría ser inyectable o no inyectable.

Hasta ahora existe una gran variedad de biomateriales desarrollados y aplicados en la regeneración de la pulpa, pero los más comúnmente utilizados son los polímeros, principalmente porque es fácil de personalizar su forma, área de superficie, porosidad, resistencia mecánica y estructura química de la manera más apropiada y adecuada. Las ventajas de los andamios de polímeros naturales son la capacidad de imitar las características de la matriz extracelular (MEC); Son biodegradables y biocompatibles, apoyando la supervivencia y la función celular. En contraste, la dificultad de aislamiento, la inducción de la respuesta inmune debido a su origen variable y las propiedades mecánicas y geométricas limitadas impiden su uso en aplicaciones clínicas. Según esto, el interés por los andamios artificiales aumentó. Se pueden construir bajo condiciones determinadas con forma específica, tamaño de poro y propiedades mecánicas, físicas y químicas requeridas con tasa de degradación controlada. Sin embargo, no son bioactivos debido a la falta de ligandos adecuados y sitios de adhesión celular (76).

Para la revitalización y reparación de la pulpa, sería preferible un andamio blando e inyectable, que puede imitar mejor la estructura única de la MEC de la pulpa y sea más fácil de aplicar en el espacio radicular, es menos invasivo apoyando la vascularidad y mostrando contracción mínima. La tendencia en odontología regenerativa es el desarrollo de andamios líquidos autopolimerizables, que se vuelven rígidos justo en el destino final. Los resultados actuales de los experimentos in vitro e in vivo con respecto a la regeneración de la pulpa sugieren que el uso de un biomaterial (polímero / biocerámica / proteínas de la matriz de dentina), no es suficiente para cumplir todos los requisitos necesarios. Por lo tanto, la combinación de varios materiales de andamio conducirá a la optimización de sus propiedades. (23)

Plasma rico en plaquetas (PRP) Y Fibrina rica en plaquetas (PRF)

Se han utilizado como un andamio en lugar de un coágulo de sangre porque PRP y PRF son ricos en factores de crecimiento, lo que podría ayudar a mejorar la regeneración del complejo pulpa-dentina. Sin embargo, una revisión sistemática de estudios clínicos de concentraciones de plaquetas en la revitalización de dientes necróticos inmaduros demostró que PRP o PRF no fue significativamente superior a un coágulo de sangre para promover el engrosamiento de las paredes del canal / desarrollo continuo de la raíz en REPs. Incluso una combinación de fibrina rica en plaquetas y coágulo de sangre en comparación con el coágulo de sangre solo no mejoró los resultados de REPs. A su vez, ningún estudio basado en la evidencia ha demostrado que el PRP o el PRF puedan mejorar la regeneración del complejo dentina-pulpa. (24)

Los materiales naturales y sintéticos se han utilizado como andamios en REPs. Además de una estructura tridimensional, el andamio tiene que imitar una matriz extracelular en propiedades biológicas y físicas. El andamio debe tener biodegradabilidad, alta porosidad y un tamaño de poro adecuado. Se han

incorporado factores de crecimiento en el andamio para facilitar la regeneración del tejido de la pulpa. (24)

Algunas características específicas se pueden integrar en las estructuras, lo que mejora su biodegradabilidad, adherencia celular, rigidez mecánica, influencia en la mineralización y actividad antibacteriana / terapéutica. Encapsulando DPSC humana en bFGF, TGF- β 1 y VEGF que contenían hidrogel peptídico de autoensamblaje, se observó la proliferación y diferenciación de células in vitro y también una formación de tejido tipo pulpa vascularizada in vivo. Este novedoso enfoque de imitación de MEC parece ser aplicable en el futuro de la endodoncia clínica. De acuerdo con el hecho de que la MEC natural sería el mejor andamio para la regeneración, se desarrolló un nuevo método de cultivo celular, en el que las propias células forman una estructura 3D, que sirve como un andamio. (23)

Song et al. (2017) sugiere otro andamio innovador para la terapia endodóntica. La preparación de pulpa dental humana descelularizada mediante la aplicación de Tris-HCl y etilendiamina tetraacética acida (EDTA) en rebanadas de dientes. Después de este proceso, la MEC pulpar conserva su complejidad y bioactividad ayudando a la proliferación de SCAP y la diferenciación odontogénica. Mientras los terceros molares extraídos puedan servir fácilmente como fuente de pulpa, la matriz derivada podría resolver los problemas éticos en un tratamiento clínico regenerativo adicional (25).

En el futuro, la alternativa a la terapia clínica del tratamiento de conducto convencional (utilizando un material inerte) es introducir una nanofibra inyectable de antibiótico y liberadora de fármacos combinada con moléculas bioactivas, que pueden mejorar la estimulación celular, supervivencia de células madre, proliferación y diferenciación y adición de células madre / progenitoras si es necesario, reconstituyendo no solo la geometría de la pulpa, sino que también contribuyen a la regeneración funcional completa (25).

Obtención matrices de andamiaje en base a plaquetas

- Plasma rico en plaquetas (Primera generación de plaquetas).

Introducido por Whitman y cols, 1997, el plasma rico en plaquetas (PRP) es un componente sanguíneo con alto contenido de plaquetas en un volumen limitado de plasma. El conteo normal de plaquetas sanguíneas está en un rango entre 150000/ul a 350000/ul, el uso de PRP en zonas quirúrgicas las aumenta hasta 1000000/ul. (76) se obtiene mediante venopunción del paciente que será intervenido y almacenamiento de la sangre en un tubo con anticoagulante para evitar activación plaquetaria. Se efectúan dos centrifugaciones para su obtención, una inicial de baja velocidad que separa tres fases de la sangre a partir de la cual se aspira la parte rica en plaquetas y se transfiere a un tubo sin anticoagulante que posteriormente es sometido a un centrifugado de mayor velocidad, juntando en el fondo las plaquetas, facilitando su extracción y separación para su uso. Posteriormente se aplica cloruro de calcio y trombina bovina permitiendo su gelificación (26).

- Fibrina rica en plaquetas (Segunda generación de plaquetas).

La fibrina rica en plaquetas fue desarrollada inicialmente en Francia por Choukroun y cols. en el año 2001. Este concentrado plaquetario de segunda generación elimina el riesgo asociado al uso de trombina bovina. Se obtiene mediante venopunción, se almacena en un tubo sin anticoagulante (aproximadamente 10 ml) que se lleva inmediatamente a centrifugación en una relación de 3000 rpm (aproximadamente 400 g) por 10 minutos. La ausencia de anticoagulante implica la activación de las plaquetas en algunos minutos tras su contacto con las paredes del tubo de vidrio, activando la cascada de la coagulación. El fibrinógeno inicialmente se ubica en la parte más alta del tubo, antes de que la trombina circulante se transforma en fibrina. Luego se obtiene un coágulo de fibrina en el medio del tubo, entre los tejidos rojos y el plasma

pobre en plaquetas en la superficie. El manejo rápido y preciso permite obtener un coágulo adecuado con una cantidad de activación plaquetaria adecuada (26).

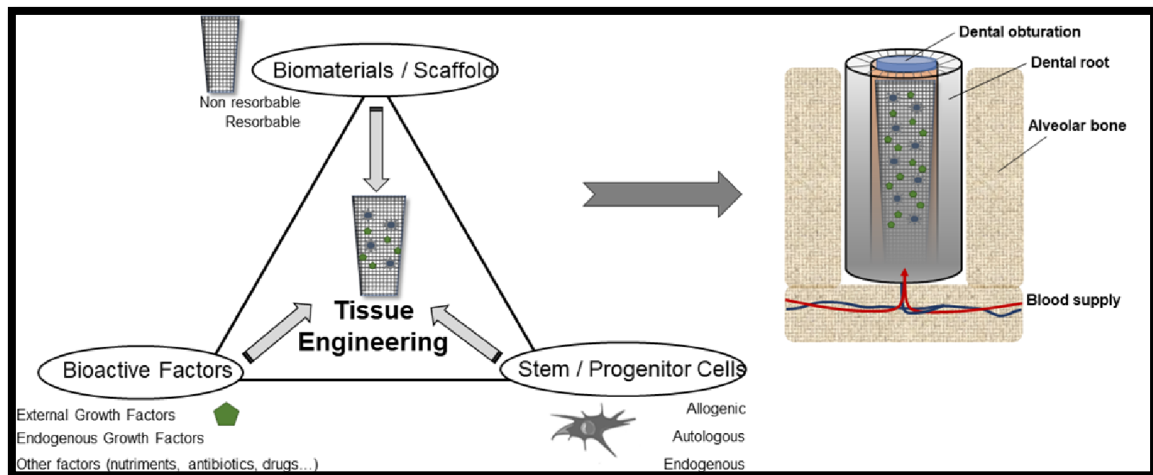


Fig 6. Concepto de ingeniería de tejidos: triada con los factores esenciales para lograr regeneración pulpar

RESULTADOS ESPERADOS EN REPs

Histológico

Thibodeau et al. realizaron procedimientos de revascularización en dientes inmaduros de perros que utilizan coágulos de sangre o colágeno tipo I de cola de rata como matriz o andamio en el espacio del canal desinfectado para generar nuevo tejido pulpar. El tejido formado en el espacio del conducto radicular desinfectado después de REPs se encontró que era tejido conectivo duro y blando (44). En estudios posteriores en animales, los tejidos formados en el espacio del canal de dientes inmaduros se caracterizan como tejidos similares a ligamentos óseos, cementos y periodontales (45). En estudios en humanos, se observaron tejidos similares en el espacio del canal desinfectado de dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica / periodontitis apical después de REPs (31).

Se propuso que la papila apical podía sobrevivir en la periodontitis apical y que las células madre de la papila apical podrían migrar al espacio del conducto radicular desinfectado y diferenciarse en odontoblastos para producir dentina en REPs. Sin embargo, incluso en dientes inmaduros de animales y seres humanos sin enfermedad pulpar y periapical después de REPs, se forman tejidos similares hueso y cemento, no se forma tejido similar a la pulpa / dentina en el espacio del canal desinfectado (46). Esto pone en duda que las células madre mesenquimales introducidas en el espacio del canal durante la inducción de sangrado intracanal en REPs podrían ser de papila apical sino de ligamento periodontal y médula ósea. Aunque las células madre pueden sobrevivir y retener el potencial de regeneración en tejidos periapicales inflamados, la exposición a largo plazo a citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β pueden inhibir la diferenciación osteogénica/dentinogénica de células madre de la papila apical (47).

Vitalidad

Diogenes et al. informa que el objetivo terciario de éxito, que se refiere a una respuesta positiva a la prueba de sensibilidad de la pulpa después de REPs en dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica fue del 50% al 60% de los casos publicados (48). Sin embargo, los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de un diente humano inmaduro permanente con periodontitis apical después de la terapia endodóntica regenerativa revelaron fibras de tipo cemento, óseas y nerviosas en el canal, aunque el tejido vital no era tejido pulpar (49). Los tejidos vitales normalmente están vascularizados e innervados y pueden responder a las pruebas de pulpa. Por lo tanto, la respuesta positiva a la prueba de sensibilidad de la pulpa de dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica después de REPs no indica necesariamente la regeneración del tejido pulpar.

Tejido regenerativo o reparativo

La regeneración se define como la restauración de la arquitectura tisular y la función biológica de los tejidos dañados mediante un tejido similar al tejido original. La reparación es la sustitución del tejido dañado por un tejido diferente del tejido original y la pérdida de la función biológica (50). En estudios en animales y humanos, el tejido pulpar dañado en el espacio del canal de los dientes inmaduros después de REPs se reemplaza por tejido similar a hueso, cemento y ligamento periodontal. Por lo tanto, REPs se considera histológicamente como un proceso reparativo y no regenerativo (51). La reparación no es una curación ideal de la herida porque el tejido dañado ha perdido su función fisiológica.

Ningún estudio ha demostrado que la regeneración natural (in vivo e in situ) de tejido u órgano humano sea posible si está completamente dañado; en consecuencia es necesario el trasplante de tejidos u órganos. La pulpa dental no es una excepción. La regeneración del complejo pulpa-dentina en el espacio del canal de los dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica después de REPs requiere que las células madre mesenquimales se introduzcan en el canal para diferenciarse en odontoblastos.

Se ha demostrado bien que las células madre de la papila dental, las células madre de la papila apical, las células madre de los dientes deciduos exfoliados y las células madre de los tejidos de la pulpa inflamada son capaces de diferenciarse en células de tipo odontoblasto. En estudios de REPs en humanos y animales, las células madre inducidas en el espacio del canal parecían ser del ligamento periodontal y la médula ósea en lugar de la papila apical porque los tejidos formados en el espacio del canal son tejidos similares al cemento y al hueso (52).

PROTOCLO EN REPs

Un análisis de datos referente a protocolos clínico de REPs, reveló que los protocolos variaron considerablemente entre los estudios (27). Diferentes protocolos de tratamiento pueden dar resultado satisfactorio, por lo tanto, es imposible evaluar el resultado verdadero del tratamiento de REPs. Parece que, independientemente de la presencia o ausencia de coágulos de sangre intracanal, las concentraciones de solución de irrigación o el tipo de medicamento intracanal utilizado en REPs, los diferentes protocolos de tratamiento pueden lograr la eliminación de los síntomas / signos clínicos de la periodontitis apical y tienen el potencial para promover el engrosamiento de las paredes del canal y / o el desarrollo continuo de la raíz (27, 28). La Asociación Americana de Endodoncia (AAE) ha sugerido las "Consideraciones clínicas para un procedimiento regenerativo" para ayudar a los médicos a controlar los dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica / periodontitis apical. Sin embargo, la AAE sugirió además que estas consideraciones deberían considerarse como una posible fuente de información, y dada la naturaleza de rápida evolución de este campo; "Los médicos también deben revisar activamente los nuevos hallazgos en otros lugares a medida que estén disponibles". El aumento del grosor de la pared del conducto radicular y / o el aumento de la longitud de la raíz se considera un objetivo deseable, pero quizás no esencial de REPs por parte de la AAE (29). A continuación se describen acciones mínimas necesarias para un correcto protocolo Reps.

Desinfección del conducto radicular

La preservación de las células madre es importante en REPs. Sin embargo, si la infección no está controlada, no se producirá la regeneración. La presencia de una infección previa podría afectar negativamente el proceso de regeneración del tejido de la pulpa al dañar las células formadoras de tejido y las

células madre en los tejidos periapicales (30). Esto se apoya en los hallazgos histológicos de estudios en animales y en informes de casos humanos, los tejidos formados en el canal radicular previamente infectados no corresponden al complejo pulpa-dentina, sino es de origen periodontal, como hueso, cemento y ligamento periodontal (31).

Se ha demostrado que citocinas proinflamatorias, como IL-1 α , TNF- α son capaces de inhibir a las células madre y evitar que se diferencien en células somáticas comprometidas con los tejidos para su regeneración o reparación (32, 33). Por lo tanto, la infección intrarradicular debe controlarse para que posiblemente se produzca la regeneración del tejido pulpar en REPs.

Irrigación

El hipoclorito de sodio es la solución de irrigación antiséptica más utilizada en la terapia del conducto radicular. Se ha demostrado que el hipoclorito de sodio es eficaz contra el biofilms formado por 5 grupos bacterianos aislados del canal de la radicular (35) y el hipoclorito de sodio del 5,25% además puede eliminar el biofilms de una sola especie en 30 segundos (36). Parece que el hipoclorito de sodio puede interrumpir y eliminar el biofilms bacteriano del conducto radicular infectado. Sin embargo, el entorno in vitro es bastante diferente del entorno del canal radicular in vivo en dientes permanentes inmaduros con una pulpa infectada que contiene residuos de tejido necrótico infectado y exudado. Estos factores pueden afectar la actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio.

El hipoclorito de sodio con concentraciones del 1% se ha utilizado en REPs (27). A su vez las consideraciones clínicas de la AAE para un procedimiento regenerativo recomiendan el uso de hipoclorito de sodio al 1.5% seguido de EDTA al 17% (29). Esta recomendación se basa principalmente en estudios que muestran la supervivencia de células madres de la papila apical frente al efecto citotóxico del hipoclorito de sodio in vitro. Por otra parte el uso de hipoclorito de sodio antes del acondicionamiento con EDTA redujo significativamente la liberación del factor de crecimiento transformante (TGF) -

β 1 (37). Este efecto probablemente se deba al daño a las proteínas, incluido el factor de crecimiento de la dentina.

El EDTA es un agente quelante utilizado para eliminar la capa de barro dentinario en la terapia convencional del conducto radicular y para provocar la liberación de factores de crecimiento de la matriz de dentina en REPs. El EDTA tiene una actividad antimicrobiana débil (37). El uso de EDTA al 17% dio como resultado un aumento de la expresión de supervivencia de SCAP, así como un cambio parcial de los efectos perjudiciales de NaOCl (38). El EDTA actúa para desmineralizar la dentina y exponer la matriz de la dentina para liberar factores de crecimiento (37). El acondicionamiento de la dentina con EDTA promueve la adhesión, migración y diferenciación de las células madre de la pulpa dental hacia o sobre la dentina (39). Por lo tanto, se recomienda una irrigación final con EDTA antes de la creación de un coágulo de sangre. Se ha demostrado que los factores de crecimiento derivados de la matriz de dentina liberados después del tratamiento con EDTA son capaces de señalar a las células madre de la papila apical para diferenciarse en células similares a odontoblastos (40). Sin embargo, no se ha regenerado ningún complejo pulpa-dentina en el espacio del canal de dientes inmaduros con pulpa necrótica después de REPs en modelos animales y humanos.

Medicación

El hidróxido de calcio se recomienda como medicación intracanal en REPs debido a su buena propiedad antimicrobiana, posee un pH alto de 12.5-12.8, lo que provoca un ambiente desfavorable para el crecimiento de las mayoría de las bacterias. Además, el hidróxido de calcio puede hidrolizar el resto lipídico del lipopolisacárido bacteriano gram negativo (LPS), lo que resulta en la liberación de ácidos grasos hidroxilados libres y la degradación del LPS (41). Por el contrario se ha demostrado que la dentina es capaz de inactivar los medicamentos intraconductos (42). Por lo tanto, el hidróxido de calcio parece tener una eficacia antimicrobiana limitada como medicación intracanal. (43).

Coágulo de sangre

La inducción de sangrado intracanal en REPs consiste en provocar intencionalmente un sangrado periapical en el espacio del canal. El objetivo es proporcionar un coágulo de sangre como un andamio e introducir factores de crecimiento derivados de las plaquetas y células madre mesenquimales en el espacio del canal para la posible regeneración del tejido pulpar. La inducción de sangrado periapical en el espacio del canal no siempre se alcanza, esto puede ser debido a la destrucción severa de los tejidos periapicales. Si no se puede lograr la inducción de sangrado periapical en la primera visita, el procedimiento puede posponerse a las siguientes visitas hasta que los tejidos periapicales se recuperen de la lesión.

Número de citas

Según la Asociación Americana de Endodoncia y la Sociedad Europea de Endodoncia, el protocolo de REPs generalmente requiere al menos dos visitas de tratamiento (29). La mayoría de los informes de casos publicados y series de casos en REPs de dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica utilizaron un medicamento intracanal, como hidróxido de calcio.

Instrumentación

Oficialmente los protocolos de REPs hoy en día no permiten la instrumentación, justifican que la desinfección se logra mediante irrigación y medicación, los argumentos que da la AAE es que las paredes se pueden “romper” al instrumentar (29), pero existe la dificultad de remover todo el tejido necrótico, anaeróbico y patógeno, por lo tanto, dejar tejido necrosado en descomposición, siendo que lo que se busca es formar nuevo tejido, por lo que no tendría lógica no instrumentar. El concepto de trabajar con limas, es el mismo concepto de preparación biomecánica. Recordar que las células madre en presencia de infección pierden su capacidad de regenerar.

PROTOCOLO DE REGENERACIÓN DENTARIA PARA DIENTE INMADURO DRA. A. CARO Y CoIs, UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO, 2019

Primera cita

1. Anestesia con Lidocaína al 2% y aislación de pieza dentaria
2. Apertura Oclusal, eliminación de caries y obturaciones metálicas
3. Irrigación con suero fisiológico si el diente está con diagnóstico de pulpitis irreversible y cuando deja de sangrar: hipoclorito de sodio al 1.5%
4. Realización de Crown Down con limas Gates Glidden 3, 2,1
5. Determinación de la LAI con LAE
6. PBM convencional a LT 0.0 si está en necrosis o a 0,5 mm si es una bio (considerar presencia de papila apical). La intención es eliminar la mayor cantidad de tejido orgánico, sin eliminar mucha dentina, para preservar los factores de crecimiento.
7. Se irriga el hipoclorito con suero fisiológico, se aplica 1 ml de EDTA al 17%, por 1 minuto, se lava con SF. Activación de cada irrigante con ultrasonido.
8. Se seca con puntas de papel
9. Medicación: con Hidróxido de Calcio en pasta, mezclado con SF, Con loseta y espátula estéril.
10. Sellado temporal con IV

Segunda cita

A los 15 días y si el paciente está asintomático se procede de la siguiente forma:

1. Lidocaína al 3%, aislamiento y eliminación de la restauración temporal
2. Eliminación completa de la pasta de hidróxido de calcio con irrigación de SF
3. Repaso PBM, irrigando con hipoclorito de sodio 1.5%, se lava con SF. Se activa irrigante con ultrasonido.
5. Irrigación con EDTA al 17% que se deja en el canal por 1 minuto, se activa con ultrasonido, se lava con suero fisiológico y luego se seca con puntas de papel.
6. Se induce sangramiento a nivel apical pasando con lima a 3 mm. Más allá del ápice.
7. Se agrega matriz de FRP extraída minutos antes al paciente.

8. Se agrega Biodentine 2 mm. A nivel de la unión cemento dentina
9. Restauración con IV, el que se cubre con compósito
10. Rx control.
11. Citar a control clínico y Rx a los 3m, 6m y 9m, luego 1 vez al año hasta los 5 años.

CASO CLINICO

Paciente sexo masculino 13 años de edad, ASA I, acude a facultad de odontología de la Universidad de Valparaíso a fines del año 2017. Al examen clínico presenta pieza 2.2 con alteración de forma, fistula activa en zona vestibular, asintomático. Radiográficamente se observa odontoma dilatado y lesión osteolítica apical.

Diagnostico:

- Clínico: Diente con alteración de forma (Dens in dente)
- Pulpar: Necrosis pulpar
- Periapical: Absceso apical crónico



Fig 7. Fotografía inicial 22/12/2017



Fig. 8 Cone Beam. Imagen 1 corte V-P. Imagen 2 corte coronal oblicuo. Imagen 3 Corte axial radicular. 13/12/2017

Primera cita 22/12/2017:

- Sesión exploratoria
- Se accede a 1 conducto central con lima k 15, se determina longitud de 14 mm
- Medicación intraconducto con hidróxido de calcio
- Se realiza reconstrucción coronaria
- Se elimina fistula



Fig. 9 Fistulectomía y reconstrucción coronaria con composite

Segunda cita 29/12/2017:

- Se permeabiliza conducto mesial y se canaliza a 17 mm, (LAE no se puede utilizar)
- Conducto central se canaliza con lima WO a 16 mm se intenta avanzar con Ultrasonido, pero no se logra
- Medicación intraconducto con hidróxido de calcio

Tercera cita 05/01/2018:

- Se realiza preparación biomecánica de conducto central. Lima final 100 k. Medicación intraconducto.

Cuarta cita: 11/04/2018:

- Control, asintomático.
- Se cita para Repts

Quinta cita 18/04/2018:

- Clínicamente asintomático, pero aun mal olor al acceder al conducto
- Se realiza repaso PBM, según protocolo Repts UV.

Sexta cita 30/05/2018:

- Reagudización del caso, se reactiva fistula vestibular, se realiza drenaje de exudado vía cameral
- Repaso PBM
- Medicación intraconducto

Séptima cita 13/06/2018:

- Asintomático
- Se realiza Reps, se produce fractura de corona durante el procedimiento

Octava cita 20/06/2018

- Asintomático
- Se realiza reconstrucción coronaria con composite

Novena cita 23/08/2018

- Asintomático, pero presenta fistula vestibular, se realiza retiro de tejido de granulación, no existe drenaje purulento
- Irrigación suero fisiológico
- Se cita para 1 mes, evaluación de fistula

Decima cita 26/09/2018:

- Asintomático, pero persiste fistula vestibular inactiva, se sospecha de cicatriz
- Se indica terapia ATB, amoxicilina 875 mg/Ac. Clavulánico 125 mg. Cada 12 hrs. Por 7 días
- Control en 1 mes

Paciente asiste a control de tratamiento de revascularización p2.2 realizado en Junio 2018. Inicialmente su control se debería haber realizado en el mes de Octubre 2018, pero no se presentó por un largo periodo.

Actualmente asintomático, al examen clínico de pieza dental 2.2 se observa reconstrucción coronaria completa con resina compuesta, restauración

infiltrada palatina con Vidrio Ionómero, en zona vestibular en relación a pieza 2.2 y 2.3 una fístula activa (Fig. 9). Radiográficamente, además presenta alteración de forma (Dens in dens), también existe imagen radiolúcida apical en pieza 2.2 compatible con un granuloma periapical, con un diagnóstico periapical de Absceso apical crónico (Fig. 10).



Fig. 9 imagen clínica de paciente con fístula activa.12/08/2019



Fig. 10 Rx. Retroalveolar periapical dónde se observa imagen radiolúcida en relación al ápice de la pieza dentaria 2.2. 18/06/2018

Planificación de tratamiento año 2019

1. Determinación de longitud de trabajo mediante Localizador apical + Preparación biomecánica + Sesión 1 medicación.
2. Repaso preparación biomecánica + Sesión 2 medicación.

3. Repaso preparación biomecánica + Sesión 2 medicación.
4. Revascularización según protocolo UV.
5. Control.

Primera cita (12/08/2019)

- Se realiza técnica anestésica infiltrativa vestibular al , con anestesia al 2% 1 tubo y aislamiento absoluto,
- Apertura cameral con una fresa de baja velocidad carbide redonda, con una lima K 10 se encuentran tres conductos (fig. 11).
- Se realiza protocolo Irrigación UV Reps
- Control de longitud de los conductos con localizador electrónico de foramen (Raypex, vdw). Las longitudes obtenidas fueron :
 - o Conducto mesial = 15mm.
 - o Conducto central = 17mm.
 - o Conducto distal = 17mm.
- Preparación biomecánica de los conductos con lima K 35, a esa longitud se encuentra tope apical
- Irrigación hipoclorito de sodio 1,5% + Suero fisiológico + Edta 17%
- Se activa cada irrigante con Ultrasonido
- Medicación intracanal de todos los canales con hidróxido de Calcio
- Doble sellado con Fermín y vidrio ionómero



Fig 11 . cavidad de acceso y entrada a conductos 12/08/2019

Segunda cita (19/07/2019)

Fístula persistente

- Se realiza técnica anestésica infiltrativa vestibular con anestesia al 2%, 1 tubo + aislamiento absoluto
- Preparación biomecánica de los conductos con lima K40 a las longitudes ya establecidas

- Irrigación hipoclorito de sodio 1,5% + Suero fisiológico + Edta 17%
- Se activa cada irrigante con Ultrasonido
- Segunda sesión de medicación intraconducto con hidróxido de Calcio
- Doble sellado con Fermín y vidrio ionómero.

Tercera cita (23/08/2019)

Fistula persistente

- Se realiza técnica anestésica infiltrativa vestibular al , con anestesia al 2% 1 tubo y aislamiento absoluto
- Repaso de la preparación biomecánica con lima k40
- Irrigación hipoclorito de sodio 1,5% + Suero fisiológico + Edta 17%
- Se activa cada irrigante con Ultrasonido
- Tercera sesión de medicación intraconducto con hidróxido de calcio
- Doble sellado con Fermín y vidrio ionómero.

Cuarta cita (30/08/2019)

Fistula persistente

- Se realiza técnica anestésica infiltrativa vestibular con anestesia al 2%, 1 tubo + aislamiento absoluto
- Preparación biomecánica de los conductos con lima K50 a longitudes de trabajo correspondientes
- Irrigación hipoclorito de sodio 1,5% + Suero fisiológico + Edta 17%
- Se activa cada irrigante con Ultrasonido
- Cuarta sesión de medicación intraconducto con hidróxido de calcio
- Doble sellado con Fermín y vidrio ionómero
- Fistulectomía con cuchareta de caries

Quinta cita (04/10/2019)

No hay presencia de fistula + silencio clínico (Fig. 12)

- Se realiza técnica anestésica infiltrativa vestibular con anestesia al 3%, 1 tubo y aislamiento absoluto
- Se procede a realizar tratamiento de revascularización según protocolo UV:
 - ✓ Remoción restauración temporal + eliminación completa de la medicación con irrigación de suero fisiológico
 - ✓ Repaso de la preparación biomecánica de los conductos con lima K50
 - ✓ Irrigación con hipoclorito de sodio 1.5% + suero fisiológico + Irrigación con EDTA al 17%
 - ✓ Se activa cada irrigante con Ultrasonido
 - ✓ Se seca con puntas de papel

- ✓ Se lava con suero fisiológico
- ✓ Se induce sangramiento a nivel apical pasando con lima k40 a 3 mm. más allá del ápice (Fig. 13)
- ✓ Se agrega matriz de FRP (Fig.14 y 15) extraída minutos antes del paciente.
- ✓ Se agrega Biodentine a nivel de la unión cemento dentina (Fig.16) + restauración de vidrio ionómero + obturación con resina compuesta
- ✓ Chequeo oclusión



Fig. 12. Paciente no presenta fístula. (04/10/2019)

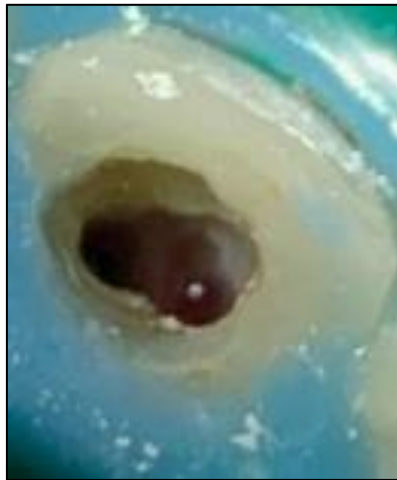


Fig 13. Inducción de sangrado apical. (04/10/2019)



Fig.14. Matriz de FRP Obtenida por metodo Choukroun y cols. (04/10/2019)



Fig. 15. Se Introduce matriz de FRP dentro del conducto (04/10/2019)



Fig. 16 Sellado con Biodentine (04/10/2019)

Sexta cita (23/10/2019)

- Control Clinico: No hay presencia de fistula + silencio clínico (Fig. 17)
- Control Rx. REPS (Fig. 18)



Fig. 17. Control clinico a los 15 dias de REPs (23/10/2019)



Fig. 18. Radiografia control Obturacion Biodentine (23/10/2019)

Septima cita (22/11/2019)

- Control Clínico: No hay presencia de fistula + silencio clínico
- Se cita para Marzo 2019 proximo control con Radiografia para obserar cambios a nivel oseó



Fig 19. Control clínico al mes aprox. de realizar Reps. Flecha indica cicatriz de fistula.

DISCUSIÓN

Cuando nos vemos enfrentados a este tipo de casos, en donde encontramos una anatomía compleja se nos hace más difícil determinar un tratamiento adecuado. El éxito de nuestro tratamiento estará determinado por el grado de malformación del dens invaginatus, su detección precoz y la capacidad de desinfección durante el tratamiento.

Para determinar un correcto diagnóstico debemos realizar un examen clínico exhaustivo y observar alguna anatomía irregular que se presente en las coronas de la pieza dentaria, recordemos que este tipo de casos la mayoría se obtiene de hallazgo radiográfico, ya que, habitualmente son asintomáticos clínicamente. El uso de la técnica radiográfica retroalveolar periapical con desplazamiento ayuda a obtener una mejor visualización de la anatomía radicular. El uso del Cone Beam es una herramienta de apoyo, que nos permite un mejor manejo en el tratamiento de estas piezas dentarias que presentan anatomía compleja, incluso se pueden realizar modelos en tercera dimensión de donde se obtiene valiosa información para evaluar y planificar tratamientos (53, 54).

En referencia al caso expuesto, el paciente ya había sido sometido a un tratamiento REPs, con resultados poco alentadores, en un inicio pensamos que el motivo principal de la reagudización del cuadro había sido una deficiente limpieza de los conductos radiculares al tener una anatomía poco común, también asociamos que el problema era la restauración que tenía la pieza dentaria (provisoria) ya que se encontraba infiltrada. En referencia a la limpieza de los conductos radiculares, el protocolo UV enfatiza la importancia de realizar no solo una buena preparación biomecánica de los conductos con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de tejido infectado, sino también el uso de ultrasonido durante la irrigación ya que utiliza pequeñas limas inactivas que oscilan libremente en el canal ya conformado a frecuencias ultrasónicas (25-30 kHz) activando al irrigante a través de microstreaming acústico (77). Además en una revisión bibliográfica realizada por Virdee SS et al., concluyen que las técnicas de activación del irrigante mejoran la eliminación del barro dentinario y el debridamiento en comparación con la irrigación convencional con solo el uso de jeringa, por lo mismo recomiendan su uso durante el tratamiento de conducto radicular (78). Otro punto desfavorable en cuanto a la efectividad del tratamiento, fue la poca frecuencia de asistencia del paciente lo que perjudicó ampliamente en el control de la infección, provocando un aumento en el número de sesiones de limpieza y conformación con la finalidad de erradicar la mayor cantidad de familias bacterianas y así lograr el equilibrio para que el sistema inmune del hospedero mantuviera controlado el cuadro infeccioso.

A su vez este protocolo actual UV, nos obliga entonces a realizar una restauración definitiva en la misma sesión para así disminuir la probabilidad de infiltración bacteriana, obviamente antes de esta restauración definitiva, se debe realizar un sellado de 2 mm aprox. con Biodentine en la unión cemento-dentina, posteriormente aplicar una base de V. Ionomero y finalmente la restauración con resina compuesta, con esto aseguramos que nuestro tratamiento esté herméticamente sellado, disminuyendo toda posibilidad de re-contaminación.

La realización de Reps en un Dens in dens es poco común, más complicado aun cuando el diagnóstico es absceso apical crónico, ya que la anatomía atípica y la lesión apical presentada lo único que provoca es que el pronóstico final sea poco alentador, en este caso se realiza la regeneración a pesar de las dificultades anatómicas presentes ya que este tipo de tratamiento permite bajar la carga bacteriana dentro del conducto y así obtener un sellado biológico con nuevo tejido estimulando cierre apical y promoviendo curación ósea, que es la finalidad principal de este caso, además es un tratamiento de bajo costo, en donde no hay riesgos de transmisión de enfermedades y tampoco de rechazo inmunológico.

Debemos considerar también el problema estético que se produce al perder la pieza dentaria considerando además que el paciente se encuentra en plena etapa de la adolescencia en donde está en constante búsqueda de su identidad y aceptación de sus pares.

Finalmente, al realizar un análisis en el seguimiento de nuestro caso clínico podemos encontrar poca efectividad en cuanto al tiempo de control. Pero en la literatura actual existe evidencia científica que demuestra un positivo resultado a largo plazo, como el estudio de Cho WC et al. que reporta que a los 3 meses de seguimiento de REPs en un canino maxilar, se observó una reducción de la radiolucidez periapical y formación radicular, además no presentó recurrencia de lesión o rarefacción periapical durante el período de seguimiento de 24 meses (55). A su vez, Goel S et al. informa sus resultados en tratamiento de REPS Dens invaginatus clase II con FRP y Biodentine, los signos y síntomas clínicos se resolvieron después del tratamiento, a los 24 meses mostró curación completa de la lesión periapical. Además concluyen que estos casos pueden tratarse de manera no quirúrgica con la ayuda de CBCT, microscopio quirúrgico, FRP y Biodentine con un seguimiento exitoso de 30 meses (56).

CONCLUSIÓN

En la actualidad las terapias de regeneración pulpar son una alternativa efectiva en casos de malformación anatómica como un Dens invaginatus, el concepto de ingeniería de tejidos aplicable hoy en día a las piezas dentarias nos permiten la posibilidad de un tratamiento más conservador acompañado de efectividad, teniendo siempre en cuenta que la compleja anatomía presente hace que los casos sean un reto para el operador, desafiando constantemente sus conocimientos y destrezas.

Debemos considerar el tratamiento de regeneración pulpar como una opción al tratamiento de patologías pulpares en dientes inmaduros, ya sea para inducir el término del cierre apical, obtener curación ósea evitando la pérdida de hueso producto de la infección osteolítica e incluso con fines en donde buscamos mantener la pieza dentaria con fines rehabilitadores en un futuro.

Es importante durante la terapia regenerativa pulpar, realizar una exhaustiva limpieza y conformación del conducto radicular, es por esto que el uso de ultrasonido en esta etapa es indispensable, además al finalizar la terapia REPs debemos asegurar el sellado de la cavidad con materiales biocompatibles que favorezcan un sellado hermético, y así evitar reinfección.

El objetivo principal de REPs es la eliminación de los síntomas clínicos y además lograr curación ósea. Si no obtenemos el resultado esperado, podemos realizar nuevamente el tratamiento, asegurando una buena preparación de los conductos radiculares e irrigación continua, según protocolo ya establecido.

Existen reportes de Dens invaginatus que demuestran la efectividad del tratamiento en el tiempo, pero se deben realizar seguimientos con plazos más extensos para poder obtener mejor evidencia que apoye este tipo de terapia en malformaciones dentarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hulsman M. Dens invaginatus: aetiology, classification, prevalence, diagnosis, and treatment considerations. *Int Endod J* 1997;30:79–90.
2. Goel S, Nawal RR, Talwar S. Management of Dens Invaginatus Type II Associated with Immature Apex and Large Periradicular Lesion Using Platelet-rich Fibrin and Biodentine. *J Endod*. 2017;43(10):1750-5.
3. Plascencia H, Diaz M, Moldauer BI, Uribe M, Skidmore E. Non Surgical Endodontic Management of Type II Dens Invaginatus with Closed and Open Apex. *Iran Endod J*. 2017;12(4):534-9.
4. Abazarpour R, Parirokh M, Farhadi A, Jalali Z, Kheirabadi N. Successful Ultra-Conservative Management of a Mandibular Premolar with Dens Invaginatus. *Iran Endod J*. 2017;12(3):390-5.
5. Oehlers FA. Dens invaginatus (dilated composite odontome): I—variations of the invagination process and associated anterior crown forms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1957;10:1204–18.
6. Ozbas H, Subay RK, Ordulu M. Surgical retreatment of an invaginated maxillary central incisor following overfilled endodontic treatment: a case report. *Eur J Dent*. 2010;4(3):324-8.
7. Iwaya S, Ikawa M, Revascularization KM, Iwaya S, Ikawa M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. 2001;(January 1996):185–7.
8. Huang AH, Chen Y, Lin L, Shieh T, Wing-sang A. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. 2008;571–4.
9. Nakashima BM, Scincnes I. *Tissue Engineering In Endodontics*. 2005;3(3): 3–5.
10. Mariela B. Caso clínico “ DENS IN DENTE : ANOMALÍA DENTAL DIFÍCIL DE TRATAR . REPORTE DE UN CASO CLÍNICO .” 2013;9(2):35–8.
11. Kettunen P, Laurikkala J, Itäranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 2000; 219: 322–332.
12. Hosey M T, Bedi B. Multiple dens invaginatus in two brothers. *Endod Dent Traumatol* 1996; 12: 44–47.
13. Patel, S., Dawood, D. A., Ford, T. P. [et al.]. (2007). The potential applications of cone beam computed tomography in a management of endodontic problems. *Int. Endod J*, 40, 818-830.

14. Pindborg JJ. Pathology of the Dental Hard Tissues. Philadelphia: Saunders; 1970.
15. Rotstein I, Stabholz A, Heling I, Friedman S. Clinical considerations in the treatment of dens invaginatus. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:249–54.
16. Oehlers, F. A. (1957). Dens invaginatus (dilated composite odontome). I. Variations of the invagination process and associated anterior crown forms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 10, 1204–1218.
17. McNamara CM, Garvey MT, Winter GB: Root abnormalities, talon cusps, dens invaginatus with reduced alveolar bone levels: case report. *Int J Paed Dent* 1998; 8: 41-45.
18. Murray PE GGF. Regenerative Endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics*. 2007 Abril.
19. American Association of Endodontists [Online].; 1995-2016. Available from: <https://www.aae.org/>.
20. MC. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I follow-up of periapical repair and apical closure of immature. *Av Odontoestomatology*.; 1972(23)
21. De SCB. Biocompatibilidad de Células Madres Mesenquimales de Tejido Gingival Humano en Cultivo con un Andamiaje de Polímero Sintético de Ácido Poliláctico (OPLA). 2014;32(3):767–72.
22. Orti V, Collart-Dutilleul P-Y, Piglionico S, Pall O, Cuisinier F, Panayotov I. Pulp Regeneration Concepts for Nonvital Teeth: From Tissue Engineering to Clinical Approaches. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2018;ten.teb.2018.0073. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2018.0073>
23. Curso regeneración pulpar, Dra. Alicia Caro, realizado 30 de Agosto 2018
24. Murray, P.E., Garcia-Godoy, F., and Hargreaves, K.M. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of endodontics* 33, 377, 2007.
25. Song, J.S., Takimoto, K., Jeon, M., Vadakekalam, J., Ruparel, N.B., and Diogenes, A. Decellularized Human Dental Pulp as a Scaffold for Regenerative Endodontics. *J Dent Res* 96, 640, 2017.
26. Curso regeneración pulpar, Dra. Alicia Caro, dictado el 30 de Agosto 2018.
27. Kontakiotis, E. G., Filippatos, C. G., Tzanetakis, G. N., & Agrafioti, A. (2015). Regenerative Endodontic Therapy: A Data Analysis of Clinical Protocols. *Journal of Endodontics*, 41(2), 146–154. doi:10.1016/j.joen.2014.08.003
28. Diogenes, A., Henry, M. A., Teixeira, F. B., & Hargreaves, K. M. (2013). An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics*, 28(1), 2–23. doi:10.1111/etp.12040

29. American Association of Endodontists. Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. Revised 2016. https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf
30. Kim SG (2016) Infection and pulp regeneration. *Dentistry Journal* 4, 4.
31. Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM (2014) Histological study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *Journal of Endodontics* 40, 133-9.
32. Liu C, Xiong H, Chen K, Huang Y, Huang Y, Yin X (2016) Long-term exposure to pro-inflammatory cytokines inhibit the osteogenic/dentinogenic differentiation of stem cells from the apical papilla.
33. Wang F, Jiang Y, Huang X, Liu Q et al. (2017) Pro-inflammatory cytokines TNF- α attenuates BMP9-induced osteo/odontoblasts differentiation of the stem cells of dental apical papilla. *Cellular Physiology and Biochemistry* 41, 1725-35.
34. Gallacher A, Ali R, Bhakta S. Dens invaginatus: Diagnosis and management strategies. *Br Dent J [Internet]*. 2016;221(7):383–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.724>
35. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K (2001) An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of irrigants on biofilm of root canal isolates. *International Endodontic Journal* 34, 300-7.
36. Sena NT, Gomes BPFA, Vianna E et al. (2006) In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *International Endodontic Journal* 39, 878-85.
37. Galler KM, Buchalla W, Hiller K-D, et al. (2015) Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *Journal of Endodontics* 41, 363-8.
38. Martin DE, De Almeida JFA, Henry MA et al. (2014) Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *Journal of Endodontics* 40, 51-5.
39. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M et al. (2011) Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *Journal of Endodontics* 37, 1536-41.
40. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T et al. (2008) Characterization of apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth – a pilot study. *Journal of Endodontics* 34, 166-71.
41. Safavi KE, Nichols K (1993) Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics* 19, 76-78.

42. Haapasalo M, Qian W, Portnier I, Waltimo T (2007) Effect of dentin on antimicrobial properties of endodontic medicaments. *Journal of Endodontics* 33, 917-25.
43. Sathorn C, Parashos P, Messer M (2007) Antimicrobial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal* 40, 2-10.
44. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan D, Trope M (2007) Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *Journal of Endodontics* 33, 680-9.
45. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT (2010) Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *Journal of Endodontics* 36, 56-63.
46. Torabinejad M, Faras H, Corr R, Wright KR, Shabahang S (2014) Histologic examinations of teeth treated with 2 scaffolds: A pilot animal investigation. *Journal of Endodontics* 40, 515-20.
47. Liu C, Xiong H, Chen K, Huang Y, Huang Y, Yin X (2016) Long-term exposure to pro-inflammatory cytokines inhibit the osteogenic/dentinogenic differentiation of stem cells from the apical papilla.
48. Diogenes A, Ruparel NB (2017) Regenerative Endodontic Procedures: Clinical Outcomes. *Dental Clinics of North America* 61, 111-25.
49. Lei L, Chen Y, Zhou R, Huang X, Cai Z (2015) Histologic and immunohistochemical findings of a human immature permanent tooth with apical periodontitis after regenerative endodontic therapy. *Journal of Endodontics* 41, 1172-9.
50. Kumar V, Abbas AK, Fausto N et al. (2015) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders.
51. Lin LM, Rosenberg PA (2011) Repair and regeneration in endodontics. *International Endodontic Journal* 44, 889-906.
52. Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM, Kahler B. Regenerative endodontics: a comprehensive review. *Int Endod J*. 2018;51(12):1367–88.
53. Kfir A, Telishevsky-Strauss Y, Leitner A, Metzger Z. The diagnosis and conservative treatment of a complex type 3 dens invaginatus using cone beam computed tomography (CBCT) and 3D plastic models. *International Endodontic Journal*, 46, 275–288, 2013
54. Zubizarreta-macho Á, Ferreiroa A, Agustín-panadero R, Rico-romano C. Endodontic re-treatment and restorative treatment of a dens invaginatus type II through new technologies. 2019;11(6).

55. Cho WC, Kim MS, Lee H, Choi SC, Nam OH. Pulp revascularization of a severely malformed immature maxillary canine. 2016;58(2):295–8.
56. Goel S, Nawal RR, Talwar S. Management of Dens Invaginatus Type II Associated with Immature Apex and Large Periradicular Lesion Using Platelet-rich Fibrin and Biodentine. J Endod [Internet]. 2017;4–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.04.005>
57. Hülsmann M, Bahr R, Grohmann U. Hemisection and vital treatment of a fused tooth & literature review and case report. Endod Dent Traumatol. 1997;13:253-258
58. Oehlers, FAC. The radicular variety of dens invaginatus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1958; 11(11): 1251- 1260.
59. Hülsmann M. Dens invaginatus: aetiology, classification, prevalence, diagnosis, and treatment considerations. Int Endod J. 1997; 30: 79-90
60. Teixidó, M.; Abella, F.; Duran-Sindreu, F.; Moscoso, S. & Roig, M. The use of cone-beam computed tomography in the preservation of pulp vitality in a maxillary canine with type 3 dens invaginatus and an associated periradicular lesion. J. Endod., 40(9):1501-4,2014.
61. Langer, R., Vacanti, JP. tissue engineering. Science . 1993 ; 260: 920-926
62. Niklason, LE., Langer, R. Prospects for organ and tissue replacement. JAMA 285 (5). 2001; 573-576
63. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., andHorwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8, 315, 2006.
64. Pagella, P., Neto, E., Lamghari, M., andMitsiadis, T.A. Investigation of orofacial stem cell niches and their innervation through microfluidic devices. Eur Cell Mater 29, 213, 2015.
65. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., andShi, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 5807, 2003
66. Hu, B., Unda, F., Bopp-Kuchler, S., Jimenez, L., Wang, X.J., Haikel, Y., Wang, S.L., andLesot, H. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. J Dent Res 85, 416, 2006.
67. Murry, C.E., andKeller, G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: Lessons from embryonic development. Cell 132, 661, 2008.
68. Forraz, N., andMcGuckin, C.P. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. Cell Proliferation **44**, 60, 2011.

69. Takahashi, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663, 2006.
70. Huang G (2008): A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *Journal of dentistry* 2008; 36:379-386
71. Barrientos, S. et al., (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 16(5):585-601.
72. Zhang W, Yelick P (2010): Vital pulp therapy: current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *International Journal of Dentistry* 2010; 1-9.
73. Nakashima, M., and Akamine, A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *Journal of endodontics* 31, 711, 2005.
74. Li Zhang , Y.M., Yanying Wang, Yubao Li, Seeram Ramakrishna. Review scaffold design and stem cells for tooth regeneration. *Japanese Dental Science Review* 49, 14, 2013.
75. Sharma, S., Srivastava, D., Grover, S., and Sharma, V. Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 8, 309, 2014.
76. Marx R. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry* 2001; 10: 225-228.
77. Van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *International Endodontic Journal* 40, 2007: 415–26
78. Virdee SS, Seymour DW, Farnell D, Bhamra G, Bhakta S. Efficacy of irrigant activation techniques in removing intracanal smear layer and debris from mature permanent teeth : a systematic review and. 2017;1–17.
79. Barzuna-Pacheco M. Dens in dente: dental anomaly difficult to treatment; report of a case. *Rev Cient Odontol.* 2013; 9 (2): 35-38
80. Sübay RK, Kayataş M. Dens invaginatus in an immature maxillary lateral incisor: a case report of complex endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102 (2): e37-41