

1172
630
R 17303

T
S968i
2014



INERVACIÓN DE LA PULPA DENTAL Y REABSORCIÓN RADICULAR FISIOLÓGICA EN DIENTES TEMPORALES HUMANOS



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

Alumna: Dra. Kiyoko Suzuki Barrera

Director Del Programa
Prof. Dr. Juan Onetto Calvo
Docente Guía: Prof. Dr. Eduardo Couve Montané
Cátedra de Odontopediatría

A Dios, a mis padres, a mi hermana Claudia, a Jorge y a mis amigos residentes de la
Especialidad de Odontopediatría años 2013-2014.

AGRADECIMIENTOS

- Al Prof. Dr. Eduardo Couve, quien generosamente siempre dio todo su apoyo, desde el nacimiento de este proyecto, con una total entrega de su tiempo, sus conocimientos y experiencia, siendo sin duda fundamental para la realización y culminación de este proyecto.
- Al Prof. Dr. Juan Eduardo Onetto y Prof. Dra. Marie Therese Flores, quienes siempre con gran disposición entregaron sus conocimientos y experiencia durante toda mi residencia, siendo también esenciales en esta investigación.
- Al Prof. PhD. Oliver Schmachtenberg, quien proporcionó de manera desinteresada, sus conocimientos y experiencia, siendo imprescindibles en este trabajo.
- A la Biol. Victoria Devia, quien brindó generosamente su ayuda y conocimientos en la realización del procesamiento de muestras y uso de microscopía confocal, que fueron primordiales en la ejecución de esta investigación.
- Al Dr. Marco Lovera, quien proporcionó su colaboración en la realización del procesamiento de muestras.
- Al Departamento de Biología Celular, Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, y al Centro Interdisciplinario de Neurociencia, Universidad de Valparaíso, que nos facilitó sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.
- A los Residentes de la Especialidad de Odontopediatría años 2013-2014 y al equipo que trabaja en la Clínica de Odontología Pediátrica y del Adolescente de la Universidad de Valparaíso, quienes derivaron de manera oportuna los pacientes, para un correcto desarrollo de esta investigación.

Resumen	
1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	2
2.1. Pulpa Dental en Dientes Temporales.....	2
2.1.1. Generalidades.....	2
2.1.2. Desarrollo de la inervación y su función.....	2
2.1.3. Complejo dentino-pulpar.....	7
2.1.4. Inervación del complejo dentino-pulpar.....	9
2.1.5. Células Gliales y regeneración de la inervación.....	11
2.1.6. Células inmuno-competentes y defensa del CDP.....	14
2.2. Reabsorción radicular fisiológica del diente temporal.....	16
2.3. Reabsorción radicular fisiológica y Pulpa Dental en Dientes Temporales.....	20
3. Planteamiento Hipótesis y Objetivos.....	24
4. Materiales y Método.....	25
4.1. Tipo de Estudio.....	25
4.2. Universo.....	25
4.3. Criterios de Inclusión/Exclusión.....	25
4.4. Muestra.....	26
4.5. Variables.....	26
4.6. Recolección y Procesamiento de la Información.....	27
4.7. Determinación de etapas de reabsorción radicular fisiológica.....	27
4.8. Inmunohistoquímica y microscopía confocal.....	28
5. Resultados.....	30
6. Discusión.....	37
7. Conclusiones.....	39
8. Limitaciones y Sugerencias.....	40
9. Bibliografía.....	41
10. Anexos.....	44

RESUMEN

La reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales corresponde a un proceso progresivo y complejo asociado a la erupción del diente permanente, proceso fundamental en el crecimiento y desarrollo del paciente odontopediátrico. Sin embargo, el efecto de la reabsorción radicular fisiológica sobre la condición de la pulpa dental ha sido poco estudiado. Como hipótesis de trabajo hemos planteado que la reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales puede actuar como injuria sobre las fibras nerviosas que inervan la pulpa dental, promoviendo fenómenos de degeneración axonal. Para evaluar esta hipótesis, en el presente estudio se propuso determinar el estado y cambios en la inervación de la pulpa dental y reacciones celulares asociadas para tres etapas definidas de reabsorción radicular fisiológica. Dientes temporales en distintas etapas de reabsorción radicular fueron fijados en PFA 4%, desmineralizados y seccionados para ensayos inmunohistoquímicos y análisis mediante microscopía confocal. Se determinaron cambios progresivos en la inervación de la pulpa a nivel coronario, evidenciando una marcada desorganización y fragmentación de neurofilamentos a nivel axonal y degradación progresiva de axones mielinizados tanto a nivel del plexo de Raschkow y haces nerviosos en la pulpa coronaria. En dientes temporales con reabsorción radicular inicial se evidencia una activación temprana de las células de Schwann mielinizantes y no-mielinizantes, observando la formación de bandas de Büngner y una progresiva activación como células inmunocompetentes (HLA-positivas). Además, se determinó un incremento progresivo de células inmunocompetentes en relación a las etapas más avanzadas del proceso de reabsorción radicular fisiológica. De esta manera, se propone que la reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales, constituye un proceso que ejerce una injuria progresiva y mantenida de las fibras nerviosas, promoviendo la degeneración axonal y una denervación en la pulpa dental, evidencias que permiten explicar el declive de la función sensorial en dientes temporales asociados con etapas finales de reabsorción radicular. El estudio permite concluir una relación entre las diferentes etapas de la reabsorción radicular con un progresivo proceso de degeneración axonal de tipo Walleriana. Las implicancias de estos resultados permiten proyectar futuras investigaciones, postulando que los dientes temporales son un buen modelo para estudiar fenómenos de degeneración axonal asociados a procesos fisiológicos. Dentro de las implicancias clínicas del estudio, destacar que una mejor comprensión del estado de la pulpa dental durante este proceso fisiológico, presente en todos los pacientes odontopediátricos, es fundamental para pronosticar la probabilidad de éxito de intervenciones clínicas. En este sentido, se puede determinar que la pulpa dental en dientes temporales mantiene una inervación asociada con su capacidad de reparación y defensa durante la progresión del proceso de reabsorción radicular fisiológica, incluso hasta dos tercios de la longitud radicular. Por lo tanto, si el estado de la pulpa dental se diagnostica con precisión, la elección de terapias pulpares conservadoras, con un uso apropiado de anestesia local, permite conservar el diente temporal, siendo un mantenedor de espacio fisiológico y representa de esta manera, el tratamiento adecuado para los pacientes odontopediátricos.

La pulpa dental en dientes temporales y permanentes es considerada un tejido conectivo altamente innervado por haces nerviosos que entran en la pulpa desde el ápice para distribuirse extensamente a nivel de la corona. Las fibras que innervan la pulpa dental se componen principalmente de aferentes sensoriales del nervio trigémino y ramas simpáticas del ganglio cervical superior. Cada uno de estos haces contiene axones mielínicos y no-mielínicos (Torneck, 1994). Estos nervios sensoriales se distribuyen en la unión dentino-pulpar a nivel coronal (Byers et al., 2003; Rodd y Boissonade, 2001, 2002). En la interfase dentino-pulpar una densa red sensorial forma el plexo de Raschkow, desde el cual se proyectan radialmente terminales nerviosos que atraviesan la capa odontoblástica alcanzando la preentina (Rapp et al., 1967; Couve et al., 2014). Terminales nerviosos sensoriales median la nocicepción, y están involucrados en la sensación dolorosa, sugiriendo que la innervación es crucial para la protección del diente, su defensa inmunoinflamatoria y reparación de la pulpa dental (Byers y Narhi, 1999; Rodd y Boissonade, 2002).

Los procesos involucrados en la reabsorción radicular fisiológica en la dentición temporal aún no están del todo comprendidos. La reabsorción y exfoliación son procesos complejos que involucran eventos programados y la función coordinada de osteoblastos, osteoclastos, odontoclastos, folículo dental y células del ligamento dental (Wise et al., 2002). Aunque, los mecanismos precisos que activan la reabsorción radicular son aún desconocidos. Se ha propuesto el rol del folículo dental y las células del retículo estrellado en la secreción de factores de reclutamiento de monocitos para promover la activación de odontoclastos (Tyrovola et al., 2008).

Por otra parte, los cambios en la innervación pulpar en dientes temporales y los mecanismos involucrados no han sido completamente descritos. En el presente estudio se ha planteado como hipótesis de trabajo, que la reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales es un evento progresivo que puede actuar como injuria sobre las fibras nerviosas que innervan la pulpa dental, promoviendo degeneración axonal y la progresiva denervación de la pulpa dental. Los resultados del estudio permitirán explicar el progresivo declive de la función sensorial en dientes temporales asociados con las etapas finales de reabsorción radicular.

Por lo anterior, el propósito del presente estudio es determinar los cambios en la innervación que ocurren en la pulpa dental coronal durante el proceso de reabsorción radicular en dientes temporales humanos. El estudio se ha enfocado en caracterizar mediante inmunohistoquímica comparativa y microscopía confocal los cambios de la innervación pulpar y reacciones celulares asociadas durante tres etapas definidas de la reabsorción radicular.

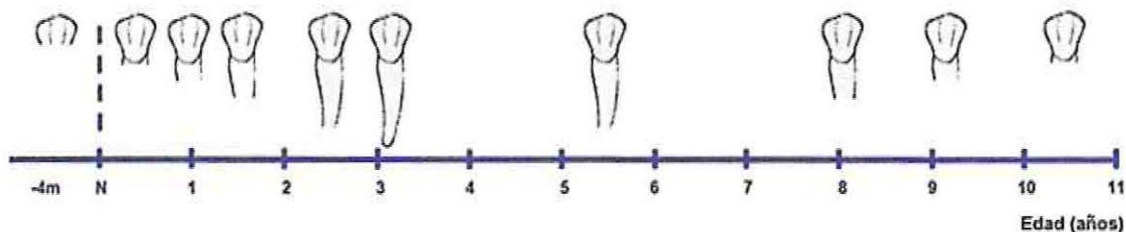
2.1 Pulpa Dental en Dientes Temporales

2.1.1 Generalidades

Las características estructurales de los dientes temporales, especialmente el menor espesor de su esmalte y su dentina, el grado de mineralización, capacidad reparativa de su pulpa, condicionan en mayor o menor medida, el soporte de las fuerzas de masticación, su vulnerabilidad por un lado y su mayor capacidad de respuesta por otro (Gomez de Ferraris y Campos, 2009).

La pulpa dental se origina a partir de las células ectomesenquimáticas de la papila dental, células derivadas de la cresta neural durante el desarrollo temprano cráneo-facial (Chai et al., 2000). La pulpa de dientes temporales tiene un alto potencial para la reparación, lo que sugiere la presencia de células "pluripotenciales" capaces de diferenciarse en diversos tipos de células (Lin et al., 1994).

La pulpa dental de los dientes temporales se caracteriza por tener un periodo de vida más corto que la pulpa de los dientes permanentes (Esquema 1).



Esquema 1: Línea de tiempo ciclo vital dientes temporales (caninos). Procesos de formación y reabsorción (Adaptado de: Koch et al., 2011;(Moorrees et al., 1963).

En la pulpa de los dientes temporales, se distinguen zonas topográficas idénticas a las que se observan en la pulpa de dientes permanentes.

2.1.2 Desarrollo de la inervación y su función

Si bien el dolor es un fenómeno subjetivo, que involucra no sólo respuestas sensoriales fisiológicas, sino también aspectos emocionales, conceptuales y motivacionales del comportamiento, la existencia de neuronas periféricas sensoriales nociceptivas conforma la base para el dolor y de las sensaciones dolorosas, que son provocadas por activación de nervios intradentales. La transmisión de la información sensorial consiste en una cascada de eventos, por lo que el control del dolor dental debe basarse en una comprensión del origen de las señales de dolor y la compleja modulación que puede tener lugar a nivel local y en niveles superiores (Luukko et al., 2011).

De esta manera, neuronas detectan cambios en el ambiente ya sean nocivos o no nocivos y transmiten la información sensorial a través de impulsos eléctricos. Las respuestas sensoriales de la dentina son transmitidas por fibras nerviosas que inervan el complejo dentino-pulpar, siendo el diente un órgano sensorial único (Chung et al., 2013).

Los haces nerviosos que entran en la pulpa de los dientes se componen principalmente de aferentes sensoriales del nervio trigémino y ramas simpáticas del ganglio cervical superior. Cada haz contiene axones miélinicos y no-miélinicos (Torneck, 1994).

Las neuronas aferentes conducen impulsos sensoriales, y las neuronas eferentes proporcionan modulación neurogénica de la microcirculación, reacciones inflamatorias, y quizás regulen la dentinogénesis. Las fibras nerviosas sensoriales suelen ser clasificadas de acuerdo con su diámetro, velocidad de conducción, y su función. La pulpa contiene dos grandes tipos de fibras nerviosas sensoriales: miélinicas (fibras A) y no-miélinicas (fibras C) (Fig.1) (Luukko et al., 2011).

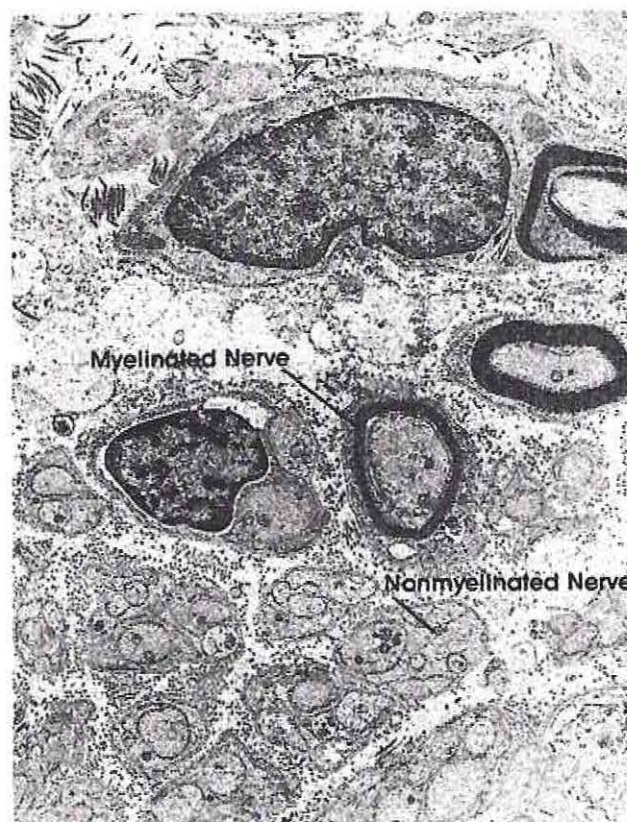


Fig.1: Micrografía Electrónica de una sección transversal de la pulpa dental mostrando axones miélinicos y no-miélinicos (Torneck, 1994).

Fibras A miélinicas: de diámetro 1 a 6 μm en el caso de las fibras A δ y 6 a 12 μm en el caso de las fibras A β . Son de conducción rápida, con una velocidad de 12 to 30 m/s y se asocian a dolor agudo y localizado. Están localizadas en la porción coronal de la pulpa, con una mayor densidad en los cuernos pulpares (Torneck, 1994; Bender, 2000).

Fibras C amielínicas: de diámetro 0.4 a 1.2 μm . Son de conducción lenta, con una velocidad de 0.5 to 2 m/s y se asocian a dolor sordo y difuso. Están localizadas en la zona de tejido pulpar propiamente tal, extendiéndose en la zona rica en células (Torneck, 1994; Bender, 2000).

Dentro de estos tipos hay al menos 6 subtipos de fibras nerviosas sensoriales basadas en su fisiología: A-beta, A-delta rápida, A-delta lenta y 3 tipos de fibras C (Tabla 1). (Byers et al., 2003)

Fisiología	Sensación	Neuroquímica	Activación
Sensorial			
A-beta	Pre-dolor, agudo Dolor	Calbinden, RT-97, CA, PARV, S-100	Vibración, frío intenso, movimiento del fluido dentinario, Serotonina, mostaza, eléctrica (bajo voltaje)
A-delta rápida	Pre-dolor, agudo Dolor	CGRP, p75, CA	Frio intenso, movimiento del fluido dentinario, serotonina, mostaza, eléctrica (medio voltaje)
A-delta lenta	Dolor	CGRP, NGF SP, NKA, p75	Capsaicina, daño pulpar, ATP, frío intenso, eléctrica (alto voltaje)
C-fibra (polimodal)	Dolor	CGRP, SP, NKA, VR1, VRL, p75	Daño pulpar, ATP, calor intenso, eléctrica (alto voltaje)
C-fibra (silenciosa)	Dolor	CGRP, SP, NKA, VR1, VRL, p75	Histamina, Bradiquinina, Capsaicina
C-fibras	Dolor	IB4, GDNF, Gal-R	Daño nocivo del tejido??, eléctrica (alto voltaje)
Simpáticas			
C-fibra		NPY, NE, DBH	Activación simpática, mediadores de la inflamación

Tabla 1: Características de fibras nerviosas en un diente normal (Byers et al., 2003).

Así el diente está inervado por un gran número de axones mielínicos y no-mielínicos. El número de axones que entran en un premolar humano puede alcanzar 2,000 o más, y cada axón se puede ramificar para formar múltiples puntos de inervación (Luukko et al., 2011).

La red que comprende a ambos tipos de axones mielínicos y no-mielínicos forman una red axonal a nivel subodontoblástico denominado como plexo de Raschkow (Avery y Chiego, 2006).

Los caninos temporales humanos totalmente desarrollados tienen significativamente más axones mielínicos que los caninos permanentes, pero el número de axones no-mielínicos era similar (Tabla 2) (Johnsen y Johns, 1978).

	Primary teeth					
	Number of myelinated axons			Number of unmyelinated axons		
	n	Mean	SD	n	Mean	SD
Canines	12	439	71	10	2521	722
Resorbed canines	3	260	22	3	1949	652
Extensively resorbed canine	1	142	—	—	—	—

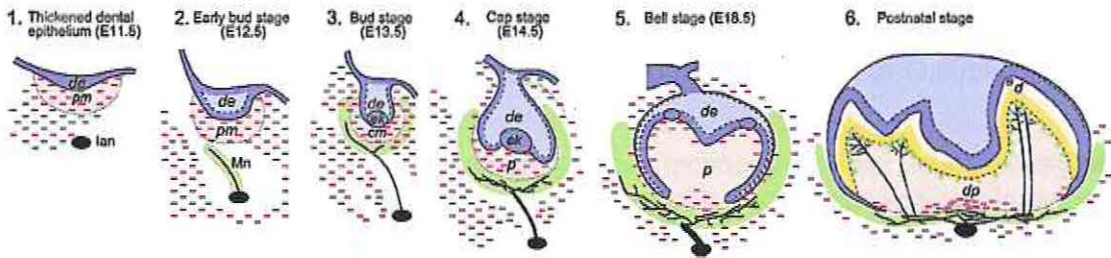
Tabla 2: Número de axones mielínicos y no-mielínicos (Johnsen y Johns, 1978).

Luego, las fibras mielínicas pierden su vaina de mielina y emergen como terminaciones nerviosas (Byers, 1984, Jain et al., 2013). Las terminaciones nerviosas de los dientes son terminaciones libres; no hay material capsular alrededor de las terminaciones y en la mayoría de los casos se extienden mucho más allá de la célula de Schwann y la lámina basal (Byers, 1984).

Por otra parte, cabe destacar que el patrón de inervación se establece tempranamente durante el desarrollo del germen dentario. Así el crecimiento nervioso sensorial dental y su patrón es un proceso gradual que está íntimamente ligado a morfogénesis dental. Tanto el factor de crecimiento nervioso (NGF)* y como la semaforina 3A (Sema3A)** tienen funciones esenciales durante el desarrollo de la inervación y son reiteradamente requeridos en diferentes etapas de este proceso (Esquema 2) (Fried et al., 2000; Luukko y Kettunen, 2014).

* NGF: esencial para el desarrollo de los nervios periféricos, incluyendo el nervio trigémino. Estas proteínas controlan la supervivencia neuronal, la orientación de los procesos nerviosos, la regulación de la densidad de inervación, y la modulación de procesos metabólicos neuronales (Fried et al., 2000). La sobre-regulación de NGF en la periferia de la pulpa coronaria previo al crecimiento de los axones del nervio trigémino sugiere que puede atraer las fibras nerviosas a su objetivo final, en este caso la pulpa dental coronal, posiblemente en combinación con BDNF que también está sobre-regulado en la periferia pulpar (Luukko y Kettunen, 2014).

** Sema3A: tiene un papel esencial en la inervación pulpar controlando la temporización de la penetración de la fibra nerviosa en la pulpa, su patrón y la formación del plexo nervioso en el complejo dentino-pulpar a través de su función quimio-repulsiva. Esto apoya la hipótesis de que la inervación de los dientes está regulada por la actividad coordinada de moléculas neuroregulatorias expresadas localmente ejerciendo influencias (negativas/positivas) sobre las fibras nerviosas dentales crecientes (Moe et al., 2012). Su expresión está regulada por interacciones epitelio-mesenchima, y por factores como TGF- β , FGF y Wnt. De esta manera algunas de las moléculas de señalización que median las interacciones tisulares odontogénicas también regulan la inervación dental, controlando la expresión de moléculas neuroregulatorias (Luukko y Kettunen, 2014).



Esquema 2: Localización de las fibras del nervio trigémino durante diferentes etapas de la morfogénesis dental (Luukko y Kettunen, 2014).

El hecho de que el desarrollo de los dientes y la inervación del nervio trigémino estén estrechamente integrados sugieren que, además de servir para funciones neuronales clásicas tales como la recepción sensorial, los nervios dentales tienen funciones más amplias en el desarrollo y la función del órgano dental (Luukko y Kettunen, 2014).

En este sentido, el hallazgo de que la denervación en dientes de rata resulta en anquilosis radicular, y en la reducción de la distribución de los restos epiteliales de Malassez destaca importantes funciones de las fibras nerviosas diferentes a las funciones neuronales clásicas (Fujiyama et al., 2004).

Esto sugiere que los restos epiteliales de Malassez pueden estar implicados en el mantenimiento del espacio periodontal y que la inervación sensorial podría estar indirectamente asociada. Así la denervación activa la reabsorción de la superficie de la raíz, que posteriormente es reparada por cemento celular, y por otra parte los restos epiteliales de Malassez pueden regular negativamente la reabsorción radicular e inducir la formación de cemento acelular (Fujiyama et al., 2004).

Con respecto a la inervación en dientes temporales como se indicó anteriormente tanto fibras mielínicas como no mielínicas entran por el foramen apical como ramificación del nervio alveolar. Estos nervios se extienden como haces que acompañan paralelamente los vasos sanguíneos, recorriendo el diente de manera axial (Bernick, 1952).

Haces de nervios (nerve bundles) en la pulpa radicular: los nervios que vienen desde el foramen apical, siguen la distribución de los vasos sanguíneos y pasan por la pulpa radicular de manera axial por el diente. En la zona apical el haz nervioso se arboliza en algunas ocasiones. En algunos casos se pueden encontrar fibras nerviosas en la periferia de la pulpa, las que luego de recorrer axialmente la pulpa generan pequeñas arbolizaciones en la zona subodontoblástica. En la zona cervical de la pulpa los haces nerviosos se ramifican en conjunto con los vasos sanguíneos y se dirigen al área periférica. En esta área una parte de pequeños haces alcanzan la zona rica en células y aparecen en la región cervical de la pulpa y constituyen un abundante plexo nervioso subodontoblástico. Las fibras nerviosas se arbolizan desde el plexo y pasan a través de la zona libre de células, terminando entre los odontoblastos (Itoh, 1976).

2.1.3 Complejo Dentino-Pulpar

La organización periférica de la pulpa dental se corresponde con el Complejo Dentino-Pulpar (CDP).

Desde el punto de vista embriológico ambos tejidos dentinario y pulpar tienen su origen en la papila dentaria y funcionalmente los odontoblastos son los responsables de la formación y mantenimiento de la dentina, actividad dentinogénica. Por lo anterior, se le considera como un tejido biológico único, pero con características histológicas diferentes (Gomez de Ferraris y Campos, 2009; Couve et al., 2013).

La interrelación entre los componentes del CDP es de gran importancia durante el desarrollo fisiológico para la mantención y reparación de los tejidos (Smith, 2000).

Desde el punto de vista topográfico podemos observar en el CDP cinco zonas diferentes: la interfase dentina/predentina, la capa odontoblástica, la zona acelular de Weil, la capa sub-odontoblástica o zona rica en células y la zona central de la pulpa o tejido pulpar propiamente tal (Fig.2) (Gomez de Ferraris y Campos, 2009).

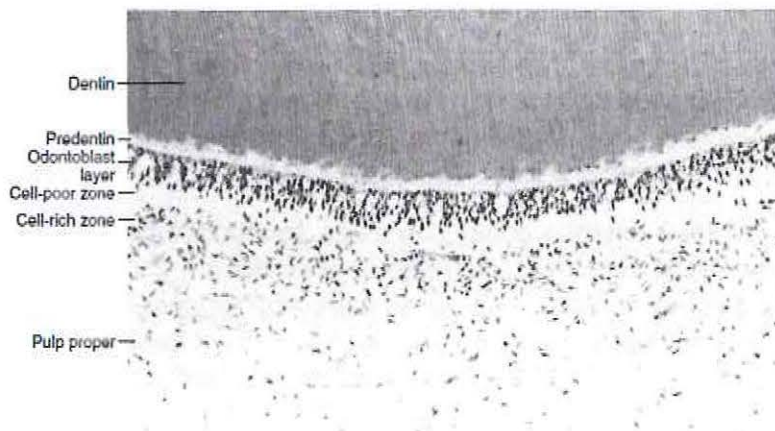


Fig.2: Zonas topográficas del complejo dentino-pulpar (Luukko et al., 2011).

El CDP es una unidad funcional capaz de desarrollar una actividad dentinogénica, defensiva y sensorial.

Su actividad *dentinogénica* función principal del odontoblasto, como se mencionó anteriormente, implica una cadena de diferentes mecanismos tales como la diferenciación y las interacciones de células, la síntesis de una matriz orgánica, y la eventual formación de cristales minerales en esta matriz extracelular. En la dentinogénesis podemos encontrar tres grandes etapas de secreción de: Dentina Primaria, Dentina Secundaria y Dentina Terciaria (Linde y Goldberg, 1993).

Dentina Primaria: El diente está formado mayormente por dentina primaria, que contornea la cámara pulpar. La capa exterior de la dentina primaria, dentina del manto, difiere del resto de la dentina, siendo la capa formada por odontoblastos recién diferenciados, de 150 μm de ancho con una matriz orgánica que consiste en la sustancia fundamental, la matriz está ligeramente menos mineralizada (4%) que el resto de la dentina primaria, la cual es la dentina circumpulpar (Torneck, 1994).

Dentina Secundaria: Se desarrolla luego de que la formación radicular se ha completado. La dentina secundaria representa la continuidad, pero mucho más lenta, de la deposición dentinaria por odontoblastos. La dentina secundaria tiene un patrón incremental y una estructura tubular menos regular que la dentina primaria, pero se continúa con ella. Aunque se deposita alrededor de la periferia del espacio de la pulpa, no se deposita uniformemente, especialmente en los dientes molares. Hay una mayor deposición de dentina secundaria en el techo y el piso de la cámara pulpar, lo que conduce a una reducción asimétrica en el tamaño y forma de la cámara y de los cuernos pulpares. Estos cambios en el espacio pulpar, pueden detectarse fácilmente en las radiografías y son importantes en la determinación de la forma de preparación de la cavidad (Torneck, 1994).

Además, los odontoblastos son las primeras células que *responden defensivamente* frente a los estímulos nocivos provenientes del medio externo, esta respuesta por parte de los odontoblastos es la secreción de dentina terciaria que se forma adyacente a los túbulos dentinarios. Se han propuesto dos tipos de dentina terciaria (Smith et al., 1995):

- Dentina Reaccional: matriz de dentina terciaria secretada por células odontoblásticas sobrevivientes, en respuesta a un estímulo de leve a moderado.
- Dentina Reparativa: Matriz de dentina terciaria secretada por una nueva generación de células odontoblásticas en respuesta a un estímulo severo. Esto ocurre después de la muerte de los odontoblastos post-mitóticos originales, que son los responsables de la secreción fisiológica de dentina primaria y secundaria.

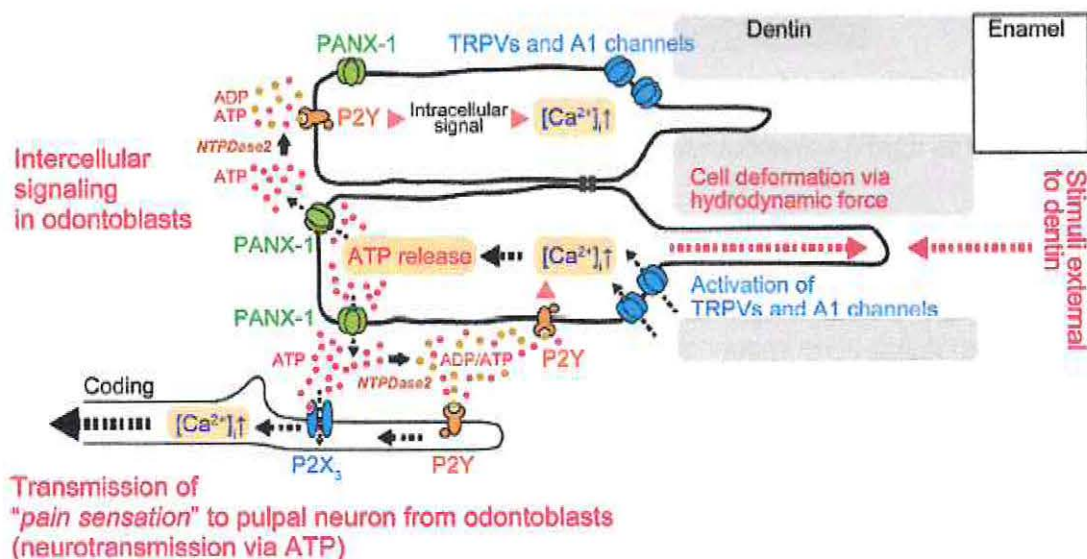
Cabe destacar, que los odontoblastos están acoplados a través de uniones intercelulares, uniones gap, formando una empalizada y juegan así un rol en los mecanismos defensivos y la estimulación de respuestas inflamatorias ante la invasión patógena a través de los túbulos dentinarios, creando una barrera pre-dentina-odontoblasto que constituye la primera línea de defensa contra patógenos (Couve et al., 2013).

Con respecto a su *actividad sensorial*, podemos decir que el CDP es altamente sensitivo a los cambios de temperatura, eléctricos, químicos y de presión. Hay teorías que intentan explicar este fenómeno (Chung et al., 2013):

- 1) Teoría de inervación directa: se basa en que los nervios llegan a la unión amelodentinaria.
- 2) Teoría hidrodinámica: se basa en la premisa de que cuando la dentina es estimulada, los fluidos y el proceso odontoblástico se mueven dentro de los túbulos, haciendo contacto con los terminales nerviosos.
- 3) Teoría de transducción: se basa en que el proceso odontoblástico es el receptor de los estímulos conduciendo el dolor a los terminales nerviosos en la periferia pulpar.
- 4) Teoría del odontoblasto como receptor hidrodinámico (Esquema 3): se investigó la transducción de la señal intercelular entre odontoblastos y neuronas ganglionares del trigémino (TG), después de la estimulación mecánica directa de odontoblastos. La estimulación mecánica de odontoblastos individuales aumentó la concentración de calcio intracelular libre, mediante la activación del receptor mecanosensitivo transitorio (TRP) posiblemente de los canales TRPV1, TRPV2, TRPV4, y TRPA1, pero no TRPM8. En co-cultivos de odontoblastos y TG neuronas, los incrementos en calcio intracelular no sólo se han observado en odontoblastos mecánicamente

estimulados, sino también en odontoblastos vecinos y TG neuronas. (Shibukawa et al., 2014)

El ATP liberado por odontoblastos estimulados mecánicamente mediante panexina-1 en respuesta a la activación del canal TRP, transmite una señal a receptores en las neuronas TG (P2X3). Se sugiere que los odontoblastos son células receptoras sensoriales que detectan las fuerzas hidrodinámicas dentro de los túbulos dentinarios vía canales TRP y que el ATP liberado por los odontoblastos funciona como un neurotransmisor en la secuencia de transducción sensorial para el dolor dentinario (Esquema 3) (Shibukawa et al., 2014).



Esquema 3: Esquema de la comunicación química odontoblasto-TG neurona y odontoblasto-odontoblasto (Shibukawa et al., 2014).

De esta manera, el complejo dentino-pulpar es protector gracias a su respuesta ante estos estímulos (Avery y Chiego, 2006).

2.1.4 Inervación del Complejo Dentino-Pulpar

Fibras nerviosas en la pulpa coronal: las fibras se arbolizan en pequeños haces que se irradian en la periferia inervando todas las superficies del diente. Estas fibras forman una red nerviosa adyacente a la zona rica en células de la pulpa. Esta red se conoce como plexo de Raschkow. En la porción coronal, excepto en el cuerno pulpar, este plexo va paralelo a la capa odontoblastica (Fig.3). Por otra parte en el cuerno pulpar las fibras nerviosas se dividen en abanicos que se superponen alternativamente. En la zona media de la corona se observan troncos más pequeños y más numerosos que los observados en dientes definitivos (Mohiuddin, 1950; Itoh, 1976; Rodd y Boissonade, 2001; Monteiro et al., 2009).

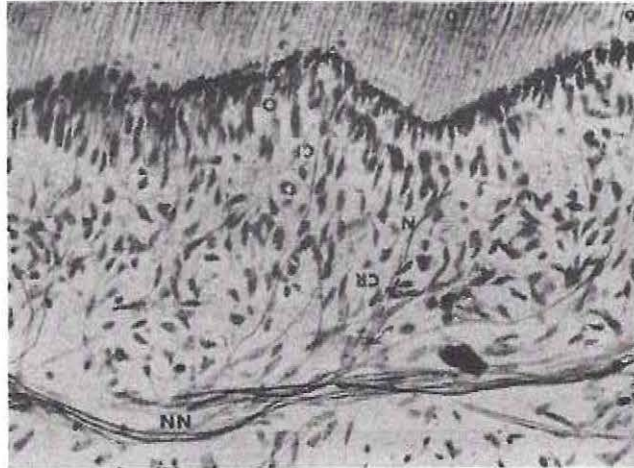


Fig.3: Cámara pulpar en un diente temporal sin reabsorción. Las fibras amielínicas forman una red que termina con ramificaciones entre los odontoblastos (Rapp et al., 1967).

Distribución de fibras nerviosas en la capa odontoblástica y predentina: se ha observado que la dentina de los dientes temporales está inervada. En la mayoría de las muestras se puede observar una continuidad de las fibras nerviosas en la pulpa y en la dentina (Egan et al., 1999). Así al observar las fibras nerviosas en la pulpa radicular no se observan en la capa subodontoblástica u odontoblástica excepto en raras instancias. Cerca de la porción coronal de la pulpa el plexo subodontoblástico está bien desarrollado en la proximidad de la zona rica en células. Algunas fibras terminan bajo la capa subodontoblástica o en la capa odontoblástica, otras pasan la zona libre de células y la capa odontoblástica y terminan en la proximidad del borde pulpo-predentinario o penetran en la predentina. Se observan algunas fibras delgadas que viajan entre fibroblastos, penetran la capa odontoblástica y llegan a la predentina éstas últimas son las fibras de Von Korff (Bernick, 1952; Itoh, 1976).

Las fibras nerviosas que entran en la predentina pueden ser clasificadas en 3 tipos debido a su trayectoria. El primer tipo penetra en los túbulos dentinarios en la predentina y van directamente hacia el frente de calcificación. El segundo tipo al llegar a la predentina va oblicuamente o transversalmente, después de penetrar en el centro de la predentina, las fibras nerviosas pasan en ángulos rectos a los túbulos de la dentina en paralelo al límite predentina-dentina, estas fibras recorren una distancia más corta que en los dientes permanentes. El tercer tipo entra en los tubulos dentinarios, alcanzan el límite predentina-dentina forman una curva y vuelven a la capa odontoblástica, donde terminan (Itoh, 1976).

Hay mucha controversia acerca la sensibilidad de la dentina de la dentición temporal. Algunos dentistas tienen la percepción de que el diente temporal es menos sensible que el definitivo. Estudios exactos para determinar la sensibilidad en la dentición primaria han sido difíciles de realizar debido a la edad y la comprensión de los pacientes odontopediátricos. Aun así se ha mostrado que la dentición temporal está inervada, siendo la zona con mayor inervación la región cervical del diente. Lo anterior fundamenta completamente el uso de anestesia local en procedimiento invasivos en dientes temporales con vitalidad pulpar (Egan et al., 1999).

2.1.5 Células Gliales y regeneración de la inervación

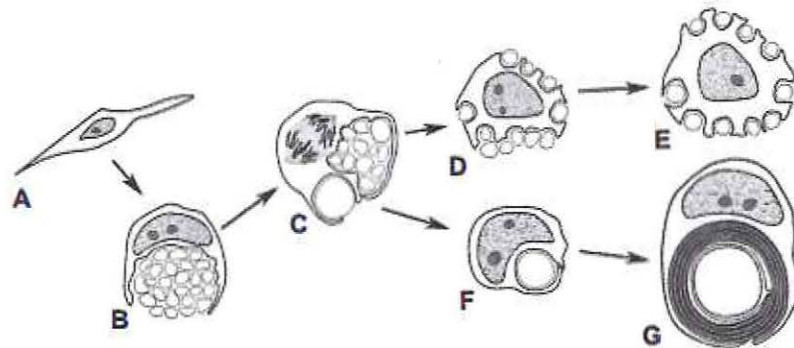
Las células de Schwann son reconocidas como unas de las células más complejas del sistema nervioso periférico (SNP), son células que evidencian un alto grado de plasticidad, siendo capaces de transformarse rápidamente durante el desarrollo y en respuesta a lesiones de axones periféricos (Kidd et al., 2013).

Se originan a partir de células que migran de la cresta neural y que dan lugar a muchos tipos celulares, la cascada precisa de señales que generan que las células de la cresta neural entren en el linaje de células de Schwann no ha sido completamente dilucidado (Kidd et al., 2013).

Durante el desarrollo, las células de Schwann se asocian con haces de axones a medida que se extienden en la periferia, apoyan el crecimiento axonal durante esta fase, generando una variedad de factores de crecimiento (Kidd et al., 2013).

Son así, las principales células gliales del SNP, mielinizando los axones. La vaina de mielina sirve como aislamiento disminuyendo de ese modo la capacitancia de la membrana del axón y aumentando la velocidad de conducción (Ydens et al., 2013).

Con respecto a los estados de diferenciación de células de Schwann durante el desarrollo, en una primera etapa la célula de Schwann migra y rodea el haz de axones, segrega un axón de mayor diámetro y luego se divide. Una célula derivada de esta división, mieliniza el axón segregado, mientras que la otra célula permanece asociada con el haz de axones en desarrollo. Esta segregación del axón y división celular continúa hasta que el axón es mielinizado o es parte del soporte de axones no-mielinizados formando las denominadas fibras de Remak (Esquema 4) (Kidd et al., 2013).



Esquema 4: Estados de diferenciación de células de Schwann durante el desarrollo. A: migración célula de Schwann, B: rodea el haz de axones, C: segregación de un axón, D-E: célula asociada al haz de axones no-mielínicos, fibra de Remak, F-G: célula mieliniza el axón segregado (Kidd et al., 2013).

Dentro de la distribución de las principales proteínas de mielina podemos encontrar la proteína básica de la mielina (MBP) que se localiza en la superficie citoplasmática de la célula de Schwann, permitiendo la compactación de la mielina (Kidd et al., 2013).

Cada unidad de células de Schwann no-mielinizantes (fibra de Remak) en una sección transversal, incluye una única célula de Schwann y por lo general múltiples axones. Por

definición, las células de Schwann no-mielinizantes (fibra de Remak) si bien se caracterizan por la falta de expresión de mielina, también se caracterizan por expresar moléculas de adhesión celular y receptores de superficie que están disminuidos en células mielinizantes. Esta relación entre las células de Schwann no-mielinizantes y axones sugiere funciones específicas en el mantenimiento axonal (Kidd et al., 2013)

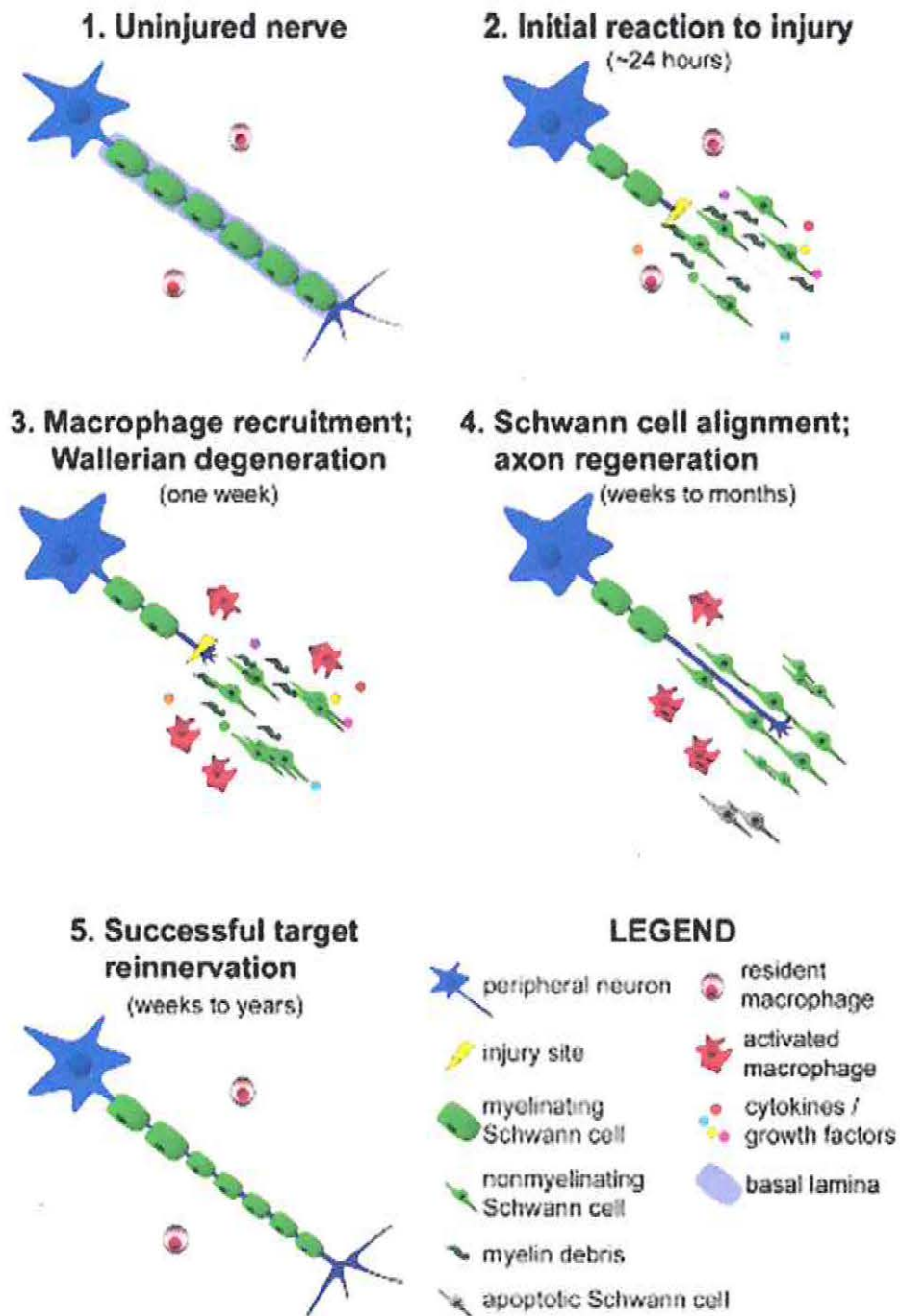
Después de una lesión, las células mielinizantes degradan su mielina y se desdiferencian en células no-mielinizantes, readquiriendo capacidades propias del desarrollo temprano, incluyendo la proliferación, la producción del factor de crecimiento, la regeneración de brotes de axones y la mielinización (Mirsky et al., 2008; Kidd et al., 2013).

De esta manera, la característica más notable de las células de Schwann es que no sólo se diferencian en una célula altamente especializada productora de mielina, sino que también pueden revertir el proceso de diferenciación y volver a una célula no-mielinizante capaz de remielinizar axones. La desdiferenciación es rápida y relativamente completa. Luego de la transección axonal, las células de Schwann regulan negativamente la producción de proteínas de mielina incluyendo MBP (Kidd et al., 2013).

Cuando se altera este sistema bien organizado, cualquiera de las funciones del SNP puede verse afectada. Tras la neurodegeneración, se desencadena una respuesta inmune. Los macrófagos reclutados fagocitan activamente desechos y producen mediadores tóxicos, lo que contribuye al daño del nervio. Las células T también se infiltran en el nervio periférico y promueven la respuesta inmune local mediante la producción de citoquinas y quimioquinas. Cabe destacar en este sentido que células no inmunes, tales como la microglia en el sistema nervioso central o células de Schwann en el sistema nervioso periférico, desempeñan un papel clave en la respuesta inmune innata y adaptativa. Al igual que la microglía, las células de Schwann realizan un reconocimiento de señales de peligro endógenas y exógenas (Ydens et al., 2013).

Una injuria como la axotomía o aplastamiento de un nervio periférico conduce a la degeneración del segmento distal del nervio este proceso se conoce como Degeneración Walleriana (WD). Durante WD (Esquema 5) se crea un microambiente que permite un exitoso rebrote de las fibras nerviosas del segmento proximal del nervio. Las células de Schwann responden a la degeneración axonal con desmielinización, disminución en la regulación de genes de mielina, desdiferenciación y proliferación. Finalmente se alinean en tubos (bandas Büngner) y expresan moléculas en su superficie que guían la regeneración de las fibras (Stoll y Muller, 1999).

Durante este proceso los macrófagos son rápidamente reclutados al segmento distal y eliminan la gran mayoría de los restos de mielina. Así la respuesta inflamatoria se inicia por la desintegración axonal en el segmento distal del nervio: esto genera una permeabilización de la barrera neurovascular y activa a las células de Schwann cercanas y los macrófagos residentes a través de receptores sensibles al daño tisular. Cambios moleculares en el segmento distal de la fibra nerviosa incluyen la regulación positiva de las neurotrofinas, moléculas de adhesión celular neural, citoquinas y otros factores solubles y sus correspondientes receptores (Stoll y Muller, 1999; Gaudet et al., 2011).



Esquema 5: Progresión de la degeneración Walleriana y regeneración axonal después de la lesión en el nervio periférico (Gaudet et al., 2011).

2.1.6 Células Inmuno-competentes y defensa del CDP

La defensa contra microorganismos tiene lugar primero, a través de la inmunidad innata y las respuestas posteriores, a través de la inmunidad adaptativa (Abbas et al., 2008).

La inmunidad innata aporta la primera línea de defensa frente a microbios, sus principales componentes son: barreras físicas y químicas (por ej. epitelio), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales-NK), proteínas sanguíneas como los factores del sistema del complemento y mediadores de la inflamación, y citoquinas (Abbas et al., 2008).

Dentro de la inmunidad adaptativa existen dos tipos: inmunidad humoral e inmunidad celular. La inmunidad humoral cuenta con anticuerpos producidos por linfocitos B, que reconocen los antígenos, neutralizan su capacidad infecciosa y los marcan como diana para su eliminación por mecanismos efectoros; es así el principal mecanismo de defensa contra microbios extracelulares y sus toxinas. La inmunidad celular cuenta con los linfocitos T, los microbios intracelulares (como virus y algunas bacterias) sobreviven y proliferan al interior de fagocitos y otras células. Las defensas contra estas infecciones, corresponde a la inmunidad celular que fomenta la destrucción de microorganismos residentes para suprimir reservorios de infección. El inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas y su desarrollo requiere de la captación de antígenos y su exposición ante linfocitos específicos. Las células que cumplen esta misión se denominan células presentadoras de antígenos, las más especializadas son las células dendríticas, que atrapan los antígenos, los transportan hacia los órganos linfáticos y los presentan a linfocitos T, desencadenando la respuesta inmunitaria (Abbas et al., 2008).

La pulpa dental está rodeada por tejidos duros, que comprenden una barrera física contra los patógenos y las lesiones iatrogénicas. Una vez que la integridad de esta barrera es vulnerada, elementos nocivos de origen externo pueden entrar en el tejido pulpar (Jontell et al., 1998).

De esta manera, la defensa del complejo dentino-pulpar implica una variedad de sistemas biológicos, en la que el sistema inmune desempeña un papel fundamental (Jontell et al., 1998).

Así en la pulpa dental además de las células asociadas a la inervación y vascularización, otros tres tipos de células son constituyentes: macrófagos, célula dendrítica y linfocitos. Estas células participan en la inmuno-sobrevivencia de la pulpa. La cantidad de células dendríticas y macrófagos constituye cerca del 8% de las células en la pulpa dental, con una relación de 4:1 respectivamente (Torneck, 1994).

Los macrófagos son monocitos que han dejado en el torrente sanguíneo, entrado en los tejidos, y diferenciado en diversas subpoblaciones. Una subpoblación importante es bastante activa en la endocitosis y fagocitosis. El material ingerido es destruido por la acción de enzimas lisosómicas. Otro subconjunto de macrófagos participa en las reacciones inmunes en el procesamiento de antígenos y presentación a linfocitos T de memoria. El antígeno procesado se une a moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre el macrófago, donde puede interactuar con receptores específicos presentes en linfocitos T. Cuando se activa por estímulos inflamatorios apropiados, los macrófagos son capaces de producir una gran variedad de factores

solubles, incluyendo la interleucina 1, el factor de necrosis tumoral, factores de crecimiento y otras citoquinas (Luukko et al., 2011).

Las células dendríticas (DCs) se caracterizan por tener procesos citoplásmicos dendríticos y la presencia de complejos de MHC de clase II en su superficie celular. En la pulpa normal, que se encuentran principalmente en la periferia de la pulpa coronal cerca de la predentina pero pueden migrar al centro de la pulpa por estimulación de antígenos. Juegan un papel central en la inducción de la inmunidad dependiente de linfocitos T. Al igual que los macrófagos presentadores de antígeno, las células dendríticas fagocitan antígenos de proteína y luego los presentan (Luukko et al., 2011). Se ha demostrado que estas células son heterogéneas en términos de fenotipo y función, incluyendo células con características comparables con las de DCs en otros tejidos (Jontell et al., 1998).

Se ha reportado el hallazgo de linfocitos T en pulpas normales de dientes humanos. Así la presencia de macrófagos, células dendríticas, y linfocitos T indica que la pulpa está bien equipada con las células requeridas para el inicio de las respuestas inmunes (Luukko et al., 2011).

2.2 Reabsorción radicular fisiológica en dentición temporal

El desarrollo de la dentición, luego de que se han formado los tejidos mineralizados de la corona y raíz, continúa a través de la vida postnatal hasta que el diente erupciona desde el alveolo alcanzando la posición funcional de oclusión (Wise et al., 2002).

El movimiento de los dientes durante la erupción consiste en la preparación de una vía de erupción a través del hueso y tejidos blandos. Esta vía se genera con la reabsorción de hueso, la reabsorción radicular de los dientes temporales y remoción de tejidos blandos incluyendo el paso a través del epitelio (Marks y Schroeder, 1996).

Así la erupción y exfoliación son procesos complejos que involucran eventos programados y la función coordinada de osteoblastos, osteoclastos, odontoclastos, folículo dental y células del ligamento dental (Wise et al., 2002).

La reabsorción es un proceso que resulta en la pérdida del tejido mineralizado. Es un fenómeno con una etiología multifactorial que concierne tanto al hueso, siendo necesario un adecuado proceso de remodelado óseo, como a los tejidos duros del diente. En el caso de la reabsorción fisiológica, ésta ocurre sólo en la dentición temporal (Majewska-beska y Szczepanska, 2012).

Los eventos precisos que inician y controlan la reabsorción radicular en dientes temporales han sido difícil de explicar (Harokopakis-Hajishengallis, 2007). Al parecer es dependiente de la erupción del germen del diente definitivo, del desarrollo general del organismo y de fuerzas oclusales (Obersztyn, 1963).

De esta manera la reabsorción radicular es un proceso fisiológico fundamental en el ciclo vital del diente temporal, que permite finalmente la erupción del diente definitivo, siendo clave en el proceso de crecimiento y desarrollo.

Dentro de los procesos y células implicados en el proceso de reabsorción están:

Remodelación Ósea y Rol del Osteoclasto:

La diferenciación de los osteoclastos, células involucradas en la remodelación ósea, depende del ligando RANK (RANKL) y de la osteoprotegerina (OPG) que regula negativamente la osteoclastinogénesis y estimula la apoptosis de osteoclastos. El receptor de RANKL es RANK y está localizado en la superficie del osteoclasto (Harokopakis-Hajishengallis, 2007; Tyrovola et al., 2008).

Otro factor importante en la regulación del proceso es M-CSF, un factor de crecimiento producido por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y monocitos, uno de los mecanismos de acción de M-CSF es la sobre-regulación de RANK y la disminución de OPG, promoviendo la formación, fusión, diferenciación, activación y sobrevivencia de osteoclastos. La diferenciación de osteoclastos también está estimulada por citoquinas (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-11 y IL-17) (Harokopakis-Hajishengallis, 2007).

Se puede concluir que OPG, RANKL y RANK forman una red clave en la regulación del metabolismo óseo y la biología del osteoclasto (Tyrovola et al., 2008).

Rol del Folículo Dental:

Originado del mesenquima de la cresta neural, el folículo dental es un saco de tejido conectivo laxo que rodea al órgano de esmalte de cada diente (Wise et al., 2002).

La importancia del folículo dental en el proceso de erupción se demostró en estudios en perros, en los que se removió el folículo de premolares y no hubo erupción (Cahill y Marks, 1980). Además dejando el folículo intacto, removiendo el diente e insertando una réplica artificial, resultó en la erupción del diente artificial (Marks y Cahill, 1984).

Estos estudios eliminan las teorías previas de erupción, debido a que posibles tejidos propulsivos como la pulpa y las raíces estaban ausentes (Wise et al., 2002).

La reabsorción de los dientes temporales es más avanzada en las áreas adyacentes al folículo dental, y los períodos de reabsorción se alternan con períodos de reparación (Furseth, 1968).

Por otra parte, factores citotróficos liberados por el folículo dental y el retículo estrellado, como el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), interleuquina-1 α y el factor de crecimiento transformante β 1 estimulan la expresión de RANKL durante el proceso de erupción, lo que en consecuencia conduce a una reabsorción radicular fisiológica de los dientes temporales y una exitosa erupción de los dientes definitivos (Tyrovola et al., 2008).

Así el folículo dental del diente permanente y el tejido conectivo adyacente a la raíz del diente temporal podrían jugar un papel importante en el desarrollo y la activación de odontoclastos antes y en el momento específico del inicio de la reabsorción radicular fisiológica (Sahara, 2001).

Odontoclastos:

Las células responsables de la reabsorción del tejido dental son los odontoclastos, que liberan enzimas hidrolíticas que desmineralizan los cristales de apatita del tejido dental y subsecuentemente degradan proteínas de dentina por acción de la cathepsina K y MMP-9 (Sasaki et al., 1988; Harokopakis-Hajishengallis, 2007).

Las células progenitoras de los odontoclastos residen en la pulpa dental y ligamento periodontal, comparten características similares con los osteoclastos tales como la expresión de la cathepsina K, la cathepsina D, fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), metaloproteinasas de la matriz (MMP-9), H⁺ ATPasa y la formación de bordes rugosos (Wang y McCauley, 2011).

Estudios inmunohistoquímicos han mostrado que el receptor RANK es expresado por odontoclastos y el RANKL por odontoblastos, fibroblastos de la pulpa, ligamento periodontal y cementoblastos. Estudios similares han mostrado que M-CSF y OPG son expresadas por odontoblastos, ameloblastos y células del tejido pulpar. La regulación de la expresión de RANKL, OPG y M-CSF por estas células dentales parecen ser importantes para la diferenciación y activación de los preodontoclastos durante la reabsorción radicular fisiológica y patológica (Harokopakis-Hajishengallis, 2007).

Si bien la protección de la raíz frente a la reabsorción mientras el hueso está en constante degradación es un fenómeno no resuelto, es más intrigante el porqué las raíces de la

dentición temporal se reabsorben fisiológicamente mientras las de la dentición definitiva no (Harokopakis-Hajishengallis, 2007).

Dado que la distribución de las proteínas de la matriz extracelular es diferente en dientes temporales que en definitivos, puede que la activación de osteoclasto/odontoclasto sea dependiente de la matriz extracelular (Lee et al., 2004).

Ligamento Periodontal:

Dos proteínas de la matriz extracelular asociadas a la adhesión y activación de odontoclastos, sialoproteína ósea y osteopontina, se han encontrado mayormente expresadas en el ligamento periodontal de dientes temporales. Lo que sugiere una expresión diferente de las proteínas de la matriz extracelular entre ambas denticiones, lo que podría actuar como señalización selectiva para la adhesión del odontoclasto y por consiguiente de la reabsorción radicular de los dientes temporales (Lee et al., 2004).

Además hay estudios que demuestran que el ligamento periodontal del diente temporal sintetiza RANKL y OPG favoreciendo la osteoclastogénesis (Hasegawa et al., 2002). Células del ligamento periodontal en proceso de reabsorción radicular expresan disminución de los niveles de OPG y aumento de los niveles de RANKL, el que es probable que interactúe con RANK en la membrana del odontoclasto (Fukushima et al., 2003).

Así RANKL es expresado en fibroblastos del ligamento y osteoblastos en el lado comprimido del ligamento, donde pareciera que la osteoclastogénesis se da en respuesta a un estrés mecánico (Kanzaki et al., 2002).

Las constantes fuerzas masticatorias debilitan el ligamento periodontal de los dientes temporales lo que puede causar necrosis del ligamento lo que genera producción local de citoquinas, bajo la influencia de las citoquinas los macrófagos y monocitos son reclutados (Kanzaki et al., 2002).

Por otra parte, la reabsorción radicular de los molares inferiores temporales sin sucesores permanentes comienza más tarde que la reabsorción fisiológica. En los molares temporales sin gérmenes permanentes, odontoclastos y células inmunes estaban presentes principalmente en la pulpa apical en el inicio de reabsorción radicular. Esto sugiere que la pulpa dental de los molares temporales, así como las células inmunes, pueden desempeñar un papel importante en la reabsorción radicular en molares primarios sin gérmenes de dientes permanentes. Además esto sugiere que, en ausencia de diente permanente, las células mononucleares TRAP-positivas podrían entrar la pulpa dental antes del comienzo de la reabsorción de la raíz, fusionándose aquí para formar odontoclastos (Lin et al., 2012).

Cementoblastos:

En la fase activa de la reabsorción radicular, se observan mayor cantidad de odontoclastos con un borde rugoso bien desarrollado y una clara reducción de la zona, presencia de cementoblastos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, y muchos vasos sanguíneos. Los cementoblastos estuvieron presentes en la reabsorción de la superficie de la dentina adyacente a odontoclastos y, en muchos casos, estas células se comunicaban entre sí a través de las uniones gap (Sasaki et al., 1990; Sahara, 2001).

Epitelio Gingival:

Se sugiere que la unión dentogingival, así como epitelio gingival, desempeñan papeles importantes en el proceso de exfoliación de los dientes temporales humanos. Después de la reabsorción de las raíces, la unión dentogingival migra a lo largo del interior de la superficie de reabsorción y finalmente alcanza la superficie de la pulpa coronal. Al mismo tiempo, el epitelio gingival también prolifera y migra bajo la corona del diente en la superficie que recubre la erupción del diente de sucesión (Sahara et al., 1993).

Fluido Crevicular:

Otro factor que puede influir en la reabsorción es el contenido del fluido crevicular. Se observó una concentración elevada de fosfoproteínas en dientes temporales en proceso de reabsorción radicular, como también en dientes permanentes con reabsorción patológica (Mah y Prasad, 2004).

2.3 Reabsorción radicular fisiológica y Pulpa Dental en Dientes Temporales

Considerar si existe cualquier cambio en la histología pulpar en el proceso de reabsorción fisiológica es fundamental para tomar decisiones de tratamiento informadas en dientes temporales (Monteiro et al., 2009).

El proceso de reabsorción de la dentina coronal de dientes temporales muestra claramente cambios histológicos relacionados con el tiempo. Durante el tiempo de reabsorción, el tejido pulpar conservó su estructura normal. Sin embargo, cuando la reabsorción radicular se acercaba a su finalización, células inflamatorias comenzaron a infiltrarse gradualmente en la pulpa, y los odontoblastos se comenzaron a degenerar. Después de esto, odontoclastos multinucleados aparecieron, y con ello la reabsorción de la predentina a la dentina (Sahara et al., 1992).

La actividad odontoclástica se detectó inicialmente sólo en la superficie pulpar de las zonas inferiores de la corona. Poco a poco se extendió hacia las regiones del cuerno pulpar a lo largo de la pared de la cámara pulpar. Finalmente la superficie de la dentina reabsorbida fue revestida de tejido conectivo fibroso (Sahara et al., 1992).

Por otra parte, la pulpa de dientes temporales expresa factores inhibitorios (OPG, Cbfa-1, y posiblemente TGF- β) y estimuladores (RANKL, MCP-1, y CSF-1), siendo la expresión de éstos últimos significativamente mayor en etapas avanzadas de reabsorción en comparación con los dientes permanentes (Yildirim et al., 2008).

Así las células del tejido pulpar de dientes temporales en la última etapa antes de exfoliación expresan factores reguladores claves para la actividad osteo / odontoclásticas como el sistema RANKL / OPG y CSF-1 conocidos por regular la diferenciación de los osteoclastos y su maduración (Yildirim et al., 2008).

Cabe destacar estudios que postulan, que si bien se observa disminución de la densidad de inervación, aumento de células inmuno-competentes, y aumento de la vascularización, evidentes en dientes temporales con el progresivo proceso de reabsorción radicular en dientes temporales, estas diferencias no son estadísticamente significativas (Monteiro et al., 2009).

Inervación durante la reabsorción radicular fisiológica

Los dientes temporales en proceso de exfoliación muestran marcados cambios en su pulpa.

La alta correlación entre el número de axones mielínicos y no-mielínicos en los dientes temporales indica una asociación entre éstos, y durante la reabsorción radicular, se degeneran (Johnsen y Johns, 1978).

Se observan varicosidades, lo que se acepta como signo definitivo de degeneración. En general, los cambios degenerativos sólo eran demostrables en axones de alrededor de 1 μ o más de diámetro. Los axones más finos desaparecieron en las últimas etapas de la reabsorción de la raíz sin precedente de cambios en su estructura (Mohiuddin, 1950).

Los cambios degenerativos (Fig. 4) en fibras nerviosas mielínicas ocurren temprano en el proceso de reabsorción radicular. Cambios degenerativos similares se han reportado en otros estudios de fibras nerviosas durante la degeneración Walleriana. Los dientes

temporales parecen ser un buen modelo para la observación de la degeneración nerviosa fisiológica (Karlsson et al., 1974).

Al parecer el cambio más temprano y más persistente es el aumento en el espesor de manera desigual en los axones. Esto es seguido por la formación de varicosidades, que más tarde se convierten en vesículas. Las vesículas probablemente estallan, lo que deja axón dentado o irregular. Finalmente se produce la fragmentación en gránulos lo que parece estar seguido por disolución (Mohiuddin, 1950; Rapp et al., 1967).

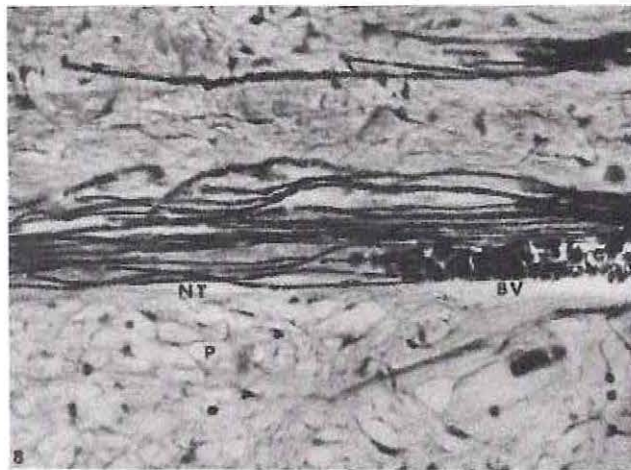


Fig. 4: Cámara pulpar en un diente temporal con reabsorción. Evidencia de cambios degenerativos tempranos en la fibra nerviosa (Rapp et al., 1967).

Los cambios degenerativos descritos anteriormente no se desarrollaron en el mismo grado en todas las fibras en un diente en proceso de exfoliación, ni en todas las fibras en un solo diente. Algunas fibras mostraron cambios avanzados, mientras que fibras adyacentes no mostraron ninguno en absoluto (Mohiuddin, 1950).

Lo anterior puede explicar lo encontrado en otros estudios en donde algunas fibras nerviosas que se encontraron en dientes temporales con reabsorción, mostraron una morfología similar a la apariencia que se describe en un cambio degenerativo. Sin embargo, otras fibras mostraron una morfología similar a la encontrada en dientes permanentes en los que no hay reabsorción (Fearnhead, 1961).

Por otra parte la degeneración no se propaga a las fibras madre de los troncos nerviosos dentales o los grandes haces de fibras que se dividen dentro de los maxilares. Así los axones involucrados en la inervación del diente temporal se retiran y emiten brotes emergentes al diente permanente de reemplazo. Por lo tanto, un axón puede transitoriamente inervar tanto una pulpa de un diente temporal y la de su sucesor permanente (Brenan, 1986).

Con el avance de la reabsorción, el número de fibras nerviosas visto en la pulpa disminuyó de manera constante, tanto es así que en las últimas etapas, sólo fragmentos de axones finos podían ser observados, y la arborización normal de fibras había desaparecido completamente. La corona del diente entonces parecía descansar sobre un tejido de granulación, en el que casi no había fibras nerviosas. Cabe señalar entonces que esta

temprana degeneración terminal en los nervios de los dientes temporales probablemente puede explicar la ausencia de dolor cuando se exfolian (Mohiuddin, 1950; Bernick, 1952).

Las señales moleculares que regulan la de- y regeneración de los axones de la pulpa durante el desarrollo de este importante evento siguen siendo desconocidos. Es probable que la degeneración axonal pulpar se produce por liberación de factores moleculares liberados por las células de la pulpa durante la reabsorción radicular, tal vez en respuesta a cambios inflamatorios locales (Fried et al., 2000).

Es probable que los diferentes eventos están interconectados de manera que la erupción de un diente permanente provoca la reabsorción y exfoliación del diente temporal correspondiente, con los cambios neuronales que ocurren en respuesta a esta reorganización (Fried et al., 2000).

Capa odontoblástica durante la reabsorción radicular fisiológica

Los odontoblastos durante la reabsorción del diente temporal pierden su organización pseudoestratificada y muestran una apariencia aplanada manteniendo en las primeras etapas de reabsorción sus conexiones célula a célula (uniones gap). En etapas más avanzadas, los odontoblastos pierden sus conexiones célula a célula, se degeneran y permitir el contacto inicial de los odontoclastos con la superficie de la predentina (Kannari et al., 1998; Angelova et al., 2004).

Se ha demostrado una estrecha asociación de las células que expresan el antígeno de clase II del MHC con los odontoblastos a través de la progresión de la reabsorción en el diente temporal. Se deberá probar si las células dendríticas o macrófagos ubicados en estrecha asociación con odontoblastos posiblemente liberen algunas citoquinas, conduciendo a la desorganización y degeneración de los odontoblastos (Kannari et al., 1998).

Células inmunocompetentes durante la reabsorción radicular fisiológica

La pulpa de dientes temporales está equipada con varios tipos de células inmunocompetentes. Estas células muestran un aumento en el diente temporal con el progreso de la reabsorción radicular fisiológica (Angelova et al., 2004; Yildirim et al., 2008).

Así la pulpa mantiene su capacidad de cicatrización y la defensa durante la reabsorción radicular progresiva de los dientes temporales, debido a que los mecanismos de defensa de la pulpa dental se basan en la organización y función de las células inmunocompetentes (Simsek y Duruturk, 2005).

Los linfocitos B, CD3 +, CD4 +, CD8 + (linfocitos T) y las células NK están presentes en la pulpa de los dientes temporales en diferentes etapas de reabsorción. En dientes sin reabsorción, los linfocitos CD3 +, son los más prevalentes (15%) (Simsek y Duruturk, 2005).

El marcador CD45 reveló pequeñas estructuras redondeadas, con una apariencia consistente con el tamaño de los linfocitos B. Se observa diferente densidad en la marca en la pulpa de dientes temporales, mostrando correlación con el grado de reabsorción radicular fisiológica (Rajan et al., 2013).

La pulpa dental contiene numerosas células HLA-DR-positivas de diversas formas; las que muestran una apariencia dendrítica se localizaron principalmente en la periferia de la pulpa,

asociadas estrechamente con los odontoblastos (Kannari et al., 1998; Angelova et al., 2004).

La presencia de linfocitos B se observó en todos los dientes observados. Esto indica que los linfocitos B están presentes en la pulpa normal en dientes temporales. Por otra parte el número de linfocitos B se encontró aumentado en relación con la reabsorción radicular fisiológica (Simsek y Duruturk, 2005).

Las células NK incrementaron en un número significativo con el progreso de la reabsorción radicular, esto puede sugerir que las células NK proliferan en respuesta a la destrucción de tejido durante la reabsorción radicular fisiológica (Simsek y Duruturk, 2005).

Así incluso en etapas tempranas de reabsorción radicular, se muestra un aumento de los macrófagos, linfocitos T y células dendríticas. Este aumento sugiere que los macrófagos, en lugar de células residentes en la pulpa, son responsables de la fagocitosis del tejido degenerativo pulpar (Angelova et al., 2004).

Además la activación de los linfocitos T podría contribuir a la defensa del tejido pulpar, generando citoquinas que activan los macrófagos. A su vez la creciente evidencia sugiere que los linfocitos T activados pueden generar RANKL (Angelova et al., 2004; Yildirim et al., 2008)

Durante las etapas finales de reabsorción, las células inmunocompetentes se localizan de forma consistente en el CDP, adyacentes a los preodontoclastos u odontoclastos, cubriendo la superficie de la dentina expuesta después del desprendimiento de los odontoclastos hasta el inicio de la formación de cemento. Esto sugiere que las células inmunocompetentes en la pulpa coronal de dientes temporales humanos juegan un papel inductor en la diferenciación, migración y / o activación de odontoclastos y cementoblastos durante la reabsorción radicular (Kannari et al., 1998).

Por otra parte, además del proceso de reabsorción en sí, la atrición del diente temporal con la posterior exposición de dentina podría ejercer como un factor que influye en el aumento de células inmunocompetentes (Angelova et al., 2004).

Cabe destacar que el conocimiento del potencial de un diente para responder a una lesión, de acuerdo con la etapa de la reabsorción radicular, es muy valioso para predecir la probabilidad de éxito de intervenciones como recubrimiento pulpar indirecto o pulpotomía (Monteiro et al., 2009).

De esta manera, como se señaló anteriormente, la pulpa mantiene su capacidad de cicatrización y defensa contra el avance de lesiones cariosas y la progresiva reabsorción fisiológica en los dientes temporales, incluso hasta dos tercios de la longitud radicular. Por lo tanto, terapias pulpares conservadoras, con un uso apropiado de anestesia local, pueden representar un tratamiento adecuado para los dientes temporales si el estado de la pulpa se diagnostica con precisión (Simsek y Duruturk, 2005; Rajan et al., 2013).

Hipótesis

La reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales es un evento progresivo que puede actuar como injuria sobre las fibras nerviosas que inervan la pulpa dental, promoviendo degeneración axonal.

Objetivo General

Determinar el estado de la inervación de la pulpa dental en relación al proceso de reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales.

Objetivos Específicos

1. Determinar la inervación de la pulpa dental en dientes temporales mediante marcadores neuronales (NF y β III-Tubulina) para tres etapas definidas del proceso de reabsorción radicular fisiológica.
2. Caracterizar las células de Schwann mielinizantes y no-mielinizantes durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica mediante marcadores (S-100, GFAP y MBP).
3. Establecer estados de la pulpa dental en tres etapas del proceso de reabsorción radicular fisiológica mediante marcaje de células inmuno-competentes (HLA, CD68 y CD45).
4. Evidenciar la presencia de fenómenos de degeneración axonal a nivel pulpar en relación al proceso de reabsorción radicular fisiológica.

4.1 Tipo de Estudio

Estudio descriptivo observacional de la invasión pulpar en dientes temporales con reabsorción radicular fisiológica.

4.2 Universo

Dientes temporales con indicación de exodoncia, en pacientes hasta 14 años 1 mes de edad, atendidos en la clínica de odontología pediátrica y del adolescente de la Universidad de Valparaíso, donados mediante consentimiento escrito/firmado entre los meses de Noviembre del año 2013 y Septiembre del año 2014.

4.3 Criterios inclusión/exclusión

* **Inclusión:**

- Pacientes sistémicamente sanos
- Pacientes con dentición temporal o mixta.
- Pacientes con dientes temporales con exfoliación fisiológica.
- Pacientes con dientes temporales con indicación de exodoncia por ortodoncia.
- Pacientes con dientes temporales sanos: con su corona intacta y sin evidencia de lesiones en superficie y surcos de esmalte.
- Pacientes que sus apoderados firmen el consentimiento informado y deseen participar.

* **Exclusión:**

- Dientes con pulpitis irreversible, necrosis pulpar y restos radiculares.
- Pacientes con dientes temporales con trauma dentoalveolar, con diagnósticos que tengan como tratamiento indicado la exodoncia, o avulsionados.
- Pacientes con dientes temporales afectados por lesión tanto caries activas como detenidas.

4.4 Muestra

Aprobación del estudio y Consentimiento informado: El presente proyecto ha sido aprobado de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Bioética de la Investigación de Seres Humanos de la Universidad de Valparaíso (Anexo 1). Las muestras procesadas en el presente trabajo han sido donadas en forma voluntaria mediante previo asentimiento de paciente odontopediátrico y consentimiento informado firmado por el adulto responsable del paciente.

Tamaño: 37 Dientes Temporales. 23 Caninos y 14 Molares

Promedio de edad: 9 años 6 meses

Forma de selección: Muestreo no probabilístico. Los dientes fueron recolectados en las dependencias de la Clínica de Odontopediatría y del Adolescente de la Universidad de Valparaíso. Las muestras se obtuvieron de acuerdo con los criterios de inclusión/exclusión. Estos fueron recolectados a medida que se fueron extrayendo durante el segundo semestre del año 2013 y el año 2014, hasta llegar a un número de 44 dientes seleccionados para realizar el estudio. Los dientes fueron donados como se señaló anteriormente mediante previo asentimiento de paciente odontopediátrico y consentimiento informado firmado por el adulto responsable del paciente.

Unidad de estudio

Inervación de la pulpar dental de dientes temporales.

4.5 Definición de variables a evaluar

1. Tipo de diente, Dientes temporales: Variable cualitativa, escala nominal. Dientes que erupcionan entre los 8 a 30 meses de edad aproximadamente, que se exfolian y sustituyen por los dientes definitivos.
2. Grado de Reabsorción radicular: Variable cualitativa, escala ordinal. Identificación de la etapa de reabsorción radicular fisiológica en el diente temporal, establecida en base a tres grados (inicial, medio y final).
3. Fibras nerviosas: Variable cualitativa. Se identificarán mediante el anticuerpo NF-200 (neurofilamentos) y β III-Tubulina (marcador neuronal).
4. Células gliales mielinizantes y no-mielinizantes (C. Schwann): Variable cualitativa. Se identificarán mediante los anticuerpos S-100, GFAP y MBP.
5. Células inmunocompetentes: Variable cualitativa. Se identificarán debido a la inmuno-reactividad que poseen frente a los anticuerpos anti-HLA-DR, CD68 y CD45.

4.6 Forma de recolección y procesamiento de la información

Los pacientes con indicación de exodoncia que participaron en este estudio, fueron atendidos en los box 1 al 5 de la clínica de odontología Pediátrica y del Adolescente de la Universidad de Valparaíso, derivados por los mismos profesionales de este servicio.

Luego de indicada la extracción dentaria, y de aplicar los criterios de selección de inclusión/exclusión se le explicó al apoderado del paciente en qué consistía la participación de su pupilo en este estudio, por medio de una Hoja informativa, en la cual se especificó el objetivo y características de esta investigación. Posteriormente, al resolver todas las dudas del apoderado, se procedió a entregar un Consentimiento Informado, el cual debió ser firmado por el mismo, para poder llevar a cabo el procedimiento (Anexo 2).

Una vez recepcionado el paciente, se identificó el diente a extraer, para luego efectuar el registro de datos determinados en la ficha clínica (Anexo 3).

Se procedió a la aplicación de EMLA como anestésico tópico en el lugar de la punción y luego anestésiar el diente a extraer con solución anestésica al 2%, utilizando la técnica apropiada para cada caso (técnica de spix para dientes del maxilar inferior y técnica infiltrativa para dientes del maxilar superior); a continuación se obtuvo la muestra mediante exodoncia del diente con el instrumental apropiado para cada caso. Se separó el diente y se observó la presencia de exposición pulpar. Sólo en los casos en que no se observaba exposición se procedió a realizar un corte transversal con una fresa de alta velocidad 3 mm bajo el límite amelocementario.

Luego se depositó con la pinza estéril en un tubo cónico graduado de 50ml identificado con el número de ficha correspondiente, el cual contenía paraformaldehído al 4% con ácido pícrico al 0.5% para su fijación durante 6 hrs.

Las muestras son desmineralizadas en solución de EDTA al 4,13%, la cual se debe cambiar una vez a la semana, repitiendo este proceso durante 2 meses, para luego iniciar con todos los procesos necesarios para ensayos inmunohistoquímicos y microscopia confocal.

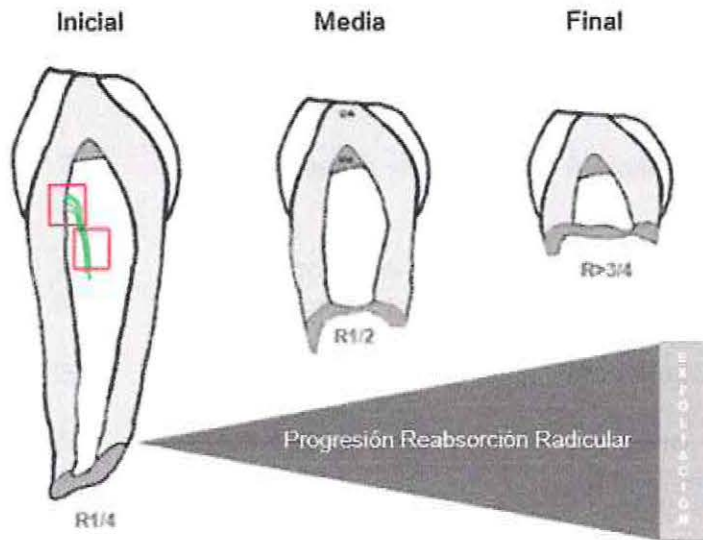
4.7 Determinación de etapas de reabsorción radicular fisiológica

Se realizó la determinación de la etapa de reabsorción radicular fisiológica en el diente temporal. En este sentido cabe destacar que las normas de la formación y la reabsorción de los caninos temporales, se basan en estudios que utilizaron radiografías laterales u oblicuas, y en el caso de las etapas de la reabsorción radicular, se ordenan según las etapas de formación de forma inversa. Las etapas de reabsorción son inicial, definida como la etapa más temprana (res $\frac{1}{4}$); media, definida como la etapa en la que permanece la mitad de la raíz (res $\frac{1}{2}$) y tres-cuartos, definida como la etapa en la que se han reabsorbido $\frac{3}{4}$ de la raíz (res $\frac{3}{4}$) (Esquema 6) (Moorrees et al., 1963; Knott y O'Meara, 1967; Haralabakis et al., 1994).



Esquema 6: Etapas de reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales (Moorrees et al., 1963).

Por lo anterior, en el presente estudio se establecen tres etapas: inicial, media y final (Esquema 7)



Esquema 7: Etapas de reabsorción radicular fisiológica en el diente temporal (inicial, media y final). Imágenes de microscopia confocal fueron obtenidas en dos regiones del complejo dentino-pulpar coronal (Recuadros rojos).

4.8 Inmunohistoquímica y Microscopia Confocal

Las muestras desmineralizadas fueron lavadas con PBS y colocadas por 2 horas en solución criopreservante de sacarosa PBS (pH 7,4) al 15% y luego en igual solución al 30% durante 24 horas. Las muestras embebidas en solución criopreservante se montaron en medio de congelación para tejidos (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) y congeladas a -25°C . Se realizaron cortes de $20\mu\text{m}$ y $50\mu\text{m}$ en un criostato (Leica CM-1900) operado a -25°C . Las secciones fueron recogidas y montadas en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina. Las secciones montadas en los portaobjetos son rehidratada en PBS e incubadas por 1 hora en la solución de bloqueo que contiene 1% de albúmina de suero bovino (BSA), 1% suero de caballo, y 0.3% Triton X-100.

Luego se agregan los anticuerpos primarios, que están preparados en solución de bloqueo y se dejan actuar durante 12 horas a una temperatura de 4°C . Las muestras pasan por 3 lavados de PBS de 5 minutos cada una. Después se agregan los anticuerpos secundarios que también están preparados en una solución de bloqueo y se dejan actuar 1 hora a temperatura ambiente; se vuelve a lavar con PBS para retirar los excesos.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Marcación
Anti-Neurofilamento	1:1000	DyLight 488 - Goat anti-chicken IgY Alexa 488 - rabbit anti-mouse IgG	Neurofilamentos de Neuronas
Anti- β III-Tubulina	1:200	Cy3 - donkey anti-mouse IgG	Marcador neuronal
Anti-S-100	1:250	Cy3 - rabbit anti-mouse IgG	Marcador célula Schwann
Anti-GFAP	1:500	Cy3 - rabbit anti-mouse IgG	Marcador célula Schwann
Anti-MBP	1:200	Cy3 - goat anti-rat IgG	Marcador de mielina
Anti-HLA-DR	1:50	Cy3 - donkey anti-mouse IgG	Células presentadoras de antígenos
Anti-CD68	1:200	Alexa 488 - rabbit anti-mouse IgG	Macrófagos
Anti-CD45	1:500	Cy3 - donkey anti-mouse IgG	Antígeno común para Leucocitos (LCA)

Tabla 3: Anticuerpos Primarios y Secundarios utilizados en el estudio.

Luego se procede a marcar núcleos con DAPI por 10 minutos, se lava y finalmente se cubren las muestras con medio de montaje (Dako Industries, Carpintería, CA, USA). Para su mantención las muestras se guardan en cajas a 4°C.

Las muestras procesadas fueron observadas y analizadas con un microscopio confocal Nikon C1 Plus. El equipo emplea tres laser de distintas longitudes de onda de emisión (409, 488, 543nm). Los fluorocromos asociados a anticuerpos secundarios fueron Cy3, DyLight 488, Alexa488. Los núcleos fueron contrastados con DAPI. Los registros digitales fueron procesados con el programa AutoQuant deconvolution (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) y analizadas digitalmente mediante los programas: Ez-C1 3.90 (Nikon Corporation) y Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) para proyecciones de máxima intensidad. Para ajustes de brillo y contraste se utilizó el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

El presente estudio centra su análisis en los cambios en la inervación, células gliales y células inmunocompetentes, que ocurren en la pulpa dental coronal durante el proceso de reabsorción radicular en dientes temporales humanos, caracterizando tres etapas de reabsorción radicular mediante inmunohistoquímica comparativa y microscopía confocal.

Del total de 37 muestras obtenidas, 23 correspondieron a caninos y 14 a molares. La edad promedio de los pacientes fue de 9 años y 6 meses.

Respecto a la inervación durante este proceso de reabsorción se observó una progresiva fragmentación de los neurofilamentos de axones, con una degradación progresiva de la mielina principalmente observada a nivel de haces axonales durante la progresión del proceso de reabsorción (Fig. 5-6-8).

En cuanto a las células gliales (células de Schwann), se evidenció una reacción especialmente en la etapa media del proceso de reabsorción con una notoria activación de forma similar a las bandas de Büngner evidenciadas en procesos de degeneración Walleriana, y con menor grado de diferenciación en la etapa final (Fig.7).

En relación a las células inmunocompetentes se observó un progresivo aumento durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica (Fig. 9-10).

Inervación dentro de la pulpa de dientes temporales en proceso de reabsorción

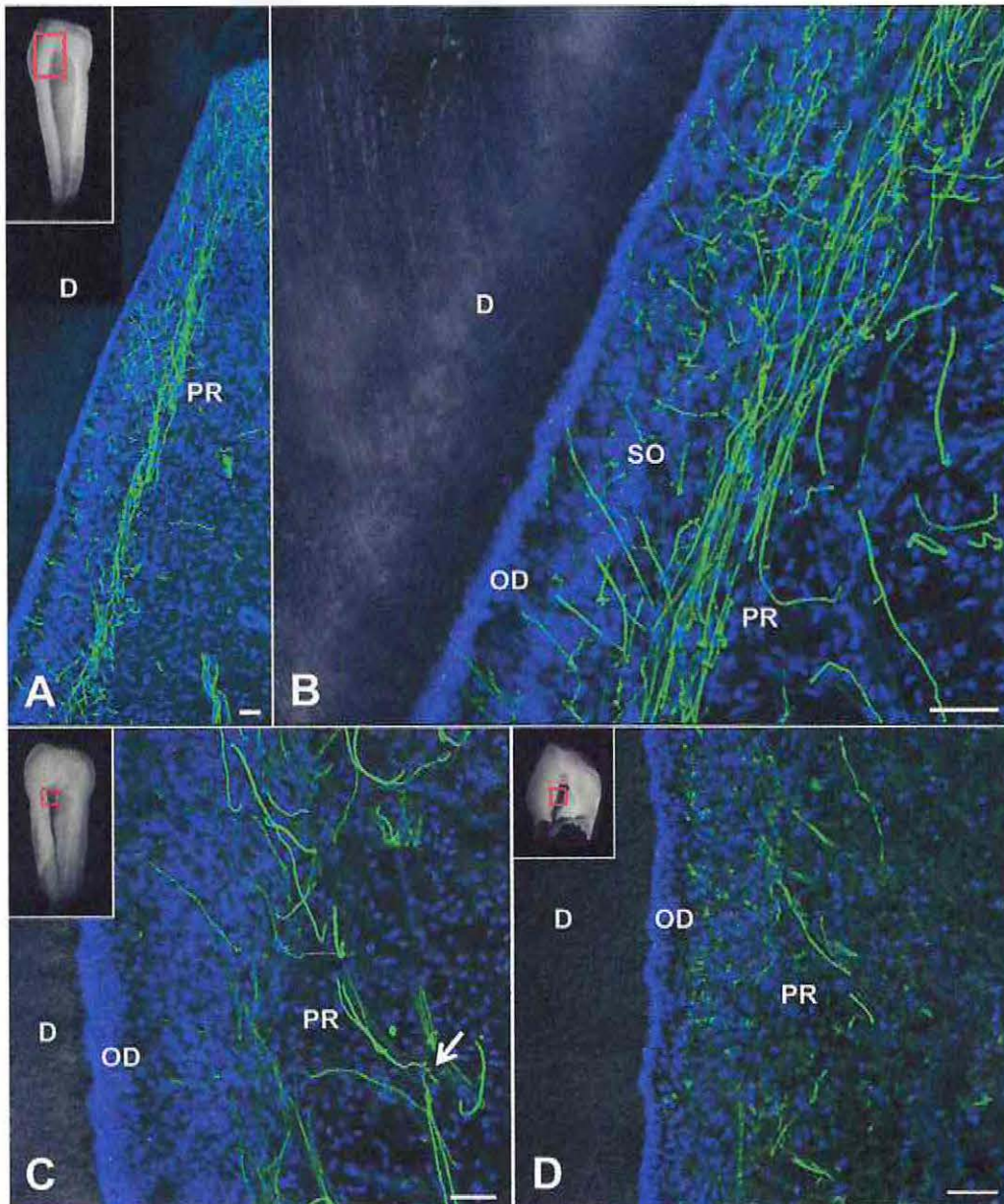


Figura 5: Microscopía confocal de inervación pulpar en diente temporal mediante inmunomarcaje para neurofilamentos (verde). La inervación del complejo dentino-pulpar a nivel coronario en dientes con reabsorción temprana evidencian un extensa red axonal a nivel subodontoblástico formando el plexo de Raschkow (A-B; inserto, diente en Etapa Inicial indicando mediante cuadro rojo zona analizada). En dientes con reabsorción en Etapa Media (inserto) la disposición de fibras nerviosas disminuye, con una marcada desorganización y fragmentación (flecha) a nivel del plexo de Raschkow (C). En dientes con reabsorción en Etapa final (inserto) se evidencia una extensa fragmentación de los neurofilamentos y marcada pérdida en la organización del plexo de Raschkow (D).

D, Dentina; OD, Odontoblastos; SO, Capa subodontoblástica; PR, Plexo de Raschkow

Barras= 50 μ m.

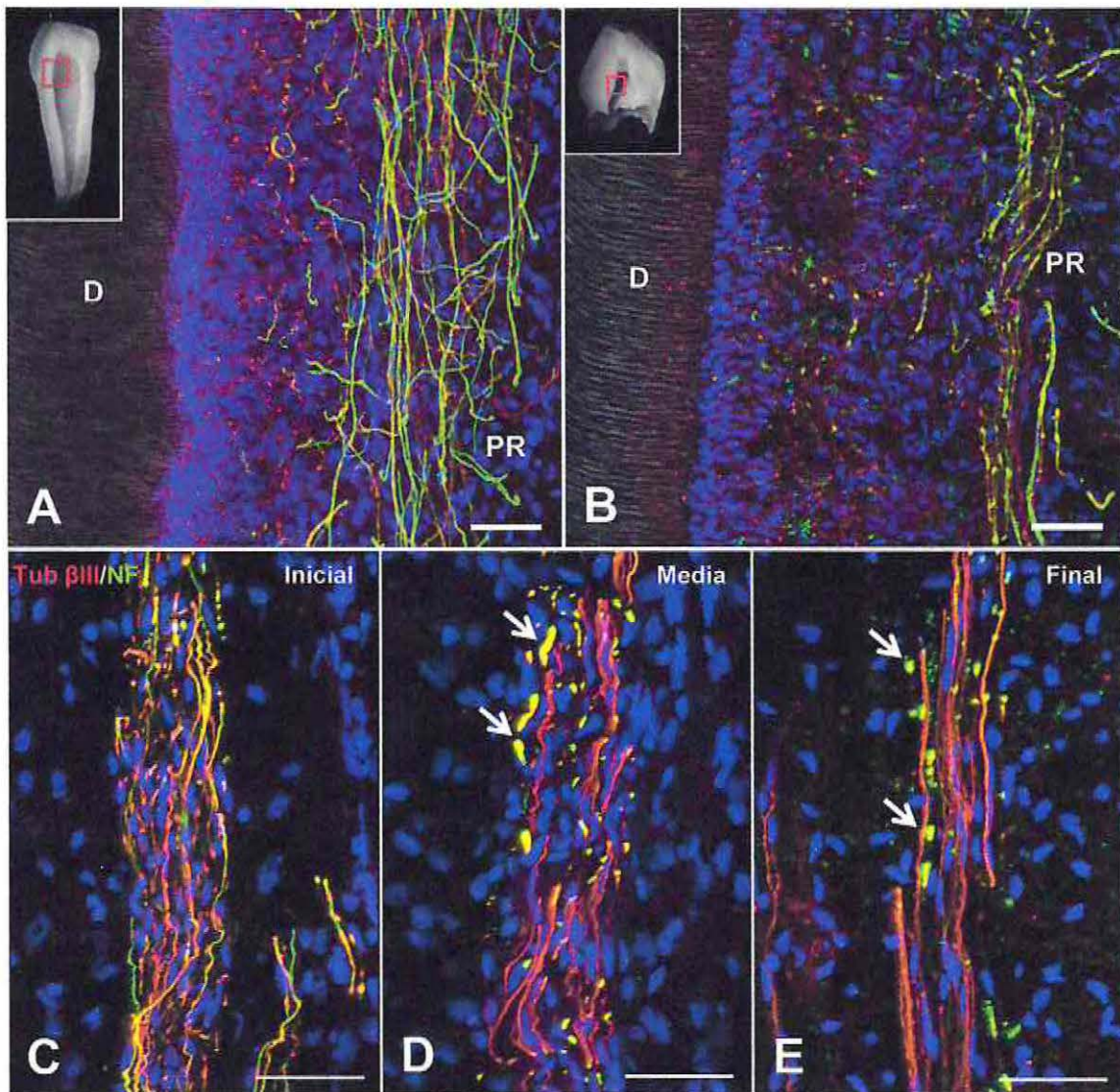


Figura 6: Microscopía confocal de inervación pulpar en diente temporal mediante doble inmunomarcaje de NF y β III-Tub. En etapas iniciales de la reabsorción se observa una extensa red axonal a nivel de cámara pulpar (A, inserto). En etapas finales de la reabsorción una fragmentada red axonal se evidencia (B). Durante el proceso de reabsorción se evidencia una marcada y progresiva fragmentación de neurofilamento (C-E).

D, Dentina; PR, Plexo de Raschkow

Barras: 50 μ m.

Células de Schwann mielinizantes y no-mielinizantes en la pulpa de dientes temporales en proceso de reabsorción

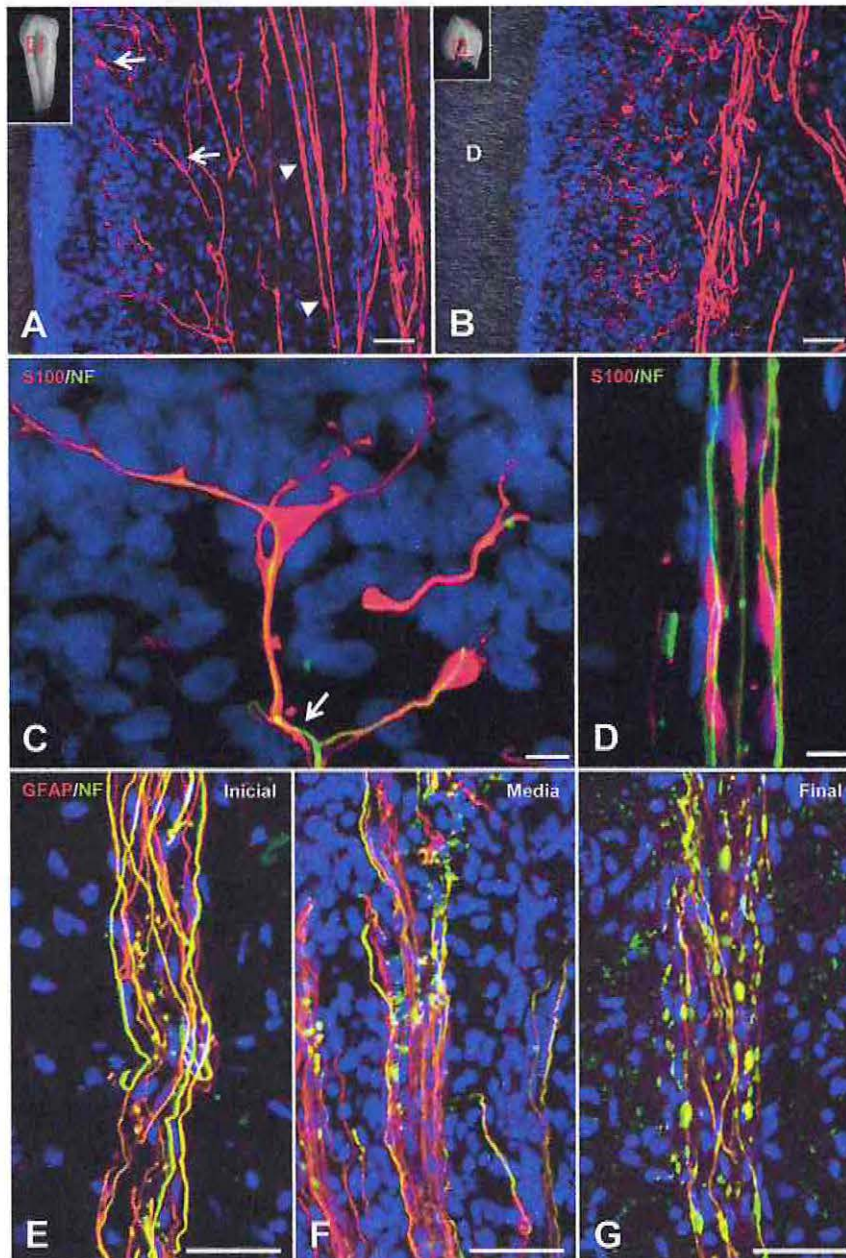


Figura 7: Caracterización de célula glial de Schwann mediante marcadores S-100 (A-D) y GFAP (E-G), y doble marcaje con anti-NF (C-G). En dientes en Etapa inicial (A. inserto), las células gliales mediante la marcación con S-100 permite diferenciar células de Schwann no mielinizantes (flecha) de mielinizantes (cabeza de flecha). En dientes en Etapa final las células de Schwann se muestran más irregulares y con menor grado de diferenciación (B). La célula de Schwann no mielinizante da soporte a axones (flecha) marcados mediante anti-NF (C). Las células de Schwann mielinizantes se observan dispuestas a lo largo de axones marcados con anti-NF (D). Mediante doble marcaje glia axón (GFAP/NF) a nivel pulpar se evidencia una progresiva fragmentación del neurofilamento en axones que forman haces para las 3 etapas.

Barras= 50 μ m (A-B; E-G); 10 μ m (C-D).

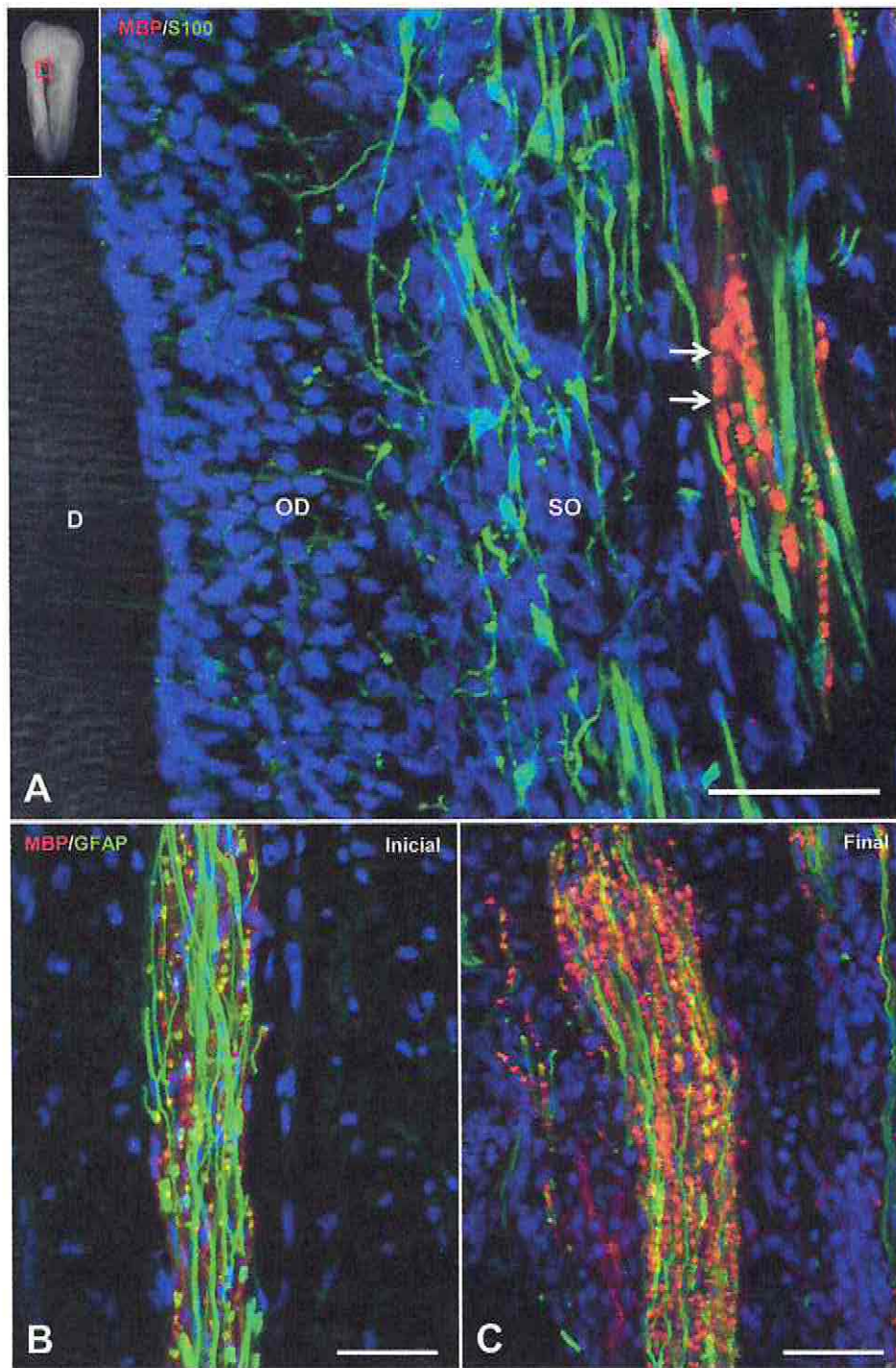


Figura 8: Caracterización de axones mielinizados mediante marcador anti-MBP. En etapas iniciales a nivel coronal se observa en el plexo de Raschkow, axones mielinizados con fragmentación de la mielina (A, flechas). La fragmentación de la mielina es una característica comúnmente observada durante el proceso de reabsorción a nivel de haces axonales (B-C).

D, Dentina; OD, Odontoblastos; SO, Capa subodontoblástica

Barras: 50 μ m.

Células inmuno-competentes en la pulpa de dientes temporales en proceso de reabsorción

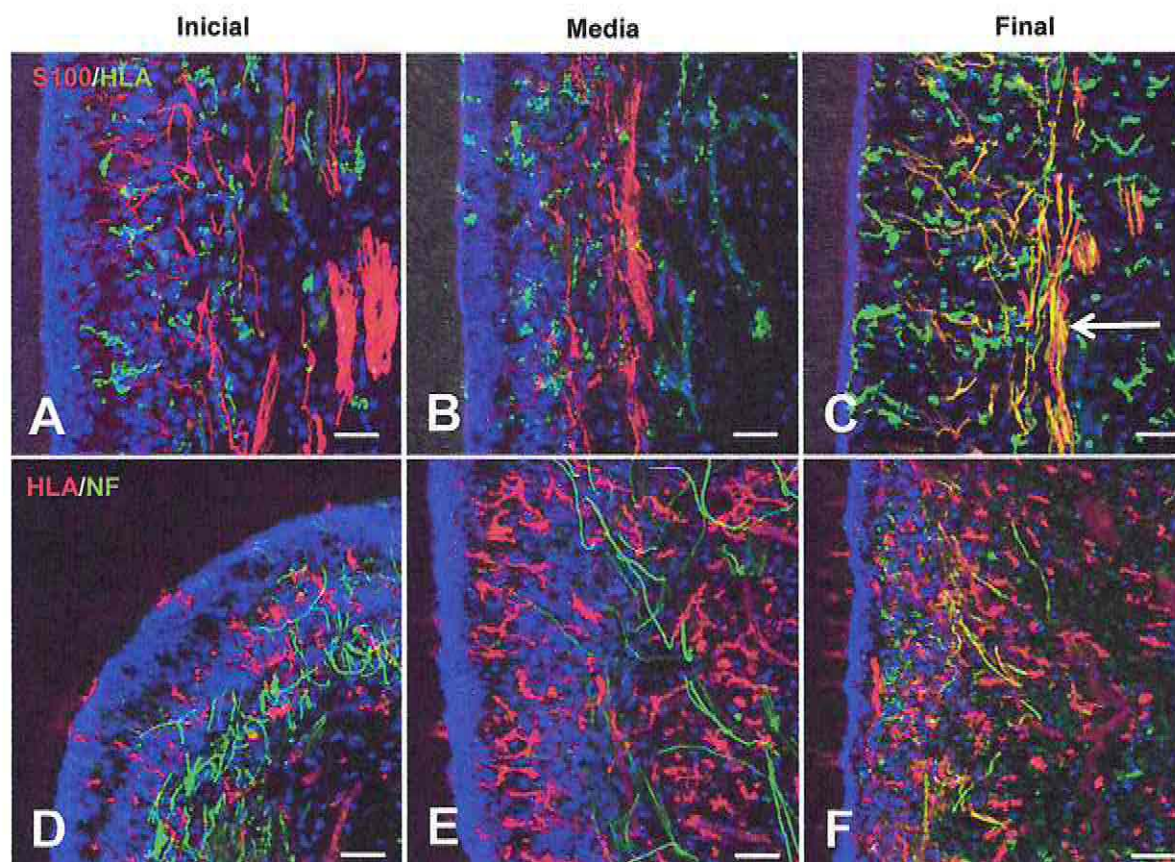


Figura 9: Imágenes representativas de células inmunocompetentes (HLA) y co-marcaje para glia (S-100) y neurofilamento (NF) a nivel de cámara pulpar para tres etapas de reabsorción radicular. En etapas inicial y media la presencia de células dendríticas y su relación espacial con células gliales es evidente (A-B). En etapa final destaca la inmunoreactividad HLA-positiva de las células gliales que co-localizan los marcadores S-100 y HLA (C, flecha). El incremento de células inmunocompetentes es progresivo en relación a las etapas de reabsorción radicular y se relaciona con una pérdida y fragmentación de neurofilamento (D-F).

Barras: 50µm.

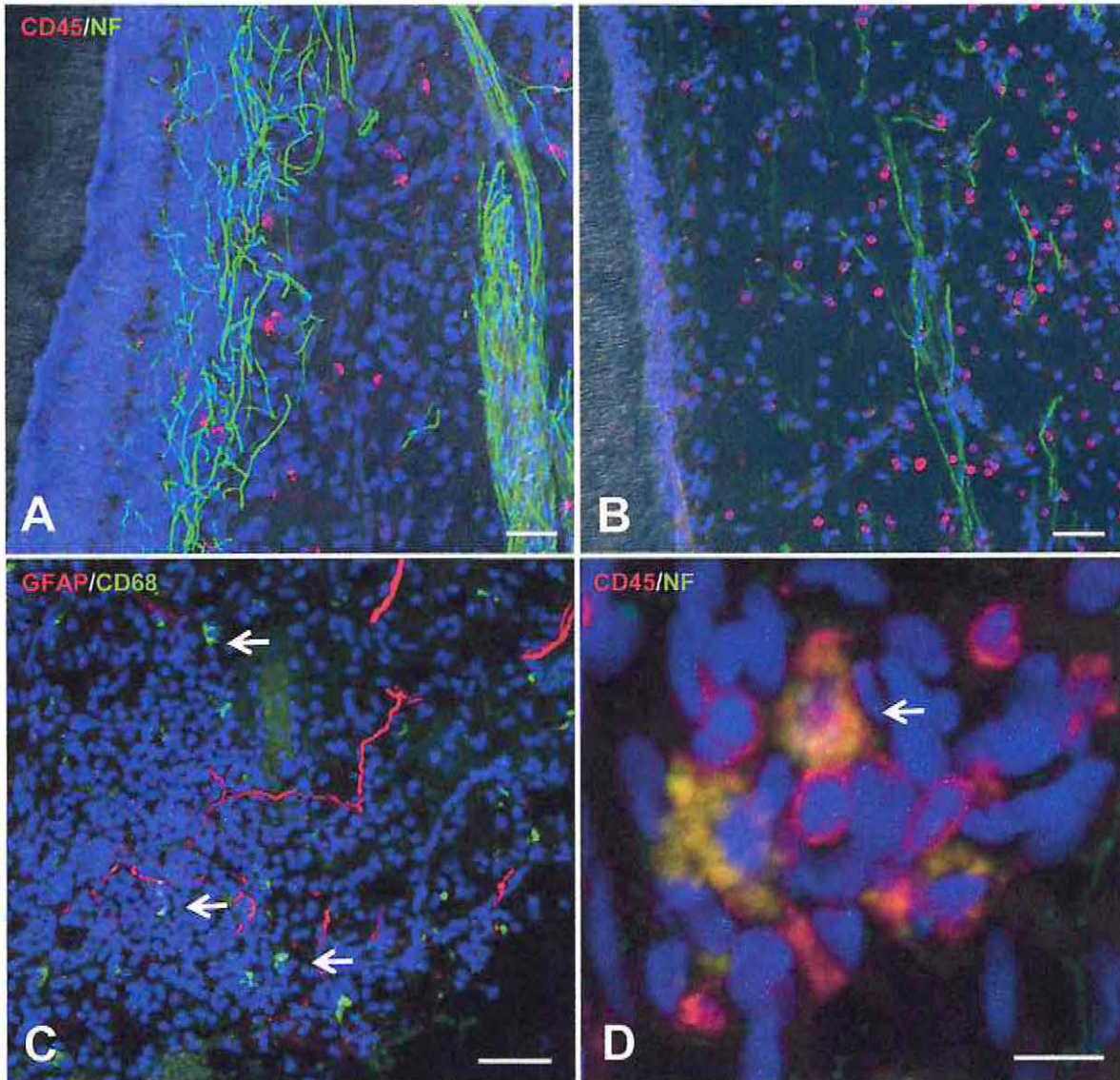


Figura 10: Caracterización de células inmunocompetentes en distintos estados de reabsorción. A-B: doble marcaje con anti-CD45 (rojo) y NF (verde). En etapa inicial escasas células CD45 inmunopositivas se observan a nivel de la cámara pulpar (A). En etapa final un considerable infiltrado de células inmunoreactivas a CD45, se observan a nivel de una cámara pulpar con escasas fibras nerviosas (B). La presencia de macrófagos acumulados en la zona de reabsorción en etapas avanzadas se caracteriza con CD68 (C, flechas). El doble marcaje de macrófagos con CD45 y NF evidencia que estas células debridan remanentes neuronales (D, flecha).

Barras: A-C= 50µm. D= 10µm.

En el presente estudio, mediante inmunohistoquímica y microscopia confocal se determinaron cambios en la inervación, células gliales y células inmunocompetentes a nivel de la pulpa dental coronal en relación a tres etapas definidas del proceso de reabsorción radicular fisiológicas en dientes temporales humanos. Lo anterior permitió observar que los dientes temporales en proceso de exfoliación muestran marcados cambios en su pulpa.

Cabe destacar que el proceso de reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales, es fundamental en el ciclo vital del diente temporal, permitiendo finalmente la erupción del diente definitivo, siendo clave en el proceso de crecimiento y desarrollo. El proceso de reabsorción tiene lugar de manera intermitente, con alternancia de periodos de reabsorción y periodos de reparación, es un proceso lento y progresivo, que puede durar 5 a 6 años aproximadamente.

Con respecto a los cambios en la inervación durante el proceso de reabsorción, se observó que la disposición de fibras nerviosas disminuye, con una marcada desorganización y progresiva fragmentación de neurofilamentos, a nivel del plexo de Raschkow. Lo que concuerda con otros estudios donde se observaron varicosidades y fragmentación durante el proceso de reabsorción en dientes temporales de gatos, monos y humanos, lo que se aceptó como signo definitivo de degeneración (Mohiuddin, 1950; Bernick, 1952; Rapp et al., 1967; Karlsson et al., 1974; Johnsen y Johns, 1978; Fried et al., 2000).

Además la fragmentación y degradación de la mielina es una característica comúnmente observada durante todo el proceso de reabsorción a nivel de haces axonales. Lo que se demostró también en estudios anteriores, donde los cambios degenerativos en fibras nerviosas mielínicas, ocurrieron tempranamente en el proceso de reabsorción, y los axones más finos desaparecieron en las últimas etapas de reabsorción (Mohiuddin, 1950, Karlsson et al., 1974), y se ha descrito también en procesos posteriores a una lesión axonal, donde las células de Schwann regulan negativamente la producción de proteínas de mielina incluyendo MBP (Kidd et al., 2013).

De esta manera se evidenció que la reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales, es un evento que puede inducir una injuria en las fibras nerviosas, promoviendo la degeneración axonal y la progresiva denervación en la pulpa dental, lo que permite explicar el progresivo declive de la función sensorial en dientes temporales asociados con las etapas finales de reabsorción radicular.

Por otra parte, con respecto a los cambios observados, durante el proceso de reabsorción, en las células gliales, se pudo diferenciar mediante marcadores la presencia de células de Schwann mielinizantes y no-mielinizantes en la pulpa dental de dientes temporales. Se observó que la célula de Schwann no-mielinizante da soporte a axones y a las células de Schwann mielinizantes se disponen a lo largo de los axones, al igual que lo descrito en estudios anteriores con respecto a la localización y función de ambos tipos celulares (Kidd et al., 2013).

Durante las diferentes etapas del proceso de reabsorción radicular se evidenció una reacción de las células gliales. Si bien las células de Schwann en la etapa inicial se localizaron en relación a axones con neurofilamentos bien preservados, es importante destacar que en etapa media se observó una fuerte inmunoreacción para GFAP en las

células de Schwann, lo que demuestra su activación, de forma similar a las bandas de Büngner observadas en procesos de degeneración Walleriana (Stoll y Muller, 1999). En la etapa final del proceso de reabsorción radicular, las células de Schwann se evidencian más irregulares y menor grado de diferenciación. Lo que se ha descrito después de una lesión, en donde las células mielinizantes degradan su mielina y se desdiferencian, readquiriendo las capacidades de desarrollo temprano (Mirsky et al., 2008; Kidd et al., 2013). Por otro lado, en esta etapa destaca la inmunoreactividad HLA-positiva de las células de Schwann, donde mediante doblemarcaje se observa que co-localizan con los marcadores S-100 y HLA. Lo anterior sería coincidente con lo expuesto en otros estudios en los que se destaca que células no inmunes, tales como la microglia en el sistema nervioso central o las células de Schwann en el sistema nervioso periférico, desempeñan un papel clave en la respuesta inmune innata y adaptativa (Ydens et al., 2013).

En cuanto a los cambios en células inmunocompetentes durante el proceso de reabsorción, se observó en la etapa inicial escasas células CD45 inmunopositivas a nivel de la cámara pulpar. En la etapa final un considerable infiltrado de células inmunoreactivas a CD45, se observaron a nivel de una cámara pulpar con escasas fibras nerviosas. Esto señala un incremento progresivo de células inmunocompetentes en relación a las etapas de reabsorción radicular, que se relaciona con una pérdida y fragmentación de neurofilamento. Estos cambios concuerdan con los descritos en otras investigaciones, en las que también se comprobó un aumento de estas células durante la reabsorción radicular fisiológica (Angelova et al., 2004; Simsek and Duruturk, 2005; Yildirim et al., 2008; Rajan et al., 2013).

La presencia de macrófagos acumulados en la zona de reabsorción en etapas avanzadas se caracterizó a través de marcaje con CD68. Por otra parte, el doble marcaje de macrófagos con CD45 y NF demostró que estas células debridan remanentes mielínicos y neuronales. Esta función ha sido definida en investigaciones anteriores en procesos de degeneración axonal, en donde los macrófagos son rápidamente reclutados y eliminan la gran mayoría de los restos de mielina, así la respuesta inflamatoria se inicia por la desintegración axonal (Stoll y Muller, 1999; Gaudet et al., 2011). De esta manera se ha sugerido que los macrófagos son responsables de la fagocitosis del tejido degenerativo pulpar durante procesos de reabsorción radicular fisiológica (Angelova et al., 2004).

Estos cambios en relación a las células inmunocompetentes durante el proceso de reabsorción y específicamente su marcado aumento en la etapa final, destaca el establecimiento de una etapa inflamatoria terminal en un sistema que está fuertemente denervado.

Es importante señalar que la cantidad de información aún es insuficiente para comprender como el sistema con sus diferentes componentes nerviosos, gliales e inmunocompetentes logra comunicarse para coordinar los cambios requeridos durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica. La mayoría de los estudios en esta área son descriptivos, y la información sobre los mecanismos etiológicos y de regulación moleculares en cuanto a los cambios celulares en este proceso, es limitada.

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, el cual tiene como propósito determinar el estado de inervación de la pulpa dental y el proceso de reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales, se puede concluir que:

Con respecto a la inervación de la pulpa dental en dientes temporales, en tres etapas del proceso de reabsorción radicular fisiológica, se determinó que la disposición de fibras nerviosas disminuye, con una marcada desorganización y progresiva fragmentación de neurofilamentos a nivel del plexo de Raschkow. Además de la pérdida y fragmentación de mielina, característica comúnmente observada durante todo el proceso de reabsorción a nivel de haces axonales.

Al caracterizar las células de Schwann mielinizantes y no-mielinizantes durante el proceso de reabsorción se observó una reacción de las células gliales, específicamente en la etapa media con una fuerte inmunoreacción en las células de Schwann, lo que demuestra su activación, de forma similar a las bandas de Büngner observadas en procesos de degeneración Walleriana. En la etapa final, las células de Schwann se mostraron más irregulares, desdiferenciadas y con inmunoreactividad HLA-positiva, indicando un papel en la respuesta inmune a nivel pulpar.

En relación a estados de la pulpa dental mediante la observación de células inmunocompetentes, se pudo establecer un incremento progresivo de estas células en relación a las etapas de reabsorción radicular.

Además se evidenció que la reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales, es un evento que puede determinar una injuria en las fibras nerviosas, promoviendo la degeneración axonal y la progresiva denervación en la pulpa dental, lo que permite explicar el progresivo declive de la función sensorial en dientes temporales asociados con las etapas finales de reabsorción radicular.

De esta manera, la implicancia del presente estudio en futuras investigaciones, es que los dientes temporales parecen ser un buen modelo para la observación de degeneración axonal fisiológica.

Cabe destacar que, la determinación de cualquier cambio en la histología pulpar en el proceso de reabsorción fisiológica es fundamental para tomar decisiones de tratamiento informadas en dientes temporales.

De esta forma, la implicancia clínica de la presente investigación es que el conocimiento de la biología pulpar durante este proceso fisiológico, presente en todos los pacientes odontopediátricos, es muy valioso para pronosticar la probabilidad de éxito de intervenciones clínicas. En este sentido, se puede determinar que la pulpa dental en dientes temporales mantiene su capacidad de reparación y defensa durante la progresión del proceso de reabsorción radicular fisiológica, incluso hasta dos tercios de la longitud radicular. Por lo tanto, si el estado pulpar se diagnostica con precisión, la elección de terapias pulpares conservadoras, con un uso apropiado de anestesia local, permite conservar el diente temporal, siendo un mantenedor de espacio fisiológico y representa de esta manera, el tratamiento adecuado para los pacientes odontopediátricos.

Dentro de las limitaciones de esta investigación podemos señalar la dificultad para obtener muestras que cumplieran con los criterios de inclusión y hayan sido sometidas correctamente al protocolo de obtención y procesamiento.

Para futuros estudios sería interesante incluir muestras sin reabsorción radicular fisiológica, a pesar de su dificultad de obtención por criterios clínicos, debido a que permitiría observar un estado pulpar previo, fundamental en el ciclo vital del diente temporal.

Se sugiere también, complementar la obtención de muestras con un registro de la vitalidad pulpar del diente, con el fin de obtener una visión de la relación existente entre la clínica y los cambios biológicos a nivel celular durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica.

Finalmente, sería interesante la aplicación del protocolo utilizado en nuestra investigación en las diferentes clínicas de nuestra Facultad, permitiendo una mayor donación de muestras para fortalecer así la investigación y docencia en nuestra área de estudio.

- ABBAS, A., LICHTMAN A., PILLAI S. 2008. "Introducción al sistema inmunitario" en *Inmunología Celular y Molecular*. Sexta Edición. España. ElSevier. Páginas: 4-17.
- ANGELOVA, A., TAKAGI, Y., OKIJI, T., KANEKO, T. & YAMASHITA, Y. 2004. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol*, 49, 29-36.
- BENDER, I. B. 2000. Pulpal pain diagnosis--a review. *J Endod*, 26, 175-9.
- BERNICK, S. 1952. Innervation of the primary tooth and surrounding supporting tissues of monkeys. *Anat Rec*, 113, 215-37.
- BRENAN, A. 1986. Innervation of the dental pulp during tooth succession in the cat. *Brain Res*, 382, 250-6.
- BYERS, M. R. 1984. Dental sensory receptors. *Int Rev Neurobiol*, 25, 39-94.
- BYERS, M. R. & NARHI, M. V. 1999. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10, 4-39.
- BYERS, M. R., SUZUKI, H. & MAEDA, T. 2003. Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc Res Tech*, 60, 503-15.
- CAHILL, D. R. & MARKS, S. C., JR. 1980. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol*, 9, 189-200.
- COUVE, E., OSORIO, R. & SCHMACHTENBERG, O. 2013. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res*, 92, 765-72.
- COUVE, E., OSORIO, R. & SCHMACHTENBERG, O. 2014. Reactionary Dentinogenesis and Neuroimmune Response in Dental Caries. *J Dent Res*, 93, 788-793.
- CHAI, Y., JIANG, X., ITO, Y., BRINGAS, P., JR., HAN, J., ROWITCH, D. H., SORIANO, P., MCMAHON, A. P. & SUCOV, H. M. 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127, 1671-9.
- CHUNG, G., JUNG, S. J. & OH, S. B. 2013. Cellular and molecular mechanisms of dental nociception. *J Dent Res*, 92, 948-55.
- EGAN, C. A., HECTOR, M. P. & BISHOP, M. A. 1999. On the pulpal nerve supply in primary human teeth: evidence for the innervation of primary dentine. *Int J Paediatr Dent*, 9, 57-66.
- FEARNHEAD, R. W. 1961. The neurohistology of human dentine. *Proc R Soc Med*, 54, 877-84.
- FRIED, K., NOSRAT, C., LILLESAAER, C. & HILDEBRAND, C. 2000. Molecular signaling and pulpal nerve development. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11, 318-32.
- FUJIYAMA, K., YAMASHIRO, T., FUKUNAGA, T., BALAM, T. A., ZHENG, L. & TAKANO-YAMAMOTO, T. 2004. Denervation resulting in dento-alveolar ankylosis associated with decreased Malassez epithelium. *J Dent Res*, 83, 625-9.
- FUKUSHIMA, H., KAJIYA, H., TAKADA, K., OKAMOTO, F. & OKABE, K. 2003. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci*, 111, 346-52.
- FURSETH, R. 1968. The resorption processes of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. *Arch Oral Biol*, 13, 417-31.
- GAUDET, A. D., POPOVICH, P. G. & RAMER, M. S. 2011. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*, 8, 110.
- HARALABAKIS, N. B., YIAGTZIS, S. C. & TOUTOUNTZAKIS, N. M. 1994. Premature or delayed exfoliation of deciduous teeth and root resorption and formation. *Angle Orthod*, 64, 151-7.
- HAROKOPAKIS-HAJISHENGALLIS, E. 2007. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J Oral Sci*, 49, 1-12.

- HASEGAWA, T., KIKUIRI, T., TAKEYAMA, S., YOSHIMURA, Y., MITOME, M., OGUCHI, H. & SHIRAKAWA, T. 2002. Human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth induce osteoclastogenesis in vitro. *Tissue Cell*, 34, 44-51.
- ITOH, K. 1976. The distribution of nerves in human deciduous and permanent teeth. *Arch Histol Jpn*, 39, 379-99.
- JAIN, N., GUPTA, A. & N, M. 2013. An insight into neurophysiology of pulpal pain: facts and hypotheses. *Korean J Pain*, 26, 347-55.
- JOHNSEN, D. & JOHNS, S. 1978. Quantitation of nerve fibres in the primary and permanent canine and incisor teeth in man. *Arch Oral Biol*, 23, 825-9.
- JONTELL, M., OKIJI, T., DAHLGREN, U. & BERGENHOLTZ, G. 1998. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 179-200.
- KANNARI, N., OHSHIMA, H., MAEDA, T., NODA, T. & TAKANO, Y. 1998. Class II MHC antigen-expressing cells in the pulp tissue of human deciduous teeth prior to shedding. *Arch Histol Cytol*, 61, 1-15.
- KANZAKI, H., CHIBA, M., SHIMIZU, Y. & MITANI, H. 2002. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*, 17, 210-20.
- KARLSSON, U., JOHNSEN, D. & HERMAN, A. M. 1974. Early degenerative nerve alterations in feline resorbing deciduous incisors as observed by electron microscopy. *J Dent Res*, 53, 1428-31.
- KIDD, G. J., OHNO, N. & TRAPP, B. D. 2013. Biology of Schwann cells. *Handb Clin Neurol*, 115, 55-79.
- KNOTT, V. B. & O'MEARA, W. F. 1967. Serial data on primary incisor root resorption and gingival emergence of permanent successors. *Angle Orthod*, 37, 212-22.
- LEE, A., SCHNEIDER, G., FINKELSTEIN, M. & SOUTHARD, T. 2004. Root resorption: the possible role of extracellular matrix proteins. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 126, 173-7.
- LIN, B. C., ZHAO, Y. M., YANG, J. & GE, L. H. 2012. Root resorption of primary molars without successor teeth. An experimental study in the beagle dog. *Eur J Oral Sci*, 120, 147-52.
- LIN, P. F., FIORE-DONNO, G. & LOMBARDI, T. 1994. Immunohistochemical detection of S-100 protein in human deciduous dental pulp. *Ann Anat*, 176, 171-3.
- LINDE, A. & GOLDBERG, M. 1993. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4, 679-728.
- LUUKKO, K. & KETTUNEN, P. 2014. Coordination of tooth morphogenesis and neuronal development through tissue interactions: lessons from mouse models. *Exp Cell Res*, 325, 72-7.
- MAH, J. & PRASAD, N. 2004. Dentine phosphoproteins in gingival crevicular fluid during root resorption. *Eur J Orthod*, 26, 25-30.
- MARKS, S. C., JR. & CAHILL, D. R. 1984. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch Oral Biol*, 29, 311-22.
- MARKS, S. C., JR. & SCHROEDER, H. E. 1996. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec*, 245, 374-93.
- MIRSKY, R., WOODHOO, A., PARKINSON, D. B., ARTHUR-FARRAJ, P., BHASKARAN, A. & JESSEN, K. R. 2008. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *J Peripher Nerv Syst*, 13, 122-35.
- MOE, K., SIJAONA, A., SHRESTHA, A., KETTUNEN, P., TANIGUCHI, M. & LUUKKO, K. 2012. Semaphorin 3A controls timing and patterning of the dental pulp innervation. *Differentiation*, 84, 371-9.
- MOHIUDDIN, A. 1950. The fate of the nerves of the deciduous teeth. *J Anat*, 84, 319-23.
- MONTEIRO, J., DAY, P., DUGGAL, M., MORGAN, C. & RODD, H. 2009. Pulpal status of human primary teeth with physiological root resorption. *Int J Paediatr Dent*, 19, 16-25.
- MOORREES, C. F., FANNING, E. A. & HUNT, E. E., JR. 1963. Formation and Resorption of Three Deciduous Teeth in Children. *Am J Phys Anthropol*, 21, 205-13.

- OBERSZTYN, A. 1963. Experimental investigation of factors causing resorption of deciduous teeth. *J Dent Res*, 42, 660-74.
- RAJAN, S., DAY, P. F., CHRISTMAS, C., MUNYOMBWE, T., DUGGAL, M. & RODD, H. D. 2013. Pulpal status of human primary molars with coexisting caries and physiological root resorption. *Int J Paediatr Dent*.
- RAPP, R., AVERY, J. K. & STRACHAN, D. S. 1967. The distribution of nerves in human primary teeth. *Anat Rec*, 159, 89-103.
- RODD, H. D. & BOISSONADE, F. M. 2001. Innervation of human tooth pulp in relation to caries and dentition type. *J Dent Res*, 80, 389-93.
- RODD, H. D. & BOISSONADE, F. M. 2002. Comparative immunohistochemical analysis of the peptidergic innervation of human primary and permanent tooth pulp. *Arch Oral Biol*, 47, 375-85.
- SAHARA, N. 2001. Cellular events at the onset of physiological root resorption in rabbit deciduous teeth. *Anat Rec*, 264, 387-96.
- SAHARA, N., OKAFUJI, N., TOYOKI, A., ASHIZAWA, Y., YAGASAKI, H., DEGUCHI, T. & SUZUKI, K. 1993. A histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. *J Dent Res*, 72, 634-40.
- SAHARA, N., OKAFUJI, N., TOYOKI, A., SUZUKI, I., DEGUCHI, T. & SUZUKI, K. 1992. Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to the shedding of human deciduous teeth. *Arch Histol Cytol*, 55, 273-85.
- SASAKI, T., MOTEGI, N., SUZUKI, H., WATANABE, C., TADOKORO, K., YANAGISAWA, T. & HIGASHI, S. 1988. Dentin resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. *Am J Anat*, 183, 303-15.
- SASAKI, T., SHIMIZU, T., WATANABE, C. & HIYOSHI, Y. 1990. Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. *J Dent Res*, 69, 67-74.
- SHIBUKAWA, Y., SATO, M., KIMURA, M., SOBHAN, U., SHIMADA, M., NISHIYAMA, A., KAWAGUCHI, A., SOYA, M., KURODA, H., KATAKURA, A., ICHINOHE, T. & TAZAKI, M. 2014. Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pflugers Arch*.
- SIMSEK, S. & DURUTURK, L. 2005. A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption. *Arch Oral Biol*, 50, 461-8.
- SMITH, A. J., CASSIDY, N., PERRY, H., BEGUE-KIRN, C., RUCH, J. V. & LESOT, H. 1995. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*, 39, 273-80.
- STOLL, G. & MULLER, H. W. 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*, 9, 313-25.
- TYROVOLA, J. B., SPYROPOULOS, M. N., MAKOU, M. & PERREA, D. 2008. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci*, 50, 367-76.
- WANG, Z. & MCCAULEY, L. K. 2011. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis*, 17, 129-42.
- WISE, G. E., FRAZIER-BOWERS, S. & D'SOUZA, R. N. 2002. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13, 323-34.
- YDENS, E., LORNET, G., SMITS, V., GOETHALS, S., TIMMERMAN, V. & JANSSENS, S. 2013. The neuroinflammatory role of Schwann cells in disease. *Neurobiol Dis*, 55, 95-103.
- YILDIRIM, S., YAPAR, M., SERMET, U., SENER, K. & KUBAR, A. 2008. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105, 113-20.

Anexo 1: Evaluación Bioética

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA

El Comité Institucional de Bioética de la Investigación en Seres Humanos de la Universidad de Valparaíso constituido por M. Liliana Alarcón C, Eva Madrid, Marie Therese Flores B, Mariana Arancibia H, Marjorie Borgeat M, Juan Pablo Jaña, en su sesión del 4 de Octubre de 2013 declara haber evaluado el proyecto "CÓMO CARIES Y ENVEJECIMIENTO AFECTAN EL COMPLEJO DENTINO-PULPAR: UN ANÁLISIS COMPARATIVO INMUNOHISTOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE TERMINALES NERVIOSOS Y ODONTOBLÁSTOS EN DIENTES HUMANOS" presentado por el investigador responsable Prof. Eduardo Couve, adscrito a la Universidad de Valparaíso.

- I. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los siguientes antecedentes:
 - a. Protocolo de Investigación
 - b. Formulario de Consentimiento Informado

- II. En la valoración bioética del proyecto, se consideraron los siguientes aspectos
 - a. Validez científica: El estudio busca responder interrogantes que son de interés para la disciplina, ocupando una metodología adecuada.
 - b. Consentimiento Informado: Considera los criterios de información al donante de la muestra biológica utilizada, respetando su autonomía y voluntad.
 - c. Riesgos y Beneficios: Se utilizan muestras biológicas donadas de manera informada.

- d. Selección Justa de sujetos: No aplica.
- e. Respeto por los sujetos: No aplica.
- f. Conflicto de Interés: No existe.

III. Ante la inexistencia de aspectos inadecuados, se APRUEBA, por un plazo de un año, el protocolo de investigación identificado en esta acta.

IV. Firma el acta en representación del comité


Diana Conteras Alarcón
Presidenta

Valparaíso, 4 de Octubre de 2013.

Anexo 2:

Hoja informativa/Consentimiento Informado utilizados en el estudio.

Donación al Banco de Muestras del LabME

(BM-LabME)

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

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

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

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

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONACIÓN DE DIENTE

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

Fecha: _____ N° Muestra _____

Diente:

Edad:

Información Clínica Relevante:

Nombre del Donante:

RUT:

Firma:

Anexo 3

<u>FICHA DE REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS</u>	Fecha:
N° Ficha clínica: _____	N° Muestra:
Nombre del paciente: _____	
Rut: _____	
Fecha de Nacimiento: _____	
Sexo: _____	
Información sistémica relevante: _____	
N° de Diente: _____	
Información clínica relevante: _____	
Observaciones: _____	
Exposición Pulpar con alta velocidad: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	
Hora de Fijación: _____	
Hora de EDTA: _____	

Anexo 4

Poster Presentado en el III Meeting Millenium Institute CINV "Science a haven for art".
Universidad de Valparaíso.

Dental Pulp Innervation in Deciduous and Permanent Human Teeth: Changes during Physiological Root Resorption, Aging and Caries

Lovera M ⁽¹⁾, Suzuki K ⁽¹⁻⁴⁾, Devia V ⁽²⁻³⁾, Schmachtenberg O ⁽²⁻³⁾, and Couve E ⁽¹⁻³⁾
 Instituto de Biología (1), Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV) (2),
 Facultad de Ciencias (3),
 Clínica de Odontología Pediátrica y del Adolescente (4), Facultad de Odontología (5),
 Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

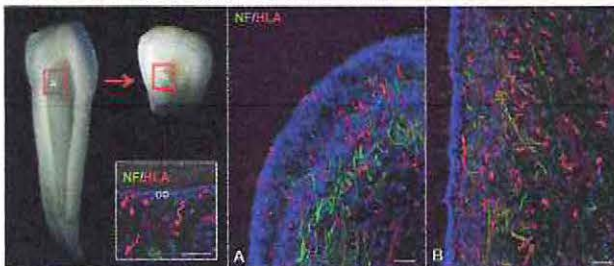


Introduction

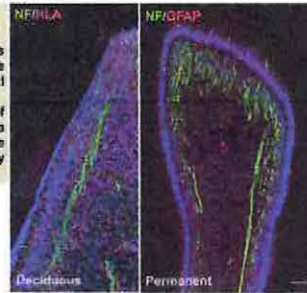
The dental pulp in human teeth is a highly innervated system, with a complex unresolved sensorial functionality. Nerve fibers endings within the peripheral dental pulp are mainly polymodal nociceptors that sense dental injury. In this project, three different models of neuroplasticity are being investigated to understand changes in deciduous and permanent human dental pulp innervation.

During physiological root resorption in deciduous teeth the odontoblast layer is progressively reduced. Prior to exfoliation of deciduous teeth, peripheral nerve fibers are fragmented and reduced in density. Neuronal innervation is also reduced, but on a different timescale, as part of the ageing process in permanent teeth. Finally, in the initial response to caries progression, we have demonstrated extensive sprouting of newly formed nerve endings together with the formation of adaptive reactionary dentin, while injured odontoblasts are reduced in size.

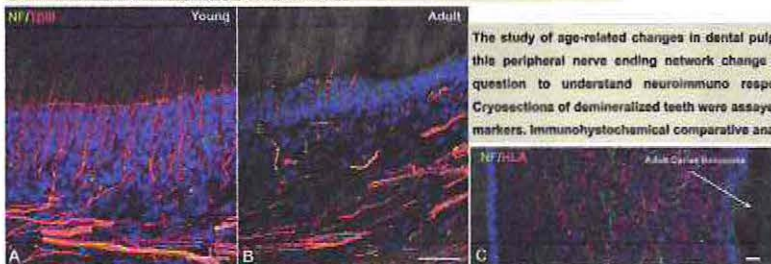
1. Neuroimmune changes during physiological root resorption



During the physiological root resorption in deciduous teeth the odontoblast layer (OD) becomes progressively reduced and disappear, while numerous HLA-DR immunopositive cells progressively invade the coronal pulp (A-B). Prior to shedding of deciduous teeth, peripheral nerve fibers became highly reduced and fragmented.

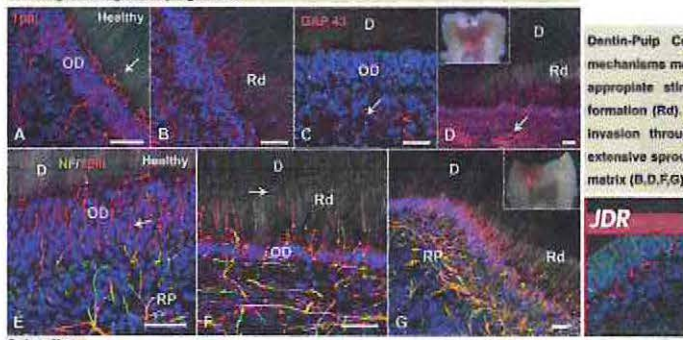


2. Innervation changes during aging of permanent teeth



The study of age-related changes in dental pulp innervation has been incompletely described. How this peripheral nerve ending network change along aging of permanent teeth is a fundamental question to understand neuroimmune responses against caries pathogens in adult teeth. Cryosections of demineralized teeth were assayed with specific neuronal and immunocompetent cells markers. Immunohistochemical comparative analysis between young and adult human teeth (A-C).

3. Changes during caries progression



Dentin-Pulp Complex response to caries progression are focal defensive mechanisms mediated by surviving post-mitotic odontoblasts (OD) in response to appropriate stimuli. Initial response is characterized by reactionary dentin formation (Rd). Reactionary dentin is an adaptive response that reduce bacterial invasion through the dentin tubules. In this region nerve endings develop extensive sprouting parallel to the radial collagen fibers of the reactionary dentin matrix (B,D,F,G).

E. Couve, P. Osorio, and O. Schmachtenberg
 Reactionary Dentinogenesis and Neuroimmune Response in Dental Caries
 J Dent Res 82(5):104-109, 2003

Conclusions

The dental pulp is the scenario of dramatic neuroplastic changes under different physiological and pathological conditions.

During root resorption a progressive reduction in odontoblasts is related with a regressive peripheral innervation.

During aging of permanent teeth there is also a relevant decrease in the nerve ending network concomitant to a reduced odontoblastic layer.

On the other hand, caries pathogens trigger neurodefensive reactions including extensive growth of nerve endings within the dental pulp.

Supported through FONDECYT grant Nos. 1141281 and 1120512 and the Millennium Institute CINV

Anexo 5

Poster Presentado en la XXVI Reunión Anual IADR División Chile 2014 (Octubre, Santiago-Chile).

Dental Pulp Innervation during Root Resorption in Human Deciduous Teeth

Suzuki K^(4,5), Lovera M⁽⁵⁾, Schmachtenberg O^(2,3), and Couve E^(1,3)



Instituto de Biología (1); Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV) (2); Facultad de Ciencias (3); Clínica de Odontología Pediátrica y del Adolescente (4); Facultad de Odontología (5); Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

Introduction

The processes involved in physiological root resorption in deciduous teeth are still incompletely understood. To explain changes in dental pulp innervation, the role of glia and immunocompetent cells is crucial to understand how the physiological root resorption process takes place as an asymptomatic condition that ends with tooth exfoliation. To this end, the present study quantitatively characterized dental pulp components during the root resorption process in deciduous teeth, using comparative immunohistochemistry and confocal microscopy.

Material and Methods

Twenty-eight deciduous teeth were extracted under clinical indication. Deciduous teeth with three different root resorption stages were fixed and demineralized. Longitudinal cryosections of each tooth were obtained and assayed with immunolabeling methods to characterize nerve fibers (NF-H, TuJ1), glial components (GFAP), myelin (MBP) and immunocompetent cells (HLA-DR, CD68). Confocal images (max. intensity z-stack projections) of axonal changes were obtained from two coronal dental pulp regions as indicated in the scheme (red boxes).

Results

During the initial stage of physiological root resorption, dental pulp organization remains well preserved with a peripheral nerve network innervating the dental pulp complex. In teeth with advanced (middle stage) root resorption, the odontoblast layer is significantly reduced, while numerous HLA-DR immunoreactive cells invade the dental pulp. Prior to exfoliation (final stage), at the coronal dental pulp, odontoblasts are flattened and peripheral nerve fibers assume a reduced and fragmented condition.

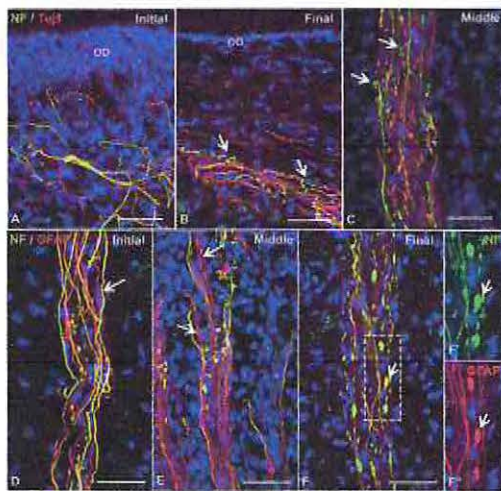
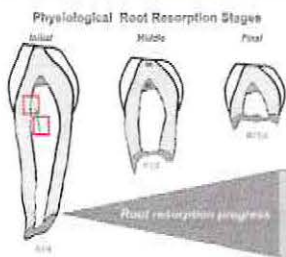


Figure 1 Representative confocal images showing neuronal markers (NF and TuJ1) and glia (GFAP) at three different stages of root resorption (A-F). Initial stages of root resorption display a well-organized nerve plexus at the dentin-pulp interface, with a prominent odontoblast layer (A). At middle and final root resorption stages, neurofilaments (NF) show severe granular fragmentation, while TuJ1 immunoreaction is preserved beneath a thinned odontoblastic layer (B-C, arrows). GFAP immunoreactive Schwann cells localize to the proximity of well-preserved NFs at initial stages (D, arrows). In teeth with more than half root resorption, strong immunolabeling is observed in activated Schwann cells (E, arrows = Douglas bodies). Axonal degeneration is prominent at final stages of root resorption (F). Active Schwann cells evidence a punctate immunoreaction with fragmented NF debris within satellite myelin void structures (see enlarged view, F-F', arrows). Scale bars = 50µm.

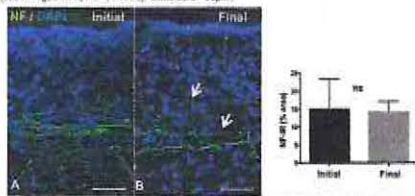


Figure 3 Representative axonal changes used for quantitative morphometric analysis of NF immunoreactivity at initial and final root resorption stages. Neurofilaments are progressively fragmented (B, arrows). Right: Semi-quantitative analysis of NF immunoreactivity revealed no difference in axonal labeling. Scale bars = 50µm.

Conclusion

Physiologic root resorption in deciduous teeth is accompanied by a prominent reduction of the odontoblastic layer associated with progressive peripheral denervation. Myelinated axons are degenerate with granular fragmentation of neurofilaments. Glial cells are activated during myelin debris removal, forming conspicuous myelin ovoids. Neurointrinsic changes within the dental pulp could explain the asymptomatic condition during the process of physiological root resorption in human deciduous teeth.

Supported by FONDECYT 1141281

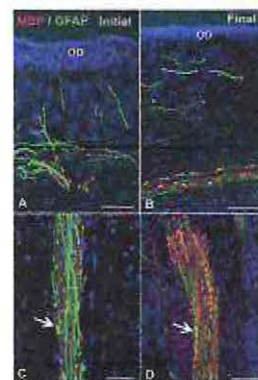


Figure 2 Confocal images showing axonal labeling of myelin component (MBP) and glia (GFAP). Fragmentation of myelin components is evident at early stages of root resorption (A, C). In demyelinating axons, GFAP is progressively fragmented into filament structures (B, D, arrows). Scale bars = 50µm.

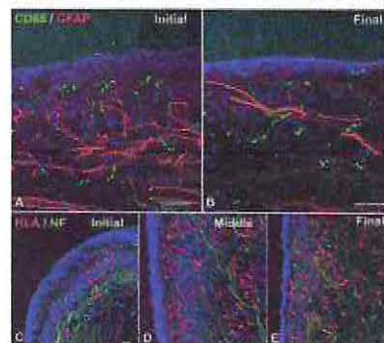


Figure 4 Confocal images showing labeling of macrophages (CD68) and immunocompetent cells (HLA). Macrophages are forming an activated network in correspondence with GFAP reactive cells (A-B). HLA immunoreaction displays a progressive increase during the root resorption progress (C-E). Scale bars = 50µm.

Innervation, Regeneration and Denervation in Human Deciduous Teeth

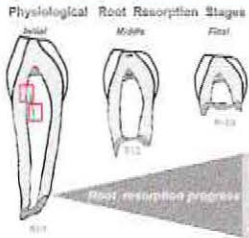
Suzuki K⁽⁴⁾, Schmachtenberg O⁽²⁻³⁾, and Couve E⁽¹⁻³⁾

Instituto de Biología (1); Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV) (2); Facultad de Ciencias (3); Clínica de Odontología Pediátrica y del Adolescente, Facultad de Odontología (4); Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile



Introduction

Deciduous teeth are highly innervated by sensory afferents of the trigeminal nerve, which are mainly polymodal nociceptors that sense injury. The processes involved in physiological root resorption (PRR) in deciduous teeth are still incompletely understood. To explain changes in dental pulp innervation, the role of glia and immunocompetent cells is crucial to understand how the physiological root resorption process takes place as an asymptomatic condition that ends with tooth exfoliation. The present study quantitatively characterized dental pulp components during physiological root resorption and caries progression in deciduous teeth, using comparative immunohistochemistry and confocal microscopy.



Material and Methods

Twenty-eight deciduous teeth with three different stages of root resorption and defined dentin caries lesions were extracted, fixed and demineralized. Longitudinal cryosections of each tooth were obtained and assayed with immunolabeling methods to characterize nerve fibers (NF-H, Tuj1), glial components (GFAP), myelin (MBP) and immunocompetent cells (HLA-DR, CD68). Innervation patterns and their changes were characterized using double-immunolabeling and confocal microscopy. Confocal images (max. intensity z-stack projections) of axonal changes were obtained from two coronal dental pulp regions as indicated in the scheme (red boxes).

Results

During the initial stages of PRR, dental pulp organization displays a well developed peripheral nerve network. In teeth with advanced (>2/3) root resorption, peripheral nerve fibers assume a reduced and fragmented condition. Myelinated fibers, affected during early PRR stages, display axonal degeneration including neurofilament fragmentation, with myelin debris taken up by reactive Schwann cells. Prior to exfoliation, at the coronal dental pulp, odontoblasts are flattened and denervation becomes evident. The odontoblast layer is progressively reduced, while numerous HLA-DR immunoreactive cells invade the dental pulp.

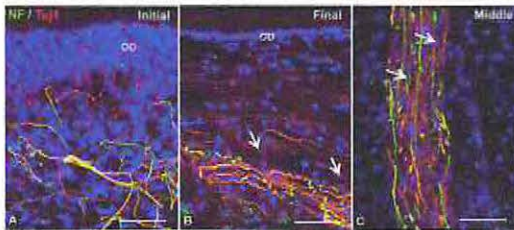


Figure 1 Representative confocal images showing minimal markers NF and Tuj1 and glia (GFAP) at three different stages of root resorption (A-F). Initial stages of root resorption display a well organized nerve network at the dentin-enamel interface, with a prominent subodontoblastic layer (A). At middle and final root resorption stages, neurofilaments (NF) show axonal granular fragmentation, while Tuj1 immunoreaction is preserved beneath a thinne odontoblastic layer (B-C, arrows). Scale bars = 50µm.

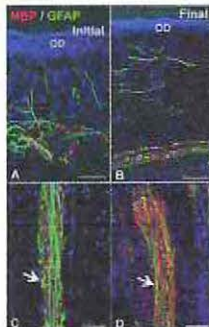


Figure 2 Confocal images showing double labeling of myelin component (MBP) and glia (GFAP). Fragmentation of myelin components is evident at early stages of root resorption (A, C). In demyelinated areas, GFAP is progressively fragmented into short structures (B, D, arrows). Scale bars = 50µm.

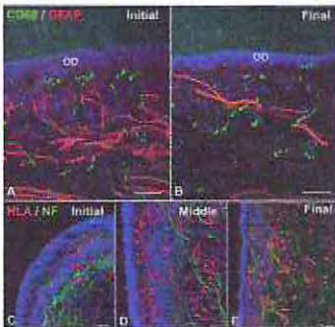


Figure 3 Confocal images showing double labeling of neurofilaments (NF) and immunocompetent cells (HLA). Macrophages are forming an organized network in representative area. GFAP positive cells (A,B). HLA immunoreaction displays a progressive increase during the root resorption process (C-E). Scale bars = 50µm.

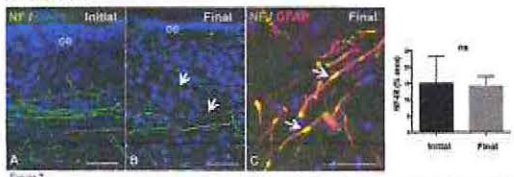


Figure 4 Representative zones selected for quantitative immunohistochemical analysis of NF immunoreactivity at initial and final root resorption stages (A-B). Neurofilaments are progressively fragmented (B, arrow). Fragmented profiles of NF become localized within Schwann cells at final stages (C, arrows). Right: Quantitative analysis of NF immunoreactivity (NF-IR) revealed no differences in overall labeling. Scale bars = 50µm.

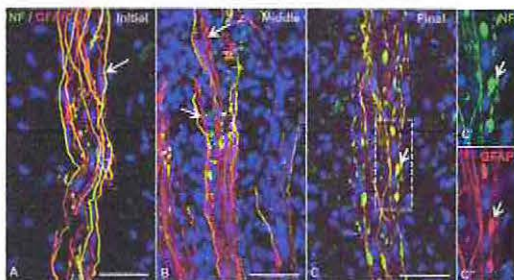


Figure 5 Confocal images showing double labeling of NF and GFAP. Axonal degeneration with fragmented NF debris and reactive Schwann cells (A, arrow). Axonal degeneration with fragmented NF debris and reactive Schwann cells (A, arrow). Axonal degeneration with fragmented NF debris and reactive Schwann cells (A, arrow). Axonal degeneration with fragmented NF debris and reactive Schwann cells (A, arrow). Scale bars = 50µm.

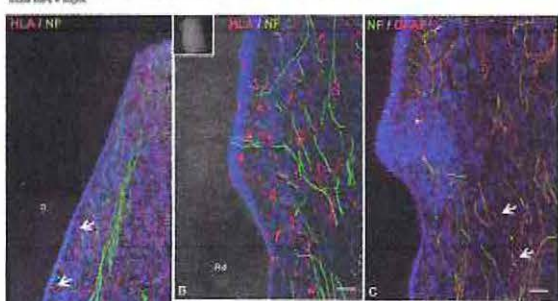


Figure 6 Confocal images showing double labeling of HLA and NF. Macrophages are forming an organized network in representative area. GFAP positive cells (A,B). HLA immunoreaction displays a progressive increase during the root resorption process (C-E). Scale bars = 50µm.

Conclusion

Dental pulp innervation in deciduous teeth shows a high degree of neural plasticity. While caries infection causes sprouting of nociceptor terminals, a progressive denervation is observed during root resorption in stages prior to tooth exfoliation. Myelinated axons degenerate with granular fragmentation of neurofilaments. Glial cells are activated during myelin debris removal, forming conspicuous myelin ovoids. Neuroimmune changes within the dental pulp could explain the asymptomatic condition during physiological root resorption in human deciduous teeth.