



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MENCIÓN NEUROCIENCIA

**RESPUESTA NEUROVASCULAR EN PULPA DENTAL DURANTE
REABSORCIÓN RADICULAR FISIOLÓGICA DE DIENTES
TEMPORALES HUMANOS**

KIYOKO SUZUKI BARRERA

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director de Tesis:

Prof. Eduardo Couve Montané

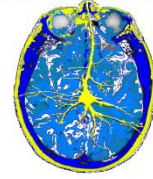
Valparaíso - Chile

2018



PROGRAMA MAGISTER EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS, MENCIÓN
NEUROCIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

Programa Magister
NEUROCIENCIA



Universidad de Valparaíso

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Coordinación de Post-Grado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

KIYOKO SUZUKI BARRERA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, en el examen de defensa de Tesis rendido el ____ de Septiembre de 2018

Director de Tesis:

Prof. Dr. Eduardo Couve

Evaluadores:

Prof. Dr. Oliver Schmachtenberg

Prof. Dr. Agustín Martínez

A Dios, a mi esposo Jorge, a mis padres, a mi hermana Claudia, a mis tíos Verónica y Jorge.

AGRADECIMIENTOS

Prof. Dr. Eduardo Couve, en mi carrera profesional hay un claro antes y después de haber conocido al Profesor Eduardo Couve. Gracias al profesor me reencontré con mi gusto por la ciencia, la investigación y la biología; me re encanté con la odontología y la biología pulpar. Trabajar junto a él me recordó porque en mi adolescencia elegí la ciencia, me hizo volver a soñar con descubrir y entender fenómenos. Siempre estaré profundamente agradecida por su pasión para ejercer la docencia y su generosidad para compartir todos sus conocimientos. Me motivó a confiar en mis capacidades y seguir mis metas, siempre inspirándome a soñar nuevos horizontes.

“Cuando yo he hecho una clase hermosa, me quedó más feliz que Miguel Ángel después del Moisés. Verdad es que mi clase se desvaneció como un celaje, pero es solo en apariencia. Mi clase quedó como una saeta de oro, atravesada siquiera en el alma de una alumna. En la vida de ella mi clase se volverá a oír, yo lo sé. Ni el mármol es más duradero que este soplo de aliento si es puro e intenso”.

Gabriela Mistral, 1979

Prof. PhD. Oliver Schmachtenberg, quien proporcionó de manera desinteresada, sus conocimientos y experiencia, siendo imprescindibles durante los años que compartimos en el laboratorio y durante la presente investigación.

Biol. Bárbara Cádiz, Victoria Devia y Constanza Berteau, quienes brindaron generosamente su ayuda y conocimientos en la realización del procesamiento de muestras y el uso de microscopía confocal, que fueron primordiales en la ejecución de esta investigación.

Sr. Fidel Vargas, quien siempre con gran disposición entregó sus conocimientos y experiencia, siendo esenciales en esta investigación.

A los alumnos Daniela Encalada, Diego Escudero y Macarena Orellana, quienes colaboraron con la recolección de muestras y con sus conocimientos, lo que permitió un correcto desarrollo de esta investigación.

Al Departamento de Biología Celular, Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, al Centro Interdisciplinario de Neurociencia y a la Facultad de Odontología Universidad de Valparaíso, que nos facilitó sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

A la Cátedra de Odontopediatría de la Universidad de Valparaíso, que permitió y facilitó la recolección de muestras durante el desarrollo de sus actividades clínicas en 4º año y 5º año de la carrera de Odontología, Universidad de Valparaíso.

FINANCIAMIENTOS:

Este Magister se realizó con el financiamiento de:

CONICYT-PCHA/Magister Nacional/2016- 22160217

Esta tesis se realizó con el financiamiento de:

FONDECYT 1141281 (EC)

ÍNDICE

Resumen/Abstract

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1 Reabsorción Radicular Fisiológica en Dientes Temporales	3
2.2. Inervación de la Pulpa Dental: Axones y Glía	9
2.2.1 Axones	9
2.2.2 Glía: Células de Schwann	11
2.3. Daño de Nervios Periféricos	13
2.3.1. Degeneración Walleriana y Células de Schwann	13
2.3.2. Reabsorción Radicular Fisiológica e Inervación Pulpar	19
2.4. Componentes Vasculares	21
2.4.1. Vasos Sanguíneos y Angiogénesis	21
2.4.2. Vasos Linfáticos y Linfangiogénesis	26
2.5. Componentes Vasculares en Pulpa Dental	30
2.6. Respuestas Neurovasculares durante Daño de Nervios Periféricos	38
3. Hipótesis y Objetivos	43
4. Materiales y Métodos	44
4.1 Tipo de estudio	44
4.2 Universo	44
4.3 Criterios de Inclusión/Exclusión	44
4.4 Muestra	45
4.5 Variables	45
4.6 Determinación de etapas de reabsorción radicular fisiológica	46

4.7 Secciones de muestra para inmunohistoquímica	47
4.8 Inmunohistoquímica	47
4.9 Análisis de muestras	49
4.10 Cuantificación y análisis estadístico	49
5. Resultados	50
6. Discusión	61
7. Conclusiones	68
8. Bibliografía	69

La reabsorción radicular fisiológica (RRF) en dientes temporales es un evento progresivo, que está mediado fundamentalmente por el folículo dental del diente sucesor, comprometiendo fenómenos de degeneración axonal de tipo Walleriana a nivel de la pulpa dental. En el presente estudio se ha planteado como hipótesis de trabajo, que los fenómenos de degeneración axonal durante RRF comprometen la activación de un fenotipo reparativo en células de Schwann asociado a respuestas vasculares e inflamatorias.

El estudio se realizó en caninos temporales humanos, clasificados en tres etapas de la reabsorción radicular (inicial, media y avanzada). Se analizaron los cambios en el fenotipo de células de Schwann, componentes vasculares y células inmuno-competentes mediante técnicas de inmunohistoquímica cuantitativa y microscopía confocal.

Los resultados muestran la reprogramación progresiva de las células de Schwann a fenotipos reparativos mediante el aumento significativo en la expresión del factor de transcripción c-jun y la expresión del receptor p75NTR en células de Schwann durante la RRF. Se determinaron cambios vasculares a través del aumento significativo de los vasos sanguíneos mediante el marcador CD31 especialmente en la zona de reabsorción, evidenciando significativos eventos de angiogénesis, cuantificados a través del marcador CD105 para las tres etapas definidas del proceso de reabsorción. Además, se evidenciaron fenómenos de linfangiogénesis determinados por la formación de una red de terminales linfáticos (PDPN⁺ y VEGFR3⁺) a nivel sub-odontoblástico en corona y raíz, especialmente aumentada en las etapas media y avanzada del proceso. Destacar el progresivo incremento de células inmuno-competentes (HLA⁺, CD68⁺, CD3⁺, CD15⁺) que definen el microambiente inflamatorio de la pulpa dental durante el proceso de RRF.

Es relevante destacar el conocimiento alcanzado en el presente trabajo, respecto a la interrelación entre la degeneración axonal, la reprogramación adaptativa de la célula de Schwann a un fenotipo reparativo, y los cambios vasculares e inflamatorios observados durante las distintas etapas de la reabsorción radicular fisiológica. Los resultados validan el efecto que tiene el proceso de reabsorción radicular sobre la capacidad de respuesta y plasticidad de los componentes neurovasculares de la pulpa dental.

Estudiar la respuesta de los componentes neurovasculares a nivel de la pulpa dental, es fundamental para comprender como estos procesos permiten un correcto recambio dentario, la mantención de una cronología normal de erupción y el progresivo declive de la función sensorial asociado a la etapa avanzada de la reabsorción radicular, permitiendo la exfoliación asintomática del diente temporal. Los resultados obtenidos confirman que los dientes temporales son un órgano sensorial, que mantienen su alta plasticidad y capacidad de reparación durante la progresión del proceso de reabsorción radicular fisiológica. Es esencial entonces lograr la traslación del conocimiento que resulta de esta investigación en procedimientos que impacten y eleven la calidad de la atención en la práctica odontológica.

ABSTRACT

Physiological root resorption (RRF) in primary teeth is a progressive event, which is fundamentally mediated by the dental follicle of the successor tooth, involving phenomena of axonal degeneration of the Wallerian type in the dental pulp. In the present study, it has been hypothesized that the phenomena of axonal degeneration during RRF compromise the activation of a reparative phenotype in Schwann cells associated with vascular and inflammatory responses. The study was carried out on primary human canines, classified in three stages of root resorption (initial, middle and advanced). Changes in the phenotype of Schwann cells, vascular components and immuno-competent cells were analyzed using quantitative immunohistochemistry and confocal microscopy techniques. The results show the progressive reprogramming of Schwann cells into repair phenotypes by significantly increasing expression of the transcription factor c-jun and p75NTR receptor in Schwann cells during RRF. Vascular changes were determined through the significant increase in blood vessels by means of the CD31 marker, especially in the resorption zone. Moreover, significant angiogenic activity was determined by the CD105 marker for the three defined stages of the resorption process. In addition, lymphangiogenesis phenomena evidenced by the formation of a network of lymphatic terminals (PDPN+ and VEGFR3+) at the sub-odontoblastic level in the crown and root, especially increased in the middle and advanced stages of the process. The progressive increase in immuno-competent cells (HLA+, CD68+, CD3+, CD15+) that define the inflammatory microenvironment of the dental pulp during the RRF process. It is important to highlight the knowledge reached in the present work, regarding the interrelationship between axonal degeneration, adaptive reprogramming of the Schwann cell to a reparative phenotype, and the vascular and inflammatory changes observed during the different stages of physiological root resorption. The results validate the effect of the root resorption process on the response capacity and plasticity of the neurovascular components of the dental pulp. Studying the response of the neurovascular components at the level of the dental pulp is essential to understand how these processes allow a correct dental replacement, the maintenance of a normal chronology of eruption and the progressive decline of the sensory function associated with the advanced stage of root resorption, allowing the asymptomatic exfoliation of the primary tooth. The results confirm that primary teeth are a sensory organ, which maintain their high plasticity and repair capacity during the progression of the physiological root resorption process. It is therefore essential to translate the knowledge resulting from this research into procedures that impact and enhance the quality of care in dental practice.

Los cambios que ocurren en la pulpa dental durante la reabsorción radicular fisiológica (RRF) en la dentición temporal aún no están del todo comprendidos. La reabsorción y exfoliación son procesos complejos que involucran eventos programados, asociados a 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 no están del todo comprendidos, 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).

Se ha observado que durante este proceso, en la pulpa dental hay una serie de cambios asociados a la inervación e infiltrado inflamatorio (Suzuki et al., 2015). De esta manera, se ha evidenciado una progresiva degeneración axonal con fragmentación de neurofilamentos, activación de las células de Schwann y su disposición en bandas de Büngner, eventos similares a los observados durante degeneración de tipo Walleriana.

Con respecto a los cambios observados en vasos sanguíneos de la pulpa dental, los estudios son escasos, se ha descrito un aumento de la vascularización asociado a RRF (Monteiro et al., 2009). Cambios en los vasos linfáticos no han sido estudiados durante la reabsorción radicular fisiológica. Sin embargo, se ha establecido linfangiogénesis asociadas a procesos inflamatorios dentro de la pulpa dental humana (Pimenta et al., 2003; Tahmiscija et al., 2012; Dacic et al., 2013).

Considerando que, la reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales es un evento progresivo, que está mediado fundamentalmente por el folículo dental del diente sucesor, comprometiendo fenómenos de degeneración axonal de tipo Walleriana a nivel de la pulpa dental, en el presente estudio se ha planteado como hipótesis de trabajo, que los fenómenos de degeneración axonal durante RRF comprometen la activación de un fenotipo reparativo en células de Schwann asociado a respuestas vasculares e inflamatorias.

Por lo anterior, el propósito del presente estudio es determinar la activación de células de Schwann y cambios vasculares e inflamatorios en la pulpa dental relacionados a fenómenos de degeneración axonal durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales. El estudio se ha enfocado en caracterizar mediante inmunohistoquímica comparativa y microscopía confocal los cambios en las células de Schwann, de los componentes vasculares y las células inmuno-competentes durante tres etapas definidas de la reabsorción radicular.

2.1 REABSORCIÓN RADICULAR FISIOLÓGICA EN DENTICIÓN TEMPORAL

Durante el desarrollo de los dientes temporales, se inicia su proceso de erupción 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 radicular 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).

Por otra parte, cabe destacar que la duración del proceso de reabsorción radicular fisiológica es de 5 años aproximadamente (Figura 1).

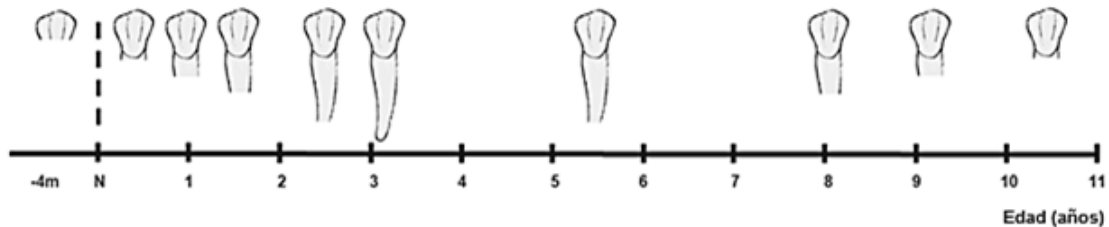


Figura 1: Línea de tiempo ciclo vital dientes temporales (caninos). Procesos de formación y reabsorción radicular (Adaptado de: Koch et al., 2011; Moorrees et al., 1963).

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:

Osteoclasto y remodelación ósea:

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; Tyrovolá 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 supervivencia 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 (Tyrovolá et al., 2008).

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 (Tyrovolá 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 catepsina 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 catepsina K, la catepsina 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).

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 osteoclastogenesis (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 osteoclastogenesis 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 definitivos comienza más tarde que la reabsorción fisiológica de molares con sucesores. En los molares temporales sin gérmenes definitivos, 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 temporales sin gérmenes de dientes definitivos (Lin et al., 2012).

Cementoblastos:

En la fase activa de la reabsorción radicular, se observan mayor cantidad de odontoclastos, 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 radicular, 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).

2.2 INERVACIÓN DE LA PULPA DENTAL: AXONES Y GLÍA

2.2.1 Axones

La pulpa dental se origina a partir de 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 multipotenciales capaces de diferenciarse en diversos tipos de células (Miura et al., 2003).

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) como la semaforina 3A (Sema3A) tienen funciones esenciales durante el desarrollo de la inervación y son reiteradamente requeridos en diferentes etapas de este proceso (Fried et al., 2000; Luukko y Kettunen, 2014).

Por otra parte, el dolor es un fenómeno subjetivo, que involucra respuestas sensoriales fisiológicas, aspectos emocionales, conceptuales y motivacionales del comportamiento, siendo la existencia de neuronas periféricas sensoriales nociceptivas esencial para conformar 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 mielínicos (fibras A) y no-mielínicos (fibras C) (Torneck, 1994).

Fibras A mielínicas: 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 (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 (Torneck, 1994; Bender, 2000).

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).

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

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).

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

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).

2.2.2 Glía: Células de Schwann

Las células de Schwann se originan a partir de células que migran de la cresta neural, son reconocidas como unas de las células más complejas del sistema nervioso periférico (SNP). Evidencian un alto grado de plasticidad, siendo capaces de transformarse rápidamente durante el desarrollo y en respuesta a lesiones de axones periféricos (Jessen & Mirsky, 2008).

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 las 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 (Figura 2) (Jessen & Mirsky, 2008; Kidd et al., 2013).

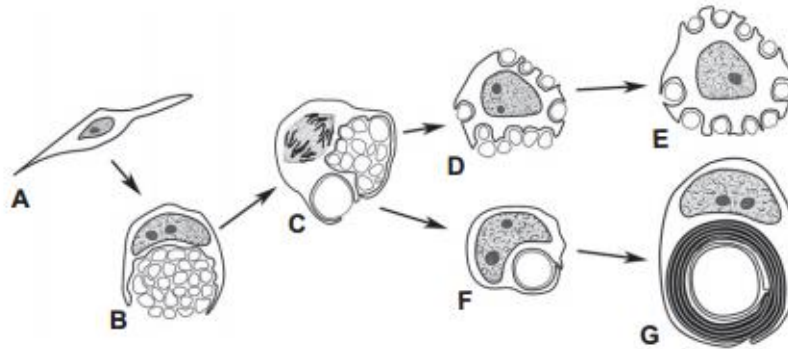


Figura 2: Estados de diferenciación de células de Schwann durante el desarrollo. A: migración célula de Schwann, B: rodea el haz de axones, C: segregación de un axón, D-E: célula asociada al haz de axones no-mielínicos, fibra de Remak, F-G: célula mieliniza el axón segregado (Kidd et al., 2013).

Como se detallará en la próxima sección; después de una lesión, las células mielinizantes degradan su mielina, se desdiferencian y se activan en células con un fenotipo reparativo, adquiriendo capacidades propias para guiar el proceso de regeneración (Jessen & Mirsky, 2016).

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 transformarse en una célula no-mielinizante capaz de remielinizar axones (Arthur-Farraj et al 2012; Kidd et al., 2013; Jessen & Mirsky 2016).

En la pulpa dental se ha observado una sofisticada organización de las células de Schwann, que forman parte de una red multicelular neuroinmune en asociación con fibras nerviosas,

vasos sanguíneos y células dendríticas (Farahani et al., 2011; Couve et al., 2018). Además se ha evidenciado su alta plasticidad fenotípica, durante procesos esenciales del ciclo vital de dientes temporales y definitivos como la reabsorción radicular fisiológica (Suzuki et al., 2015) y el envejecimiento (Couve et al., 2018).

Al mismo tiempo, la presencia de las células de Schwann como un componente celular en la interfase dentino-pulpar demuestra que su asociación con los terminales nerviosos sensoriales y los componentes del sistema inmunitario, forma parte de una barrera multicelular integrada para la defensa contra patógenos y la reparación de la dentina (Couve et al., 2018).

2.3 DAÑO DE NERVIOS PERIFÉRICOS

2.3.1 Degeneración Walleriana y células de Schwann

Como fue descrito originalmente por Waller en 1850, al observar los nervios hipogloso y glossofaríngeo en rana, luego de dañar mediante seccionamiento, la degeneración de nervios periféricos muestra una marcada producción de varicosidades axonales a lo largo del muñón distal de nervios periféricos (Waller, 1850).

Un daño como la axotomía o compresión de un nervio periférico conduce a la degeneración del segmento distal del nervio, este proceso se conoce como Degeneración Walleriana (WD). Durante este proceso se transforma el microambiente normalmente hostil al crecimiento de los nervios, en un terreno de apoyo al crecimiento, y dota al sistema nervioso periférico de su notable y característico potencial regenerativo (Arthur-Farraj et al 2012).

En roedores luego de un daño, los nervios periféricos pueden regenerarse con una tasa de 1-3 mm por día, este alto potencial de regeneración se atribuye a las propiedades únicas de las

células gliales del sistema nervioso periférico, las células de Schwann (Figlia, 2018; Jessen & Mirsky, 2016).

Debido a que las células de Schwann durante este proceso regenerativo, están especializadas para la reparación y difieren de otras células de su linaje, se denominan células de Schwann reparativas. Este fenotipo reparativo de la célula de Schwann es diferente a la célula de Schwann inmadura, ya que muestran un perfil de expresión molecular distinto (aumento de glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), oligodendrocyte transcription 1 (Olig1), Sonic hedgehog (Shh) y artemina; los que son controlados por c-jun) (Jessen & Mirsky, 2016). La célula de Schwann reparativa morfológicamente se caracteriza por ser alargada, esto da como resultado células que son aproximadamente 2 a 3 veces más largas que las células mielinizantes y Remak, a partir de las cuales se han originado. Por lo que, las células de mielinizantes y Remak dan paso a células alargadas que forman bandas de Büngner en los nervios lesionados y luego dichas células pueden volver a transformarse en células mielinizantes (Gomez-Sanchez et al., 2017). De esta manera guían la regeneración axonal permitiendo que los axones alcancen sus áreas blanco, gracias a la formación de las bandas de Büngner (Jessen & Mirsky, 2016).

Por lo tanto, si bien la función principal de las células de Schwann es la producción de mielina alrededor de los axones periféricos, después de un daño, estas células pierden rápidamente su estado diferenciado y se convierten en el centro de una respuesta compleja (Figlia, 2018):

(1) Degradación de mielina a través de la autofagia:

La degradación de la mielina dañada es esencial, ya que los desechos de mielina actúan como barrera para la regeneración axonal. El inicio de la degradación de mielina depende de la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2). Así PLA2 está aumentada en células de Schwann y

macrófagos luego del daño y permanece de esta manera hasta 2 semanas después (Gaudet et al., 2011).

Un evento importante en el inicio de la fragmentación de la mielina es la destrucción de la unión en las incisiones de Schmidt-Lanterman. Esta remodelación de la membrana parece requerir una función de enzimas lisosómicas. La Proteína-1 asociada a lisosomas (LAMP-1), un marcador lisosomal, aumenta drásticamente en los nervios lesionados y se localiza inicialmente en las incisiones durante la fragmentación de la mielina. Después de la lesión del nervio periférico, la autofagia se activa dentro del primer día en las células de Schwann. Por lo tanto, es muy probable que la activación de la autofagia y de lisosomas, sea un mecanismo de las células de Schwann para llevar a cabo la desmielinización (Tricaud & Park, 2017).

La desmielinización representa una reprogramación profunda de la célula de Schwann mielinizada. Este paso de la reprogramación celular comienza en el núcleo alrededor de 4 h después de la lesión del nervio. El evento mejor caracterizado en este paso es la activación del factor de transcripción c-jun. Este factor es un componente clave del complejo de transcripción AP-1. Durante la degeneración Walleriana, c-Jun está fuertemente regulado positivamente 4 h después de la lesión del nervio con una activación máxima a las 12 h (Tricaud & Park, 2017).

De esta manera se ha observado que la eliminación de c-Jun en las células de Schwann produce una degradación más lenta de la mielina, un crecimiento más lento del axón y una mayor pérdida de neuronas después de la lesión nerviosa. Por el contrario, la sobreexpresión de c-Jun en las células de Schwann da como resultado un aclaramiento de mielina más rápido, pero afecta la remielinización posterior (Fazal et al., 2017).

(2) Reclutamiento de macrófagos:

Por otra parte, se ha observado que las células de Schwann expresan receptores Toll-like (TLR) como TLR1 que luego de una axotomía están aumentados, este patrón de expresión de TLRs sugiere que la célula de Schwann tiene un rol centinela en el sistema nervioso periférico. En este sentido, se ha evidenciado que ligandos TLR endógenos, que se liberan de los axones que se desintegran, se unen los a los TLRs encontrados en las células de Schwann y las células inmunes (por ejemplo, macrófagos) que conducen a la activación de cascadas inflamatorias que son esenciales para promover la regeneración de los axones (Gaudet et al., 2011).

Luego de una semana de la lesión, las células inmunitarias reclutadas, especialmente los macrófagos, asumen un papel principal en la eliminación de desechos y la producción de factores de crecimiento en la próxima etapa de la degeneración Walleriana. Las células de Schwann en el nervio distal sintetizan las citoquinas proinflamatorias TNF- α e interleucina (IL)-1a en 5 hrs, y luego a las 24hrs IL-1b. Del mismo modo, la expresión de IL-6 y LIF (factor inhibidor de leucemia) se incrementa dentro de las 3 horas de PNI; el tratamiento con IL-6 de células de Schwann aumenta la expresión de MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1, MCP-1/CCL2). El TNF- α también provoca la producción de MCP-1 y la metaloproteinasa de matriz (MMP) -9; ambos necesarios para la acumulación de macrófagos inducida por el daño (Gaudet et al., 2011).

Esta acumulación de macrófagos, por un lado, contribuye a la degeneración Walleriana al eliminar los restos de mielina, y por otro lado, su heterogeneidad da lugar a un fenotipo antiinflamatorio (M2), promoviendo la regeneración del nervio periférico (Chen et al., 2015).

Por tanto, 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 (Stoll y Muller, 1999; Gaudet et al., 2011).

(3) Secreción de factores neurotróficos:

Como se expuso anteriormente la célula de Schwann se desdiferencia en un fenotipo reparativo diferente al de una célula de Schwann inmadura. Este fenotipo reparativo expresa un aumento de factores y receptores neurotróficos como: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurotrophin-3 (NT3), nerve growth factor (NGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), p75NTR, Sonic hedgehog (Shh) y artemina (Meyer et al., 1992; revisado en Jessen & Mirsky, 2016).

Además se ha observado que en ausencia de c-jun en las células de Schwann hay deficiencia en el proceso de regeneración axonal y un aumento de la muerte neuronal. Por lo que, luego de un daño axonal, la activación de c-jun en la glía es esencial para la expresión de factores neurotróficos importantes en el crecimiento del axón dañado (Arthur-Farraj et al 2012; Fontana et al., 2012)

De esta manera la célula de Schwann tiene un rol activo en la regeneración axonal luego del daño a través de la expresión de factores y receptores neurotróficos que permiten el crecimiento y supervivencia neuronal.

(4) Remielinización de axones regenerados:

Las células de Schwann se desdiferencian, regulan positivamente genes implicados en promover el crecimiento de axones, la supervivencia neuronal y la invasión de macrófagos, y activar mecanismos para romper sus vainas de mielina y transformar morfológicamente en células con procesos largos y paralelos. Esto les permite formar pistas de regeneración ininterrumpidas (Bandas de Büngner) que guían a los axones de regreso a sus objetivos. Para completar el proceso de reparación, las células de Schwann envuelven los axones regenerados y se transforman de nuevo para generar células mielínicas y no mielinizantes (Remak) (Stoll y Muller, 1999; Arthur-Farraj et al 2012).

Este proceso en el que las células de Schwann reparativas vuelven a ser células mielinizantes, se acompaña de un acortamiento notable de su morfología en 7 veces aproximadamente (Gomez-Sanchez et al., 2017).

Como se indicó en la sección anterior las células de Schwann secretan factores neurotróficos o expresan receptores de estos factores en respuesta al daño axonal. En este sentido la expresión de receptores del factor de crecimiento nervioso (NGFR) como p75 está sobrerregulada en los nervios dañados, teniendo correlación con la remielinización del axón comprometido (Song et al., 2006; Tomita et al., 2007). De esta manera la célula de Schwann juega un rol importante en la plasticidad de los axones terminales a través de la expresión de receptores como p75 (Couve et al., 2018).

2.3.2 Reabsorción Radicular Fisiológica e inervación pulpar

Durante la reabsorción radicular fisiológica, la inervación pulpar de dientes temporales presenta marcados cambios degenerativos. Hay un alto número de axones mielínicos y no-mielínicos en los dientes temporales, los que durante la reabsorción radicular se degeneran (Johnsen y Johns, 1978). Por lo que se observan varicosidades, lo que se acepta como signo definitivo de degeneración axonal. En general, los cambios degenerativos comprometen principalmente axones de alrededor de 1μ o más de diámetro (Mohiuddin, 1950).

Los cambios degenerativos en fibras nerviosas mielínicas ocurren temprano en el proceso de reabsorción radicular. Se han reportado cambios degenerativos similares en fibras nerviosas durante la degeneración Walleriana. Por tanto, los dientes temporales parecen ser un buen modelo para la observación de la degeneración nerviosa fisiológica (Karlsson et al., 1974).

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).

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).

De esta manera, se han evidenciado cambios en la inervación durante el proceso de reabsorción, se ha observado que la disposición de fibras nerviosas disminuye (Monteiro et al., 2009), con una marcada desorganización y progresiva fragmentación de neurofilamentos, a nivel del plexo de Raschkow. Además la fragmentación y degradación de la mielina es una característica comúnmente observada durante todo el proceso de reabsorción a nivel de haces axonales (Suzuki et al., 2015).

Por otra parte, durante las diferentes etapas del proceso de reabsorción radicular se evidencia 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. En la etapa final del proceso de reabsorción radicular, las células de Schwann se evidencian más irregulares y con 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. 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 (Suzuki et al., 2015). 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 re-organización (Fried et al., 2000).

2.4 COMPONENTES VASCULARES

2.4.1 Vasos sanguíneos y angiogénesis

El recubrimiento interno de los vasos sanguíneos está formado por células endoteliales, que surgen de la misma célula precursora que las células hematopoyéticas, el hemangioblasto (Choi et al., 1998). Por consiguiente, la integridad estructural y funcional de la célula endotelial es esencial en el mantenimiento de la pared del vaso y la función circulatoria (Sumpio et al., 2002).

De esta manera, las paredes de los vasos están compuestas por células endoteliales y células peri-endoteliales o murales (pericitos, células de músculo liso, fibroblastos), que están integradas en una matriz extracelular. Durante el desarrollo, el sistema vascular alcanza un nivel de organización compleja, gracias a procesos de vasculogénesis y angiogénesis que involucran eventos de formación, estabilización, ramificación, remodelación, poda y especialización. Por tanto, los vasos logran madurar en estructuras especializadas: capilares, arteriolas, vénulas, arterias y venas (Greif, 2012; Jain, 2003).

Los vasos sanguíneos más grandes son las arterias y las venas, que tienen una pared gruesa y resistente de tejido conjuntivo y capas de células musculares lisas. La pared interna está revestida por una lámina única extremadamente delgada de células endoteliales, el endotelio, separada de las capas externas circundantes por una lámina basal (Alberts et al., 2014).

Las arteriolas precapilares están completamente investidas de células musculares lisas vasculares que forman su propia membrana basal y están dispuestas circunferencialmente, estrechamente empaquetadas y estrechamente asociadas con el endotelio. Tanto arteriolas como vénulas tienen una mayor cobertura de células murales en comparación con los capilares (Jain, 2003).

Los capilares, los vasos más abundantes en nuestro cuerpo, debido a la estructura de su pared y su gran relación superficie-volumen, forman el sitio principal de intercambio de nutrientes entre la sangre y el tejido. Consisten en células endoteliales rodeadas por membrana basal y una capa escasa de pericitos (Jain, 2003).

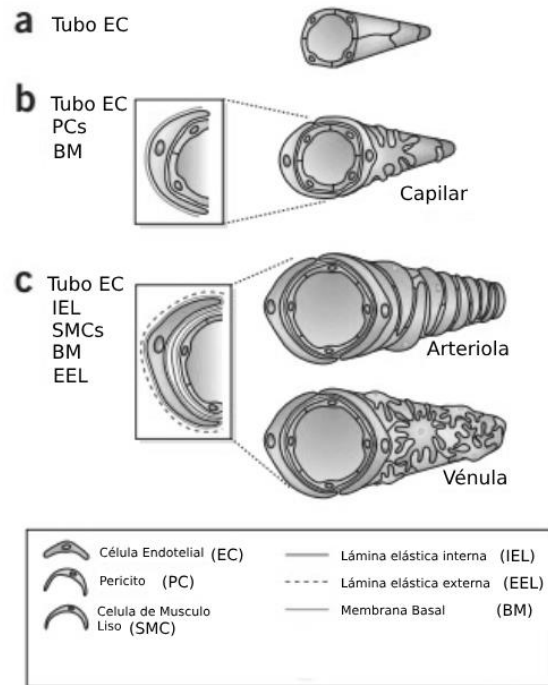


Figura 3: Composición de la pared de vasos sanguíneos: capilar, arteriola y vénula (Jain, 2003).

Los pericitos son células presentes en intervalos a lo largo de las paredes de capilares y vénulas poscapilares. Extienden procesos citoplasmáticos a lo largo de la superficie del tubo endotelial. Estos procesos generalmente abarcan varias células endoteliales y ocasionalmente se unen a ramas capilares vecinas. Los pericitos están envueltos en una membrana basal que es continua con la membrana basal endotelial. Por lo tanto, los pericitos maduros están dentro de una membrana basal en capilares y vénulas, una característica que hace posible identificar

sus procesos citoplasmáticos mediante electromicroscopía de transmisión en secciones ultrafinas (Armulik et al., 2011; Attwell et al., 2016). Los pericitos permiten mantener la estabilidad del vaso, modular la permeabilidad vascular y regular el flujo sanguíneo a través de su función contráctil. Debido a su heterogeneidad morfológica y funcional es que se ha sugerido definir distintas sub-clases de pericitos (Attwell et al., 2016).

Si bien hay varios marcadores conocidos de pericitos, estos no se encuentran únicamente en los pericitos y con frecuencia se expresan dinámicamente (Armulik et al., 2011). El uso de una combinación de marcadores de exclusión para otros tipos de células y la expresión positiva de marcadores de pericitos conocidos ha permitido una comprensión más profunda de estas células (Wong et al., 2015). Por ejemplo, el análisis inmunohistoquímico de muestras humanas ha revelado que la expresión de NG2 y α SMA en pericitos varía según el tipo de vaso que rodean. Los pericitos que rodean los capilares son NG2 + / α SMA-, en las vénulas NG2- / α SMA + y en las arteriolas NG2 + / α SMA +, con expresión de CD146 y PDGFR β en todas las muestras (Crisan et al., 2012).

Como se ha señalado anteriormente las células endoteliales son esenciales en la conformación y funcionalidad vascular. La célula endotelial participa en todos los aspectos de la homeostasis, pero también en los procesos fisiológicos o patológicos, como la trombosis, la inflamación o la remodelación de la pared vascular (Michiels, 2003).

Las células endoteliales embrionarias tempranas migran, proliferan y se diferencian para formar los primeros rudimentos de los vasos sanguíneos, en un proceso llamado vasculogénesis. El crecimiento posterior y la ramificación de los vasos en todo el cuerpo se produce principalmente por la proliferación y el movimiento de las células endoteliales de estos primeros vasos, en un proceso llamado angiogénesis (Alberts et al., 2014).

En ambos procesos (vasculogenesis y angiogenesis), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es un factor clave en la proliferación y migración de células endoteliales. VEGF es expresado por células hipóxicas y de esta forma activa la angiogenesis en las zonas hipóxicas (Carmeliet & Tessier-Lavigne 2005; Larrivee et al 2009).

Durante el crecimiento angiogénico, algunas células endoteliales dentro de la pared del vaso capilar se seleccionan para la proliferación. Estas células endoteliales se conocen como células tip, que tienen un patrón de expresión genética diferente al de las células del tallo o stalk, y por ello son capaces de guiar este proceso. Las células tip son células especializadas y con motilidad que extienden prolongaciones (filopodios) capaces de censar factores de crecimiento, matriz extracelular y otras señales atractivas o repulsivas en el tejido que las rodean (Adams & Eichmann 2010). La existencia de una célula tip y células stalk es esencial, ya que si todas las células proliferaran indiscriminadamente, la sección afectada de la red vascular podría desintegrarse y comprometer la perfusión tisular (Adams & Alitalo, 2007).

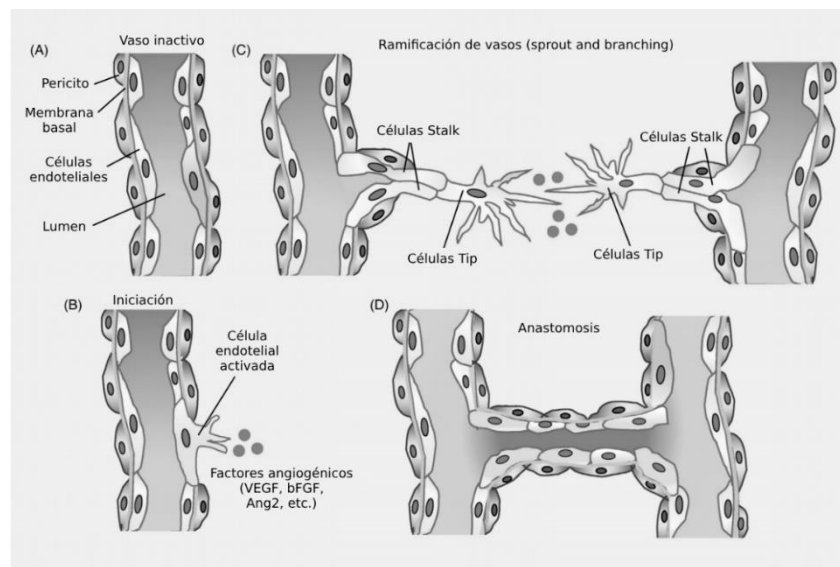


Figura 4: Esquema pasos del proceso de angiogenesis: vaso inactivo, inicio de brote, proliferación del vaso y anastomosis (Duran et al., 2018).

De esta manera, la proliferación está controlada por el equilibrio entre las señales pro-angiogénicas (+), como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factores que promueven la inactividad (-), como el contacto pericito-célula endotelial, ciertas moléculas de matriz extracelular (MEC) o inhibidores de VEGF (Adams & Alitalo, 2007).

Las células tip responden a VEGF-A guiando la migración, que funciona como una señal quimio atractiva que promueve la extensión polarizada de los filopodios; y la respuesta proliferativa a VEGF-A ocurre en las células stalk. Estas dos respuestas celulares están mediadas por la actividad agonista de VEGF-A en el receptor VEGF2 (Gerhardt et al., 2003).

Los receptores Notch y su ligando Delta-like-4 (DLL4) son esenciales para la proliferación. La señalización Dll4-Notch1 entre las células endoteliales sirve para restringir la formación de célula tip en respuesta a VEGF, estableciendo así la relación adecuada entre célula tip y las células stalk requeridas para los patrones de ramificación (Hellström et al., 2007). Para lograr este proceso, VEGF interactúa con VEGFR2, expresado en la superficie de las células endoteliales de los vasos preexistentes. Con la estimulación de VEGF, la expresión de Dll4 se incrementa en las células tip. A su vez, el ligando Dll4 activa la señalización de Notch en las células stalk, suprimiendo consecuentemente el fenotipo de la célula tip (Blanco & Gerhardt, 2013).

Por otra parte, como la angiogénesis está regulada por cambios en la tensión de O₂, y las células endoteliales y las células peri-endoteliales constituyen la primera línea de interfaz con la sangre, no es sorprendente que estas células estén equipadas con mecanismos para detectar diferencias en el suministro de O₂. Un ejemplo de mecanismos de detección de O₂, es que las células vasculares expresan sensores de O₂ que interactúan con la familia del factor

de transcripción inducible por hipoxia (HIF), que a su vez retransmite las adaptaciones a los cambios en la tensión de O₂ (Fraisl et al., 2009).

De acuerdo con el importante papel de la hipoxia en el proceso, una gran cantidad de genes implicados en diferentes etapas de la angiogénesis responden a la hipoxia. Se ha enfatizado la importancia de HIF (particularmente HIF-1 α) en la regulación de genes implicados en la angiogénesis. HIF-1 es un factor de transcripción con estructura de heterodímero que media la actividad inducible por la hipoxia (Pugh & Ratcliffe, 2003). De esta manera, HIF-1 juega un papel esencial en la activación de la expresión de VEGF en células hipóxicas (Forsythe et al., 1996).

2.4.2 Vasos Linfáticos y Linfangiogénesis

Los vasos linfáticos están diseñados para cumplir funciones especializadas como: homeostasis de fluidos, absorción de lípidos y tráfico de células inmunes (Betterman & Harvey, 2016). De esta manera, el sistema linfático proporciona un sistema de drenaje para el líquido (linfa) que se filtra de los vasos sanguíneos, así como una ruta de salida para los glóbulos blancos que han migrado de los vasos sanguíneos a los tejidos. Los linfáticos forman un sistema de ramificación de afluentes, que en última instancia descargan en un solo vaso linfático grande, el conducto torácico, que se abre hacia la vena subclavia, cerca del corazón. Al igual que los vasos sanguíneos, los linfáticos están revestidos con células endoteliales (Alberts et al., 2014).

El fluido intersticial formado a partir de la extravasación de soluto y fluido de los capilares sanguíneos, ingresa a los capilares linfáticos de 10-60 μm de diámetro, que consisten en una capa endotelial y una membrana basal. Las uniones especializadas, discontinuas, entre las

células endoteliales de los capilares linfáticos representan sitios de entrada de fluido y células inmune. Estos capilares transportan la linfa hacia los vasos linfáticos de mayor tamaño. Los vasos linfáticos recolectores de 50-200 μm de diámetro están compuestos por células endoteliales, una membrana basal, pericitos y válvulas endoteliales, que evitan el flujo linfático retrógrado, tienen uniones continuas célula-célula. La expansión del volumen del líquido intersticial ejerce tensión radial sobre los filamentos de anclaje unidos a las células endoteliales lo que aumenta el volumen luminal (Scallan et al., 2010; Alitalo et al., 2005; Coso et al., 2014).

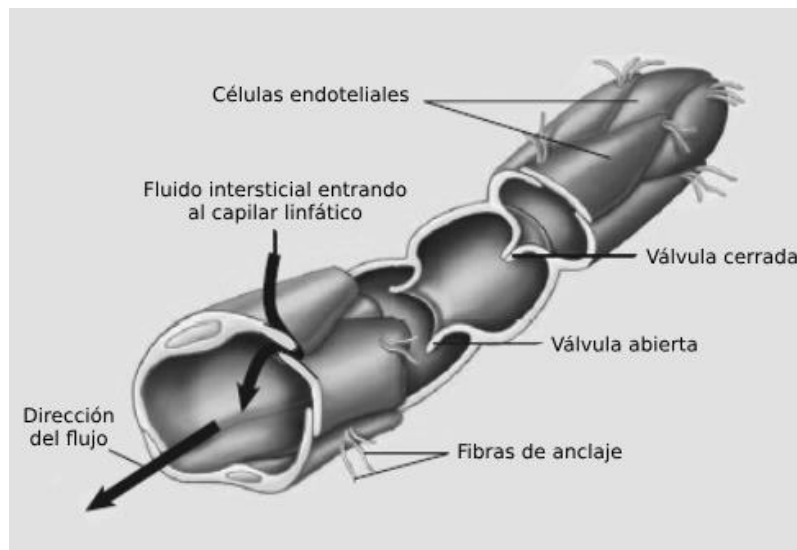


Figura 5: Esquema de la estructura del capilar linfático (Patton & Thibodeau, 2013).

Durante el período embrionario, la formación de vasos linfáticos es iniciada por la expresión del factor de transcripción homeobox Prox-1 en un subconjunto de células endoteliales de la vena cardinal. Las células endoteliales linfáticas que expresan Prox-1 migran y establecen el saco linfático primario que posteriormente es remodelado en una delicada red de vasos linfáticos. Células endoteliales linfáticas maduras expresan marcadores tales como Prox-1, receptor VEGF-3, receptor hialurónico endotelial de vasos linfáticos LYVE-1 y podoplanina

(mucoproteína transmembrana expresada selectivamente en el endotelio linfático), que se utilizan con frecuencia para identificar vasos linfáticos (Kim et al., 2012).

Las funciones especializadas del sistema linfático sugieren diferencias en la composición molecular del endotelio vascular linfático y sanguíneo (Podgrabinska et al., 2002).

Con respecto a lo anterior, se han observado distintos patrones de expresión de marcadores vasculares en vasos linfáticos y sanguíneos. LYVE-1 distingue inequívocamente el endotelio linfático del endotelio de vasos sanguíneos. Se detectó CD31 en todos los vasos, aunque los niveles de expresión fueron menores en el endotelio LYVE-1+. Los capilares sanguíneos también se marcaron fuertemente para CD34, que estaba completamente ausente de los vasos LYVE-1+. La expresión de actina del músculo liso (SMA α), un marcador de células murales, se limitó a capilares sanguíneos y no se detectó en asociación con vasos LYVE-1+ (Podgrabinska et al., 2002).

Además se evidenció que VEGF es un factor de supervivencia potente para las células endoteliales vasculares sanguíneas y linfáticas, que promueve la formación de una extensa red vascular. Por otra parte, VEGF-C indujo selectivamente la supervivencia y la formación de células endoteliales linfáticas (Podgrabinska et al., 2002). Esto se ha observado durante el desarrollo del sistema linfático, donde la salida de las células progenitoras endoteliales linfáticas de las venas cardinales depende del eje de señalización de VEGF-C/VEGFR3, que es una vía clave para regular el crecimiento y la morfogénesis de los vasos linfáticos (Betterman & Harvey, 2016).

Por otra parte, la linfangiogénesis es el desarrollo de la vasculatura linfática inicial, el crecimiento de nuevos vasos y la hiperplasia de las estructuras existentes (Abouelkheir et al.,

2017). Se genera en entornos de inflamación que van desde el microambiente tumoral a la infección y la enfermedad autoinmune. Si bien la mayoría de los casos incluyen infección, la promoción de la linfangiogénesis se ha relacionado con una mayor resolución de edema tisular y una activación más rápida y efectiva de la inmunidad adaptativa. Se ha relacionado también el aumento de linfangiogénesis a afecciones inflamatorias crónicas (Betterman & Harvey, 2016).

El mecanismo de señalización predominante y consistente para la linfangiogénesis es la activación del receptor VEGF (VEGFR) -3 por sus ligandos VEGF-C y VEGF-D. Los niveles séricos de VEGF-C y VEGF-D son elevados durante la inflamación, confirmando además un papel de conducción en la inflamación asociada a linfangiogénesis (Abouelkheir et al., 2017). VEGF-C y VEGF-D también se unen a neuropilin-2 (Nrp 2), un receptor de semaforinas en el sistema nervioso que también se expresa en los capilares linfáticos (Alitalo et al., 2005).

Múltiples tipos de células pueden participar o ayudar en la linfangiogénesis como una fuente de factores de crecimiento linfático que inducen la proliferación de las células endoteliales linfáticas. En este sentido, los macrófagos son una fuente importante de los factores de crecimiento pro linfangiogénicos como VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D, así como las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9 (Harvey & Gordon, 2012; Betterman & Harvey, 2016).

Por otra parte, se ha indicado un potencial regulador fisiológico en la linfangiogénesis, el flujo de fluido intersticial. En el mecanismo que se ha propuesto, los canales de fluido se forman dentro del medio extracelular, y luego las células endoteliales linfáticas migran a lo largo de estos canales para organizarse en una red linfática funcional (Boardman & Swartz, 2003).

2.5 COMPONENTES VASCULARES EN LA PULPA DENTAL

Vasos sanguíneos y Angiogénesis

La pulpa dental tiene una extensa red vascular cuya primera función es mantener la homeostasis a través del transporte de nutrientes, hormonas, gases y la remoción de productos de desecho. La microcirculación pulpar es un sistema dinámico que regula el flujo sanguíneo y linfático en respuesta a eventos metabólicos (Ikeda & Suda, 2012). Los vasos sanguíneos entran y salen de la pulpa dental por medio del foramen apical y accesorios. Una a dos arteriolas ingresan al foramen apical, con los haces nerviosos sensoriales y simpáticos. Los vasos que salen de la pulpa dental están estrechamente relacionados con las arteriolas y los haces nerviosos que ingresan al foramen apical (Nanci, 2013).

Una vez que las arteriolas entran en la pulpa, se produce un aumento en el calibre del lumen y por consiguiente, una reducción en el grosor de la pared del vaso. Las arteriolas ocupan una posición central dentro de la pulpa, algunas forman bucles en forma de U que pueden participar en la regulación del flujo sanguíneo pulpar. (Kim, 1985). Durante su curso en una dirección principalmente oclusal dan lugar a un gran número de ramas que pasan hacia el plexo capilar subodontoblástico (Kramer, 1960). El número de ramificaciones emitidas de esta manera aumenta a medida que las arteriolas pasan coronalmente, de modo que, en la región coronal de la pulpa, se observan numerosos capilares que se dividen y se subdividen para formar una extensa red capilar vascular (Saunders, 1957; Kramer, 1960; Rodd & Boissonade, 2005; Nanci, 2013). El plexo capilar es principalmente subodontoblástico, pero una pequeña cantidad de asas capilares penetran en la capa de odontoblastos (Kramer, 1960).

Esta distribución del plexo capilar parece estar relacionada con la distribución de los odontoblastos, ya que en ausencia de odontoblastos hay ausencia del plexo capilar periférico

(Kramer, 1960). Así, en pulpa dental de dientes de roedores se ha observado que los cambios en los capilares periféricos están estrechamente relacionados con la actividad secretora de los odontoblastos (Yoshida & Ohshima, 1996).

De esta manera, la red capilar terminal muestra una jerarquía progresiva continua, es decir, de arteriolas, con un diámetro $\leq 100 \mu\text{m}$ (Provenza, 1958; Kim, 1985) a capilares, con un diámetro $<10 \mu\text{m}$ (Harris & Griffin 1971; Kim, 1985) a vénulas, con un diámetro $\leq 200 \mu\text{m}$, por lo que el diámetro de las vénulas es mayor que el diámetro de las arteriolas (Kim, 1985).

Las vénulas tienen paredes más irregulares y ocupan el área mayor en la porción central de la pulpa. Desde el plexo capilar subodontoblástico, el drenaje venoso tiene la forma de un gran número de vasos que se extienden principalmente oblicuamente hacia la parte central de la pulpa y en dirección apical. A medida que las venas se acercan al foramen apical, parecen reducirse tanto en número como en diámetro (Kramer, 1960; Kim, 1985).

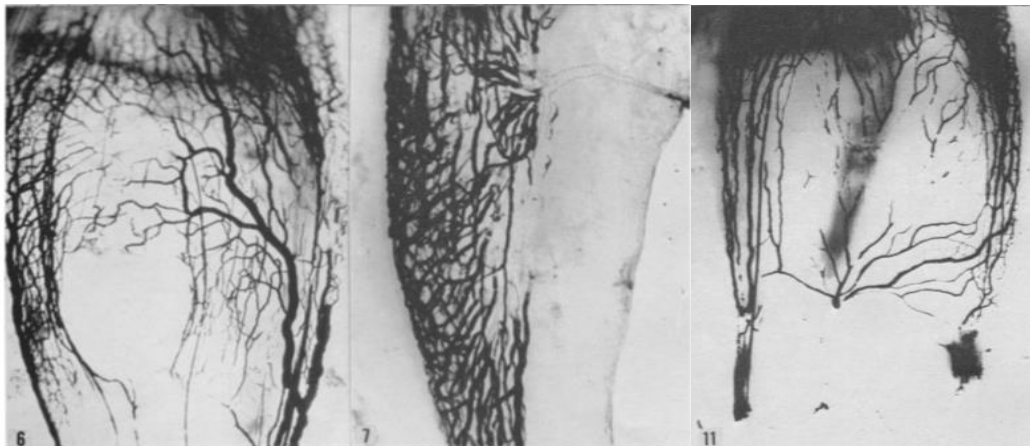


Figura 6: Fotomicrografías que muestran los vasos sanguíneos de la pulpa cameral y de conductos radiculares en un segundo molar temporal humano (Kramer, 1960).

Por otra parte la pulpa dental se caracteriza por presentar anastomosis arteriovenosas y arteriolas de bucle en forma de U, señaladas anteriormente (Harris & Griffin, 1971; Kim,

1985). Al respecto cabe destacar que debido a que la pulpa dental está casi completamente encerrada en la dentina rígida e inflexible, no puede producirse una expansión significativa del tejido, y se cree que en condiciones inflamatorias, los mecanismos que producen tumefacción pulpar podrían provocar la estrangulación de los vasos apicales y una consecuente necrosis pulpar. De esta manera las anastomosis arteriovenosas pueden tener una influencia importante en el resultado de episodios que tienden a alterar el flujo sanguíneo en la pulpa (Kramer, 1960).

En la pulpa dental, se pueden identificar 6 segmentos vasculares fundamentales en función de la morfología de las células peri-endoteliales, como las células de músculo liso y los pericitos. Estos segmentos son arteriolas musculares, arteriolas terminales, arteriolas precapilares, capilares, vénulas poscapilares, y vénulas (Iijima & Zhang, 2002).

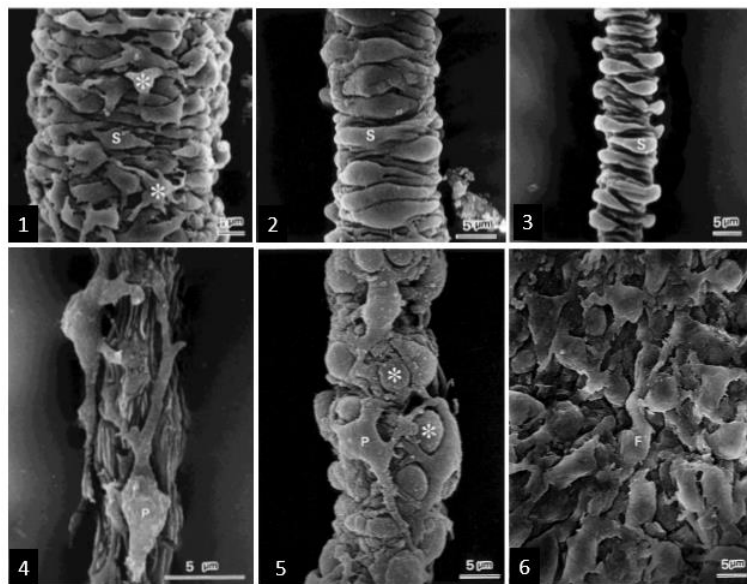


Figura 7: Micrografía electrónica de barrido mostrando arteriola muscular (1), arteriola terminal (2), arteriola precapilar (3), capilar (4), vénula postcapilar (5) y vénula (6) en pulpa dental de perro (Iijima & Zhang, 2002).

En vasos pequeños, las capas peri-endoteliales consisten en células de músculo liso en arteriolas, y pericitos en capilares o vénulas. Las células de músculo liso se distinguen de los pericitos por su orientación con respecto al eje vascular longitudinal; las células orientadas circularmente se consideran células de músculo liso, mientras que las orientadas longitudinalmente son pericitos. Los pericitos son muy escasos en los capilares, mientras que los de las vénulas son más numerosos y emiten procesos en todas las direcciones (Iijima & Zhang, 2002).

Por otra parte, la hipoxia inicia la angiogénesis en la pulpa dental dañada, que se genera cuando el tejido pulpar está sujeto a la interrupción del suministro de oxígeno: crecimiento del germen dental durante el proceso de desarrollo, crecimiento del germen del diente modificado después del injerto en vivo; y situaciones patológicas encontradas durante lesiones de pulpa cariadas/post-trauma dental y durante procedimientos terapéuticos (Rombouts et al., 2017).

Lo anterior se ha observado en células en cultivo, donde la hipoxia aumentó la expresión de HIF-1alfa y VEGF en células madre de pulpa dental (DPSCs) y fibroblastos de pulpa dental (HDPF). En medio hipóxico los HDPF (no DPSCs) indujeron la proliferación y el brote de células endoteliales en comparación con el medio de las células normóxicas. Estos datos demuestran que la hipoxia induce respuestas proangiogénicas y sugieren que el VEGF participa en la revascularización de pulpas dentales hipóxicas (Aranha et al., 2010).

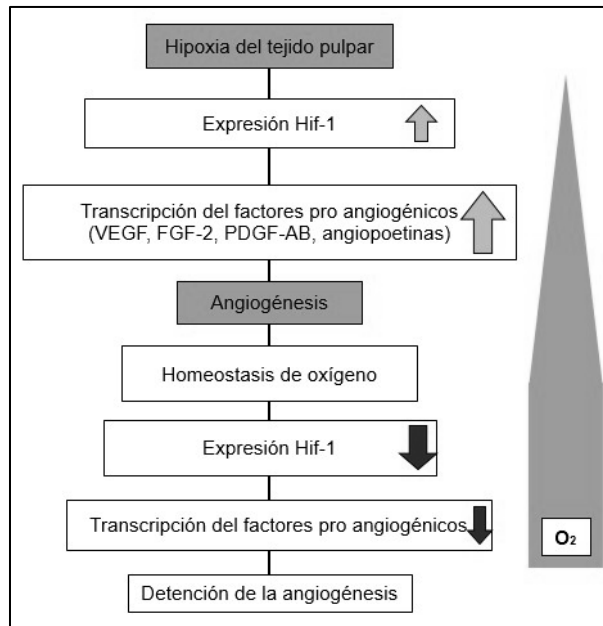


Figura 8: Diagrama conceptual de hipoxia pulpar y el aumento de factores proangiogénicos, que inducen a angiogénesis (Rombouts et al., 2017).

De esta manera, se ha evidenciado que en condiciones hipóxicas se observa una mayor secreción de VEGF en células madre obtenidas de papila apical, en fibroblastos de pulpa dental y células madre de pulpa dental (Rombouts et al., 2017).

Por otra parte, también se han observado factores proangiogénicos, luego de condiciones de estrés en cultivo, en las cuales monocapas celulares se sometieron a lesiones mecánicas y secretaron niveles significativos de PDGF-AB, VEGF y FGF-2. Se demostró que PDGF-AB parece jugar un papel importante porque su nivel mostró el mayor aumento en células lesionadas mecánicamente (Tran-hung et al., 2008).

Además se han obtenido resultados que indican, que cuatro factores de crecimiento angiogénicos (VEGF, FGF-2, PDGF, TGFβ) se liberaron después de la aplicación de fuerza ortodóncica y desempeñan un papel en la respuesta angiogénica de la pulpa, siendo más eficaces en combinación (Derringer & Linden, 2004). Se ha demostrado que tanto VEGF

como FGF-2 son esenciales en la revascularización, ya que ambos factores angiogénicos aumentaron la densidad de microvasos pulpares en comparación con los controles no tratados (Mullane et al., 2008).

Por lo tanto, las células de la pulpa dental secretan factores de crecimiento angiogénicos que juegan un papel fundamental en la angiogénesis que precede a la formación reparadora de dentina (Tran-hung et al., 2008). La secreción de dichos factores de modulación subraya el importante papel de la capacidad angiogénica de la pulpa durante su propia regeneración (Rombouts et al., 2017).

Vasos Linfáticos y Linfangiogénesis

La presencia de vasos linfáticos dentro de la pulpa dental se ha evaluado a través de diferentes técnicas (inmunohistoquímica, microscopía electrónica, tinción de hematoxilina-eosina, principalmente). Como se indicó anteriormente la pulpa dental está rodeada de tejido duro inextensible, por lo que la presencia de una red vascular que permita la homeostasis de fluidos, absorción de lípidos y tráfico de células inmunes, es fundamental para mantener el equilibrio dentro del tejido pulpar.

Se han observado mediante marcadores LYVE-1 y VEGFR-3 un extenso sistema de vasos linfáticos en la pulpa dental en ratas y ratones. Para evaluar linfangiogénesis se realizó una exposición pulpar, y luego de una semana, se encontró una red fina de vasos linfáticos desde el área inflamada hasta la exposición. Además se observó una co-localización de anticuerpos LYVE-1 y F4/80 (anticuerpo de macrófagos en roedores) en el área bajo la exposición, este hallazgo podría indicar que los macrófagos contribuyen directamente a la formación de nuevos vasos linfáticos (Berggreen et al., 2009).

En la pulpa dental de gatos se encontraron vasos linfáticos en todos los dientes que fueron estudiados. En la mayoría de los dientes los vasos linfáticos estaban presentes en la corona y en las regiones apicales de la pulpa, en la zona subodontoblástica o más centralmente en la pulpa: pero no se encontró ninguno en la capa odontoblástica o en los cuernos pulpares (Bishop y Malhotra, 1990).

Con respecto a la distribución de los vasos linfáticos en pulpa dental humana se han descrito vasos linfáticos de varias dimensiones en la pulpa central de los dientes estudiados. Por lo general, acompañan a los vasos sanguíneos en su curso a través de la pulpa. Los capilares linfáticos que están compuestos por una sola capa de células endoteliales se originaron como inicios ciegos en la capa odontoblástica, en la pulpa propiamente dicha y adyacentes a la capa odontoblástica (Bernick, 1977).

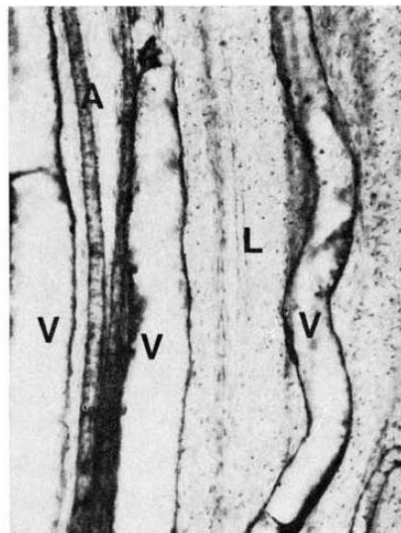


Figura 9: Sección de pulpa dental de un molar superior definitivo, donde el vaso linfático acompaña vénulas y arteriolas en su curso por la pulpa (Bernick, 1977).

La presencia de vasos linfáticos en pulpa dental sana ha sido un tema controvertido, de esta manera hay estudios que describen su ausencia en pulpa dental de perros (Martin et al., 2010),

y en humanos (Gerli et al., 2010). Sin embargo, otros estudios han demostrado la presencia de vasos linfáticos en pulpa dental humana sana (Bernick, 1977; Marchetti et al., 1992; Matsumoto et al., 2002) y durante procesos inflamatorios (Marchetti et al., 1992; Pimenta et al., 2003; Tahmiscija et al., 2012; Dacic et al., 2013).

De esta manera, algunos estudios han descrito el impacto de la inflamación en los vasos linfáticos dentro de la pulpa dental humana. Al respecto a través de anticuerpos CD31 y VEGFR3 se ha observado un aumento en el número de vasos linfáticos de pulpas con inflamación asociada a caries (Pimenta et al., 2003). También se ha observado un aumento del número de vasos linfáticos asociado a inflamación mediante el anticuerpo D2-40 (podoplanina) (Tahmiscija et al., 2012); y mediante vasos CD31+ con un lumen sin glóbulos rojos (Dacic et al., 2013). Estos resultados sugieren procesos de linfangiogénesis asociados a procesos inflamatorios dentro de la pulpa dental humana.

Teniendo en cuenta los estudios recientes, se puede concluir que el sistema de drenaje linfático de la pulpa sana está poco desarrollado. La mayoría de los vasos linfáticos pueden aparecer en la pulpa inflamada como resultado de la linfangiogénesis que se produce principalmente en respuesta a una mayor presión del líquido intersticial. Sin embargo, se necesitan más investigaciones, particularmente con inmunohistoquímica con anticuerpos altamente específicos, para sacar conclusiones finales (Stefanski, 2013).

2.6 RESPUESTAS NEUROVASCULARES DURANTE DAÑO DE NERVIOS PERIFÉRICOS

Organización y Relación de los Componentes Neurovasculares

Durante el desarrollo, las fibras nerviosas y vasos sanguíneos se organizan mediante un patrón de alineamiento altamente jerárquico y ordenado a través de nuestro organismo. Así, los mecanismos involucrados en la organización de las redes nerviosas y vasculares mantienen similitudes esenciales (Carmeliet & Tessier-Lavigne 2005).

Sabemos que el descubrimiento de las moléculas que guían el crecimiento axonal, ha mostrado que los axones son guiados para alcanzar sus blancos a través de señales atractivas y repulsivas. También se ha observado que estas señales guían a los vasos sanguíneos durante la vasculogénesis y angiogénesis (Carmeliet & Tessier-Lavigne 2005; Larrivee et al 2009).

Por otra parte, en la piel se ha observado que los nervios periféricos proporcionan un modelo que determina el patrón de la ramificación de los vasos sanguíneos y la diferenciación arterial, a través de la secreción local de VEGF (Mukoyama et al., 2002). Además durante el proceso de angiogénesis, las células tip, extienden prolongaciones capaces de censar factores de crecimiento y otras señales atractivas o repulsivas en el tejido que las rodean (Adams & Eichmann 2010).

De la misma manera, se ha observado que los vasos producen señales (como artemina y neurotrofina-3) que atraen axones a la cercanía del vaso (Carmeliet & Tessier-Lavigne 2005).

Así, tanto las células tip como los conos axónicos responden a guías moleculares de las mismas familias como: Slits y Roundabouts, Netrinas y receptores UNC5, Semaforinas,

Plexinas y Neuropilinas, Efrinas y receptores de efrinas (Carmeliet & Tessier-Lavigne 2005; Adams & Eichmann 2010; Quaegebeur et al., 2011).

Por tanto, la angiogénesis y la regeneración axonal tienen la misma función, alcanzar y mantener el tejido blanco. Como se indicó anteriormente, en el caso de los vasos el tejido hipóxico secreta VEGF, iniciando la vascularización. Así la expresión de VEGF esta disminuida cuando la célula recibe un apropiado suministro de oxígeno. En el caso de los axones, el tejido blanco sin inervación secreta factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el que disminuye al conseguir una apropiada inervación en el tejido. Cabe destacar que la formación de la red capilar y de los axones terminales está gobernada por los requerimientos metabólicos y eléctricos de los tejidos blanco (Carmeliet & Tessier-Lavigne 2005). Por lo anterior, ambos sistemas son capaces de generar respuestas coordinadas y complejas ante procesos de degeneración/regeneración.

Daño de Nervios Periféricos: Respuestas Neurovasculares

Como se señaló en la sección 2.3 luego de un daño en nervios periféricos, se genera una respuesta multicelular en la que los axones se degeneran, proceso conocido como degeneración Walleriana. El objetivo de este proceso es lograr la regeneración axonal y con esto alcanzar el tejido blanco nuevamente.

Durante este proceso la célula de Schwann juega un rol esencial en la guía de los axones a través de bandas de Büngner. Sin embargo, para llevar a cabo este rol la célula de Schwann necesita a su vez la guía de vasos sanguíneos polarizados en el sitio del daño o zona de seccionamiento (Cattin et al., 2015).

Luego del daño, el ambiente hipóxico en la zona de sección es censado por los macrófagos, los que secretan VEGF-A, generando respuestas de angiogénesis en las células endoteliales.

Esto permite la formación de vasos sanguíneos en la zona de sección los que servirán de guía a las células de Schwann para su migración, gracias a protrusiones en ambas células; y a su direccionalidad, dada por la orientación de los vasos sanguíneos hacia los tejidos blancos. Cómo se genera esta orientación de los vasos sanguíneos aún no se ha podido establecer (Cattin et al., 2015; Cattin & Lloyd, 2016).

Por otra parte, se ha observado que luego de una compresión crónica del axón, la célula de Schwann aumenta la liberación de VEGF y la expresión de sus receptores. De esta manera, hay una inducción de la angiogénesis de los vasos sanguíneos en el sitio del daño por las células de Schwann (Gupta et al., 2005).

Lo anterior evidencia que luego de un daño (corte o compresión crónica) hay una interacción de los componentes neurovasculares que dan paso a respuestas complejas que coinciden en su cronicidad y dependen unas de otras.

Relación y respuestas Neurovasculares en la pulpa dental

En la pulpa dental humana de dientes temporales y definitivos, se ha demostrado que hay un alineamiento entre nervios y vasos sanguíneos desde que entran por el foramen apical y recorren el centro de la pulpa. Luego, nervios y vasos se ramifican y forman plexos próximos a la capa odontoblástica (Rodd & Boissonade, 2003; Zhang et al., 2017).

Durante eventos de daño como trauma oclusal (función masticatoria que excede la tolerancia y capacidad de adaptación de la pulpa y del ligamento periodontal, generando estrés mecánico) se ha observado la liberación de neuropeptidos que modulan el dolor y la inflamación como mecanismos de defensa en respuesta a este daño. De esta forma, se ha demostrado que la pulpa dental responde a estos eventos masticatorios a través de un proceso

inflamatorio neurogénico en el que la sustancia P desempeña un papel importante en la angiogénesis que va a permitir la formación de tejido mineralizado como mecanismo de defensa (Caviedes-Bucheli et al., 2017).

Por otra parte, la reabsorción radicular fisiológica, como indicamos en las secciones anteriores, es un proceso que dura aproximadamente 5 años (Moorrees et al., 1963) y constituye por tanto un daño compresivo crónico. Se han observado durante este proceso cambios en la inervación pulpar, en los componentes vasculares e infiltrado inflamatorio.

Como se señaló en la sección 2.3.2 con respecto a la inervación pulpar durante este proceso, se ha observado degeneración axonal de tipo Walleriana (Figura 11) (Mohiuddin, 1950; Karlsson et al., 1974; Brenan, 1986; Monteiro et al., 2009; Suzuki et al., 2015). Además se ha observado un aumento de los componentes vasculares asociado a la progresión de la reabsorción radicular (Monteiro et al., 2009).

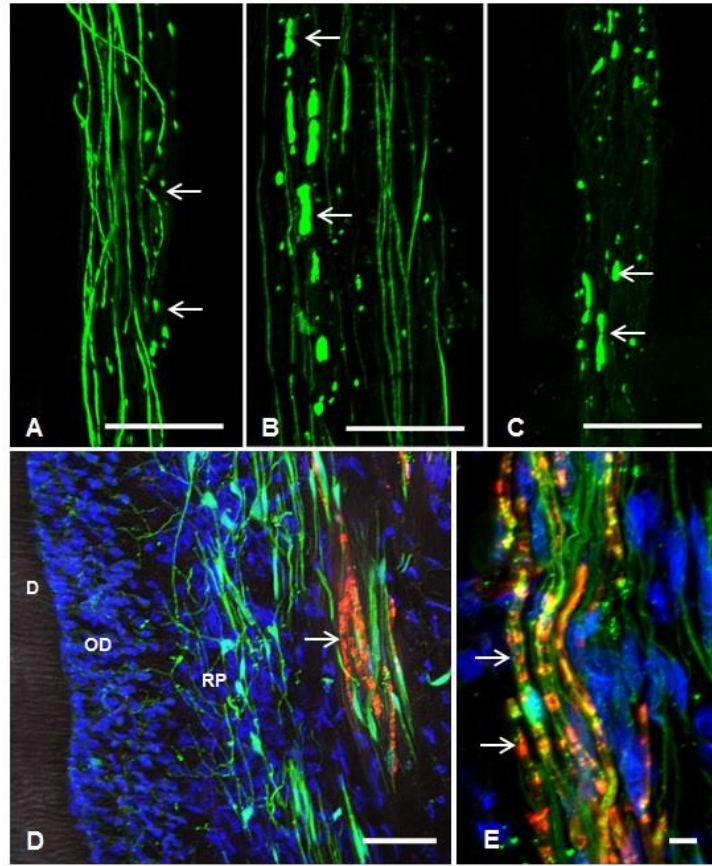


Figura 10: Fragmentación de neurofilamento (NF-200, verde) (A-C, flechas) y degradación de mielina (S-100, verde; MBP, rojo) (D-E) durante la reabsorción radicular fisiológica (RRF) en la pulpa dental de dientes temporales. (A) En etapa inicial RRF, (B) Etapa media RRF, (C) Etapa avanzada RRF. (D) Interfase dentino-pulpar en etapa inicial de RRF, se observan células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes dentro del plexo de Raschkow (RP) y degradación de los axones mielinizados (flecha), (E) En etapa media de RRF se observa mayor degradación de mielina (flechas) (Modificado de Suzuki et al., 2015).

También, se ha demostrado un aumento en el infiltrado inflamatorio, principalmente de macrófagos y células dendríticas (Angelova et al., 2004; Suzuki et al., 2015).

Lo anterior indica que la reabsorción radicular fisiológica es un evento de daño compresivo crónico que conlleva respuestas multicelulares asociadas a un proceso de degeneración axonal de tipo Walleriana.

Hipótesis

La reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales es un evento progresivo, que está mediado fundamentalmente por el folículo dental del diente sucesor, comprometiendo fenómenos de degeneración axonal de tipo Walleriana a nivel de la pulpa dental.

Como hipótesis de trabajo se plantea:

Los fenómenos de degeneración axonal durante RRF comprometen la activación de un fenotipo reparativo en células de Schwann asociado a respuestas vasculares e inflamatorias.

Objetivo general

Determinar la activación de células de Schwann y cambios vasculares e inflamatorios en la pulpa dental relacionados a fenómenos de degeneración axonal durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales.

Objetivos específicos

1. Validar el fenómeno de activación de células de Schwann durante el proceso de reabsorción radicular mediante marcadores específicos (S100, c-jun y p75NTR).
2. Caracterizar cambios en los componentes vasculares durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica mediante marcadores vasculares para vasos sanguíneos (CD31, CD34, vWF, CD105, CD146) y linfáticos (Podoplanina y VEGFR3).
3. Establecer características del infiltrado inflamatorio durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica mediante marcaje de células inmuno-competentes (HLA, CD45, CD68, CD3 y CD15).

4.1 Tipo de estudio

Estudio descriptivo observacional de la inervación y vascularización pulpar en dientes temporales con reabsorción radicular fisiológica.

4.2 Universo

Dientes temporales con indicación de exodoncia, atendidos en la clínica de pregrado de la cátedra de odontopediatría de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, donados mediante consentimiento escrito entre los meses de Agosto del año 2017 y Enero del año 2018.

4.3 Criterios de Inclusión/exclusión

Inclusión:

- Pacientes sistémicamente sanos
- Pacientes con dentición temporal o mixta.
- 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. 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: 30 Dientes temporales (caninos).

Promedio de edad: 9 años 9 meses

Forma de selección: Muestreo no probabilístico. Los dientes fueron recolectados en la clínica de pregrado de la cátedra de odontopediatría de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Las muestras se obtuvieron de acuerdo con los criterios de inclusión/exclusión. Los caninos temporales fueron recolectados a medida que se fueron extrayendo durante el segundo semestre del año 2017 y enero del año 2018, hasta llegar a un número de 30 dientes seleccionados para realizar el estudio.

Unidad de estudio: Inervación y vascularización de la pulpa dental de dientes temporales.

4.5 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 etapas (inicial, media y avanzada).
3. Células gliales (C. Schwann): Variable cualitativa. Se identificarán mediante los anticuerpos S-100, p75 y c-jun.
4. Vasos sanguíneos: Variable cualitativa. Se identificarán mediante los anticuerpos CD31, CD34, VWF, CD105, CD146.
5. Vasos linfáticos: Variable cualitativa. Se identificarán mediante los anticuerpos Podoplanina y VEGFR3.
6. Células inmuno-competentes: Variable cualitativa. Se identificarán mediante los anticuerpos HLA, CD68, CD3 y CD15.

4.6 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 1/4); media, definida como la etapa en la que permanece la mitad de la raíz (res 1/2) y avanzada, definida como la etapa en la que se han reabsorbido 3/4 de la raíz (res 3/4) (Esquema 1) (Moorrees et al., 1963; Knott y O'Meara, 1967; Haralabakis et al., 1994).

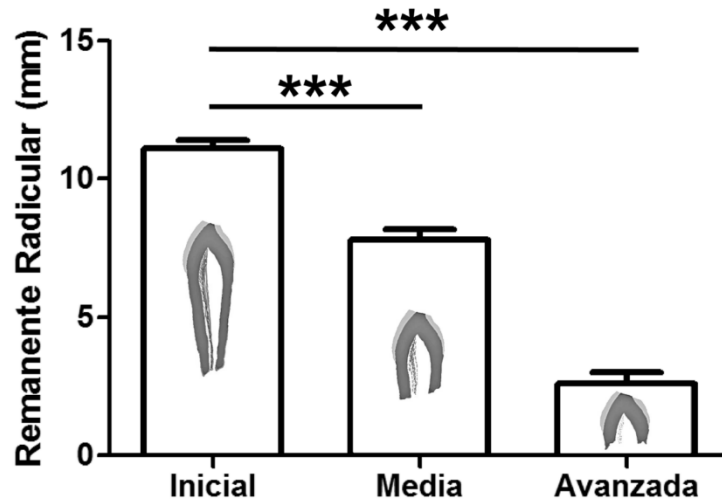


Figura 11: Gráfico remanentes radiculares de las muestras utilizadas en el estudio (Esquema de etapas RRF modificado de Suzuki et al., 2015).

4.7 Secciones de muestra para inmunohistoquímica

Las muestras se fijaron inmediatamente en paraformaldehído tamponado al 4%, y se desmineralizaron en EDTA durante 3 meses. 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 secciones de $25\mu\text{m}$ en un criostato (Leica CM-1900) operado a -25°C . Las secciones fueron recogidas y montadas en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina.

4.8 Inmunohistoquímica

Rehidratación de las muestras en PBS e incubación 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 agregaron los anticuerpos primarios (Tabla 1), que están preparados en solución de bloqueo y se dejaron actuar durante 12 horas a una temperatura de 4°C. Las muestras pasaron por 3 lavados de PBS de 5 minutos cada una. Después se agregaron los anticuerpos secundarios que también están preparados en una solución de bloqueo y se dejaron actuar 1 hora a temperatura ambiente; se realizó un lavado con PBS para retirar los excesos. Luego se procedió a marcar núcleos con DAPI por 10 minutos, se lavó y finalmente las muestras se cubrieron con medio de montaje (Dako Industries, Carpintería, CA, USA).

Anticuerpo Primario	Dilución	Proveedor	Host *	Blanco Celular
Marcadores Neuronales				
Anti-S100	1:250	DAKO	Rb/p	Células de Schwann
Anti-S100	1:200	EMD Millipore	Ms/m	Células de Schwann
Anti-p75	1:100	Thermo Scientific	Ms/m	Receptor de neurotrofina
Anti-C-jun	1:200	Cell Signaling	Rb/m	Factor transcripción c-jun
Marcadores Vasculares				
Anti-CD31	1:100	DAKO	Ms/m	Células endoteliales
Anti-CD34	1:100	Biologend	Ms/m	Células endoteliales/ células precursoras hematopoyéticas
Anti-vWF	1:100	DAKO	Rb/p	Células endoteliales / cuerpos de Weibel-Palade
Anti-CD105	1:100	DAKO	Ms/m	Glucoproteína de membrana: Endoglina, Células endoteliales.
Anti-CD146	1:100	Invitrogen	Rb/p	Glucoproteína de membrana en uniones intercelulares de células endoteliales
PDPN	1:50	Biologend	Ms/m	Proteína transmembrana en célula endotelial de vasos linfáticos
VEGFR3	1:50	Biologend	Ms/m	Receptor 3 factor de crecimiento vascular endotelial linfático
Marcadores de Células Inmuno-Competentes				
Anti-HLA-DR	1:100	Abcam	Ms/m	Receptor de superficie celular de células MHC clase II+
Anti-CD68	1:500	DAKO	Ms/m	Glicoproteína de la membrana plasmática de macrófagos
Anti-CD3	1:200	DAKO	Rb/p	Inmunoglobulina linfocitos T
Anti-CD15	1:100	DAKO	Ms/m	Molécula adhesión de neutrófilos
Otros				
DAPI	0.25 ug/mL	Sigma-Aldrich Co, MO, USA		Núcleos celulares, ADN

*Ms: Mouse; Ch: Chicken; Rb: Rabbit; Rat: Rat; m: monoclonal; p: polyclonal.

Anticuerpos secundarios: los anticuerpos secundarios utilizados corresponden a anti-mouse y anti-rabbit, (goat) de Invitrogen (Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 555), en dilución 1:500.

Tabla 1: Panel de marcadores y anticuerpos primarios utilizados en el estudio.

4.9 Análisis de muestras

Las muestras procesadas han sido observadas y analizadas en dos áreas específicas de la pulpa dental: a nivel coronario y a nivel de la zona de reabsorción, con un microscopio confocal Nikon C1 Plus. El equipo emplea tres laser de distintas longitudes de onda de emisión (408, 488, 543nm). Los registros digitales fueron procesados y analizados 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).

4.10 Cuantificación y Análisis Estadístico

Para el análisis cuantitativo, imágenes comparativas fueron seleccionadas a partir de 7 muestras para cada etapa. La cuantificación de marcadores inmunofluorescentes se determinó para un área obtenida de 400 μ m x 400 μ m con objetivo de 20x. Se utilizó el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA), para separar los canales a cuantificar y determinar el % de inmunofluorescencia en el área definida. Para la cuantificación del marcador c-jun, se estableció el porcentaje de núcleos c-jun⁺ de las células de Schwann en fascículos nerviosos de la zona central de la pulpa. El análisis estadístico comparativo de los marcadores para las distintas etapas será efectuado mediante el programa GraphPad Prism 5 y el test no paramétrico Mann-Whitney.

En el presente estudio se analizaron los cambios asociados al fenómeno de degeneración axonal de tipo Walleriana, en fenotipos de las células de Schwann, vasculares e inflamatorios, que ocurren en la pulpa dental durante el proceso de reabsorción radicular en dientes temporales humanos, caracterizado en tres etapas de reabsorción radicular mediante inmunohistoquímica comparativa y microscopía confocal en dos zonas de la pulpa dental (a nivel coronario y en la zona de reabsorción).

El análisis de las muestras mediante doble marcaje inmunohistoquímico y microscopía confocal evidencian que las células de Schwann y vasos sanguíneos sufren cambios progresivos durante el proceso de reabsorción. En secciones longitudinales para las tres etapas de reabsorción se observa a nivel coronario una disminución progresiva de las células de Schwann (Figura 12 A-C) y a nivel de la zona de reabsorción se evidencia una desorganización de las células de Schwann (Figura 12 D-F). A su vez mediante la utilización de los marcadores c-Jun y p75NTR, se establece la activación de las células de Schwann en su fenotipo reparativo (Figuras 13, 14).

El análisis de los cambios vasculares dentro de la pulpa de dientes temporales en proceso de reabsorción, muestra un incremento en la expresión de CD31 (Figuras 15, 16) y un significativo aumento en la expresión del marcador angiogénico CD105 especialmente en la zona de reabsorción (Figuras 17, 18).

La expresión de marcadores linfáticos (PDPN y VEGFR3) permite establecer fenómenos de linfangiogenesis dentro de la pulpa de dientes temporales, principalmente a través de la emergencia de una red de terminales linfáticos a nivel coronario (Figura 19), siendo

progresivo su marcaje, por lo que las etapas media y avanzada se caracterizan por un aumento de vasos linfáticos asociado al proceso de reabsorción.

Finalmente, la caracterización de las células inmuno-competentes dentro de la pulpa de dientes temporales es relevante, con un aumento progresivo en las etapas media y avanzada (Figura 20), confirmando resultados previamente publicados (Suzuki et al., 2015).

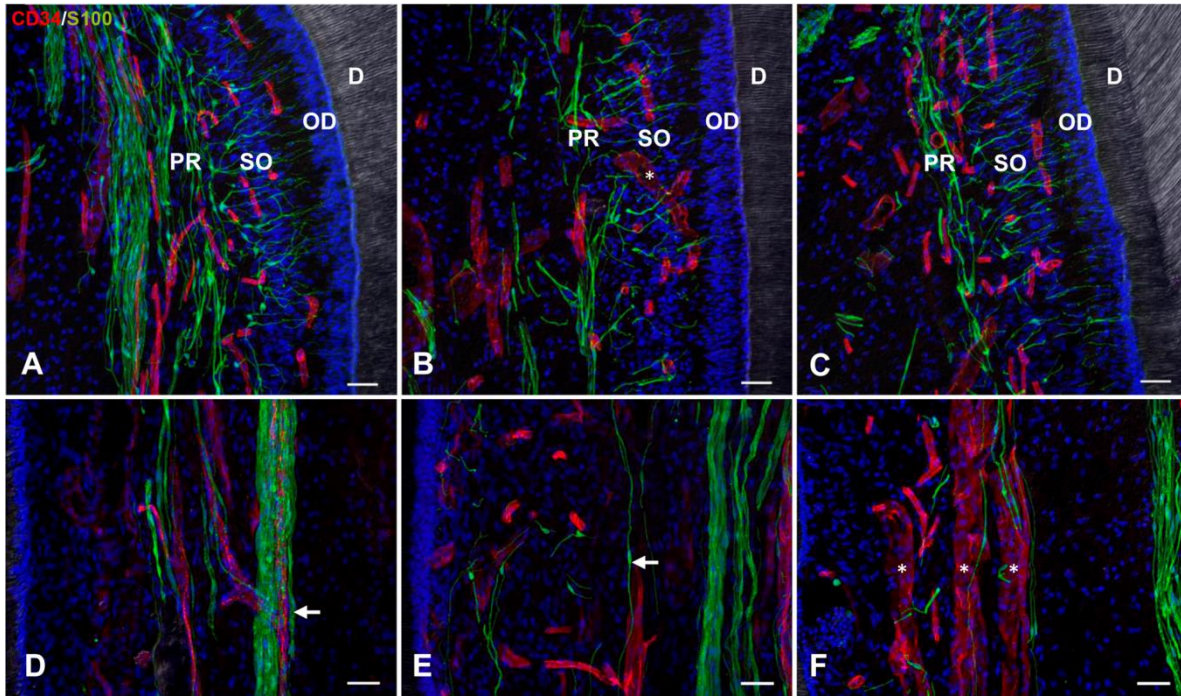


Figura 12: Inmunohistoquímica de células de Schwann (S100, verde) y vasos sanguíneos (CD34, rojo) en pulpa dental de caninos temporales durante reabsorción radicular fisiológica, a nivel coronario (A-C) y a nivel de la zona de reabsorción (D-F). (A) En la etapa inicial de la reabsorción se observa organización de la red glial y la presencia de vasos sanguíneos en la interfase dentino-pulpar. (B) En la etapa media la red glial se muestra desorganizada asociada a un aumento de los componentes vasculares en la interfase dentino-pulpar. (C) En la etapa avanzada del proceso se observa un plexo de Raschkow disminuido y un aumento de los capilares sanguíneos. (D) Se evidencia una disposición lineal (flecha) del fascículo nervioso y los vasos sanguíneos. (E) Se observan células de Schwann de fenotipo reparativo, independientes de los fascículos (flecha). (F) Se observa un evidente aumento de los vasos sanguíneos asociado a la etapa avanzada del proceso (asteriscos).

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

Barras= 50 μ m

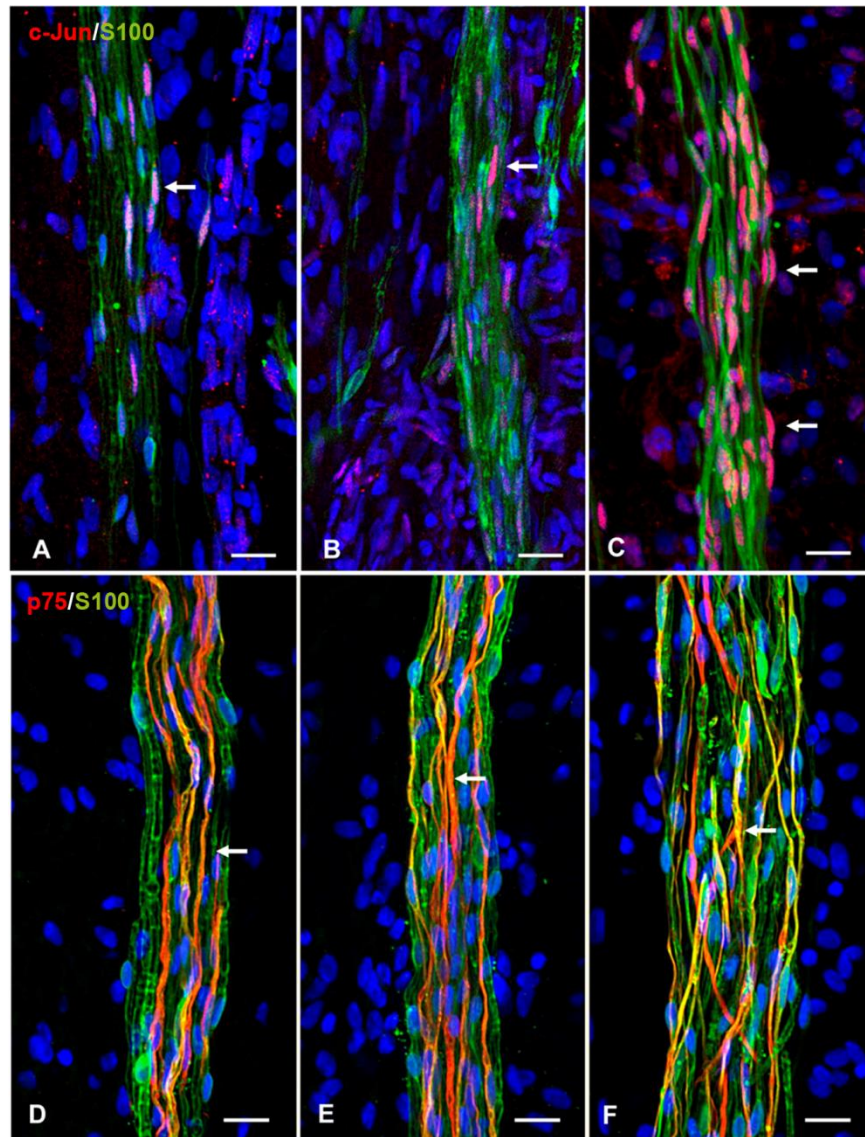


Figura 13: Imágenes de fascículos nerviosos localizados en zona central de la pulpa, doble marcaje de células de Schwann (S100, verde), factor de transcripción c-jun (rojo, A-C) y receptor p75NTR (rojo, D-F). (A, B) En las etapas inicial y media se observa la activación del factor de transcripción c-jun en algunos núcleos de las células de Schwann (flechas). (C) La etapa avanzada presenta un aumento significativo en la expresión de núcleos c-jun⁺ (flechas). (D, E) El doble marcaje con p75NTR muestra expresión en células de Schwann no-mielinizantes (flechas), mientras las mielinizantes evidencian una severa fragmentación. (F) Se observa una marcada fragmentación de dominios mielinizados y células de Schwann que expresan p75NTR en disposición desorganizada.

Barras= 20 μ m

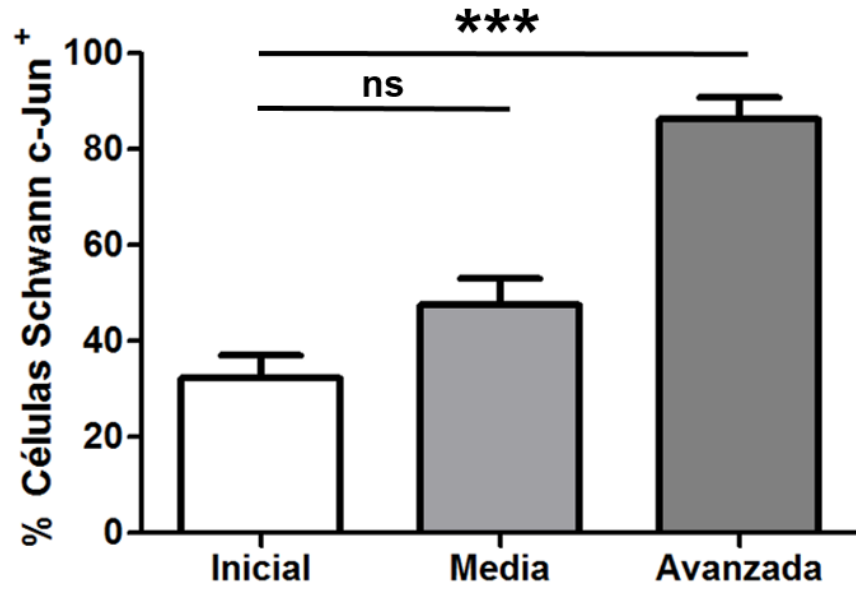


Figura 14: Análisis cuantitativo del porcentaje de núcleos de células de Schwann c-jun⁺ en las etapas inicial (n=7), media (n=7) y avanzada (n=7) de RRF (***=p< 0.001).

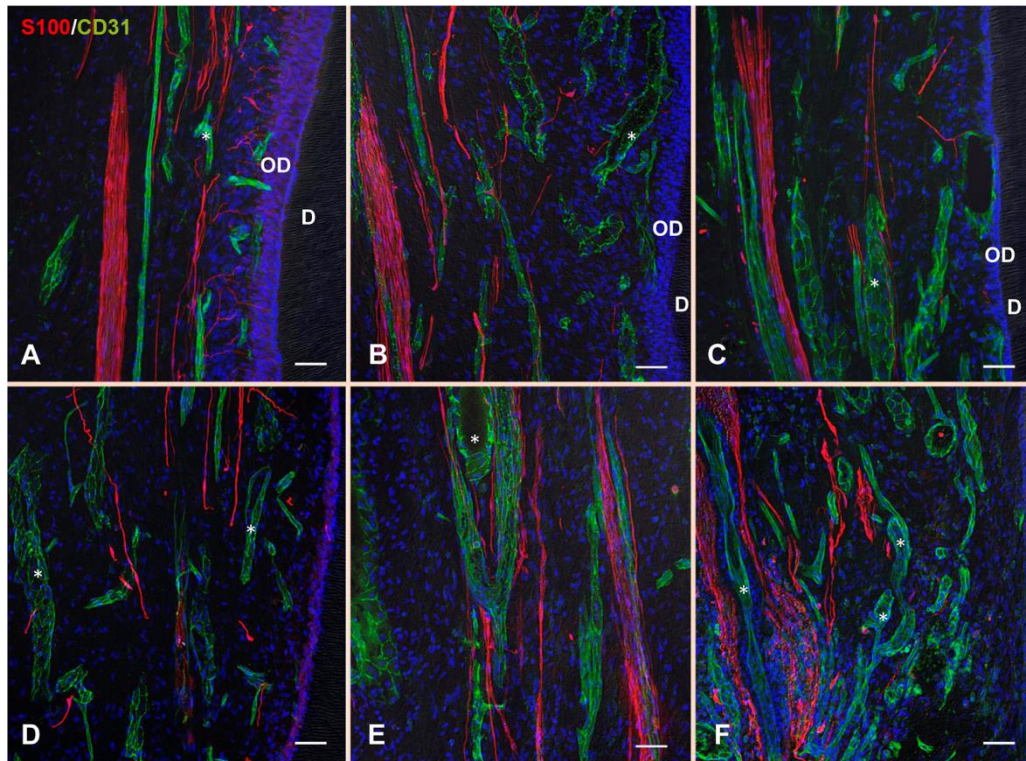


Figura 15: Imágenes representativas de los componentes vasculares (CD31, verde) y células de Schwann (S100, rojo) de la pulpa en dientes temporales durante RRF, a nivel coronario (A-C) y a nivel de la zona de reabsorción (D-F). La expresión de CD31 muestra un aumento importante en los diámetros vasculares (asteriscos) con un remodelado de la red vascular.

D, Dentina; OD, Odontoblastos.

Barras= 50 μ m

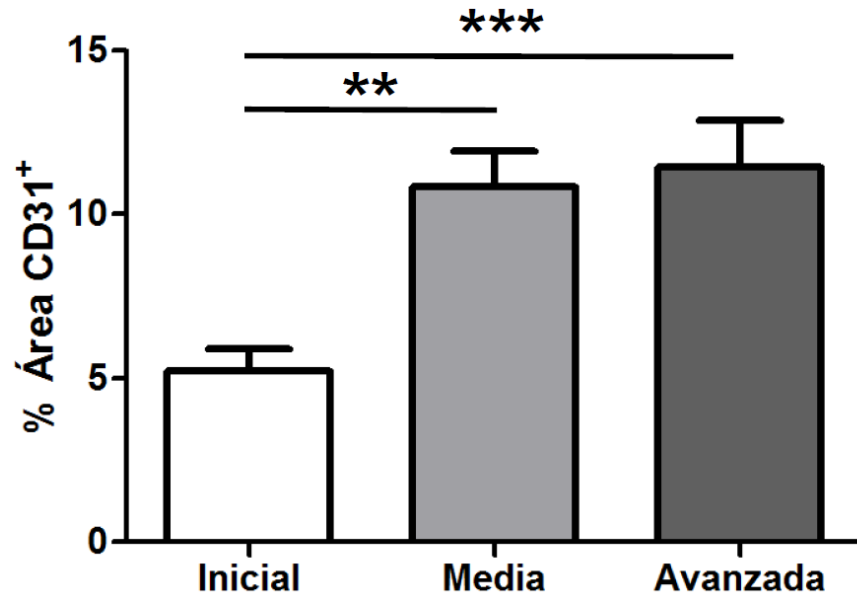


Figura 16: Análisis cuantitativo del porcentaje de área de inmunofluorescencia CD31⁺ en la zona de reabsorción, en las etapas inicial (n=7), media (n=7) y avanzada (n=7) de RRF (**=p<0.01, ***=p< 0.001).

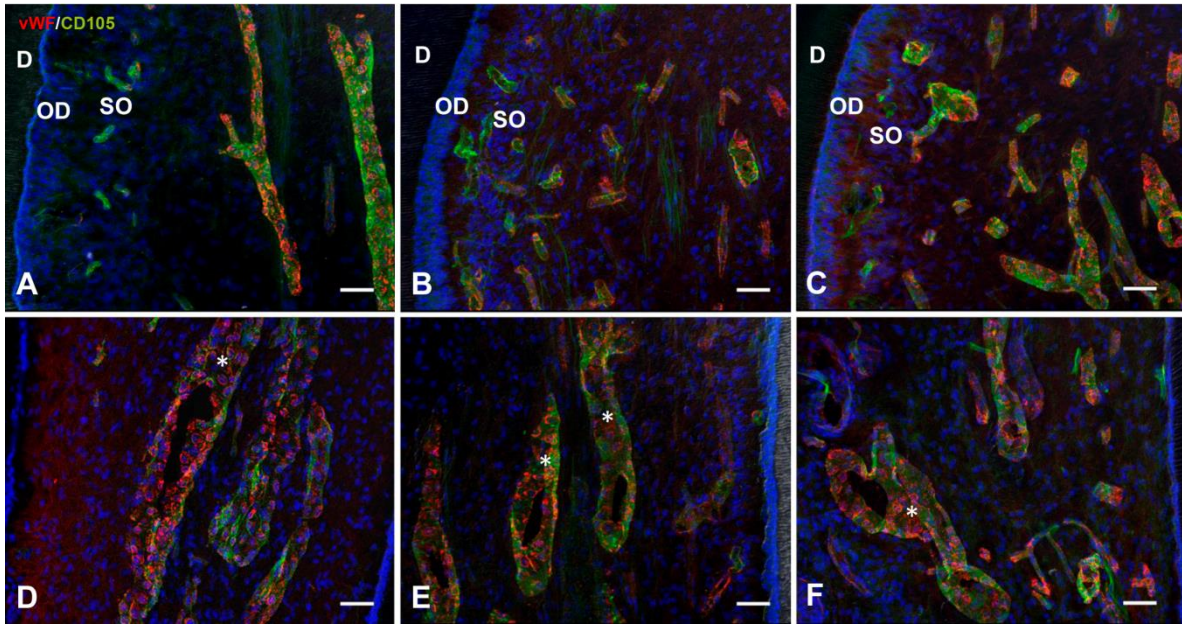


Figura 17: Imágenes representativas de angiogénesis (CD105, verde) de vasos sanguíneos (vWF, rojo) en la pulpa de dientes temporales durante reabsorción radicular fisiológica, a nivel coronario (A-C) y a nivel de la zona de reabsorción (D-F). Se observan cambios relevantes en el patrón de marcaje a nivel coronario, siendo significativa la expresión en etapas terminales a nivel de la zona de reabsorción.

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

Barras= 50 μ m

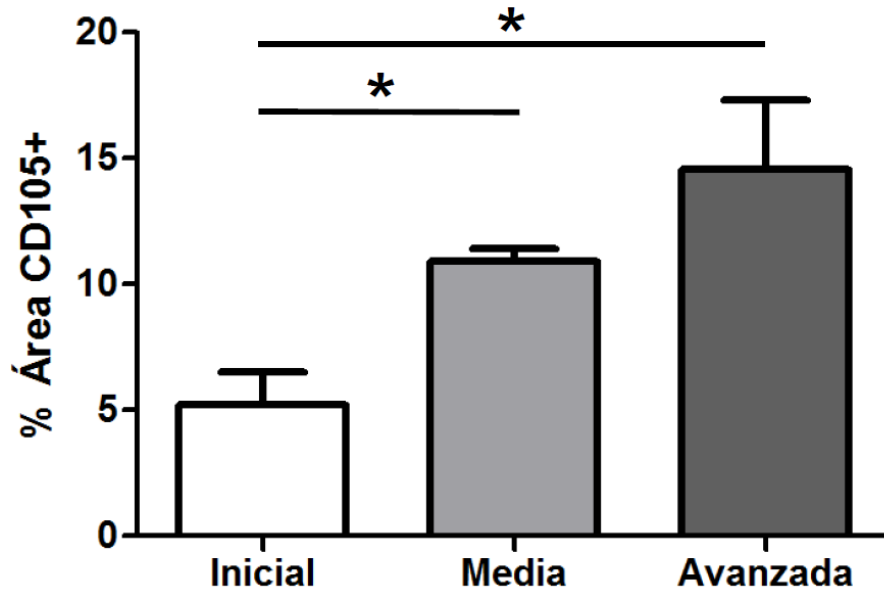


Figura 18: Análisis cuantitativo del porcentaje de área de inmunofluorescencia CD105⁺ en la zona de reabsorción, en las etapas inicial (n=7), media (n=7) y avanzada (n=7) de RRF (*=p<0.05).

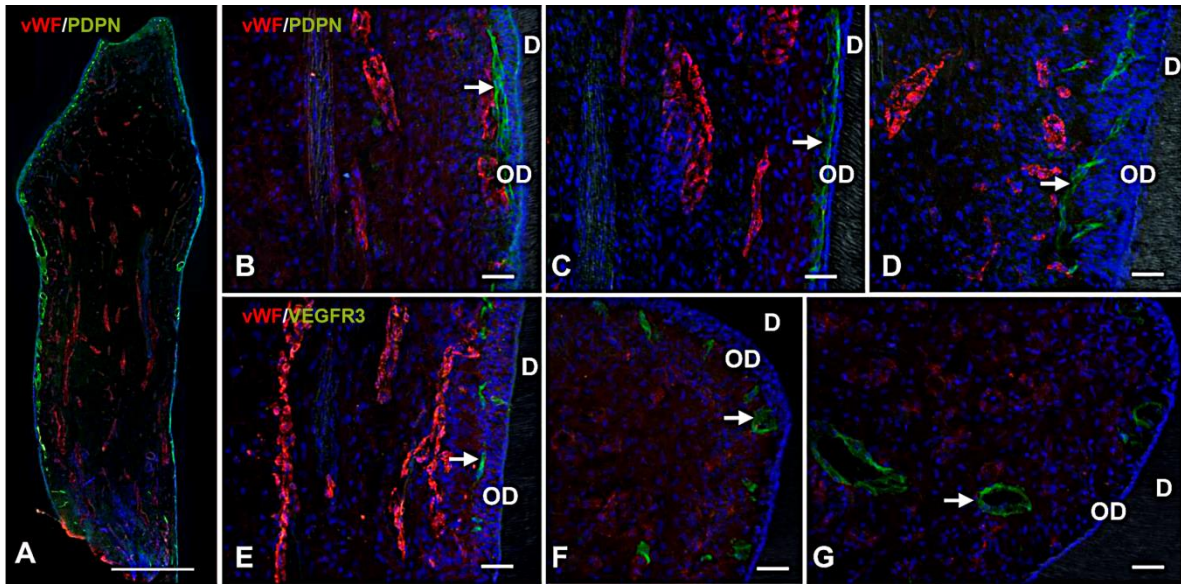


Figura 19: Caracterización de vasos linfáticos (PDPN, verde A-D, F-G; VEGFR3, verde E) mediante doble marcaje con vasos sanguíneos (vWF, rojo) en la pulpa de dientes temporales durante RRF. Se observa la presencia de vasos linfáticos adyacentes a la capa odontoblástica en todas las etapas del proceso de reabsorción (flechas) (A, D, F, G etapa avanzada; B, E etapa inicial; C etapa media).

D, Dentina; OD, Odontoblastos

Barras= A, 1mm; B-G, 50 μ m

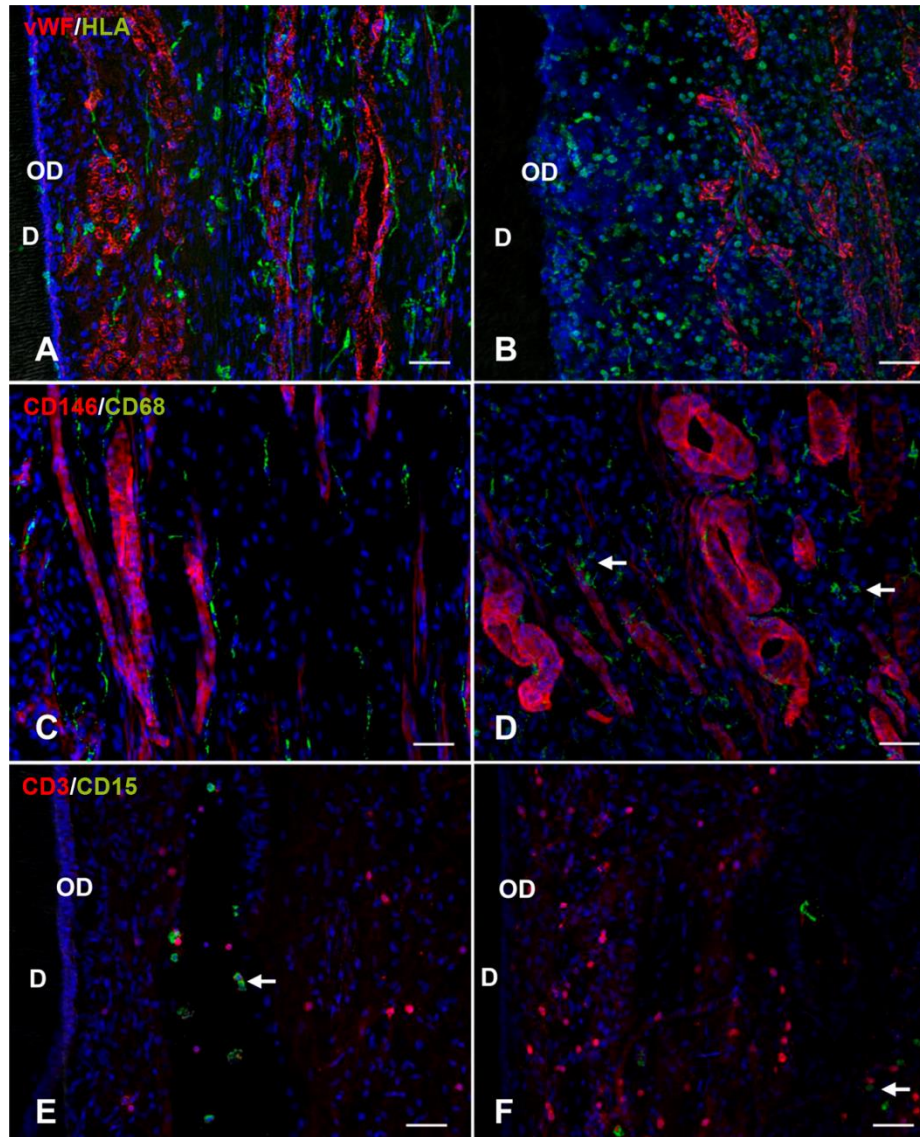


Figura 20: Inmunomarcaje de células inmuno-competentes (HLA, CD68, CD3, CD15) durante las etapas media (A, C, E) y avanzada (B, D, F) de RRF. Se observa un aumento del infiltrado de células HLA⁺ (B), en la zona de reabsorción el número de macrófagos (CD68⁺) se ve aumentado notoriamente (D). El infiltrado de linfocitos (CD3⁺) y neutrófilos (CD15⁺) muestra importantes cambios en su patrón.

D, Dentina; OD, Odontoblastos

Barras= 50 μ m

En el presente estudio, mediante técnicas de inmunohistoquímica y microscopia confocal se determinó la activación de células de Schwann y los cambios vasculares e inflamatorios en la pulpa dental asociados a fenómenos de degeneración axonal durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales humanos. Lo anterior permitió caracterizar que los dientes temporales en proceso de reabsorción evidencian cambios progresivos a nivel axonal, glial y vascular 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 el recambio y la erupción del diente definitivo, siendo clave en el proceso de crecimiento y desarrollo. El proceso de reabsorción es un proceso lento y progresivo, que puede durar 5 a 6 años aproximadamente. De esta manera, la reabsorción radicular fisiológica genera una compresión crónica de las fibras nerviosas en la zona reabsortiva induciendo un daño axonal que se manifiesta como degeneración axonal de tipo Walleriana y con ello la activación de las células de Schwann con la finalidad de reparar los axones dañados (Suzuki et al., 2015; Jessen & Mirsky, 2016).

Se ha observado en nervios periféricos que la degeneración Walleriana conlleva una respuesta multicelular en el dominio distal del tejido dañado. De esta forma la degeneración axonal desencadena una cascada de respuestas celulares que conduce a la eliminación de los desechos de mielina y a la producción de un medio que promueve la regeneración axonal posterior al daño (Gaudet et al., 2011). Durante la RRF la compresión en la zona apical de la raíz del diente temporal induce la degeneración de las fibras nerviosas y respuestas multicelulares en la pulpa dental (Suzuki et al., 2015), de manera que la pulpa dental exhibe

características propias del dominio distal del tejido dañado observado en otros nervios periféricos durante la degeneración Walleriana (Stoll y Muller, 1999; Jessen & Mirsky, 2016; Cattin & Lloyd, 2016).

La activación de la glía durante RRF se evidencia a través de una reprogramación de la célula de Schwann en un fenotipo reparativo que morfológicamente se caracteriza por ser más alargado que las células mielinizantes y Remak (Gomez-Sanchez et al., 2017). La reprogramación celular de la célula de Schwann se evidencia a través de la expresión del factor de transcripción c-jun (Tricaud & Park, 2017). En el presente trabajo se ha determinado que la expresión de c-jun en las células de Schwann muestra un aumento significativo en relación a las etapas definidas de RRF.

Las células de Schwann reparativas secretan citoquinas pro-inflamatorias (como la proteína quimiotáctica de monocitos 1, MCP-1 y factores tróficos como BDNF, GDNF, NT3, NGF, VEGF y p75NTR (Meyer et al., 1992; Arthur-Farraj et al 2012; Fontana et al., 2012). La expresión de p75NTR está relacionada a la remielinización del axón comprometido (Song et al., 2006; Tomita et al., 2007). Durante la RRF se observa una activación progresiva del receptor p75 en las células de Schwann de la pulpa dental. De esta manera la célula de Schwann tiene un rol activo en la regeneración axonal luego de un daño a través de la expresión de factores y receptores neurotróficos que permiten el crecimiento y supervivencia neuronal.

Por lo anterior, se ha determinado que el fenotipo reparativo de la célula de Schwann permite guiar mediante la formación de bandas de Büngner, la regeneración y remielinización de axones dañados para recuperar la inervación y con ello la función del tejido dañado (Jessen & Mirsky, 2016; Suzuki et al., 2015).

Los fenómenos de daño de nervios periféricos asociados a degeneración axonal, comprometen cambios vasculares relevantes, con remodelación vascular y angiogénesis (Cattin et al., 2015). Durante RRF, se determinó un aumento significativo en el porcentaje de área de CD31 especialmente en la zona de reabsorción, del diámetro de los vasos sanguíneos y un marcado remodelamiento de los componentes vasculares. Además el aumento progresivo de CD105 en la zona de reabsorción en relación a las etapas del proceso de reabsorción radicular fisiológica, permite la caracterización significativa de la actividad angiogénica en esta área.

Cabe destacar que la endoglina (CD105) es una glucoproteína de membrana predominantemente expresada en linajes celulares dentro del sistema vascular, que durante la proliferación de células endoteliales está sobreexpresada, por lo que constituye un importante marcador de angiogénesis (Fonsatti et al., 2003).

Lo anterior permite establecer que los cambios en los componentes vasculares conllevan procesos de remodelación y angiogénesis asociada a RRF. Estos fenómenos pueden ser relacionados al efecto hipóxico de la reabsorción radicular, determinando estas condiciones de angiogénesis. Por lo tanto, las células de la pulpa dental secretan factores de crecimiento angiogénicos (factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2)) que juegan un papel fundamental en la angiogénesis (Tran-hung et al., 2008). De esta manera, la secreción de dichos factores subraya el importante papel de la capacidad angiogénica de la pulpa durante su propia regeneración (Rombouts et al., 2017).

Como se indicó anteriormente, la célula de Schwann juega un rol esencial en la guía de los axones a través de la formación de bandas de Büngner. Sin embargo, para llevar a cabo este

rol la célula de Schwann necesita a su vez la guía de vasos sanguíneos polarizados en el sitio del daño (Cattin et al., 2015). Asociado al daño axonal, el ambiente hipóxico en el sitio dañado, el reclutamiento de macrófagos y las células de Schwann, generan la secreción de VEGF-A, lo que genera respuestas de angiogénesis en las células endoteliales (Gupta et al., 2005). Esto permitiría ocupar los vasos sanguíneos como guías para las células de Schwann en el proceso regenerativo (Cattin et al., 2015; Cattin & Lloyd, 2016). De esta manera la angiogénesis que se inicia luego del daño generado por la RRF permite que las células de Schwann en su fenotipo reparativo logren obtener la guía de los nuevos vasos sanguíneos para a su vez formar las bandas de Büngner que guiarán a los axones en su regeneración.

La linfangiogénesis asociada a procesos inflamatorios ha sido establecida como un fenómeno determinante por su rol en la respuesta inmune y en el drenaje de fluidos (Betterman & Harvey, 2016; Abouelkheir et al., 2017). Durante RRF se observa la emergencia de los vasos linfáticos con un marcado aumento de los vasos linfáticos durante las etapas media y avanzada de RRF. Este hallazgo concuerda con otros estudios donde se han descrito eventos de linfangiogénesis en relación a procesos inflamatorios en la pulpa dental humana (Pimenta et al., 2003; Tahmiscija et al., 2012; Dacic et al., 2013). A su vez, el crecimiento de nuevos vasos linfáticos se ha relacionado con una mejor resolución del edema tisular y una activación más rápida y efectiva de la inmunidad (Betterman & Harvey, 2016). Como la pulpa dental está rodeada de tejido duro inextensible, la presencia de una red vascular linfática que permita la homeostasis de fluidos y tráfico de células inmunes, es fundamental para mantener el equilibrio dentro del tejido pulpar.

La reabsorción radicular evidencia un proceso inflamatorio progresivo caracterizado por el incremento en la expresión de HLA-DR y del infiltrado de células inmunes como

macrófagos, células CD15⁺ y CD3⁺. Estos cambios se corresponden 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; Monteiro et al., 2009; Suzuki et al., 2015). A su vez, se ha descrito que durante la degeneración Walleriana las células inmunitarias reclutadas, especialmente los macrófagos, asumen un papel principal en la eliminación de desechos y la producción de factores de crecimiento en la etapa de regeneración axonal (Gaudet et al., 2011). Esta acumulación de macrófagos contribuye a la eliminación de los restos de mielina, y por otro lado, su heterogeneidad da lugar a un fenotipo antiinflamatorio (M2), que promueve la regeneración del nervio periférico (Chen et al., 2015). Por lo que el aumento de las células inmuno-competentes asociado a RRF y por consiguiente a la degeneración axonal, permite la eliminación de desechos y promueve procesos regenerativos a nivel pulpar.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto proponemos un modelo en que la reabsorción radicular fisiológica es un proceso multicelular altamente regulado, determinado por la degeneración axonal progresiva en asociación a la reprogramación de las células de Schwann en un fenotipo reparativo, cambios vasculares significativos (angiogénesis) en relación con un aumento notable de la infiltración de células inmunocompetentes y el desarrollo de una extensa red linfática (linfangiogénesis). Todos estos eventos explican el progresivo declive de la función sensorial en dientes temporales asociado a la etapa avanzada de la reabsorción radicular y de esta manera permiten la exfoliación asintomática del diente temporal (Figura 21).

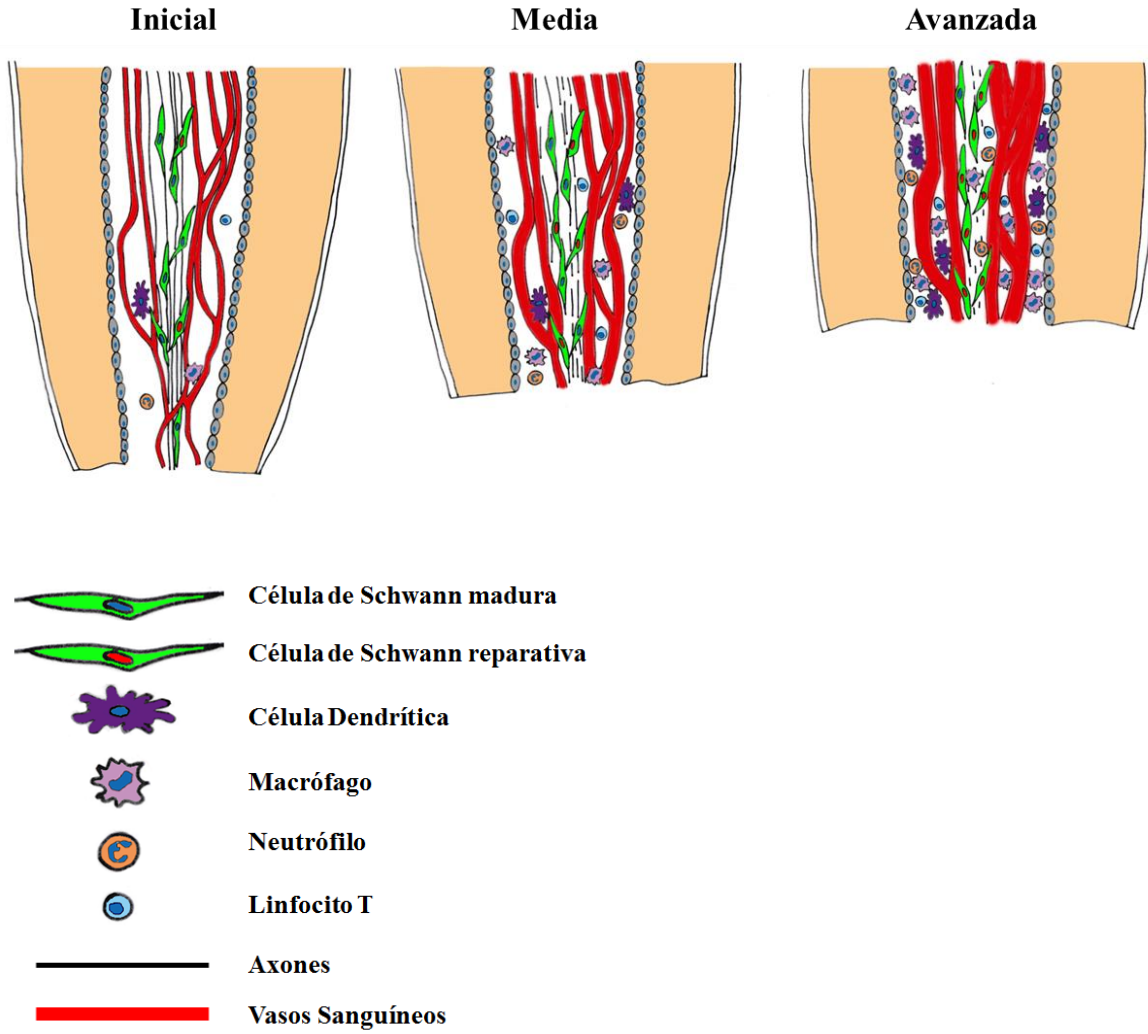


Figura 21: Representación esquemática de la respuesta neurovascular e inflamatoria en la pulpa dental de dientes temporales durante reabsorción radicular fisiológica.

Proyección clínica del estudio

El conocimiento sobre la interrelación entre la degeneración axonal, la activación de la célula de Schwann y los cambios vasculares e inflamatorios, observados durante la reabsorción radicular fisiológica es fundamental para comprender como estos procesos permiten un correcto recambio dentario, la mantención de una cronología normal de erupción y cómo alteraciones en la sucesión de estas respuestas neurovasculares están asociadas a anomalías del proceso eruptivo. De esta manera, la presente investigación permite determinar que el recambio dentario está determinado por una sucesión de eventos a nivel pulpar que concluyen con la exfoliación del diente temporal.

En este sentido, se puede corroborar que los dientes son un órgano sensorial, que a través de la nocicepción censan el medio, esto conlleva que la pulpa dental en dientes temporales mantenga su alta plasticidad y su capacidad de reparación durante la progresión del proceso de reabsorción radicular fisiológica, incluso hasta dos tercios de la longitud radicular. Por lo tanto, si el estado fisiopatológico pulpar se determina 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.

Es esencial entonces lograr la traslación del conocimiento que resulta de esta investigación en procedimientos que impacten y eleven la calidad de la atención en la práctica odontológica.

Considerando los resultados obtenidos en la presente investigación, la cual tiene como propósito determinar la activación de células de Schwann y cambios vasculares e inflamatorios en la pulpa dental relacionados a fenómenos de degeneración axonal durante el proceso de reabsorción radicular fisiológica en dientes temporales, se puede concluir que:

- Se validó el fenómeno de activación de células de Schwann caracterizado por cambios morfológicos, la expresión del factor c-jun y la activación del receptor p75, que define su fenotipo reparativo.
- Se determinó cambios en los componentes vasculares que validan eventos de remodelación vascular asociados a angiogénesis y linfangiogénesis durante el proceso.
- Se estableció un aumento progresivo del infiltrado inflamatorio asociado al proceso de reabsorción radicular fisiológica.

ABOUELKHEIR GR, UPCHURCH BD, RUTKOWSKI JM. 2017. Lymphangiogenesis: fuel, smoke, or extinguisher of inflammation's fire?. *Exp Biol Med* (Maywood). Apr;242(8):884-895.

ADAMS RH, EICHMANN A. 2010. Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. May;2(5):a001875.

ADAMS RH, ALITALO K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jun;8(6):464-78.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, MORGAN D, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. 2015 "Stem Cells and Tissue Renewal" en *Molecular Biology of the Cell*. Sexta Edición. Estados Unidos. Garland Science. Páginas: 1235-1238.

ALITALO K, TAMMELA T, PETROVA TV. 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. Dec 15;438(7070):946-53.

ANGELOVA A, TAKAGI Y, OKIJI T, KANEKO T, YAMASHITA Y. 2004. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. Jan;49(1):29-36.

ARANHA AM, ZHANG Z, NEIVA KG, COSTA CA, HEBLING J, NÖR JE. 2010. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod*. Oct;36(10):1633-7.

ARMULIK A, GENOVÉ G, BETSHOLTZ C. 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. Aug 16;21(2):193-215.

ARTHUR-FARRAJ PJ, LATOUCHE M, WILTON DK, QUINTES S, CHABROL E, BANERJEE A, WOODHOO A, JENKINS B, RAHMAN M, TURMAINE M, WICHER GK, MITTER R, GREENSMITH L, BEHRENS A, RAIVICH G, MIRSKY R, JESSEN KR. 2012. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron*. Aug 23;75(4):633-47.

ATTWELL D, MISHRA A, HALL CN, O'FARRELL FM, DALKARA T. 2016. What is a pericyte?. *J Cereb Blood Flow Metab*. Feb;36(2):451-5.

AVERY, J., CHIEGO, D., 2006. "Dental Pulp" en *Essentials of oral histology and embryology: a clinical approach*. Tercera Edición. USA. Elsevier. Páginas: 121-133.

BENDER, I. B. 2000. Pulpal pain diagnosis--a review. *J Endod*, 26, 175-9.

BERGGREEN E, HAUG SR, MKONYI LE, BLETSA A. 2009. Characterization of the dental lymphatic system and identification of cells immunopositive to specific lymphatic markers. *Eur J Oral Sci*. Feb;117(1):34-42.

BERNICK, S. 1952. Innervation of the primary tooth and surrounding supporting tissues of monkeys. *Anat Rec*, 113, 215-37.

BERNICK S. 1977. Lymphatic vessels of the human dental pulp. *J Dent Res*. Jan;56(1):70-7.

BETTERMAN KL, HARVEY NL. 2016. The lymphatic vasculature: development and role in shaping immunity. *Immunol Rev*. May;271(1):276-92.

BISHOP MA, MALHOTRA M. 1990. An investigation of lymphatic vessels in the feline dental pulp. *Am J Anat*. Mar;187(3):247-53.

BLANCO R, GERHARDT H. 2013. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Jan 1;3(1):a006569.

BOARDMAN & SWARTZ, BOARDMAN KC, SWARTZ MA. 2003. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis. *Circ Res.* Apr 18;92(7):801-8.

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.

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.

CARMELIET P, TESSIER-LAVIGNE M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature.* Jul 14;436(7048):193-200.

CATTIN AL, BURDEN JJ, VAN EMMENIS L, MACKENZIE FE, HOVING JJ, GARCIA CALAVIA N, GUO Y, MCLAUGHLIN M, ROSENBERG LH, QUEREDA V, JAMECNA D, NAPOLI I, PARRINELLO S, ENVER T, RUHRBERG C, LLOYD AC. 2015. Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell.* Aug 27;162(5):1127-39.

CATTIN AL, LLOYD AC. 2016. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* Aug;39:38-46.

CAVIEDES-BUCHELI J, GOMEZ-SOSA JF, AZUERO-HOLGUIN MM, ORMEÑO-GOMEZ M, PINTO-PASCUAL V, MUNOZ HR. 2017. Angiogenic mechanisms of human

dental pulp and their relationship with substance P expression in response to occlusal trauma. *Int Endod J.* Apr;50(4):339-351.

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.

CHEN P, PIAO X, BONALDO P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. 2015. *Acta Neuropathol.* Nov;130(5):605-18.

CHOI K, KENNEDY M, KAZAROV A, PAPADIMITRIOU JC, KELLER G. 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* Feb;125(4):725-32.

CHUNG, G., JUNG, S. J. & OH, S. B. 2013. Cellular and molecular mechanisms of dental nociception. *J Dent Res*, 92, 948-55.

COSO S, BOVAY E, PETROVA TV. 2014. Pressing the right buttons: signaling in lymphangiogenesis. *Blood.* Apr 24;123(17):2614-24.

COUVE E, LOVERA M, SUZUKI K, SCHMACHTENBERG O. 2018. Schwann Cell Phenotype Changes in Aging Human Dental Pulp. *J Dent Res.* Mar;97(3):347-355.

CRISAN M, CORSELLI M, CHEN WC, PÉAULT B. 2012. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med.* Dec;16(12):2851-60.

DACIC D, VELICKOVIC L, DACIC S, RISTIC A, VELICKOVIC S, PETROVIC A, RAKONJAC M. 2013. Influence of Inflammation to Lymphangiogenesis in Human Dental Pulp. *Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš* 30(1):15-19

DERRINGER KA, LINDEN RW. 2004. Vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor 2, platelet derived growth factor and transforming growth factor beta released in human dental pulp following orthodontic force. *Arch Oral Biol.* Aug;49(8):631-41.

DURAN CL, HOWELL DW, DAVE JM, SMITH RL, TORRIE ME, ESSNER JJ, BAYLESS KJ. 2017. Molecular Regulation of Sprouting Angiogenesis. *Compr Physiol.* Dec 12;8(1):153-235.

FARAHANI RM, SIMONIAN M, HUNTER N. 2011. Blueprint of an ancestral neurosensory organ revealed in glial networks in human dental pulp. *J Comp Neurol.* Nov 1;519(16):3306-26.

FAZAL SV, GOMEZ-SANCHEZ JA, WAGSTAFF LJ, MUSNER N, OTTO G, JANZ M, MIRSKY R, JESSEN KR. 2017. Graded Elevation of c-Jun in Schwann Cells In Vivo: Gene Dosage Determines Effects on Development, Remyelination, Tumorigenesis, and Hypomyelination. *J Neurosci.* Dec 13;37(50):12297-12313.

FIGLIA G. 2018. c-Jun in Schwann Cells: Stay Away from Extremes. *J Neurosci.* Apr 4;38(14):3388-3390.

FONSATTI E, SIGALOTTI L, ARSLAN P, ALTOMONTE M, MAIO M. 2003. Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies. *Curr Cancer Drug Targets.* Dec;3(6):427-32.

FONTANA X, HRISTOVA M, DA COSTA C, PATODIA S, THEI L, MAKWANA M, SPENCER-DENE B, LATOUCHE M, MIRSKY R, JESSEN KR, KLEIN R, RAIVICH G, BEHRENS A. 2012. c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *J Cell Biol.* Jul 9;198(1):127-41.

FORSYTHE JA, JIANG BH, IYER NV, AGANI F, LEUNG SW, KOOS RD, SEMENZA GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* Sep;16(9):4604-13.

FRAISL P, MAZZONE M, SCHMIDT T, CARMELIET P. 2009. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell.* Feb;16(2):167-79.

FRIED, K., NOSRAT, C., LILLESAAR, C. & HILDEBRAND, C. 2000. Molecular signaling and pulpal nerve development. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11, 318-32.

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 AD, POPOVICH PG, RAMER MS. 2011. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* Aug 30;8:110.

GERHARDT H, GOLDING M, FRUTTIGER M, RUHRBERG C, LUNDKVIST A, ABRAMSSON A, JELTSCH M, MITCHELL C, ALITALO K, SHIMA D, BETSHOLTZ

C. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* Jun 23;161(6):1163-77.

GERLI R, SECCIANI I, SOZIO F, ROSSI A, WEBER E, LORENZINI G. 2010. Absence of lymphatic vessels in human dental pulp: a morphological study. *Eur J Oral Sci.* Apr;118(2):110-7.

GOMEZ-SANCHEZ JA, PILCH KS, VAN DER LANS M, FAZAL SV, BENITO C, WAGSTAFF LJ, MIRSKY R, JESSEN KR. 2017. After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *J Neurosci.* Sep 13;37(37):9086-9099.

GREIF D. 2012. "Vascular Embryology and Angiogenesis" en *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. Segunda Edición. EEUU. Saunders. Páginas 1-11

GUPTA R, GRAY M, CHAO T, BEAR D, MODAFFERI E, MOZAFFAR T. 2005. Schwann cells upregulate vascular endothelial growth factor secondary to chronic nerve compression injury. *Muscle Nerve.* Apr;31(4):452-60.

HAROKOPAKIS-HAJISHENGALLIS, E. 2007. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J Oral Sci*, 49, 1-12.

HARRIS R, GRIFFIN CJ. 1971. The ultrastructure of small blood vessels of the normal human dental pulp. *Aust Dent J.* Aug;16(4):220-6.

HARVEY NL, GORDON EJ. 2012. Deciphering the roles of macrophages in developmental and inflammation stimulated lymphangiogenesis. *Vasc Cell.* Sep 3;4(1):15.

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.

HELLSTRÖM M, PHNG LK, HOFMANN JJ, WALLGARDE E, COULTAS L, LINDBLOM P, ALVA J, NILSSON AK, KARLSSON L, GAIANO N, YOON K, ROSSANT J, IRUELA-ARISPE ML, KALÉN M, GERHARDT H, BETSHOLTZ C. 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. Feb 15;445(7129):776-80.

IJIMA T, ZHANG JQ. 2002. Three-Dimensional Wall Structure and the Innervation of Dental Pulp Blood Vessels. *Microsc Res Tech*. Jan 1;56(1):32-41.

IKEDA H, SUDA H. 2012 “Circulation of the pulp” en Seltzer and Bender’s *Dental Pulp*. Segunda Edición. China. Quintessence books. Páginas 109-113.

JAIN, N., GUPTA, A. & N, M. 2013. An insight into neurophysiology of pulpal pain: facts and hypotheses. *Korean J Pain*, 26, 347-55.

JAIN RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. Jun;9(6):685-93.

JESSEN KR, MIRSKY R. 2008. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*. Nov 1;56(14):1552-65.

JESSEN KR, MIRSKY R. 2016. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol*. Jul 1;594(13):3521-31.

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.

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.

KIM S. 1985. Microcirculation of the dental pulp in health and disease. *J Endod*. Nov;11(11):465-71.

KIM H, KATARU RP, KOH GY. 2012. Regulation and implications of inflammatory lymphangiogenesis. *Trends Immunol*. Jul;33(7):350-6.

KOCH, G., THESLEFF, I., KREIBORG, S., 2011. “Desarrollo Dental y Trastornos en el Número y Forma de los Dientes” en Koch, G., Poulsen, S. (ed.), *Odontopediatría Abordaje Clínico*. Segunda Edición. Venezuela. Amolca. Página: 188.

KRAMER IR, 1960. The vascular architecture of the human dental pulp. *Arch Oral Biol*. Aug; 2:177-89.

LARRIVEE B, FREITAS C, SUCHTING S, BRUNET I, EICHMANN A. 2009. Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. *Circ Res*. Feb 27;104(4):428-41.

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.

LUUKKO, K., KETTUNEN, P., FRISTAD, I., BERGGREEN, E., 2011. "Structure and Functions of the Dentin-Pulp Complex" en Hargreaves, K., Cohen, S. (ed.), *Pathways of the Pulp*. Décima Edición. USA. Elsevier. Páginas: 463-471.

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.

MAJEWSKA-BESKA, S., SZCZEPANSKA, J. 2012. Genetic and Molecular Mechanisms of Root Resorption – a Literature-Based Study. *Dent. Med. Probl.*, 49, 3, 329–335.

MARCHETTI C1, POGGI P, CALLIGARO A, CASASCO A. 1992. Lymphatic vessels of the human dental pulp in different conditions. *Anat Rec. Sep*;234(1):27-33.

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.

MARTIN A, GASSE H, STASZYK C. 2010. Absence of lymphatic vessels in the dog dental pulp: an immunohistochemical study. *J Anat.* Nov;217(5):609-15.

MATSUMOTO Y, ZHANG B, KATO S. 2002. Lymphatic networks in the periodontal tissue and dental pulp as revealed by histochemical study. *Microsc Res Tech.* Jan 1;56(1):50-9.

MEYER M, MATSUOKA I, WETMORE C, OLSON L, THOENEN H. 1992. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol.* Oct;119(1):45-54.

MICHIELS C. 2003. Endothelial Cell Functions. *J Cell Physiol.* Sep;196(3):430-43.

MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBEY PG, SHI S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 13;100(10):5807-12.

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.

MUKOUYAMA YS, SHIN D, BRITSCH S, TANIGUCHI M, ANDERSON DJ. 2002. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell.* Jun 14;109(6):693-705.

MULLANE EM, DONG Z, SEDGLEY CM, HU JC, BOTERO TM, HOLLAND GR, NÖR JE. 2008. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *J Dent Res*. Dec;87(12):1144-8.

NANCI A. 2013. “Dentin-Pulp Complex” en *Ten Cate’s Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Octava Edición. EEUU. ElSevier. Páginas: 194-197.

OBERSZTYN, A. 1963. Experimental investigation of factors causing resorption of deciduous teeth. *J Dent Res*, 42, 660-74.

PATTON K., THIBODEAU G. 2012. “Lymphatic System” en *Anatomy and physiology*. Octava Edición. USA. Elsevier. Página: 725.

PIMENTA FJ, SÁ AR, GOMEZ RS. 2003. Lymphangiogenesis in human dental pulp. *Int Endod J*. Dec;36(12):853-6.

PODGRABINSKA S, BRAUN P, VELASCO P, KLOOS B, PEPPER MS, SKOBE M. 2002. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 10;99(25):16069-74.

PROVENZA DV. 1957. The Blood Vascular Supply of the Dental Pulp with Emphasis on Capillary Circulation. *Circ Res*. Mar;6(2):213-8.

PUGH CW, RATCLIFFE PJ. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. Jun;9(6):677-84.

QUAEGEBEUR A, LANGE C, CARMELIET P. 2011. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron*. Aug 11;71(3):406-24.

RODD HD, BOISSONADE FM. 2003. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. *J Anat.* Feb;202(2):195-203.

RODD HD, BOISSONADE FM. 2005. Vascular status in human primary and permanent teeth in health and disease. *Eur J Oral Sci*; 113: 128–134.

ROMBOUTS C, GIRAUD T, JEANNEAU C, ABOUT I. 2017. Pulp Vascularization during Tooth Development, Regeneration, and Therapy. *J Dent Res.* Feb;96(2):137-144.

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. 2001. Cellular events at the onset of physiological root resorption in rabbit deciduous teeth. *Anat Rec*, 264, 387-96.

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.

SAUNDERS, R. L. DE C. H. 1957. X-ray microscopy of human dental pulp vessels. *Nature, Lond*; 180, 1353-1354.

SCALLAN J, HUXLEY V, KORTHUIS R. 2010. “The lymphatic vasculature” en *Capillary Fluid Exchange Regulation, Functions, and Pathology*. Primera Edición. Estados Unidos. Morgan & Claypool Life Sciences. Páginas: 33-45.

- SONG XY, ZHOU FH, ZHONG JH, WU LL, ZHOU XF. 2006. Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. *J Neurochem.* Feb;96(3):833-42.
- STEFANSKI T. 2013. Lymphatic system of the dental pulp – systematic review of literature. *J Stoma* 66, 2: 202-220.
- STOLL G, MÜLLER HW. 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* Apr;9(2):313-25.
- SUMPIO BE, RILEY JT, DARDIK A. 2002. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* Dec;34(12):1508-12.
- SUZUKI K, LOVERA M, SCHMACHTENBERG O, COUVE E. 2015. Axonal Degeneration in Dental Pulp Precedes Human Primary Teeth Exfoliation. *J Dent Res.* Oct;94(10):1446-53.
- TAHMISCIJA I, RADOVICB S, BERISALICA A, JAKUPOVICA S, DOZIC A. 2012. Immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in inflamed human dental pulp. *Arch Orofac Sci* 7(2): 63-67.
- TOMITA K, KUBO T, MATSUDA K, FUJIWARA T, YANO K, WINOGRAD JM, TOHYAMA M, HOSOKAWA K. 2007. The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury. *Glia.* Aug 15;55(11):1199-208.
- TORNECK, C., 1994. “Dentin-Pulp Complex” en Ten Cate, A. (ed.), *Oral Histology, Development, Structure and Function*. Cuarta Edición. USA. Mosby. Páginas: 184-200, 205.

TRAN-HUNG L, LAURENT P, CAMPS J, ABOUT I. 2008. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol.* Jan;53(1):9-13.

TRICAUD N, PARK HT. 2017. Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm. *Cell Mol Life Sci.* Nov;74(22):4049-4057.

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.

WALLER A. 1850. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 140, 423-429.

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.

WONG SP, ROWLEY JE, REDPATH AN, TILMAN JD, FELLOUS TG, JOHNSON JR. 2015. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol Ther.* Jul;151:107-20.

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.

YOSHIDA S, OHSHIMA H. 1996. Distribution and Organization of Peripheral Capillaries in Dental Pulp and Their Relationship to Odontoblasts. *Anat Rec.* Jun;245(2):313-26.

ZHANG W, ZHANG J, ZHAO L, JIANG Y, HU X, LI Z, LIU B. 2017. Comparison of neurovascular relationships between human pulp and rat pulp. *Int J Clin Exp Med*;10(4):6017-6028.