



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Facultad de Odontología

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados

Campo de conocimiento: Área Clínica

Regeneración del complejo pulpo-dentinario a través de la inducción de péptido sintético CEMP1-p1

TESIS

Para optar por el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta: **Dina Avendaño Araiza**

Tutor:

Dr. Higinio Arzate

Facultad de Odontología

Miembros del Comité tutor:

Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez

Facultad de Odontología

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Facultad de Ciencias

Ciudad Universitaria, CDMX, Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Dr Higinio, gracias por abrirme las puertas del laboratorio desde el primer día. Gracias por darme la oportunidad de seguir creciendo y desarrollándome en el ámbito profesional y como persona. Gracias por los conocimientos compartidos durante estos dos años.

Dra Lía, gracias por brindarme no solo conocimientos sino también su amistad. Gracias por los regaños, por las palabras de aliento y el apoyo incondicional durante la maestría.

Sr. Juanito, gracias por la calidez que lo caracteriza, gracias por hacer de este proyecto el suyo, por su apoyo más allá de sus responsabilidades.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Edgar, Soni, Viri, Rita, Mikado, Dra Claudia, Dr. Gonzalo, Dr. Enrique, gracias por su apoyo resolviendo mis dudas, ayudándome sin esperar recibir nada a cambio y por el acompañamiento todo este tiempo.

A mis compañeros de clase Samuel, Carlos, Diana, Bianca, Gerardo, Jesy, Adrián, Jesús y Gustavo. Gracias por hacer de la maestría un tiempo más llevadero, gracias por las risas y por brindarme su amistad.

Gracias a cada uno de mis profesores por compartir sus conocimientos y empujarnos a no conformarnos y seguir aprendiendo, especialmente a la Dra. Aída, gracias por sacar lo mejor de nosotros.

Gracias a mis padres y hermanas por darme ánimo a pesar de la distancia, sin ustedes no hubiera podido llegar hasta aquí.

Gracias Zuriel, mi mejor amigo y compañero de vida. Gracias por soportarme, alentarme y apoyarme siempre. Por recordarme lo más importante y ayudarme a mantenerme enfocada. Gracias por cuidar de Corchito en mi ausencia.

Gracias Dios, por permitirme llegar hasta aquí, por darme esta oportunidad única en la vida. Por sostenerme en tiempos difíciles y darme aliento para terminar la maestría. Todo es por Ti y para Ti.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	4
1. LISTA DE ABREVIATURAS	6
2. RESUMEN	8
ABSTRACT	9
3. INTRODUCCIÓN	10
4. ANTECEDENTES	12
Estructura dental	12
Caries	34
MTA	42
Proteína del Cemento 1	43
Modelo animal experimental	45
5. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	46
6. JUSTIFICACIÓN	47
7. HIPÓTESIS	48
8. OBJETIVOS	48
9. METODOLOGÍA	49
Diseño del estudio	49
Población de estudio	49
Tamaño de la muestra.....	49
Criterios de selección	49
Variables	50
Selección de los grupos	50

Consideraciones éticas	51
Diseño y fabricación del aditamento.....	52
Secuencia quirúrgica acceso pulpar	54
10.RESULTADOS	57
11.DISCUSIÓN	64
12.CONCLUSIONES	66
13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1.LISTA DE ABREVIATURAS

TPV	Terapia pulpar vital
MTA	Mineral trióxido agregado
CEMP1	Proteína del cemento 1
CEMP1-p1	Péptido 1 de CEMP1
LP	Ligamento Periodontal
BMP 4/7	Proteína Morfogenética Ósea 4/7
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
Shh	Sonic hedgehog
MSX1	Msh homeobox 1
MSX2	Msh homeobox 2
MEC	Matriz extracelular
DSP	Sialoproteína Dentinaria
DPP	Fosforina Dentaria
DMP1	Proteína de Matriz Dentinaria 1
DSPP	Sialofosfoproteína dentinaria
GAG	Glicosaminoglicanos
GH	Hormona del Crecimiento
IGF 1/2	Factores de Crecimiento Similares a la Insulina 1/2
TGF- β 1/ 2 / 3	Factor de crecimiento transformante beta 1/ 2 / 3
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
ARN	Ácido Ribonucleico
IL-1	Interleucina 1
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelio-vascular
ADA	Asociación Dental Americana

Código	Aminoácido
A	Alanina
R	Arginina
N	Asparagina
D	Aspartato
C	Cisteína
Q	Glutamina
E	Ácido glutámico
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
K	Lisina
M	Metionina
F	Fenilalanina
P	Prolina
S	Serina
T	Treonina
W	Triptófano
Y	Tirosina
V	Valina

2.RESUMEN

La caries dental es una enfermedad de alcance mundial, en países industrializados más del 90% de la población adulta es afectada. De no ser tratada a tiempo llega a dañar los tejidos dentales hasta alcanzar la pulpa ocasionando una respuesta inflamatoria reversible inicial hasta progresivamente tornarse irreversible. En estos casos para mantener la vitalidad del diente, el tratamiento de elección implica la eliminación de la parte afectada, aplicando un biomaterial en contacto con la pulpa. Este procedimiento se recomienda como una alternativa al tratamiento de conductos en dientes vitales. Como resultado del tratamiento se busca la formación de dentina que proteja a la pulpa y preserve sus funciones. Diversos biomateriales y moléculas bioactivas se han estudiado con la finalidad de inducir la formación de dentina en la comunicación pulpar.

El objetivo de este proyecto fue evaluar la regeneración del complejo pulpo-dentinario en molares de ratas Wistar a 4 semanas realizando comunicación pulpar y aplicando un péptido derivado de la proteína del cemento 1, la proteína CEMP1-p1 y comparándolo con el estándar de oro en endodoncia: MTA.

Se utilizaron ratas macho Wistar. Se realizó la comunicación pulpar en el primer molar superior derecho, se conformaron los siguientes grupos: Grupo 1: Control positivo MTA; Grupo 2: Control gelfoam; Grupo 3: Experimental CEMP1-p1. Después de 4 semanas se realizó la eutanasia y se procesaron los tejidos para su análisis histomorfológico e inmunofluorescencia.

El análisis histomorfológico mostró infiltrado inflamatorio leve y formación de dentina terciaria tipo osteodentina, con vitalidad del tejido pulpar remanente e integridad en los tejidos periapicales en los grupos de MTA y CEMP1-p1. La inmunofluorescencia mostró positividad para marcadores de tejidos mineralizados (dentina, hueso y cemento) también en ambos grupos MTA y CEMP1-p1.

A pesar de no haber regeneración con morfología similar a la fisiológica de la dentina, la aplicación de CEMP1-p1 resultó ser un buen candidato para los procedimientos destinados a restaurar la integridad funcional de los tejidos dentales dañados.

.

ABSTRACT

Tooth decay is a worldwide disease. In industrialized countries more than 90% of the adult population is affected. If it is not treated on time, it damages the dental tissues until reaching the pulp causing an initial reversible inflammatory response, progressively becoming irreversible. In these cases, to maintain the vitality of the tooth, the treatment of choice involves the removal of the affected part, applying a biomaterial in contact with the pulp. This procedure is recommended as an alternative to root canal treatment for vital teeth. As a result of the treatment, dentin formation is sought to protect the pulp and preserve its functions. Various biomaterials and bioactive molecules have been studied in order to induce dentin formation in pulp communication.

The objective of this project was to evaluate the regeneration of the pulp-dentin complex in Wistar rats molars at 4 weeks by performing pulp communication and applying a cementum protein 1-derived peptide (CEMP1-p1), compared with the gold standard in endodontics: MTA.

In this study, male Wistar rats were used. Pulp communication was made in the right upper first molar, the following groups were formed: Group 1: MTA positive control; Group 2: Gelfoam control; Group 3: Experimental CEMP1-p1. After 4 weeks, euthanasia was performed and the tissues were processed for histomorphological analysis and immunofluorescence.

Histomorphological analysis showed a mild inflammatory infiltrate and osteodentine-type tertiary dentin formation, with vitality of the remaining pulp tissue and integrity in the periapical tissues in the MTA and CEMP1-p1 groups. Immunofluorescence showed positivity for mineralized tissue makers (dentin, bone and cementum) also in both MTA and CEMP1-p1 groups.

Despite the absence of regeneration with a morphology similar to the dentin physiology, the application of CEMP1-p1 turned out to be a good candidate for the procedures intended to restore the functional integrity of the damaged dental tissues.

3. INTRODUCCIÓN

La caries dental es un problema de salud bucal en la mayoría de los países industrializados, afectando 60-90% de los escolares y a la mayoría de los adultos (más del 90%) (1). Si no se interviene, llegará a formar una cavidad que puede dañar el esmalte y la dentina hasta alcanzar la pulpa dental. Las bacterias y sus toxinas penetran por los túbulos dentinarios hasta alcanzar el tejido pulpar, lo que ocasiona una respuesta inflamatoria, que inicialmente será reversible, hasta progresivamente tornarse irreversible. En estos casos para mantener la vitalidad del diente, el tratamiento de elección implica la eliminación de tejido cariado y en algunos casos de la una porción de la pulpa, aplicando un material biocompatible (Terapia Pulpar Vital). Este procedimiento se recomienda como una alternativa al tratamiento de conductos en dientes vitales (2, 3).

Aunque la Terapia Pulpar Vital se remonta al siglo XVIII, con los avances en la biología ha sido posible emplear enfoques novedosos. Con una mejor comprensión de las ciencias básicas, el avance de nuevos materiales e innovaciones tecnológicas, la terapia endodóntica ha ido evolucionando, ofreciendo mejores resultados clínicos.

Según la Asociación Americana de Endodoncia, la endodoncia regenerativa son todos los "procedimientos biológicos diseñados para reemplazar las estructuras dañadas, incluidas la dentina y las estructuras radiculares, así como las células del complejo pulpo-dentinario" (4). Actualmente la terapéutica se centra en la resolución de la enfermedad y en la supervivencia dental. Aunque la regeneración completa del complejo pulpo-dentinario con tejido que se asemeje al nativo sigue siendo el objetivo final, cada vez se busca emplear terapias más sofisticadas para lograrlo.

Entre los materiales más utilizados para la terapia pulpar están el Hidróxido de Calcio y MTA. En los últimos años se ha identificado una proteína específica del cemento: la proteína del cemento 1 (CEMP1). CEMP1 tiene una masa molecular de 25.9kDa y está formada por 247 aminoácidos (5). Diversos estudios indican que promueve la diferenciación cementoblástica de células mesenquimales del ligamento periodontal (6-8). Estudios *in vivo* demuestran que induce la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico de calvaria en ratas Wistar (9). Posee propiedades intrínsecas para unirse a los cristales de hidroxiapatita y de fosfato octacálcico (10, 11).

La utilización de proteínas nativas y recombinantes del cemento radicular, presentan limitaciones técnicas (extracción y purificación) y financieras. Recientes investigaciones se han centrado en el desarrollo de compuestos peptídicos miméticos o de identificación de dominios funcionales dentro de las mismas. Al usar una cadena corta de aminoácidos, estos se pueden utilizar en altas concentraciones, no provocan una reacción inmune y son económicos (12). Recientemente se identificó la secuencia de aminoácidos MGTSSSTDSQQAGHRCSTSN, que corresponde a los primeros 20 aminoácidos de la secuencia de la proteína CEMP1. Este fragmento se denominó péptido 1 de CEMP1 (CEMP1-p1). Diversos estudios han mostrado el efecto del péptido CEMP1-p1 como inductor del proceso de mineralización. Promueve la diferenciación de las células del Ligamento Periodontal hacia un fenotipo "mineralizante", muestra propiedades osteoinductoras y osteogénicas, mejorando la deposición fisiológica y la maduración de hueso recién formado en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas Wistar (13). Posee afinidad y promueven el crecimiento de cristales de hidroxiapatita *in vitro* (14).

En la actualidad se buscan técnicas no invasivas para conservar el máximo de la estructura dental, usando materiales biocompatibles, para prolongar la vida del órgano dentario. Diversos estudios muestran que utilizando moléculas bioactivas se puede regenerar el complejo pulpo-dentinario, logrando la formación de un sello que proteja al tejido y mantenga la vitalidad pulpar remanente. El péptido sintético CEMP1-p1 es una opción adecuada, ya que se ha comprobado que interviene en procesos celulares que inducen mineralización.

4. ANTECEDENTES

ESTRUCTURA DENTAL

El diente es un órgano complejo que consiste en estructuras altamente organizadas. Se desarrolla dentro de la mandíbula y maxilar y después de la erupción su raíz (raíces) están firmemente ancladas en el hueso alveolar propio. Entre el diente y hueso, existe una capa delgada de membrana llamada Ligamento Periodontal (LP), que juega un rol importante ya que provee múltiples funciones para mantener el diente, además sirve para absorber fuerzas o como amortiguador que evita la transmisión de estas hacia el diente.

El diente está formado por células que se originan del ectodermo y mesodermo. El esmalte está formado por ameloblastos derivados del ectodermo, células que desaparecen después de la formación completa del tejido duro.

El tejido pulpar y dentinario conforman una verdadera unidad biológica estructural, embriológica y funcional conocida como complejo pulpo-dentinario.

Los odontoblastos son importantes para ambos tejidos. Desde el punto de vista estructural, los odontoblastos se localizan en la interfase existente entre la pulpa y la dentina y su prolongación principal o proceso odontoblástico se ubica en el interior de los túbulos dentinarios, recorriendo gran parte del espesor dentinario.

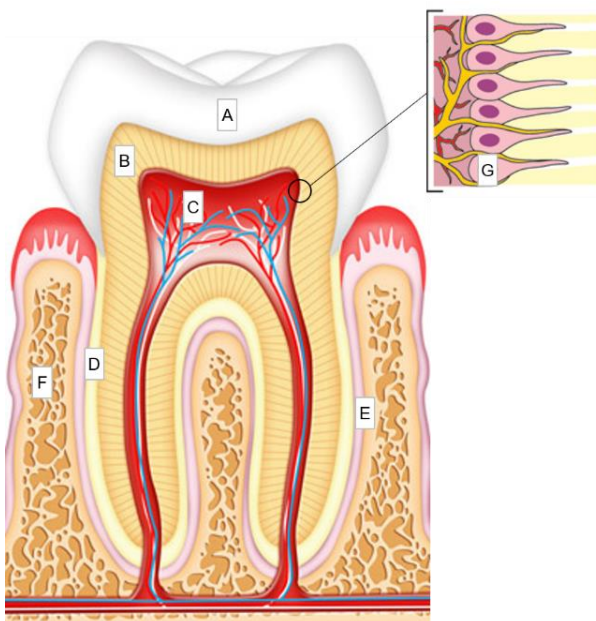


Figura 1. Estructura dental. **A** Esmalte, **B** Dentina, **C** Pulpa, **D** Cemento, **E** Ligamento Periodontal, **F** Hueso Alveolar, **G** Odontoblastos (15).

La dentina es secretada por los odontoblastos, y la pulpa dental depende de la protección provista por la dentina. Desde el punto de vista embriológico, ambos tejidos dentinario y pulpar, tienen su origen en la papila dentaria. El hecho de que sean considerados como una unidad implica que los impactos sobre la dentina afectan a los componentes pulpares, y que las alteraciones en la pulpa afectan la cantidad y calidad de la dentina producida.

1 DESARROLLO DENTAL

Se distinguen una serie de etapas según la morfología de los gérmenes dentarios durante el desarrollo:

- Brote o yema
- Casquete
- Campana

El desarrollo de los dientes comienza con la migración de células de la cresta neural hacia el maxilar y la mandíbula. El ectodermo oral de la superficie del maxilar y de la mandíbula se engruesa dando lugar a bandas en forma de C (lámina dental).

Hacia la sexta semana de vida intrauterina comienza la diferenciación de esta lámina en el mesénquima de la cresta neural, los primordios epiteliales de cada diente comienzan a tomar forma de **brotos dentarios**, correspondientes a los 10 dientes por cada maxilar (correspondiente a los dientes deciduos). Los gérmenes dentarios se asocian con condensaciones de células mesenquimatosas.

Los brotes siguen creciendo y se invaginan para llegar al **periodo de casquete**. En este periodo se observan una serie de capas que forman el órgano del esmalte: una capa externa que corresponde al "epitelio dental externo", una capa interna de ameloblastos "epitelio dental interno", y un centro de tejido laxo "retículo estrellado". El mesénquima originado de la cresta neural se sitúa en la indentación y forma la papila dental, precursor del complejo pulpo-dentinario.

Mientras se profundiza la indentación, el diente cambia y adopta el aspecto de campana. Durante el **periodo de campana**, las células mesenquimatosas de la papila adyacente a la capa dental interna de ameloblastos se diferencian en células epiteliales cilíndricas, los odontoblastos, que más tarde sintetizan dentina (15).

La diferenciación de los odontoblastos ocurre a partir de las células ectomesenquimales de la papila que se transforman primero en preodontoblastos, luego en odontoblastos jóvenes y, por último, en odontoblastos maduros o secretores. La capa de odontoblastos persiste durante toda la vida del diente, produciendo constantemente predentina.

En la periferia del diente en desarrollo, se forma una condensación de células mesenquimatosas, denominada “saco dental”, el cual formará el tejido de sostén del diente (cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar).

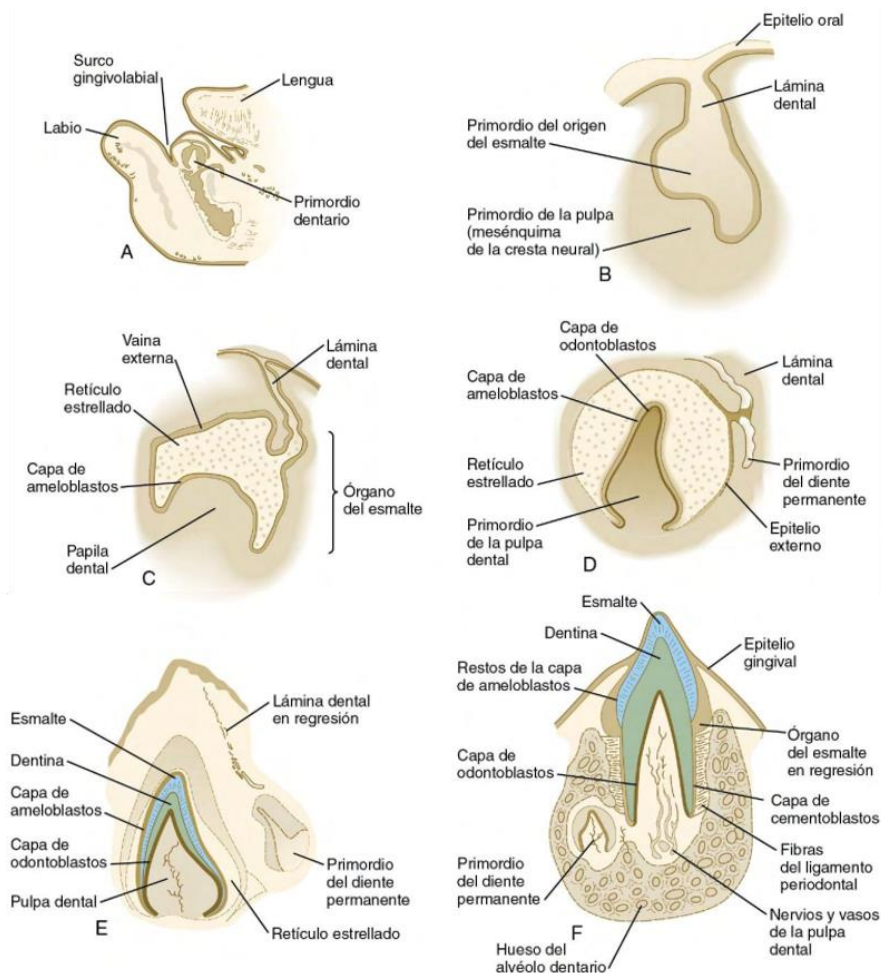


Figura 2. Desarrollo de un diente.

A Corte parasagital de la mandíbula de un embrión humano de 14 semanas, que muestra la localización relativa del germen dentario. **B** Primordio dentario en fase de **yema** en un embrión de 9 semanas. **C** Primordio dentario en estadio de **casquete** en un embrión de 11 semanas. Observese el órgano del esmalte. **D** Primordio de un incisivo central en estadio de **campana**, en un embrión de 14 semanas, antes del depósito del esmalte o la dentina. **E** Incisivo de un feto a término antes del proceso de erupción. **F** Incisivo en erupción parcial donde se observa el primordio de un diente permanente próximo a una de sus raíces (16).

Se han identificado diversas moléculas y factores que intervienen en las distintas fases del proceso. Los componentes más importantes que participan en la interacción epitelio-mesénquima son: BMP, FGF, Shh y proteínas Wnt (17).

Los factores BMP – especialmente BMP-4- estimulan al mesénquima de la yema para que exprese marcadores moleculares como los factores de transcripción Msx-1 y Msx-2, los

cuales contribuyen a determinar el patrón microscópico del órgano dentario. FGF regulan la morfogénesis epitelial y desarrollo del mesénquima estimulando la proliferación local. Las proteínas Shh, regulan el crecimiento y forma del diente. Las proteínas Wnt intervienen en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación celular.

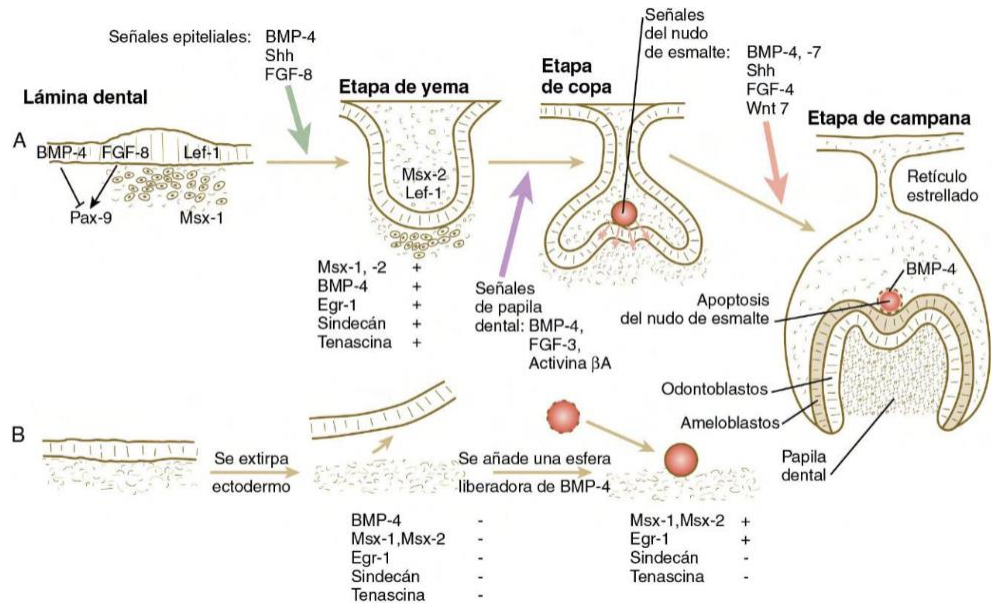


Figura 3. A Interacciones inductivas que se producen durante el desarrollo de los dientes. Las moléculas asociadas a la flecha verde son componentes de la señal emitida por la lámina dental ectodérmica para el mesénquima de la cresta neural subyacente; las moléculas asociadas a la flecha violeta representan señales enviadas por la papila dental al ectodermo que la cubre; las moléculas junto a la flecha rosa constituyen señales enviadas por el nudo de esmalte a la papila dental. **B** Experimento in vitro que muestra cómo una partícula que libera proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4) puede inducir al mesénquima dental para que exprese marcadores específicos (Msx-1, Msx-2 y Egr-1). FGF, factor de crecimiento fibroblástico; Shh, Sonic hedgehog (17).

1.1 DENTINOGENESIS

La dentinogénesis abarca los mecanismos por los cuales la papila dental elabora por medio de sus células especializadas, los odontoblastos, una matriz orgánica que luego se calcifica formando dentina. Se consideran tres etapas:

- Elaboración de la matriz orgánica, compuesta por una trama fibrilar y componente fundamental amorfo.
- Maduración de la matriz.
- Precipitación de sales minerales (mineralización).

La formación dentinaria comienza en la etapa de campana, inicia en el vértice de la papila dental que corresponde a las futuras cúspides, continuando en dirección cervical para conformar la dentina coronaria (18).

a) Ciclo vital de los odontoblastos

Los odontoblastos se diferencian de las células ectomesenquimales de la papila dental, bajo la influencia inductora del epitelio interno del esmalte. El odontoblasto presenta varias etapas dentro de su ciclo vital:

- Células mesenquimatosas indiferenciadas.
- Preodontoblastos.
- Odontoblastos jóvenes.
- Odontoblastos secretores.

Las **células mesenquimales indiferenciadas** son pequeñas con forma estrellada y núcleo grande, escaso citoplasma con pocas organelas. Sintetizan y segregan en la MEC colágena tipo I y III, proteoglicanos, glicosaminoglicanos sulfatados y fibronectina. Su diferenciación es precedida por la maduración de los preameloblastos. Progresivamente las células ectomesenquimales incrementan su volumen, contienen mayor cantidad de organelas, adoptando una forma cilíndrica baja con prolongaciones citoplasmáticas proximales denominándose ahora **preodontoblastos**. Los preodontoblastos se ubican próximos unos a otros, adquieren un epitelio cilíndrico simple. Inician su diferenciación terminal a **odontoblastos jóvenes**, con una última división mitótica.

Los odontoblastos jóvenes desarrollan sistemas de unión entre ellos, aumentan su volumen celular y toman forma más cilíndrica, su núcleo se desplaza hacia la zona distal. Se observa una prolongación o proceso odontoblástico, que caracteriza al odontoblasto joven.

Cuando el odontoblasto inicia su actividad secretora se le denomina **odontoblasto secretor**, segrega predentina entre el órgano del esmalte y los odontoblastos. Esta predentina está formada por colágena I, V y VI. Cuando la prolongación odontoblástica del odontoblasto queda alojada en el túbulo dentinario, se le conoce como **odontoblasto maduro**. Este odontoblasto continúa contribuyendo durante el resto de la vida del diente a la síntesis y mineralización, manteniendo la matriz dentinaria (18).

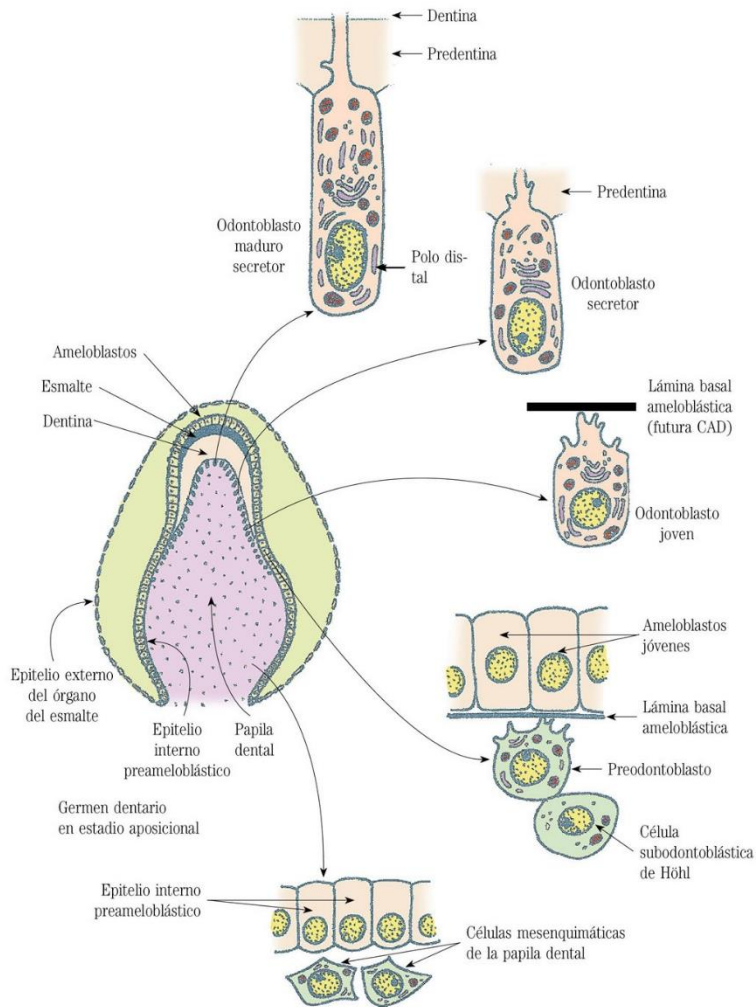


Figura 4. Estadios de diferenciación de los odontoblastos (17).

b) Formación de la predentina o dentina de manto

La primera predentina que se forma corresponde a la *dentina de manto*, tiene su origen en la papila dentaria. Su MEC está formada por fibras colágenas gruesas incluidas en abundante sustancia fundamental amorfa. Los odontoblastos una vez que la elaboran, participan en la mineralización de la siguiente forma:

- Captan y almacenan calcio.
- Elevan la concentración local de iones fosfato, por la fosfatasa alcalina que se localiza en la superficie y se difunde en la MEC.
- Formando las vesículas matriciales.

El calcio alcanza la predentina a través del odontoblasto, ya que posee canales de calcio tipo L, sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ y el sistema de ATPasa dependiente de calcio. El calcio se acumulará en algunas organelas como las mitocondrias (15).

Las vesículas matriciales, son formaciones esféricas de 100 a 200 nm de diámetro. Se originan por gemación a partir del odontoblastos. En su interior el calcio y fosfato se precipitan al encontrar un microambiente adecuado. Los iones acumulados en las vesículas precipitan como fosfato cálcico amorfo, para finalmente transformarse en cristales de hidroxiapatita, ricos en magnesio.

La formación de cristales es compleja. Primero aparecen partículas nanométricas, que forman la primera entidad visible del componente mineral. Se disponen una junto a otras en cadenas de agujas de 1-2 nm. La coalescencia de estas cadenas da lugar a cristales que forman placas. Estas placas expanden hasta formar cristales (15).

Al crecer los cristales rompen las vesículas, esparciéndose a la matriz circundante. Los núcleos se fusionan con otros, constituyendo un frente lineal de calcificación. La osteopontina y sialoproteína dentinaria (DSP) participan en la configuración de estos focos iniciales de calcificación. Los cristales siguen una orientación definida con respecto a las fibras colágenas, se disponen tanto en la superficie como en su interior (15).

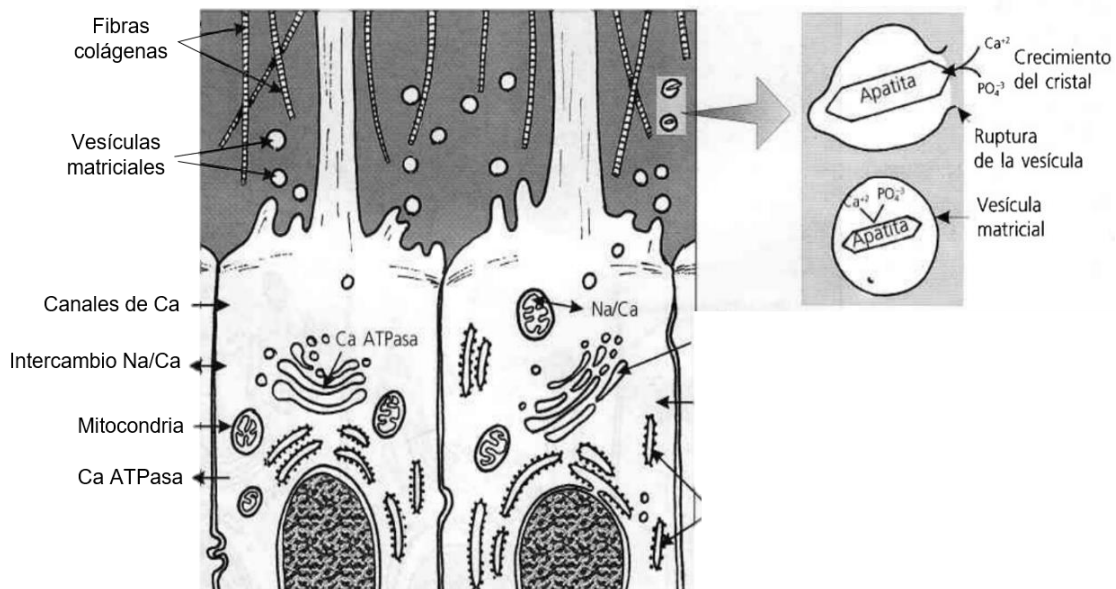


Figura 5. Formación de predentina (15).

c) Formación de la dentina

La MEC de la dentina está formada por fibras colágenas más finas y con disposición más irregular a diferencia de la predentina, y la mineralización no se forma por vesículas, sino que sigue un patrón globular. Esto implica que se produce por aposición de cristales de hidroxiapatita en varios puntos a la vez, formándose núcleos de cristalización globulares (calcosferitos), que después se fusionan con sus vecinos.

La formación de la dentina consiste en la secreción de colágena y proteoglicanos por el odontoblasto. La colágena configura una red fibrilar y los proteoglicanos desarrollan ahí su actividad metabólica. Los procesos odontoblásticos transportan la fosfoproteína dentinaria (DPP) y proteoglicanos que son vertidos por exocitosis forman el frente de mineralización, en donde el odontoblasto liberará también iones calcio. En el frente de mineralización se forman los calcosferitos, con un diámetro entre 10-20 μm . El *ratio* Ca/P de los calcosferitos de la corona es más alto (1.63 ± 0.27) que en la raíz (1.46 ± 0.28) (15).

Esta dentina está más calcificada que la dentina de manto o predentina, pero la estructura histológica es similar.

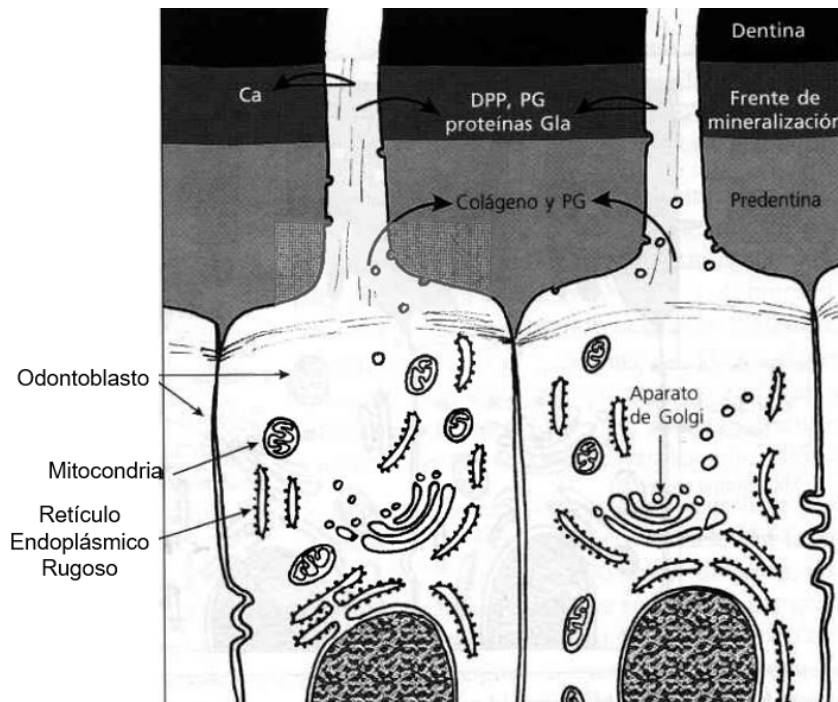


Figura 6. Formación de dentina (15).

2 DENTINA

Está compuesta de un 70% de cristales inorgánicos de hidroxiapatita, un 20% de fibras orgánicas de colágeno con pequeñas cantidades de otras proteínas y un 10% de agua de peso.

a) Matriz orgánica

Está formada principalmente por colágena tipo I, que es sintetizada por odontoblastos y representa el 90% de dicha matriz. Los tipos III, IV, V y VI se han descrito también en pequeñas proporciones.

La colágena es una proteína estructural importante en la MEC del hueso y dentina. Está formada por tres cadenas polipeptídicas “tropocolágena”. Cada cadena posee la secuencia glicina- prolina- hidroxiprolina (Gly-X-Y), sus residuos interactúan con moléculas formando una estructura fibrilar (triple hélice). La colágena es un reservorio de cationes, aniones y moléculas. La colágena tipo I forma un andamio para la precipitación de fosfato de calcio amorfo y su eventual transformación a cristales de hidroxiapatita. Aunque el proceso de nucleación y mineralización es controlado por un grupo de proteínas no colágenas.

Se han detectado proteínas semejantes a las existentes en la matriz ósea como la osteonectina, osteopontina, y proteína Gla de la dentina (similar a la osteocalcina) que contiene ácido γ -carboxiglutámico (19).

También se localizan proteínas propias de la dentina como la fosfoproteína dentinaria (DPP) que es el segundo componente más abundante de la dentina, la proteína de matriz dentinaria 1 (DMP1) y sialoproteína dentinaria (DSP).

La DMP1 pertenece a las proteínas no colágenas denominadas *SIBLING*, que presentan un dominio arginina, glicina y aspartato (RGD), el cual es un ligando de unión a integrina que puede regular la adhesión celular. La DMP1 es altamente fosforilada con fuerte afinidad al calcio, capacidad para unirse a la colágena I y autoensamblarse en una estructura β -laminar, facilitando la nucleación de cristales de hidroxiapatita. En su procesamiento da lugar a dos fragmentos: un fragmento amino-terminal glicosilado que se localiza en predentina, que es un regulador negativo de la nucleación de hidroxiapatita; así como un fragmento carboxilo-

terminal localizado en áreas de mineralización y se acumula en el núcleo de células mesenquimales (19).

La Sialofosfoproteína dentinaria (DSPP) forma parte de las proteínas *SIBLING*. A partir de la proteólisis de DSPP se generan dos fragmentos: DSP y DPP. DSP es la segunda proteína más abundante de la dentina y es considerado un marcador fenotípico de la dentina. Regula negativamente el proceso de biomineralización, y también regula la expresión de DMP1 durante la dentinogénesis y su presencia es vital para la mineralización de la dentina (19).

Los proteoglicanos también están presentes en la matriz dentinaria. El condroitín 4-sulfato y el condroitín 6-sulfato son los GAG más frecuentemente. Proteínas del suero, como la albúmina, fosfolípidos y factores de crecimiento se han identificado también. Algunos factores de crecimiento implicados en la diferenciación de odontoblastos son:

- Hormona de crecimiento (GH) juega un papel como parácrino o autócrino en el desarrollo dental.
- IGF-1 y -2 (de la familia de IGF: Factores de Crecimiento Similares a la Insulina).

Cuadro 1 Componentes de la MEC dentinaria (18).

Cuadro 1. Componentes de la matriz extracelular de la dentina.	
Fibras colágenas <ul style="list-style-type: none"> - Tipo I - Tipo I trimérico - Tipo V - Tipo III - Tipo VI, IX, X, XI, XII 	Glucoproteínas/sialoproteínas <ul style="list-style-type: none"> - Osteonectina - Sialoproteína dentinaria (DSP) - Fosfoproteína dentinaria (DPP) - Sialoproteína ósea - Osteopontina - Glucoproteína ácida ósea 75 - Sindecán 2 - Alfa-2-HS-glucoproteína (AHSG) - Laminina
Proteoglicanos <ul style="list-style-type: none"> - Decorina (PG II) - Biglucano (PG I) - Condroitina, con 4- y 6- sulfato - Dermatógeno sulfato - Queratán sulfato - Heparán sulfato 	Proteínas derivadas del suero <ul style="list-style-type: none"> - Albúmina - Fibronectina - Inmunoglobulinas
Lípidos <ul style="list-style-type: none"> - Fosfolípidos - Colesterol - Éster de colesterol - Triacilgliceroles 	Fosfoproteínas <ul style="list-style-type: none"> - Proteína de la matriz dentinaria 1, 2 - G- Carboxiglutamato A - Osteocalcina - Proteína Gla de la matriz
Enzimas proteolíticas <ul style="list-style-type: none"> - Enamelisina - Metaloproteinasa de la matriz (MMP) - Inhibidores tisulares de metaloproteinasas de la matriz (TIMP) - Gelatinasas 	Factores de crecimiento

- TGF- β 1, -2 y -3; BMP-2, -4 y -6 participan en la polarización y diferenciación de los odontoblastos. TGF- β 1 desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria y procesos tisulares regenerativos (20).

b) Matriz inorgánica

Compuesta por cristales de hidroxiapatita, similares químicamente a los del esmalte, cemento y hueso. Se diferencian de los cristales del esmalte porque son más pequeños y delgados, más parecidos a los del tejido óseo. Las dimensiones son 36 nm de longitud, 25 nm de anchura y 10nm de altura. Se orientan de forma paralela a las fibras de colágena de la matriz, disponiéndose entre y dentro de las fibras.

Además, hay cierta cantidad de fosfatos amorfos, carbonatos, sulfatos y oligoelementos como flúor, cobre, zinc, hierro, magnesio, etc. Hay calcio ligado a los componentes de la matriz orgánica que actúan como reservorio de cristales de hidroxiapatita.

Los componentes de la matriz dentinaria han sido objeto de estudio, debido a sus propiedades bioactivas. Es por eso que se considera como un reservorio de factores de crecimiento y citocinas (21). Los cuales son secretados por los odontoblastos durante la dentinogénesis primaria. Estos pueden liberarse durante la desmineralización de la matriz ante la acción ácida de la caries dental, tratamiento químico (EDTA o ácido grabador) o por materiales restauradores a base de hidróxido de calcio, MTA (mineral trióxido agregado) o Biodentine (22, 23).

La pulpa posee un potencial regenerativo bien reconocido en la dentinogénesis reparativa (21, 24). Los factores de crecimiento derivados de la dentina también desempeñan un papel clave en la regulación del reclutamiento de células progenitoras, proliferación celular y diferenciación de nuevas células secretoras de dentina (21, 24). Algunos factores (FGF, TGF- β 1, BMP-7) han sido aplicados como una opción terapéutica en recubrimientos pulpaes, observándose diferenciación de nuevas células similares a los odontoblastos (20). Estos factores de crecimiento que permanecen “secuestrados” en la matriz extracelular mineralizada de la dentina, son clave durante la mineralización, ya que su liberación puede ser responsable de una serie de eventos de señalización que orquestan y estimulan la

diferenciación de células troncales. El MTA al contener hidróxido de calcio, y permanecer bajo las restauraciones en contacto con la dentina, permite la liberación continua de factores de crecimiento bioactivos derivados de la dentina (23).

Cuadro 2 Factores clave y morfógenos presentes en dentina conocidos por su papel clave en la regeneración y reparación (25).

Cuadro 2. Componentes de la matriz extracelular de la dentina.	
Factores de crecimiento claves en la matriz dentinaria	Función regenerativa
TGF-b1	Involucrado en la diferenciación de odontoblastos primarios y promueven dentinogénesis terciaria.
Factor de crecimiento transformante beta 1	
TGF-b2	Su expresión regula la diferenciación de DPSCs a un fenotipo mineralizante.
Factor de crecimiento transformante beta 2	
TGF-b3	Promueve diferenciación odontoblástica.
Factor de crecimiento transformante beta 3	
BMP-2	Promueve diferenciación odontoblástica en modelo in vivo e in vitro y la inducción de DSPP, aumenta la actividad de fosfatasa alcalina.
Proteína Morfogénica Ósea 2	
BMP-4	Aumenta la diferenciación odontoblástica.
Proteína Morfogénica Ósea 4	
BMP-7	Promueve el fenotipo mineralizante de DPSCs.
Proteína Morfogénica Ósea 7	
IGF-1	Promueve proliferación y diferenciación de DPSCs y SCAP en un fenotipo mineralizante.
Factor de crecimiento insulínico-1	
HGF	Promueve migración, proliferación y supervivencia de MSCs.
Factor de crecimiento hepático	
VEGF	Potente factor angiogénico que ha demostrado promover la formación de vasos sanguíneos en dientes implantados subcutáneamente en ratas SCID.
Factor de Crecimiento Endotelial Vascular	
ADM	Promueve diferenciación odontoblástica por la activación de p38.
Adrenomedulina	
FGF-2	Promueve quimiotaxis y angiogénesis.
Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2	
PDGF	Promueve angiogénesis, quimiotaxis de MSCs, modula el proceso de diferenciación odontoblástica, actúa sinérgicamente con otros factores de crecimiento.
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	
EGF	Mejora la diferenciación neurogénica de DPSCs y SCAP.
Factor de crecimiento epidérmico	
PIGF	Promueve angiogénesis y diferenciación osteogénica de MSCs.
Factor de crecimiento placentario	
BDNF	Promueve crecimiento neuronal y focalización axonal.
Factor neurotrófico derivado del cerebro	
GDNF	Promueve regeneración nerviosa in vivo y proliferación/ supervivencia de células pulpares.
Factor neurotrófico derivado de la glía	
GDF-15	Promueve regeneración axonal y función después de daño, y juega un papel importante en el mantenimiento neuronal.
Factor de diferenciación/crecimiento 15	

2.1 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA DENTINA

Se diferencian tres tipos de dentina según su formación.

a) Dentina primaria

Se deposita desde las primeras etapas de la dentinogénesis hasta que el diente erupciona y entra en contacto con el antagonista.

b) Dentina secundaria

Se produce después de que se forma por completo la raíz del diente. Se deposita más lentamente que la primaria, pero su producción continúa durante toda la vida del diente. La distribución de los túbulos en esta dentina es ligeramente menos regular que en la dentina primaria. El límite entre ambas es un cambio en la dirección de los túbulos dentinarios. Se forma en toda la periferia de la cámara pulpar, lo que ocasiona una disminución progresiva de la cámara pulpar, y con ello una disminución en el número de odontoblastos por apoptosis.

c) Dentina terciaria

Dentro de este tipo de dentina, se hace la distinción entre la dentina reaccional o reactiva y la dentina reparativa.

La dentina reaccional es segregada ante un estímulo nocivo por los odontoblastos terminales post-mitóticos.

La dentina reparativa es elaborada por una nueva generación de odontoblastos por células troncales de la pulpa. Algunos la consideran como dentina neoformada (18).

La estimulación de los odontoblastos para la diferenciación y secreción posterior de dentina terciaria tendría su origen en factores de crecimiento tales como el TGF- β que serían solubilizados como consecuencia de la actividad de los ácidos de la caries sobre la dentina. La osteopontina, la osteonectina y la sialoproteína dentinaria participan también en distintas fases de este proceso de dentinogénesis.

Cuando la caries es de progreso rápido y gran extensión, la dentina que se forma sigue un patrón tubular irregular y frecuentemente se encuentran odontoblastos incluidos (osteodentina).

3 PULPA

La pulpa es un es un tejido conectivo laxo, ricamente vascularizado e innervado. Su origen embriológico es el tejido ectomesenquimal (papila dental). Está formada por un 75% de agua y por un 25% de materia orgánica; constituida por células y matriz extracelular representada por fibras y sustancia fundamental. En su periferia (unión pulpa-predentina) se ubican los odontoblastos que son células especializadas que se encargan de sintetizar dentina. Además, se encuentra rodeada totalmente por dentina mineralizada, por lo que se considera un tejido único (15). Debido al pequeño volumen del tejido pulpar confinado dentro de la dentina con poco aporte sanguíneo, excepto en el foramen apical, es difícil para el sistema inmune erradicar la infección sin un aporte sanguíneo colateral. La regeneración de la dentina dependerá de la vitalidad pulpar, mientras que, la regeneración del tejido pulpar es difícil ya que es un tejido encapsulado (contenido) en dentina sin aporte sanguíneo colateral excepto en la parte apical.

3.1 ZONAS TOPOGRÁFICAS DE LA PULPA

a) Zona odontoblástica

Se localiza inmediatamente debajo de la predentina, aunque los procesos odontoblásticos se extienden hacia la parte interna de la dentina. Esta capa está compuesta de los cuerpos celulares de los odontoblastos. Se pueden encontrar capilares, fibras nerviosas y células dendríticas.

En la porción coronal de pulpas jóvenes, los odontoblastos adoptan una forma columnar alta (26). Sus núcleos no están al mismo nivel debido a que los odontoblastos varían de altura, por eso presentan una apariencia de empalizada con grosor aparente de 3 a 5 células, cuando en realidad solo hay una capa real de odontoblastos. Los cuerpos celulares de los odontoblastos se conectan entre sí por diferentes complejos de unión, que incluyen

desmosomas, uniones gap y uniones estrechas. Los *desmosomas* se localizan en la porción apical de los cuerpos celulares y unen a los odontoblastos mecánicamente entre sí. Las uniones *Gap* están formadas por la proteína conexina que permite el intercambio de señales célula a célula (27) para sincronizar la actividad secretora que produce capas de predentina uniformes. Estas uniones son numerosas durante la formación de dentina primaria. Se han observado uniones entre odontoblastos y fibroblastos en el área subodontoblástica. Las uniones *estrechas* se localizan en la parte apical de odontoblastos jóvenes, estudios sugieren el paso directo de pequeños elementos desde capilares subodontoblásticos a la predentina y la dentina desde los odontoblastos (28). Estas uniones parece que determinan la permeabilidad de la capa odontoblástica cuando la dentina está cubierta por esmalte o cemento al restringir el paso de moléculas, iones y líquidos desde la predentina (29). Estas uniones se rompen durante la preparación de la cavidad, aumentando la permeabilidad de la dentina (30). Los odontoblastos son más por unidad de área en la porción coronal que en la pulpa radicular. En la pulpa coronal madura adoptan una forma más columnar, en la porción media de la pulpa radicular son más cuboidales (26). En la parte apical forman como una capa escamosa de células aplanadas, lo anterior en relación con la menor cantidad de túbulos dentinarios por unidad de área presentes en la raíz en comparación a la porción coronal.

Durante la maduración y envejecimiento, hay acumulación continua en la capa de odontoblastos en la porción coronal debido al estrechamiento del espacio pulpar.

b) Zona basal o Pobre en células

Esta zona estrecha de aproximadamente 40 μm de ancho, se localiza subyacente a la capa de odontoblastos. Su nombre se debe a que está relativamente libre de células. Lo atraviesan capilares sanguíneos, fibras nerviosas no mielinizadas y fibroblastos. La ausencia o presencia de esta zona, depende del estado funcional de la pulpa (26). En pulpas con ápices abiertos no está presente, por la formación rápida de dentina. En pulpas con ápice cerrado y formación continua de dentina reparadora también está ausente.

c) Zona rica en células

Contiene una proporción relativamente alta de fibroblastos. Esta zona es más prominente en la pulpa coronal que en la radicular. Además de fibroblastos, encontramos células inmunes como macrófagos y células dendríticas, células mesenquimales indiferenciadas. Según estudios en molares de rata, se cree que esta zona es resultado de la migración periférica de células que ocupaban la zona central, y que comienza durante la erupción dental (31). La división celular es rara, pero puede ocurrir ante la muerte de odontoblastos que desencadenan aumento en la mitosis. Como los odontoblastos son células post mitóticas, se reemplazan por células que migran desde la zona rica en células hacia el interior de la superficie dentinaria (32). Varios estudios sugieren que las células mesenquimales son la fuente de estos reemplazos (33).

d) Zona central de la pulpa

Formada por tejido conectivo laxo con diferentes tipos celulares (destacan los fibroblastos), escasas fibras inmersas en MEC amorfa y abundantes vasos y nervios.

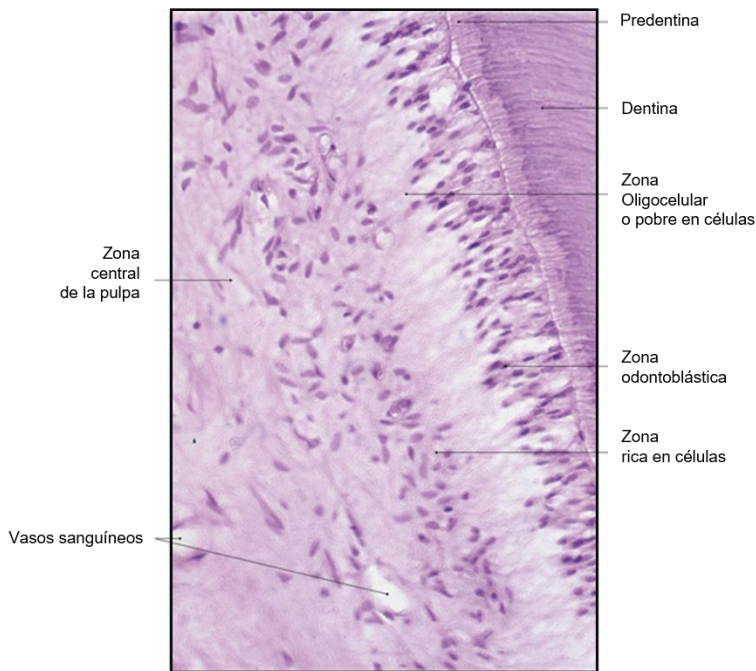


Figura 7. Detalle del complejo pulpo-dentinario. Se observan las diferentes zonas de la pulpa, pre dentina y región interna de la dentina. Técnica por descalcificación. HE, x 250 (15).

3.2 CÉLULAS DE LA PULPA

a) Odontoblasto

Es la célula más característica y especializada del complejo pulpo-dentinario con funciones dentinógenas, inmunógenas y posiblemente sensoriales (34-36). Pertenecen tanto a la pulpa como a la dentina, porque se localizan en la periferia pulpar pero, sus prolongaciones se alojan en los túbulos dentinarios. Por su disposición conforman una capa odontoblástica, que es semejante a un epitelio cilíndrico pseudoestratificado en la región coronaria y, a un epitelio cilíndrico simple de aspecto columnar más bajo en la zona radicular. En la zona coronal alcanzan 45,000 por mm² odontoblastos y su número disminuye considerablemente en la zona radicular. El tamaño celular también es mayor en la corona que en la raíz.

Durante la dentinogénesis forman dentina y túbulos dentinarios, el que la prolongación odontoblástica esté presente dentro de los túbulos convierte a la dentina en un tejido vivo sensible.

La dentinogénesis, osteogénesis y cementogénesis son bastante similares. Cada una de estas células producen una matriz compuesta por fibrillas colágenas, proteínas no colágenas y proteoglicanos capaces de mineralizar. Sus características ultraestructurales son igualmente similares, exhiben un RER altamente ordenado, aparato de Golgi prominente con gránulos secretores y numerosas mitocondrias. Además, estas células son ricas en ARN y sus núcleos contienen uno más nucleolos prominentes. Estas son características generales de células secretoras de proteínas. Las diferencias más significativas entre odontoblastos, osteoblastos y cementoblastos son sus características morfológicas y la relación anatómica entre las células y las estructuras mineralizadas que producen. Los osteoblastos y cementoblastos presentan una forma poligonal a cuboidal, en comparación al odontoblasto coronal desarrollado que es una célula columnar alta (26). Tanto en hueso como en cemento, algunos osteoblastos y cementoblastos quedan atrapados en la matriz como osteocitos y cementocitos, respectivamente. Por otro lado, el odontoblasto deja atrás un proceso celular alojado en el túbulo dentinario, mientras que el cuerpo reside fuera de tejido mineralizado. Las ramas laterales de los procesos odontoblásticos se interconectan por canalículos, al igual que los osteocitos y cementocitos se unen a través de los canalículos del hueso y

cemento; lo que proporciona una vía para comunicación intercelular y circulación de fluidos y metabolitos a través de la matriz mineralizada.

El cuerpo celular del odontoblasto secretor tiene un núcleo grande que puede contener hasta 4 nucleolos. El núcleo se sitúa en el extremo basal y está contenido en una envoltura nuclear. Presenta un complejo de Golgi bien desarrollado, ubicado centralmente en el citoplasma supranuclear. Numerosas mitocondrias en todo el cuerpo celular. El RER es prominente, consiste en cisternas apiladas en matrices paralelas que se dispersan dentro del citoplasma. Numerosos ribosomas asociados con las cisternas. El odontoblasto sintetiza principalmente colágena tipo I (37), pequeñas cantidades de Colágena tipo V en la MEC. También secreta DSP y DPP (exclusiva de la dentina), fosfatasa ácida y alcalina; esta última se relaciona estrechamente con la mineralización. El odontoblasto en reposo o inactivo, presenta menos orgánulos y son menos columnares (26). Estos cambios comienzan con la erupción cuando la producción de dentina cambia de primaria a secundaria.

Se ha demostrado la comunicación entre odontoblastos – nervios, por expresión de neuropéptidos. También sobre una posible función reguladora inmune por parte del odontoblasto, ya que se han encontrado componentes del sistema inmune innato en la capa odontoblástica (38). Se cree que estos deberían ser capaces de reconocer y responder a los componentes bacterianos y actuar como una barrera inmune.

b) Fibroblastos

Son las células más numerosas de la pulpa. Capaces de dar lugar a células tipo odontoblastos si se les da la señal adecuada. Sintetizan Colágena I y III, así como proteoglicanos y GAG, produciendo y manteniendo proteínas de la MEC. También pueden fagocitar y digerir colágena, ya que son responsables del recambio de colágena en la pulpa. Los fibroblastos se encuentran en toda la pulpa, aunque abundan en la zona rica en células. Los primeros fibroblastos diferenciados son poligonales y están ampliamente separados y distribuidos en la sustancia fundamental. Establecen contactos entre células con los múltiples procesos que poseen, estas uniones permiten señalizaciones de célula a célula. Ultraestructuralmente, los orgánulos de los fibroblastos inmaduros cuentan con un Aparato de Golgi discreto, numerosos ribosomas libres y un RER disperso. Conforme maduran, estas células adquieren un aspecto estrellado y el complejo de Golgi se agranda, el RER prolifera,

aparecen vesículas secretoras y los fibroblastos toman la apariencia de células secretoras de proteínas. Fibrillas de colágena se acumulan a lo largo de la superficie externa del cuerpo celular. Cuando aumenta el número de vasos sanguíneos, nervios y fibras de colágena, hay disminución relativa del número de fibroblastos. La mayoría de los fibroblastos pulpares son relativamente indiferenciados. Estudios han demostrado que la diferenciación de odontoblastos de reemplazo ocurre principalmente entre los fibroblastos perivasculares. Además, toman parte activa en las vías de señalización en la pulpa dental.

c) Macrófagos

Son monocitos que han abandonado el torrente sanguíneo para ingresar a los tejidos y diferenciarse en varias subpoblaciones. Se localizan en las proximidades de los vasos sanguíneos. Una subpoblación importante participa en la fagocitosis y endocitosis, eliminan glóbulos rojos extravasados, células muertas y cuerpos extraños. El material ingerido es destruido por enzimas lisosomales. Otra subpoblación participa en reacciones inmunes por el procesamiento de antígeno y presentarlo a las células T (39). Al igual que los fibroblastos, los macrófagos también participan activamente en la señalización de la pulpa, ya que son capaces de producir una gran variedad de factores solubles como IL-1, TNF, factores de crecimiento y otras citocinas.

d) Células Dendríticas

Células similares a estas, se localizan en la epidermis y membranas mucosas, donde se llaman células de Langerhans (40) (41). Se encuentran principalmente en tejidos linfoides, pero también en tejido conectivo incluyendo la pulpa (42). Son células presentadoras de antígeno, presentan complejos MHC de clase II en la superficie celular. Se localizan en la periferia de la pulpa coronal cerca de la predentina y migran ante la presencia de antígenos.

e) Linfocitos

Los Linfocitos T se encuentran en la pulpa normal. El subconjunto predominante son los Linfocitos T8 (supresores). La presencia de estas células indica que la pulpa está bien equipada para iniciar respuestas inmunológicas (43).

f) Mastocitos

Se distribuyen en tejidos conectivos, se agrupan en la cercanía a los vasos sanguíneos. Rara vez se encuentran en tejido pulpar normal (42). Aunque no se conoce por completo su función, se cree que desempeña un papel importante en las reacciones inflamatorias por el contenido de sus gránulos: heparina (anticoagulante) e histamina (mediador inflamatorio), así como factores químicos.

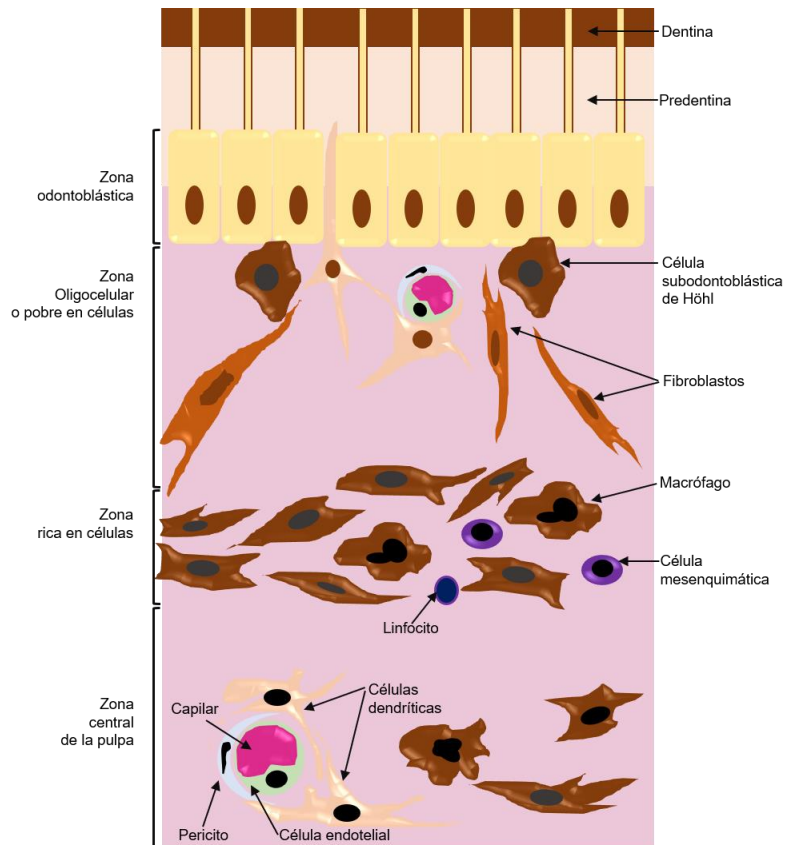


Figura 8. Zonas topográficas de la pulpa y poblaciones celulares (15).

3.3 FIBRAS

a) Fibras colágenas.

El 60% de las fibras colágenas están constituidas por el tipo I. En la porción coronal las fibras son escasas y están dispuestas en forma irregular. En la parte radicular son paralelas y se encuentran en mayor concentración.

La pulpa contiene cantidades significativas de colágena tipos III, VI y fibronectina, también se han observado tipo IV y V. La colágena tipo IV forma parte de la membrana basal de los vasos sanguíneos y el tipo V refuerza las paredes vasculares (15).

b) Fibras reticulares.

Formadas por fibrillas de colágena tipo III asociadas a fibronectina. Son fibras muy finas distribuidas en el tejido mesenquimal de la papila dental. Se disponen al azar excepto en la región odontoblástica en donde se insinúan entre las células y constituyen el plexo de Von Korff. Aumentan de diámetro con la edad. Se les denomina fibras precolágenas, ya que las fibras tipo III en el adulto son sustituidas por colágena tipo I (15).

c) Fibras elásticas.

Son muy escasas y se localizan en las paredes de las arteriolas. Su principal componente es la elastina.

d) Fibras de oxitalán.

Se consideran como fibras elásticas inmaduras.

3.4 SUSTANCIA FUNDAMENTAL

La sustancia fundamental o matriz extracelular amorfa, está integrada por proteoglicanos y agua. Los proteoglicanos poseen un núcleo proteico y cadenas laterales de GAG. En dientes recién erupcionados el GAG más predominante es el dermatán sulfato, y en pulpas ya maduras el ácido hialurónico es el componente esencial, aunque en menor proporción está el dermatán y condroitín sulfato. El ácido hialurónico se encarga de mantener la fluidez, permeabilidad de la sustancia fundamental y regular el transporte de metabolitos e impedir difusión de microorganismos. La sustancia es un medio interno por el que las células reciben nutrientes provenientes de la sangre arterial; también se eliminan los productos de desecho para ser llevados a la circulación eferente. Con la edad disminuye la actividad funcional de esta sustancia.

3.5 FUNCIONES DE LA PULPA

a) Inducción

Se pone de manifiesto durante la amelogénesis, debido a que, para el depósito y síntesis de esmalte primero es necesario que se deposite dentina.

b) Formativa

Es la función esencial de la pulpa y esta se mantiene mientras haya vitalidad. Las células encargadas de producirla son los odontoblastos, según el momento en que se elabore, surgen distintos tipos: primaria, secundaria y terciaria.

c) Nutritiva

La pulpa es la encargada de nutrir a la dentina mediante las prolongaciones odontoblásticas y metabolitos provenientes del sistema vascular pulpar.

d) Sensitiva

Ante estímulos, agresiones o dolor, la pulpa es capaz de responder. En la sensibilidad de la pulpa sin importar la naturaleza del estímulo siempre habrá una respuesta dolorosa.

e) Defensiva/ reparadora

Incluye la capacidad de formar dentina ante agresiones, la cual puede ser de dos tipos.

La primera defensa pulpar es la formación de dentina peritubular, con estrechamiento de conductos impidiendo el paso de microorganismos a la pulpa.

La formación de dentina terciaria o reparativa es elaborada por los nuevos odontoblastos. Estudios *in vivo*, demuestran que el tiempo que transcurre en una agresión pulpar directa hasta la neoformación de odontoblastos es de aproximadamente 5 días, y que la velocidad a la que depositan dentina es de $4.5\mu\text{m}$ por día (15).

CARIES

La caries dental es una enfermedad compleja mediada por la biopelícula que se puede atribuir principalmente a comportamientos que implican la ingestión frecuente de carbohidratos fermentables (azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) y una mala higiene bucal en combinación con una exposición inadecuada al fluoruro. Es una enfermedad crónica, dieto- microbiana y sitio- específica; causada por cambios en la homeostasis de factores que protegen al diente favoreciendo la remineralización. Es el resultado de interacciones complejas en la estructura dental, biopelícula, dieta, saliva e influencias genéticas. El 90% de las lesiones cariosas ocurren en las fosetas y fisuras de dientes posteriores permanentes, siendo los molares los más susceptibles (44).

1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A pesar del reconocimiento que le ha dado la OMS, sigue siendo un problema en la mayoría de los países industrializados, en los cuales se ven afectados del 60 al 90% de los niños y una gran cantidad de adultos. Es considerada la enfermedad infantil crónica más común, y su prevalencia ha aumentado en niños de 2 a 5 años en todo el mundo. En la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES) de 2011 a 2012, aproximadamente el 23% de los niños de los Estados Unidos entre 2-5 años tenían caries dental en dientes primarios. Y de esos, el 10% tenía caries dental no tratada. Tradicionalmente, se ha observado una baja prevalencia de caries en los países en desarrollo, mientras que se presenta mayor prevalencia en países desarrollados. Esta situación geográfica es compleja por la velocidad del desarrollo económico y cambios rápidos en los hábitos y dieta en muchos países. Aunque puede haber diferencia por sexo o etnia, son mínimas en comparación con factores como el consumo de azúcar, estilo de vida y nivel socioeconómico (45).

2 ETIOLOGÍA DE LA CARIES DENTAL

a) Etiología microbiana

La caries es una enfermedad microbiana en la cual las bacterias etiológicas son componentes normales de la microbiota oral y, causan la enfermedad solo cuando sus proporciones y patogenicidad cambian en respuesta a las condiciones ambientales (46). Los rasgos clave de virulencia microbiana asociada a la caries incluyen acidogénesis y tolerancia al ácido, almacenamiento de polisacárido intracelular y formación de glucano extracelular, que promueve la unión de *Streptococcus mutans* y aumenta la capacidad de disminución del pH de la biopelícula (44, 47-49). Aunque el *Streptococcus mutans* es uno de los microorganismos cariogénicos más investigados, es solo una de las más de 500 especies que se encuentran en la biopelícula dental (50). Investigaciones recientes han demostrado la ausencia de *Streptococcus mutans* en el 10- 20% de las personas que tienen caries severa (51, 52). También se ha respaldado el papel de *Candida albicans* como miembro de la microbiota oral mixta involucrada en la causalidad de caries (53). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de la placa ecológica, que propone que *Streptococcus mutans* es solo uno de los muchos microorganismos endógenos involucrados en la patogénesis de la caries.

b) Factores dietéticos

La caries es una enfermedad “dietobacteriana” por la presencia obligada de carbohidratos fermentables. La sacarosa (azúcar de mesa) tiene un papel especial como único sustrato para las glucosiltransferasas (enzimas bacterianas) involucradas en la síntesis de glucano extracelular, que es un importante factor de virulencia microbiana (44). Además, las dietas altas en azúcares tienden a ser blandas y por lo general líquidas; básicamente podríamos decir que no necesitamos dientes para su ingesta, lo que puede explicar porqué la pérdida dental es rápida (45).

c) Factores salivales y genéticos propios

Los factores relacionados con el huésped contribuyen a la susceptibilidad y/o resistencia de la caries dental. Está bien establecido que la saliva juega un papel importante en la salud de los tejidos blandos y duros en la cavidad oral. La tasa de flujo salival crónicamente baja es

uno de los indicadores más fuertes de un mayor riesgo de caries. Entre los principales factores genéticos encontramos: la morfología dental, posición y la oclusión; tiempo y secuencia de erupción dental; composición salival; y la preferencia por la dulzura. En estudios recientes, se ha demostrado que los factores genéticos pueden explicar más del 50% de la varianza en la experiencia de caries entre gemelos (54).

3 BIOLOGÍA DE LA CARIES DENTAL

a) Desmineralización - Remineralización

La caries es el resultado de la desmineralización de la estructura mineral cristalina por ácidos orgánicos producidos por bacterias de biopelículas a partir del metabolismo de carbohidratos fermentables en la dieta (azúcares) (19). Aunque existe una amplia gama de ácidos orgánicos, el ácido láctico es el producto final predominante del metabolismo del azúcar y se considera el principal ácido involucrado en la formación de caries. Los ácidos se van acumulando en la fase fluida de la biopelícula, el pH se acidifica hasta el punto en que las condiciones en la interfaz biopelícula-esmalte se saturan, y el ácido desmineraliza parcialmente la capa superficial del diente. La pérdida mineral conducirá a una mayor porosidad, ensanchamiento de los espacios entre los cristales del esmalte y ablandamiento de la superficie, lo que permitirá que los ácidos se difundan más profundamente en el diente dando como resultado desmineralización.

La acumulación de productos de reacción, principalmente calcio y fosfato, a partir de la disolución de la superficie aumentan el grado de saturación de manera que puede proteger parcialmente de la desmineralización. Además, la presencia de flúor puede inhibir la desmineralización de la capa superficial. La saliva por su parte, cumple con una acción amortiguadora, saturando la biopelícula con iones calcio, fosfato y fluoruro (55). Gracias a la naturaleza dinámica de la caries, las etapas de la caries se pueden revertir o detener en etapas iniciales. Si el proceso de caries continúa, la pulpa se verá comprometida y será necesaria una intervención quirúrgica. La caries dental es un proceso dinámico que implica ciclos repetidos de desmineralización y remineralización a lo largo del día.

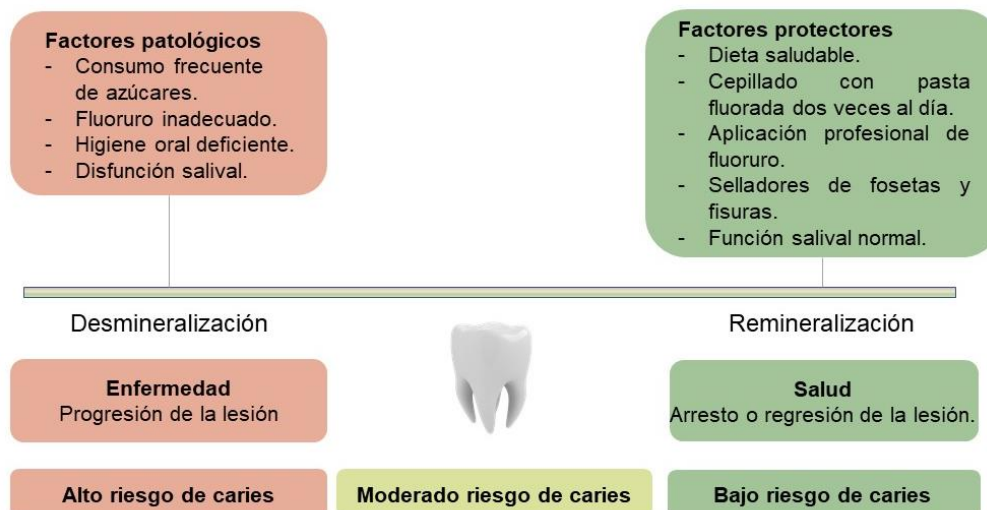


Figura 9. Factores patológicos y protectores de caries dental. Un enfoque en la optimización de los factores protectores (aquellos que favorecen la salud dental) promoverá la remineralización y cambiará el balance dinámico del proceso de caries hacia la salud y el arresto de la lesión. Si no mitigamos los efectos de los factores patológicos habrá desmineralización con progresión de la enfermedad (45).

A nivel histológico cuando la caries no se trata, avanza en ancho y profundidad, según los estudios de Langeland (56) tan pronto como la caries penetra al esmalte se ha mostrado una respuesta inflamatoria localizada en el tejido pulpar subyacente a la lesión. Presencia de bacterias invadiendo el extremo periférico de los túbulos dentinarios. Conforme avanza el proceso carioso, aumenta el cúmulo de células inflamatorias, así como la deposición de dentina terciaria, reduciendo el número de odontoblastos en la pulpa dental. No se observa necrosis hasta que las bacterias alcanzan el espacio pulpar (57). También se ha observado que a pesar de la presencia de células inflamatorias y de bacterias en la pulpa coronal, la pulpa remanente radicular puede estar libre de infiltrado inflamatorio y de bacterias (56, 57).

4 TRATAMIENTO DE LA CARIES DENTAL PROFUNDA

Ante la presencia de caries que se aproxima a la cámara pulpar en dientes vitales con ápice cerrado, los endodoncistas se enfrentan a un dilema: si se preserva la pulpa para mantener la vitalidad, incluyendo las funciones pulpares o si se elimina por completo el tejido pulpar para prevenir la probable necrosis. La terapéutica de elección anteriormente era el tratamiento de conductos, esto en su mayoría por las preocupaciones sobre la falta de fiabilidad en los procedimientos de Terapia Pulpar Vital y por los resultados subóptimos

derivados de algunos estudios de seguimiento. La Terapia Pulpar Vital (TPV) es un procedimiento dental restaurador que tiene como objetivo tratar los dientes con pulpa dental comprometida sin la extracción o excavación completa de todo el tejido pulpar sano. Incluye recubrimiento pulpar directo e indirecto, y la pulpotomía parcial o total (58). El objetivo clínico de este tratamiento es mantener la vitalidad pulpar así como las funciones homeostáticas. El éxito del tratamiento se basa en la sintomatología (prueba térmica, eléctrica, palpación, percusión y examen radiográfico). Aunque, está bien documentado que los signos clínicos y síntomas no siempre se correlacionan con el estado histológico de los dientes. En los últimos años se han utilizado moléculas bioactivas para la regeneración de pulpa y tejidos periodontales (59-61). Otro punto para considerar es que la TPV se ha recomendado como tratamiento en pacientes jóvenes con ápices abiertos por la capacidad de curación dinámica de la pulpa en comparación con personas mayores. Contrario a estos estudios, literatura reciente señala resultados exitosos de la terapia pulpar vital con signos y síntomas de pulpitis irreversible (2, 62, 63). Respecto a la edad de los pacientes para realizar estos procedimientos, no hay estudios que respalden esta recomendación.

Aunque tradicionalmente las tasas de éxito reportadas para TPV eran considerablemente más bajas, entre 37% y 13% en seguimientos de 5 y 10 años (64, 65); en reportes más recientes se ha observado una tasa de éxito desde 96.4% hasta 73.2% con seguimiento de hasta 30 años (57). Autores contemporáneos señalan que para poder mejorar el éxito de la terapia pulpar vital es necesario apegarnos a las indicaciones para estos casos.

Indicaciones para TPV:

- Dentina que rodea la exposición debe ser sana.
- Tejido rojo, homogéneo y lleno de sangre en la superficie de la herida; ausencia de áreas amarillas o zonas oscuras sin sangrado.
- Ausencia de detritos dentinarios desplazados durante la excavación.
- Lograr hemostasia en 2-3 minutos posteriores al enjuague con desinfectante suave (clorhexidina o hipoclorito de sodio al 1%), seguido del secado de la herida con algodón estéril.
- Emplear material biocompatible y posiblemente bioactivo.

Es de vital importancia realizar un examen directo de la dentina y del tejido pulpar expuesto. El uso de técnicas antisépticas estrictas son obligatorias para el éxito del tratamiento (57). Otro aspecto importante para tomar en cuenta el tamaño de la lesión, el punto de corte es de 1mm²; se considera exposición grande cuando es >1mm² y pequeña cuando es menor. La elección en cuanto a realizar pulpotomía parcial o completa se basa en la ubicación en la que se puede identificar tejido pulpar sangrante sano y que se pueda lograr fácilmente hemostasia. En caso de no encontrar condiciones óptimas en el tejido remanente, se indicará tratamiento de conductos (57). La decisión clínica de realizar tratamiento de conductos o terapia pulpar vital se debe determinar mediante la observación clínica intraoperatoria, y no basados en el diagnóstico preoperatorio como tradicionalmente se realizaba. Se propone que la decisión final para seleccionar el tratamiento más apropiado se tome después de examinar la parte más profunda de la dentina y el tejido pulpar expuesto.

El objetivo final será obtener una herida quirúrgica limpia en tejido conectivo pulpar no infectado que esté rodeado de dentina mineralizada no infectada.

El fundamento de este protocolo de tratamiento basado en histopatología e histobacteriología es estimar la localización de la infección, tanto en la dentina como en la pulpa subyacente. No se espera que se produzca curación pulpar en presencia de infección, y el objetivo es la eliminación de los tejidos infectados, así como la protección de la herida pulpar no infectada con materiales dentales biocompatibles y potencialmente bioactivos.

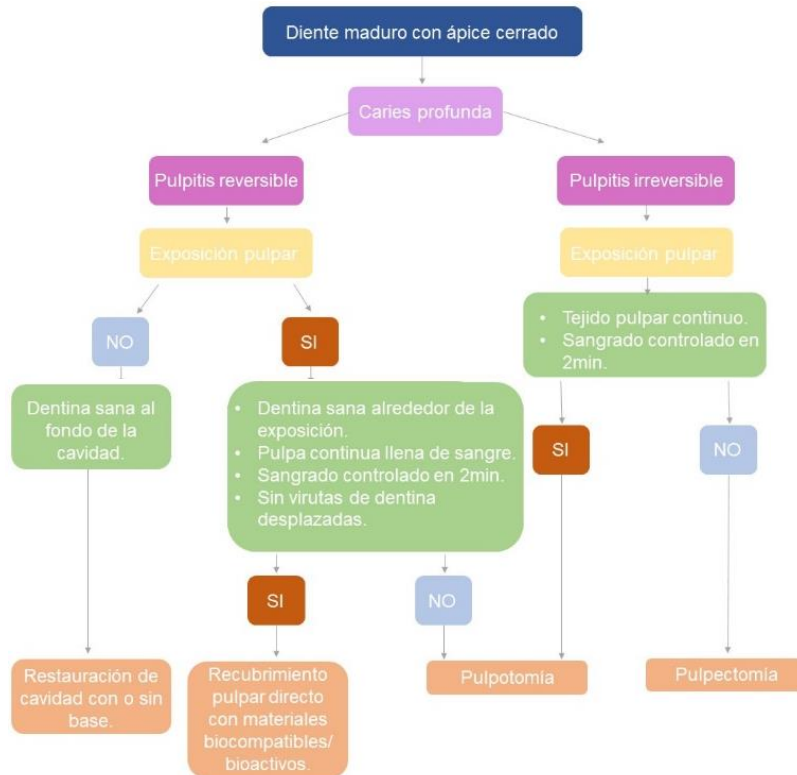


Figura 10. Diagrama que describe las pautas para la terapia pulpar vital como un enfoque alternativo en el tratamiento de la caries profunda (57).

5 REPARACIÓN O REGENERACIÓN

Así como el hueso está en constante remodelación, y el tejido neoformado se reemplaza dentro de unos meses por hueso nuevo; la dentina terciaria puede parecerse a la dentina secundaria, sin embargo, nunca será la misma y no formará una dentina continua con la dentina preexistente. Además, la curación de la pulpa es compleja ya que, a diferencia de otros tejidos conjuntivos, carece de circulación colateral haciéndola más vulnerable que otros tejidos.

La formación de dentina se puede inducir de varias formas:

- Al quedar expuesta la predentina no mineralizada liberará TGF- β , IGF -1 e IGF-2, BMP, VEGF y otros factores de crecimiento que propiciarán la proliferación y diferenciación de células troncales mesenquimales encargadas de formar dentina reparadora (66-68) y nuevos vasos sanguíneos.

- Las células dendríticas presentadoras de antígeno mediante procesos inflamatorios leves también pueden promover la diferenciación y expresión de odontoblastos similares a las moléculas implicadas en la mineralización.
- El reconocimiento de bacterias por receptores específicos de membrana de odontoblastos y fibroblastos desencadena una respuesta inflamatoria e inmune dentro del tejido pulpar que también modula el proceso de reparación.

Ciertos materiales bioactivos aumentan el potencial mineralizante inherente de la pulpa dental cuando se usan en aplicaciones directa e indirecta sobre la pulpa, los más usados actualmente son materiales a base de Hidróxido de Calcio y el Mineral Trióxido Agregado (MTA). Se ha descrito a través del tiempo que los agentes de recubrimiento inducen irritación tisular, esta reacción inflamatoria inicial se cree que es provocado por el contacto del biomaterial con la pulpa dental, y que induce este proceso reparador y formación de minerales (69).

La calidad de la dentina terciaria es muy variable. Si la irritación es leve, la dentina terciaria se podrá parecer a la primaria en cuanto al grado de mineralización y los túbulos dentinarios. Si la dentina se forma en respuesta a una lesión profunda, la dentina será atubular y pobremente mineralizada, con áreas de dentina interglobular. El grado de irregularidad de dentina se determina por numerosos factores como la cantidad de inflamación presente, el alcance de la lesión y el estado de diferenciación de los odontoblastos de reemplazo.

La peor calidad de dentina reparadora se observa cuando hay una marcada inflamación pulpar. La dentina puede estar tan mal organizada que áreas de tejido blando quedan inmersas dentro de la matriz dentinaria, dando un aspecto histológico de queso suizo.

Cuando su estructura está desorganizada, atubular y con inclusiones celulares se le conoce como "osteodentina" (15). Para que la dentina reparadora ejerza una función protectora, debe ser relativamente impermeable para evitar el paso de irritantes y compensará la pérdida de dentina. La síntesis de tejido similar a dentina por células similares a odontoblastos se considera un proceso regenerativo. Contrario a esto, el proceso de biomineralización ectópica se considera más como un proceso reparativo (70).

MINERAL TRIÓXIDO AGREGADO

Posee varias aplicaciones en endodoncia como obturación apical, en TPV, para reparar perforaciones radiculares, y como material de obturación. Es un material bioactivo (71) que es osteoconductor. Sus componentes consisten básicamente en silicato tricálcico y óxido de bismuto (72). El MTA es un polvo que consiste en finas partículas hidrofílicas que fraguan en presencia de humedad. Cuando se mezcla el polvo del MTA con agua, se forma inicialmente hidróxido de calcio y silicato de calcio hidratado, estos se transforman eventualmente en un gel coloidal pobremente cristalizado y poroso (73) con un pH de 12.5. El hidróxido de calcio es el responsable de la elevada alcalinidad del MTA después de la hidratación (74). El tiempo de fraguado es de 4 horas. En relación al uso de MTA en cita única se ha reportado que colocar el ionómero de vidrio seguido de la colocación de MTA no afecta la propiedad de fraguado del material (75). La literatura muestra que el MTA posee un efecto antibacteriano y antifúngico. Ha probado ser eficaz contra algunas bacterias facultativas, pero no sobre anaerobios estrictos (76). Su efecto podría deberse al alto pH o a sustancias que se liberan en el medio. Diversos estudios han demostrado que el MTA es un material biocompatible (77-79). No es mutagénico (80). No es tóxico ni irrita tejido nervioso (81). No produce efectos secundarios en la microcirculación, aunque puede influir en la vasoconstricción (82, 83). Por las características que presenta, el MTA es considerado el estándar de oro en endodoncia.

PROTEÍNA DEL CEMENTO 1

La Proteína del Cemento 1 (CEMP1) es considerada una proteína cemento específica. Esta proteína se aisló por primera vez de un cementoblastoma humano (84). Tiene una masa molecular teórica inicial de 25.9 kDa y se compone de 247 aminoácidos. El gen de CEMP1 se localiza en el cromosoma 16 en la región p13.3, y está formado por 1374 nucleótidos (85). Es una proteína alcalina con un punto isoeléctrico de 9.73. Los aminoácidos más abundantes que la componen son: prolina (11.3%), glicina (10.5%), alanina (10.1%), serina (8.9%), leucina (8.1%), treonina y arginina (7.7%), bajas cantidades de triptófano, ácido aspártico e isoleucina (2.0% cada uno) y fenilalanina (1.6%) (86). Por su secuencia de aminoácidos es probable que sea una proteína nuclear, aunque no tiene motivos de unión al ADN. Los aminoácidos 30-110 muestran 48% de similitud con la Colágena humana tipo I, 46% con el tipo XI y 40% de similitud con el tipo X (11). Su estructura secundaria revela un contenido de alfa-hélice de 28.6%, 9.9% de láminas beta y un 61.5% de estructura espiral al azar (87, 88). Las proteínas con alto porcentaje de estructura espiral al azar han demostrado ser multifuncionales y tienen diversas propiedades de unión; lo cual podría explicar la regulación de la composición y crecimiento de cristales de apatita por parte de CEMP1 (11). CEMP1 es expresada por cementoblastos, cementocitos, subpoblaciones de células del ligamento periodontal, células troncales mesenquimales paravasculares al ligamento periodontal, células de la vaina epitelial de Hertwig y células de folículo dental (84, 85, 89). Presenta gran cantidad de modificaciones postraduccionales como glicosilaciones y fosforilaciones. Posee dos sitios de N-glicosilación en los aminoácidos 20 y 25 (Asn-X ser/Thr). Aunque se desconoce el papel exacto de los hidratos de carbono unidos a la proteína; se cree que la glucosilación puede afectar la función de CEMP1 durante la mineralización porque se unen a su superficie aniónica iones Ca^{2+} y con esto regula el crecimiento de la hidroxiapatita (11). Diversos estudios han demostrado la asociación de esta proteína al proceso de mineralización. Incluso en células sin un fenotipo osteogénico como los fibroblastos gingivales, permitieron la mineralización de la matriz del cemento así como la expresión de proteínas implicadas en procesos de biomineralización como: fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, osteocalcina, osteopontina (90). También se reportó que CEMP1 está implicado en la migración, proliferación y diferenciación de células troncales de LP hacia un

fenotipo cementoblástico, sugiriendo su implicación en el reclutamiento de células troncales paravasculares adultas del LP del ligamento periodontal (6). Estudios *in vivo* demuestran que CEMP1 induce regeneración ósea en defectos de calvaria de tamaño crítico en ratas Wistar (9).

1 PÉPTIDO 1 DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1

Se identificó la secuencia correspondiente a los primeros 20 aminoácidos del extremo amino terminal de CEMP1, al cual se le nombró péptido 1 de la Proteína del Cemento 1 (CEMP1-p1) MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTSN. La secuencia fue seleccionada mediante un estudio *in silico*, que sugiere que el péptido se encuentra en la superficie de la proteína plegada, cumpliendo funciones biológicas importantes; confirmando que CEMP1-p1 es un péptido intrínsecamente desordenado, con propiedades dinámicas (13). La elección de esta secuencia fue por la presencia de sitios de actividad para la mineralización, por la plasticidad y facilidad para unirse los cristales de hidroxiapatita, esto último por las fosforilaciones en serinas importantes en la biomineralización. El 40% de los aminoácidos que conforman la secuencia del péptido están relacionados con la nucleación de cristales de hidroxiapatita. Estudios similares a los de la proteína nativa se realizaron, con resultados similares (13). Promueve la diferenciación de las células del ligamento periodontal hacia un fenotipo “mineralizante”, así como sus propiedades osteoinductoras y osteogénicas, que mejoran la deposición fisiológica de hueso neoformado en defectos de tamaño crítico en ratas Wistar. El emplear el péptido y no la proteína completa nos ofrece varias ventajas como: menor costo de producción, propiedades no inmunogénicas, y modulación de características que permiten cambios estructurales y mejor estabilidad (13).

MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

Los molares de rata, incluido el tejido pulpar, pueden considerarse como un molar humano pequeño con características anatómicas, histológicas, biológicas y fisiológicas similares (91, 92) debido a que los molares de rata exhiben las mismas características estructurales de la cámara pulpar, tejido pulpar, raíz y delta apical con foraminas apicales menores (93). Su desarrollo es análogo al de los molares humanos. Diversos estudios han demostrado que la curación del tejido pulpar observada histológicamente después del recubrimiento pulpar con hidróxido de calcio en molares de ratas es comparable con el proceso de curación en humanos o incluso idéntico (93). Posee ciertas ventajas sobre el uso de un modelo animal más grande, ya que el proceso de curación es más rápido en ratas. Se ha encontrado que a los 28 días de colocar hidróxido de calcio como recubrimiento hubo formación de tejido mineralizado detectable en un 83% de los molares de rata, en contraste, solo el 60% de molares de perro mostraron formación de tejido mineralizado después de las 6 semanas (94).

En cuanto a la tasa de éxito, algunos estudios encontraron tasas de éxito similares en dientes humanos y de rata después de realizar recubrimiento pulpar.

El cuidado en bioterio de ratas es sencillo comparado con otros mamíferos (perros o primates). Sin embargo, se pueden presentar algunas dificultades técnicas, como el pequeño tamaño de los molares de rata, aunque con la tecnología actual se puede contrarrestar este problema, mediante el uso de microscopio quirúrgico. Los molares de rata se consideran un modelo de estudio válido ya que provee datos valiosos sobre reacciones en el tejido pulpar después de la aplicación de materiales sobre la pulpa. Debido a esto, creemos que los molares de rata proporcionan un modelo conveniente para estudiar la biología de la pulpa. Aunque también poseen ciertos problemas intrínsecos. Según diversos estudios, las ratas de 6 semanas de edad proporcionan un modelo experimental más fácil (93).

5. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La caries es una enfermedad de alcance mundial que causa destrucción de considerable importancia, lo que impone una gran demanda de servicios y materiales. En todo el mundo, los costos directos del tratamiento debido a enfermedades dentales se estimaron en aproximadamente \$ 298 billones (dólares) anuales en 2010, de los cuales \$120 billones se atribuyen únicamente a los Estados Unidos (95). Según la ADA en 2012 se realizaron aproximadamente 175 millones de obturaciones, 35 millones de coronas completas y, 10 millones de puentes. De acuerdo con las estadísticas, la caries dental sigue siendo un problema médico y social con repercusiones económicas. Con relación a lo anterior, las secuelas pulpares de la caries dental son de gran importancia, por lo que la prevención del daño pulpar reducirá considerablemente la necesidad de restauraciones extensas, así como la terapia endodóntica.

Por lo anterior, en la actualidad se busca emplear terapéuticas no invasivas y conservar el máximo de la estructura dental, usando materiales biocompatibles para prolongar la vida del órgano dentario. Diversos estudios muestran que utilizando moléculas bioactivas se puede regenerar el complejo pulpo-dentinario, logrando la formación de un sello que proteja al tejido y mantenga la vitalidad pulpar remanente. El péptido sintético CEMP1-p1 es una opción adecuada, ya que se ha comprobado que interviene en procesos celulares que inducen mineralización (13, 14), por lo que nos lleva a plantearnos:

¿El péptido CEMP1-p1 será capaz de regenerar el complejo pulpo-dentinario en exposiciones pulpares en molares de rata a 4 semanas?

6. JUSTIFICACIÓN

La caries dental es un problema de salud pública que afecta a más del 90% de los adultos y a un gran número de niños y adolescentes (30-90%) (1), cuando se presenta en etapas avanzadas su tratamiento suele ser complejo y costoso. El enfoque contemporáneo en endodoncia propone terapéuticas más conservadoras con el fin de preservar mayor cantidad de estructura dental y mantener las funciones del tejido pulpar remanente, mediante la aplicación de un biomaterial para prolongar la vida del órgano dentario. Estos tratamientos al no necesitar equipo especial son más económicos y también se consideran relativamente sencillos, haciéndolo accesible para la población.

El MTA es considerado el estándar de oro en endodoncia por su biocompatibilidad y alta capacidad de sellado (96), por inducir diferenciación de células similares a odontoblastos y formar mayor cantidad de dentina de reparación que otros materiales (66, 97, 98). Comparado con el hidróxido de calcio (material tradicionalmente empleado) se han obtenido resultados más exitosos con el MTA hasta 90.5% (2). Aunque presenta algunas limitaciones como el difícil manejo y el largo tiempo de fraguado.

Utilizando moléculas bioactivas se puede regenerar el complejo pulpo-dentinario, logrando la formación de un sello que proteja y mantenga la vitalidad pulpar del tejido remanente. El péptido sintético CEMP1-p1 es una opción adecuada, ya que se ha comprobado que interviene en procesos celulares que inducen mineralización *in vitro*, promoviendo mineralización de células no osteogénicas hacia un fenotipo “mineralizante”, e *in vivo* por sus propiedades osteoinductoras y osteogénicas, que mejoran la deposición fisiológica de hueso neoformado en defectos de tamaño crítico en ratas Wistar (Rodrigo, Gonzalo). Siendo un buen candidato para cubrir una exposición pulpar y estimular la deposición de tejido que permita un buen sellado, protegiendo el tejido remanente, gracias a su capacidad para intervenir en el proceso de mineralización.

7.HIPÓTESIS

El péptido sintético derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP-1p1), induce regeneración dentinaria en exposiciones pulpares con características histológicas, moleculares y en extensión, similares a los de la dentina sana, y diferentes a las presentes en el grupo control.

8.OBJETIVOS

General:

Determinar si el péptido CEMP1-p1 estimula la regeneración del complejo pulpo-dentinario en exposiciones pulpares en primeros molares maxilares de ratas Wistar a 4 semanas.

Específicos:

Evaluar si CEMP-1p1 promueve neoformación del complejo pulpo-dentinario en exposiciones pulpares en molares maxilares de ratas Wistar con características histológicas similares a dentina sana.

Determinar la cantidad del complejo pulpo-dentinario neoformado en exposiciones pulpares en molares maxilares de ratas Wistar tratadas con CEMP-1p1.

Determinar la expresión de moléculas asociadas al complejo pulpo-dentinario: la Proteína de matriz dentinaria (DMP1) y Sialoproteína dentinaria (DSP).

Evaluar si la formación coincide con las características histológicas similares a dentina sana.

9. METODOLOGÍA

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se utilizaron 18 ratas macho cepa Wistar, de 250- 300g de peso, obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); y se aclimataron durante 7 días en el bioterio de la Facultad de Odontología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Universidad Nacional Autónoma de México, a una temperatura ambiente de 22°C, con un fotoperiodo de 12 horas y humedad relativa a 50%, la alimentación (Rodent Diet 5001®) y el agua fueron ad libitum.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se realizó el cálculo del tamaño de muestra empleando el software G*Power, así como la desviación estándar de estudios similares. Se obtuvo la cantidad de 5 animales para cada grupo. Aumentamos un animal más (20% más), para quedar con un tamaño total de muestra de 18. Este diseño logra un poder de .95. La tasa de error en este estudio se calcula en 0.05.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Ratas macho cepa Wistar de semanas de edad (250-300g), obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); y mantenidos en el Bioterio de División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) en Odontología de la UNAM.

2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Imposibilidad para colocar el dispositivo (grapa) para aislamiento absoluto.

3. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

Ratas que desarrollen enfermedad periodontal o infecciones dentales por causas no consecuentes al estudio, las cuáles en caso de presentarse, serán evaluadas por el Médico Veterinario Zootecnista.

VARIABLES

Definición de variables.

VARIABLES INDEPENDIENTES	VARIABLES DEPENDIENTES		
CEMP1-p1 MGTSSTDSQQAGHRRRCSTN 20µg de polvo de péptido sintético embebido en gelfoam.	Tejido neoformado	Morfometría	Expresión de moléculas propias de la dentina
MTA Polvo de mineral trióxido agregado mezclado con agua destilada ambos marca Angelous a una proporción de 3:1 según lo recomendado por el fabricante.	Túbulos dentinarios con trayecto recto desde la pulpa hasta la UAD, con prolongaciones odontoblásticas alojadas en su interior.	Matriz intertubular y túbulo dentinario con ausencia de células inflamatorias.	<u>Proteína de matriz dentinaria (DMP1)</u> . Proteína no colágena, consiste en un gran numero de dominios ácidos, múltiples sitios de fosforilación y una secuencia funcional Arg-Gly-Asp. <u>Sialoproteína dentinaria (DSP)</u> . Proteína única de la dentina. Expresada por odontoblastos. Molécula menos fosforilada, rica en ácido aspártico, glutámico, glicina y serina.
GELFOAM .5 x 1mm de esponja gelatinosa hemostática absorbible.			

Cuadro 3. Cuadro con variables dependientes e independientes.

SELECCIÓN DE LOS GRUPOS

Se constituyeron tres grupos de trabajo, dos controles y un grupo experimental. Cada grupo estuvo constituido por 6 ratas para formar el total de la población (N= 18). Los grupos se detallan a continuación.

Grupo 1 (control positivo, n=6).

6 ratas a las cuales se les realizó comunicación pulpar en el primer molar superior derecho (1mm) + colocación de MTA blanco- Angelus (MTA; Angelus, Londrina, PR, Brasil) proporción 4:1 polvo-líquido como lo recomienda el fabricante + colocación de ionómero de vidrio restaurador Fuji IX (GC, Tokio, Japón) para sellar la cavidad.

Grupo 2 (control, n=6).

6 ratas a las cuales se les realizó comunicación pulpar en el primer molar superior derecho (1mm) + colocación de gelfoam (esponja gelatinosa hemostática absorbible) + colocación de ionómero de vidrio restaurador Fuji IX (GC, Tokio, Japón) para sellar la cavidad.

Grupo 3 (experimental, n=6).

6 ratas a las cuales se les realizó comunicación pulpar en el primer molar superior derecho (1mm) + colocación de gelfoam (esponja gelatinosa hemostática absorbible) embebida con 20 µg del péptido sintético derivado de la proteína de cemento 1 (CEMP1-p1) + colocación de ionómero de vidrio restaurador Fuji IX (GC, Tokio, Japón) para sellar la cavidad.



Figura 11. Grupos control y experimental.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados en conjunto con el bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El estudio se realizó contando con la aprobación (CIE/0406/05/2020) del Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Odontología (CICUAL-FO). Apegándose a lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL ADITAMENTO

Antes de poder realizar la técnica quirúrgica, se diseñó en colaboración con el ICAT (Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología) de la UNAM, un dispositivo o grapa que nos permitiera trabajar logrando un campo con aislamiento absoluto, para evitar la contaminación de la cavidad y mejorar la visibilidad del campo operatorio.

Para la fabricación, se empleó una técnica aditiva que consiste en crear un modelo 3D del objeto que se quiere imprimir. Primero se realizaron tomografías de cráneos de ratas Wistar con 200 cortes aproximadamente para poder obtener los detalles anatómicos y sobre estas imágenes poder realizar el diseño del dispositivo.

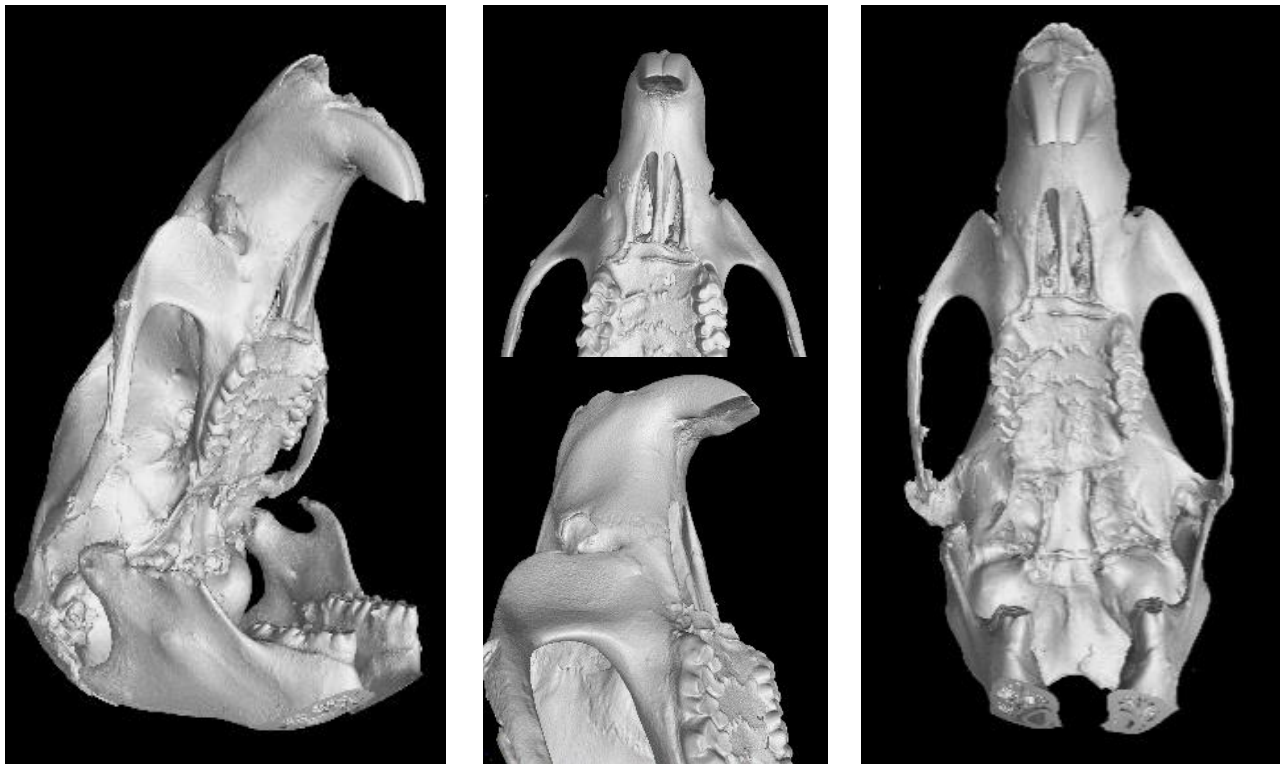


Figura 12. Resultado de las tomografías en cráneos de ratas Wistar.

El segundo paso consistió en diseñar el modelo mediante el software de diseño asistido por computadora (CAD) o mediante técnicas de ingeniería reversa mediante escáner láser (99).

El archivo CAD se convirtió a un formato de archivo de fabricación aditiva estándar, generalmente un archivo STL (100).

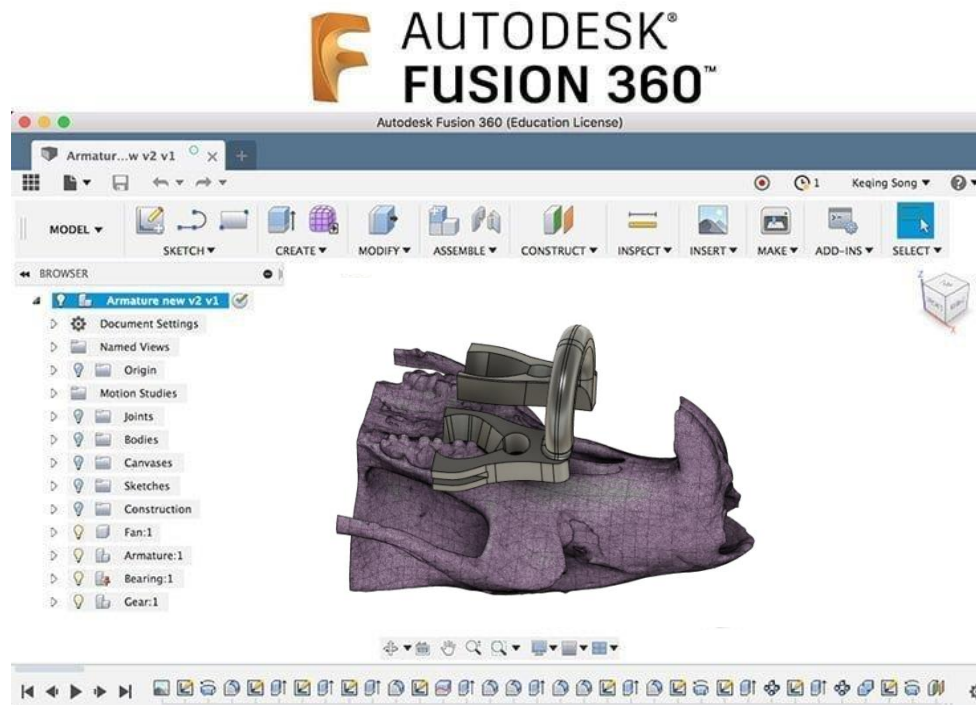


Figura 13. Uso del software Fusion 360 para el diseño del dispositivo para el primer molar maxilar.

En la tercera etapa se realizó la transferencia del archivo STL y se verificó la configuración de la máquina en cuanto al posicionamiento y tamaño del objeto en la plataforma de construcción. Por último, se imprimió el modelo mediante la técnica de inyección del material capa por capa. Las capas de material endurecían en presencia de luz ultravioleta (100).

Después de construir la pieza y potencialmente aplicar períodos de enfriamiento y curado, el modelo se retiró de la impresora. Para finalmente eliminar el material de soporte, así como realizar la limpieza y pulido del aditamento. Una vez obtenido el dispositivo, cada aditamento se probó en las ratas para verificar su eficacia y notificar sobre cambios en el diseño para mejorar la función de este.

En la figura 14 presento los dispositivos que se diseñaron, así como las modificaciones que se hicieron, hasta llegar al definitivo.

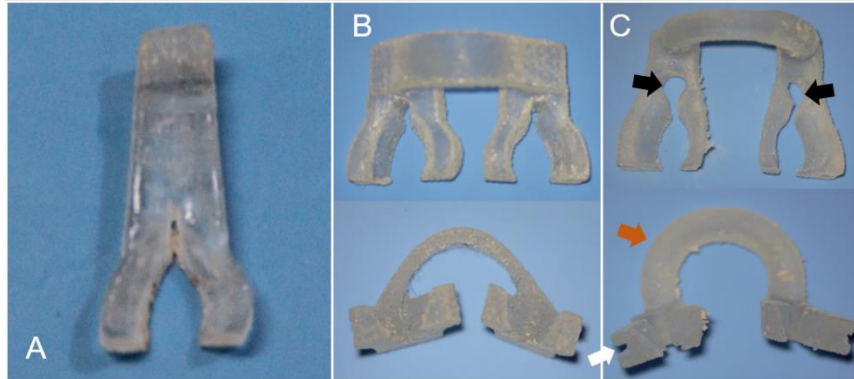


Figura 14. Prototipos del dispositivo.

A Primer dispositivo que se confeccionó, la principal desventaja fue la falta de estabilidad y por lo tanto la imposibilidad para colocarlo; la modificación clave fue ampliarnos al lado contrario para que se retuviera tanto en el molar derecho como izquierdo.

B Segunda propuesta de diseño. Modificación principal arco extendido hacia el molar izquierdo. El principal problema fue la falta de retención del dique de hule.

C Prospecto definitivo. Las principales modificaciones que se realizaron fueron: *flechas negras* mayor apertura de la aleta para que se adaptara mejor en la zona cervical del molar, *flecha blanca* presencia de un riel lateral para que el dique de hule tuviera retención y, *flecha naranja* el arco de unión de ambos lados se pronunció más para que estuviera más tenso y se mantuviera en su lugar.

SECUENCIA QUIRÚRGICA ACCESO PULPAR

Se aplicó anestesia Zolazepam (20-40 mg/kg) y maleato de acepromacina (0.5-1 mg/kg) vía intramuscular.

El animal se aseguró en la mesa operatoria, en posición dorsal, con la cabeza inmovilizada por los incisivos superiores e inferiores. Se desplazó la lengua hacia el lado izquierdo, permitiendo el acceso al primer molar maxilar. Se procedió a colocar el aditamento junto con el dique de hule en los primeros molares maxilares y se selló el espacio presente entre el diente y la grapa con resina fluida para obtener aislamiento absoluto.

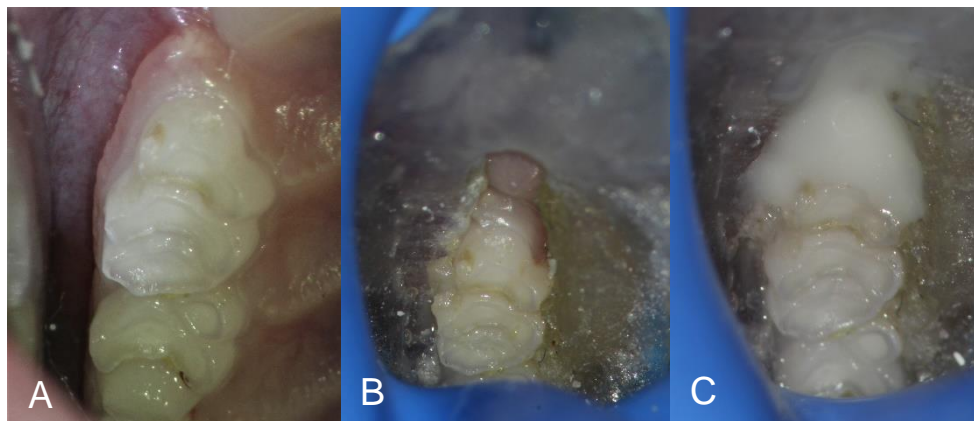


Figura 15.

A Vista oclusal del primer molar superior derecho.

B Colocación de la grapa y el dique de hule en el molar, nótese que queda un espacio entre la grapa y el molar.

C Aplicación de resina fluida para sellar espacios.

Se realizó antisepsia del campo operatorio con una bolita de algodón estéril con etanol al 75%. Con la ayuda de magnificación (Microscopio quirúrgico Carl Zeiss OPMI Pico) se realizó el acceso oclusal en el primer molar maxilar derecho, utilizando la pieza de mano del motor para implantes NSK Surgic AP a 800 rpm con una fresa redonda de carburo de $\frac{1}{4}$ ISO 005 (el tamaño más pequeño disponible) colocándola sobre la fosa mesial en ángulo de 90° siguiendo el eje longitudinal del diente, y avanzando hacia la fosa distal con movimientos intermitentes y no desgastando por más de 3 segundos la estructura dental para evitar calentamiento de tejidos periapicales, con irrigación constante y abundante utilizando PBS (solución de fosfato amortiguadora estéril). Hasta tener una cavidad de 1mm de mesial a distal y de profundidad también (medido con la parte delgada de la Sonda William).

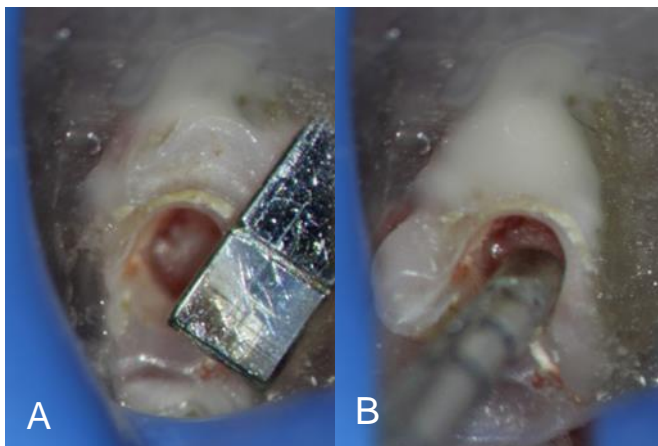


Figura 16.

- A** Rectificación de la cavidad de acceso pulpar de 1mm medida con la sonda William.
- B** Cavidad de acceso pulpar de 1mm de profundidad medida con el extremo redondo de la sonda William.

Finalmente se lavó la cavidad con PBS y se realizó hemostasia con puntas de papel estéril R25 VDW para colocar el material según correspondiera a cada grupo y sellar la cavidad con ionómero de vidrio restaurador Fuji IX (GC, Tokio, Japón).

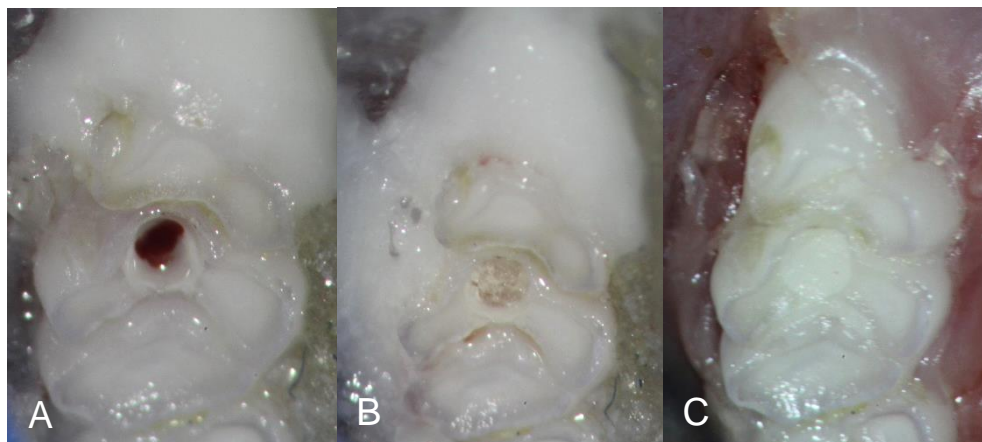


Figura 17.

- A** Limpieza de la cavidad.
- B** Colocación del material (gelfoam) dentro de la cavidad.
- C** Tratamiento terminado, obsérvese la colocación de ionómero para sellar la cavidad.

Después de 4 semanas se realizó la eutanasia con monóxido de carbono para evitar dolor y sufrimiento del animal. Se procesaron los tejidos para el análisis histológico, histomorfométrico e inmunofluorescencia.

PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Después de la eutanasia, se retiró la hemimaxila derecha. Se fijaron las muestras con formaldehído al 10% durante 24 horas. Posteriormente se lavaron con agua corriente durante 2 horas y se colocaron en una solución de EDTA al 10% durante 4 semanas para su descalcificación, con recambios del EDTA cada semana. Se deshidrataron en concentraciones descendentes de alcohol, se clarificaron en xileno y embebieron en parafina para realizar cortes de 5 μm de grosor. Los especímenes se tiñeron con Tricrómica de Masson. Las laminillas se montaron y observaron empleando microscopía óptica utilizando el microscopio Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania).

INMUNOFLUORESCENCIA

Las laminillas se desparafinaron en xilol y rehidrataron en concentraciones descendentes de alcohol etílico y lavaron con PBS por 5 min. Posteriormente fueron incubados con los anticuerpos primarios a una dilución de 1:100 en PBS + 2 mg/ml de BSA. Se incubaron toda la noche a 4 °C, posteriormente se lavaron las laminillas en PBS + Tween 20 al 0.01% por 5 minutos, se repitió 2 veces más, y un último lavado se realizó con PBS. El siguiente paso fue incubar el anticuerpo secundario acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución de 1:50 o Alexa Rojo a una dilución 1:400, durante 2 horas a temperatura ambiente y se realizaron los lavados pertinentes con PBS + Tween 20 al 0.01% por 5 min y el último con PBS. Las laminillas se montaron y observaron en un microscopio de epifluorescencia indirecta Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania).

10. RESULTADOS

ANÁLISIS HISTOMORFOLÓGICO

Grupo control positivo MTA.

Transcurridas las 4 semanas, observamos la comunicación pulpar, formación de dentina terciaria tipo osteodentina con inclusiones celulares (figura 18 B).

En la porción coronal observamos infiltrado inflamatorio leve, y presencia continua de la capa odontoblástica (a excepción de la región media en donde se realizó la comunicación).

En la pulpa radicular observamos la continuidad de la capa odontoblástica, y los tejidos periapicales íntegros, con ausencia de infiltrado inflamatorio (figura 18 C, D).

Grupo control gelfoam.

Después de 4 semanas, se observaron áreas de necrosis en la pulpa coronal (figura 19 B). Presencia de tejido no vital y fibras colágenas desordenadas en la raíz distal. En la raíz mesial observamos tejido pulpar vital remanente con infiltrado inflamatorio leve en la zona de la raíz mesial, así como presencia de una hiper celularidad en la región apical (figura 19 C,D).

En la zona que corresponde a la comunicación pulpar, se observa la presencia material extraño.

Grupo experimental CEMP1-p1.

A las 4 semanas, podemos observar la comunicación pulpar, próximo a la comunicación pulpar se observa material extraño. Formación de osteodentina en la zona distal, próxima a esta zona presencia de tejido necrótico. En la zona mesial, también se aprecia la formación de dentina terciaria más organizada muy cerca de la dentina secundaria (figura 20 B). En la pulpa radicular de la raíz mesial observamos infiltrado inflamatorio leve (figura 20 C). La capa odontoblástica es continua a lo largo de la raíz. Presencia de tejidos periapicales íntegros (figura 20 D).

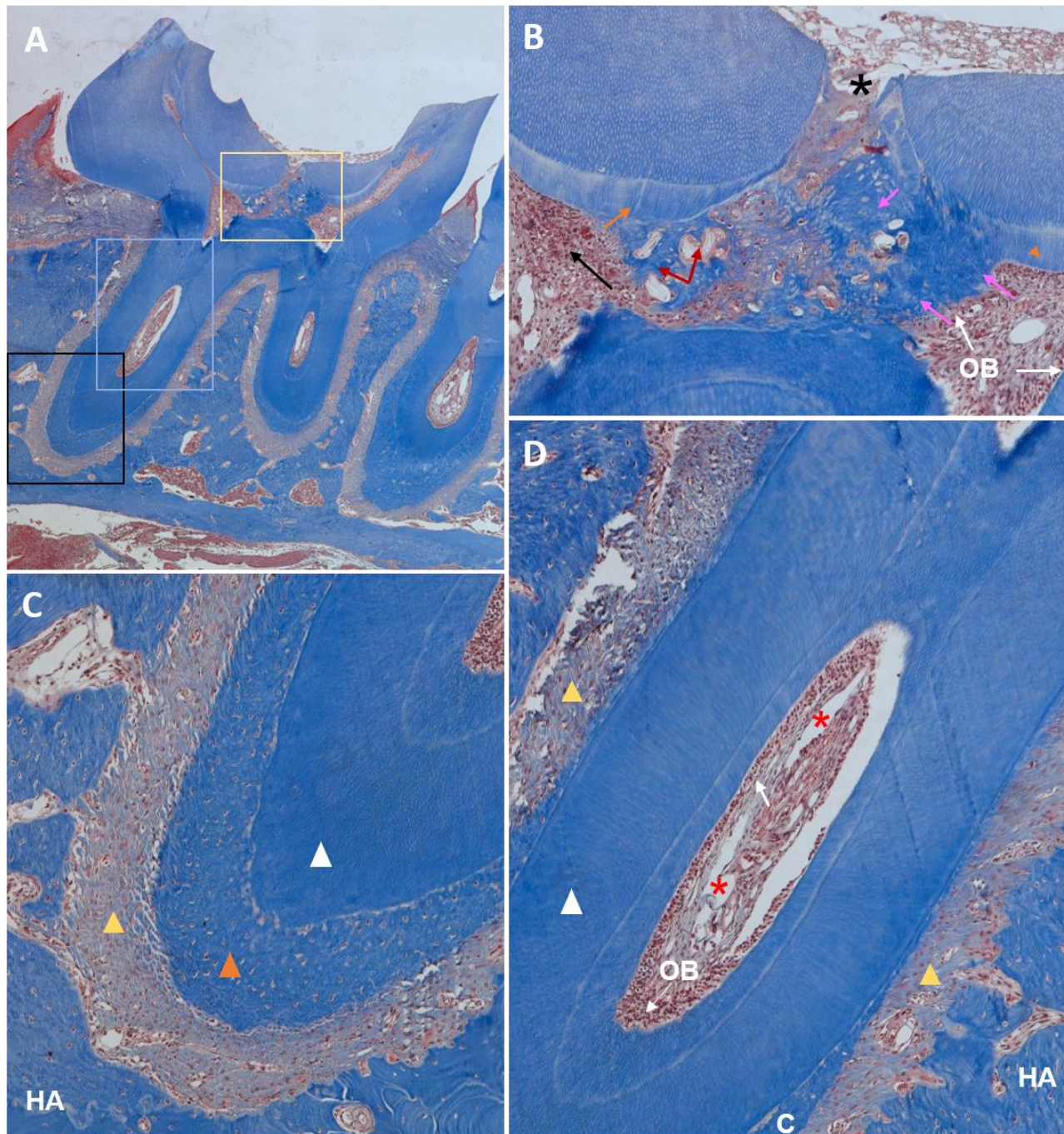


Figura 18. Imágenes histológicas representativas del grupo control positivo -MTA a las 4 semanas.

A Fotomicrografía de primer molar superior derecho corte sagital teñida con Tricrómica de Masson. Cuadro amarillo corresponde a la imagen B, cuadro azul corresponde a imagen D y cuadro negro a la imagen C. **B** Cámara pulpar. Comunicación de cámara pulpar (asterisco negro) con presencia de osteodentina (flecha rosa) con una capa continua de odontoblastos (flecha blanca), la cual presenta inclusiones celulares y material extraño (flecha roja) con infiltrado inflamatorio leve (flecha negra). **C** Ápice/ Tejidos periapicales. Integridad de los tejidos de sostén del diente: cemento (triángulo naranja), ligamento periodontal (triángulo amarillo) y hueso alveolar HA. **D** Porción media del conducto radicular. Presencia de pulpa radicular vital, capa de odontoblastos continua (flecha blanca), presencia de vasos sanguíneos (asterisco rojo).

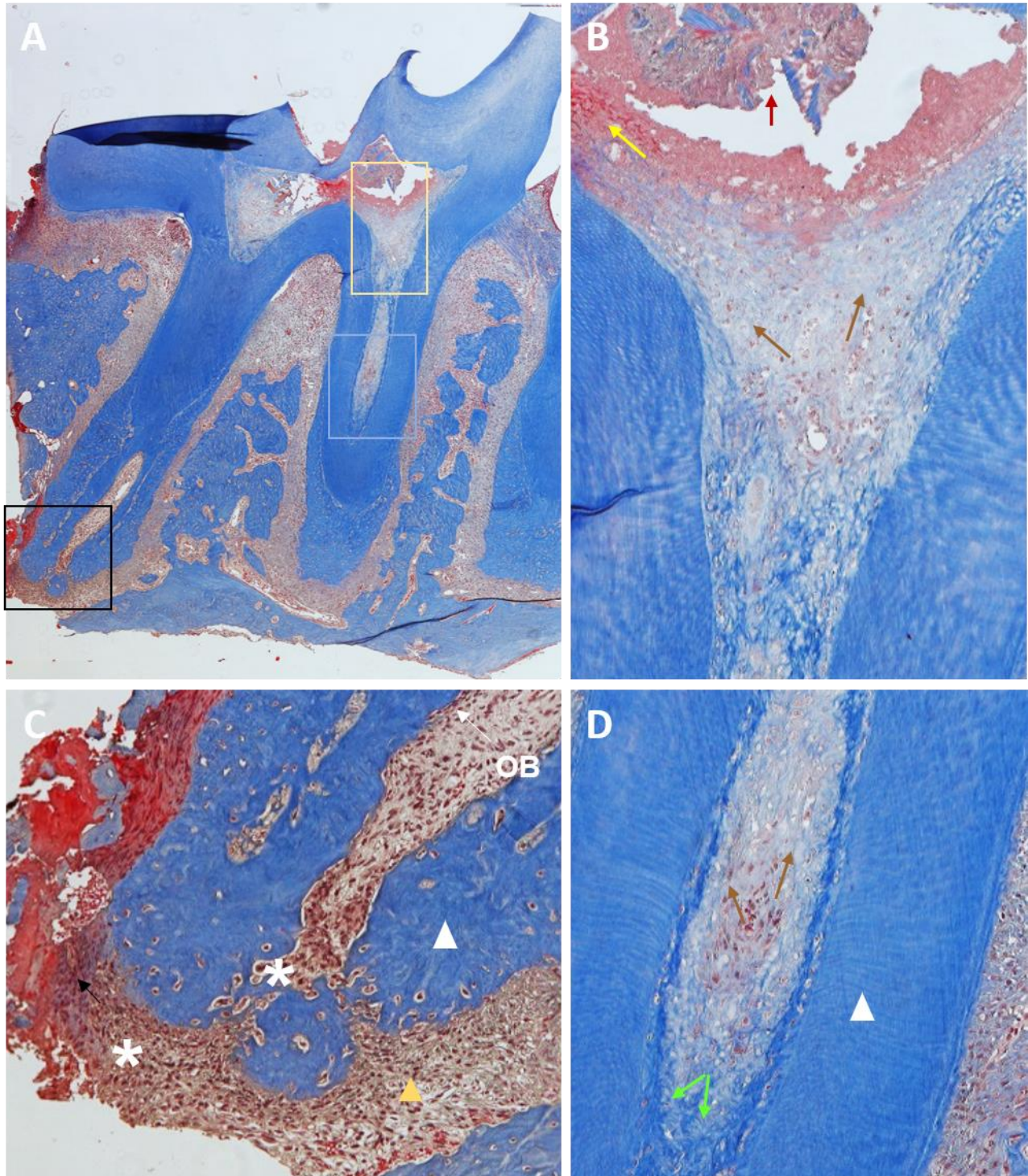


Figura 19. Imágenes histológicas representativas del grupo control -gel foam a las 4 semanas.

A Fotomicrografía de primer molar superior derecho corte sagital teñida con Tricrómica de Masson. Cuadro amarillo corresponde a la imagen B, cuadro azul corresponde a imagen D y cuadro negro a la imagen C. **B** Cámara pulpar. Presencia de pulpa no vital (flecha marrón) con áreas de necrosis (flecha amarilla) y presencia de material extraño (flecha roja). **C** Ápice/ Tejidos periapicales. Infiltrado inflamatorio leve (flecha negra), hiper celularidad (asterisco blanco) en el ligamento periodontal (triángulo amarillo) con presencia de pulpa vital remanente con capa de odontoblastos continua (flecha blanca). **D** Porción media del conducto radicular. Presencia de tejido no vital (flecha marrón) y colágena (flecha verde).

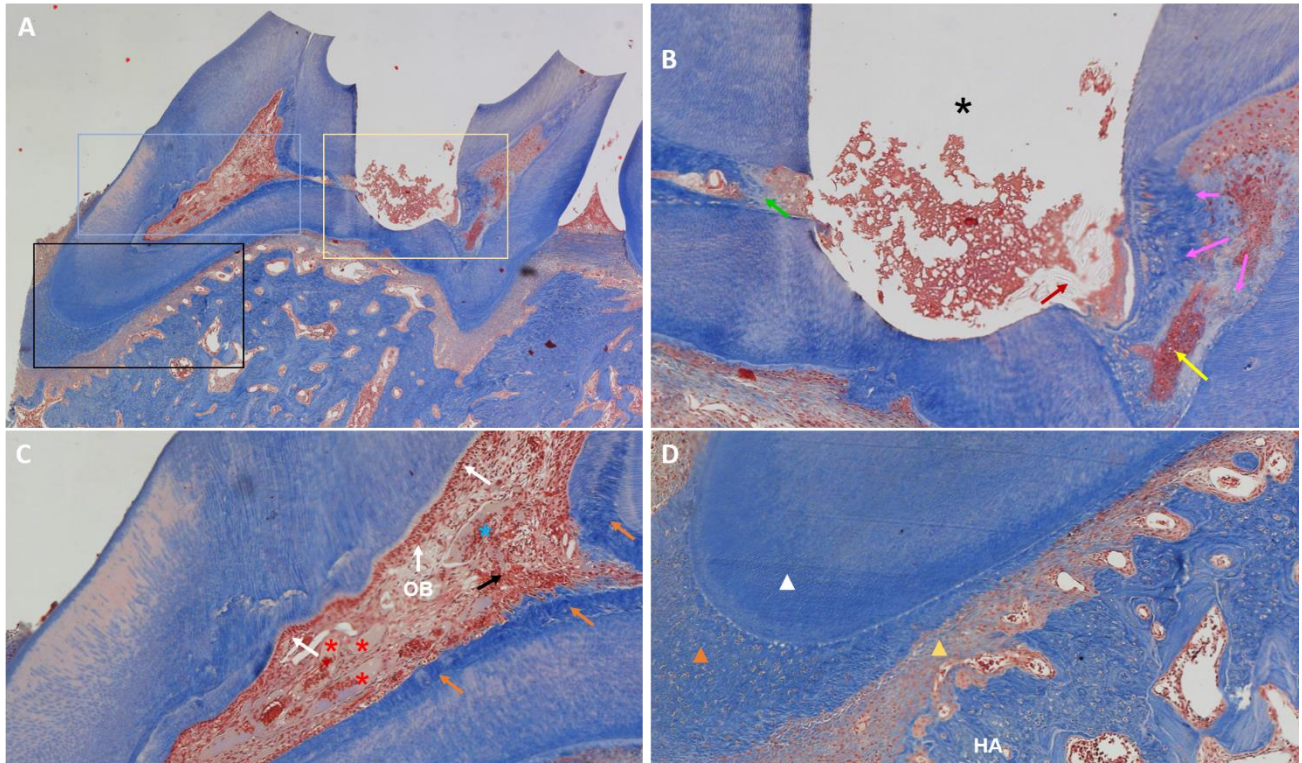


Figura 20. Imágenes histológicas representativas del grupo experimental -CEMP1-p1 a las 4 semanas.

A Fotomicrografía de primer molar superior derecho corte sagital teñida con Tricrómica de Masson. Cuadro amarillo corresponde a la imagen B, cuadro azul corresponde a imagen C y cuadro negro a la imagen D. **B** Cámara pulpar. Se observa la comunicación pulpar (asterisco negro), presencia de material extraño (flecha roja), formación de osteodentina (flecha rosa) con inclusiones celulares, áreas de necrosis adyacente a la osteodentina (flecha amarilla). **C** Porción media del conducto radicular. Presencia de pulpa vascularizada (asterisco rojo) con hemorragia (asterisco azul) e infiltrado inflamatorio leve (flecha negra), se observa una capa continua de odontoblastos (flecha blanca) y dentina secundaria (flecha naranja). **D** Ápice/ Tejidos periapicales. Presencia de tejidos de sostén del diente sin alteración: cemento (triángulo naranja), ligamento periodontal (triángulo amarillo) y hueso alveolar HA.

INMUNOFLUORESCENCIA

Se evaluó la expresión de marcadores para la dentina a las 4 semanas a través de doble marcaje. En el grupo control positivo MTA estaban expresados DMP1, CEMP1, DSP y AMGN en los fibroblastos de la pulpa dental (figura 21 A, B, E, F, J). DMP1, CEMP1, AMGN y BSP estaban expresados en los odontoblastos. BSP y DMP1 se expresaron en los odontoblastos de la dentina terciaria (osteodentina) recién formada, y en la zona de transición con la dentina secundaria (figura 21 M, N, O).

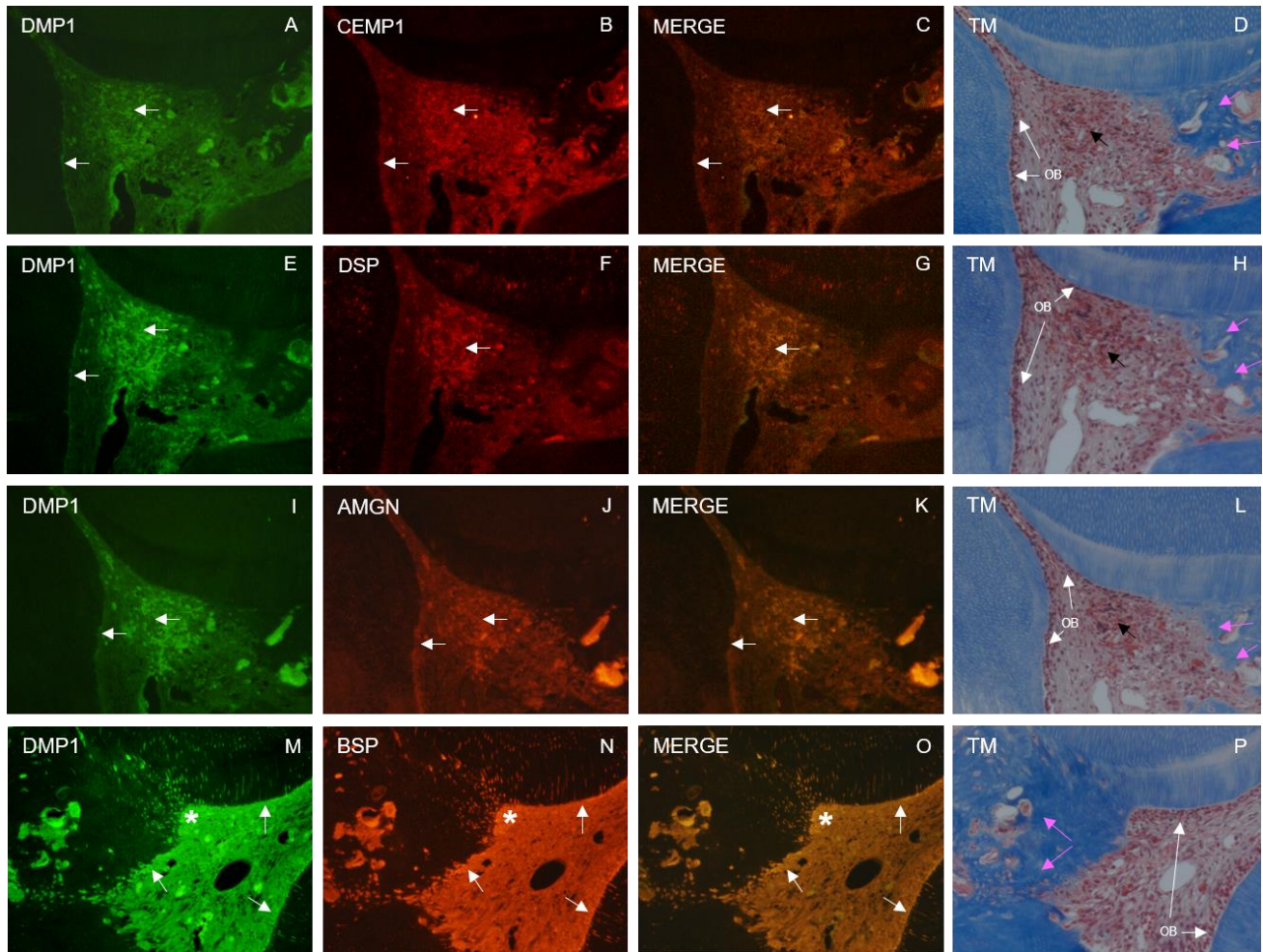


Figura 21. Inmunofluorescencia del grupo control positivo -MTA a 4 semanas. **A, E, I, M** Áreas positivas a DMP1. **B** Áreas positivas a CEMP1, **C** Áreas positivas a DMP1 y CEMP1. **D, H, L, P** Fotomicrografía teñida con Tricrómica de Masson de la zona coronal observamos la presencia de osteodentina (flecha rosa), capa continua de odontoblastos (flecha blanca) e infiltrado inflamatorio leve (flecha negra). **F** Área positiva a DSP. **G** Áreas positivas a DMP1 y DSP. **J** Áreas positivas a AMGN. **K** Áreas positivas a DMP1 y AMGN. **N** Áreas positivas a BSP, se observa un área de transición entre la dentina secundaria y osteodentina (asterisco). **O** Áreas positivas para DMP1 y BSP.

Para el grupo control gelfoam, ningún marcador fue positivo en las zonas evaluadas (figura 22).

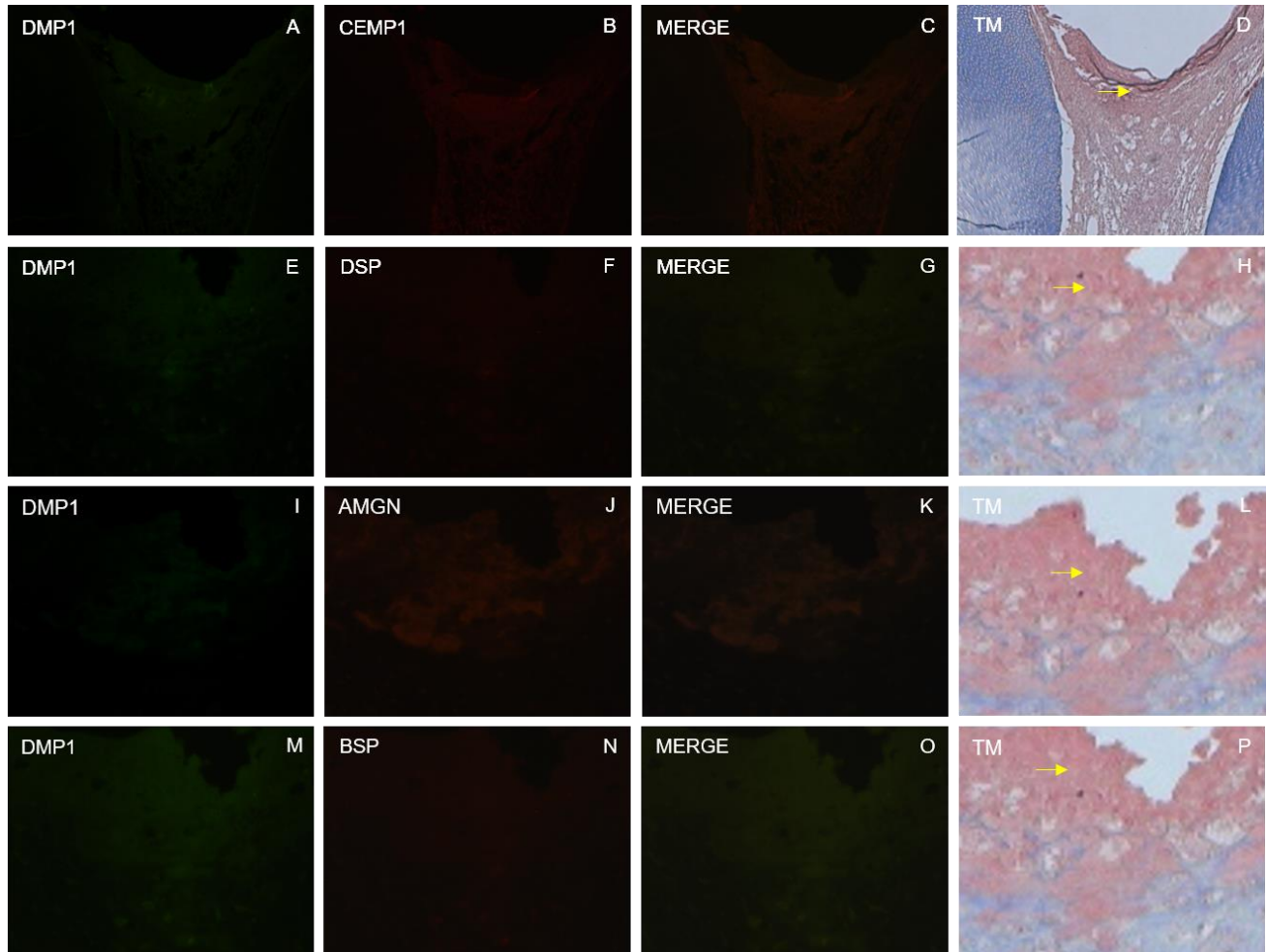


Figura 22. Inmunofluorescencia del grupo control -gelfoam a 4 semanas. **A, B, C, E, F, G, I, J, K, M, N, O** Ausencia de positividad para las proteínas DMP1, CEMP1, DSP, AMGN y BSP. **D, H, L, P** Fotomicrografía teñida con Tricrómica de Masson de la zona coronal observamos tejido necrótico (flecha amarilla).

En el grupo experimental CEMP1-p1 se expresó DMP1, CEMP1, AMGN y BSP en los odontoblastos (figura 23 A, B, J, N). DMP1, CEMP1, DSP, AMGN y BSP estaban expresados en los fibroblastos (figura 23 A, B, F, J, N).

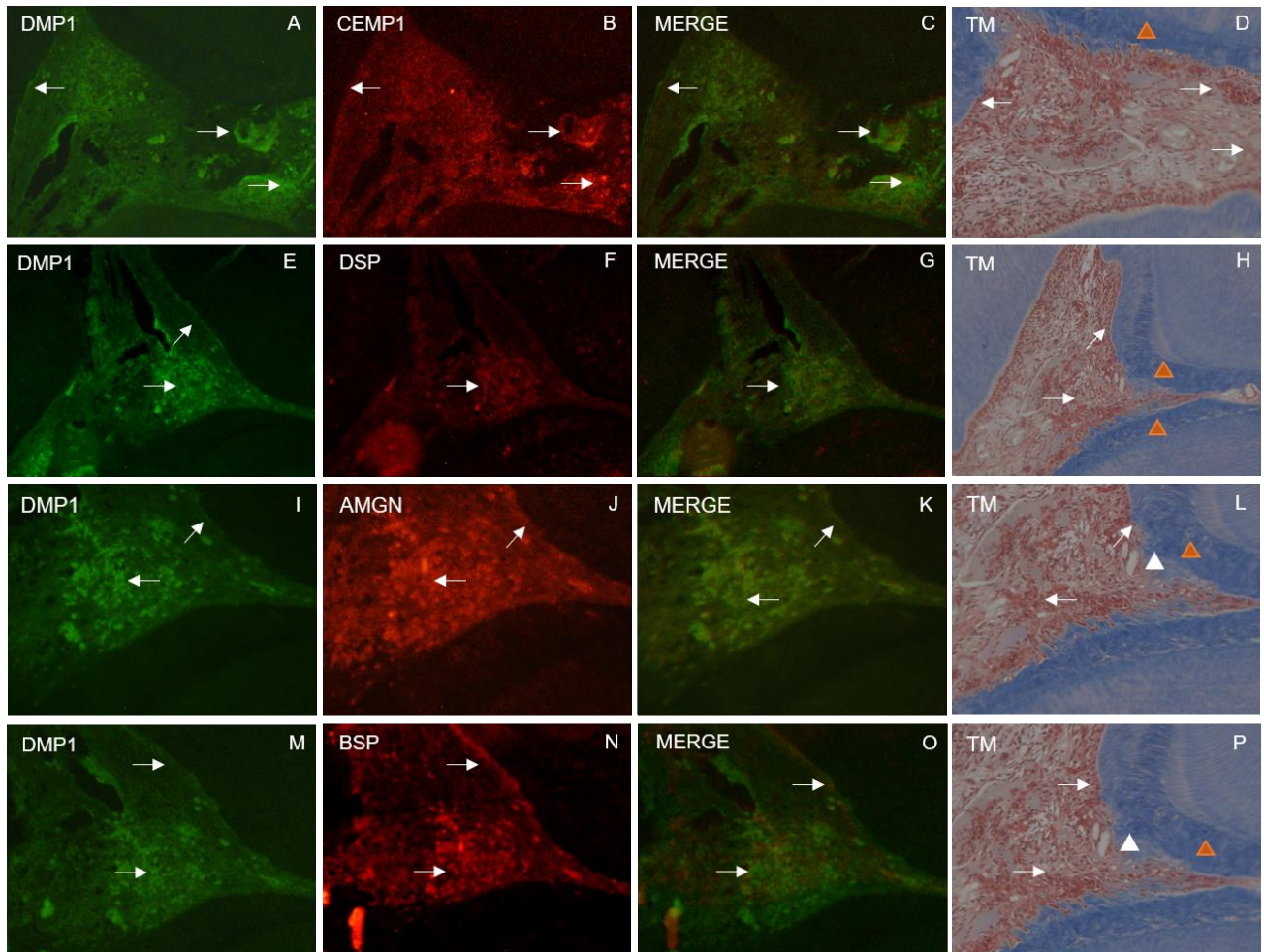


Figura 23. Inmunofluorescencia del grupo experimental -CEMP1-p1 a 4 semanas. **A, E, I, M** Áreas positivas a DMP1. **B** Áreas positivas a CEMP1. **C** Áreas positivas a DMP1 y CEMP1. **D, H, L, P** Fotomicrografía teñida con Tricrómica de Masson de la zona coronal observamos la presencia de dentina secundaria (triángulo naranja), dentina terciaria (triángulo blanco) y capa continua de odontoblastos (flecha blanca). **F** Área positiva a DSP, **G** Área positiva a DMP1 y DSP, **J** Áreas positivas a AMGN, **K** Áreas positivas a DMP1 y AMGN, **N** Áreas positivas a BSP. **O** Áreas positivas para DMP1 y BSP.

11. DISCUSIÓN

El objetivo de los tratamientos actuales es aplicar técnicas no invasivas y conservar el máximo de la estructura dental, usando materiales biocompatibles, para prolongar la vida del órgano dentario. Se ha demostrado que utilizando moléculas bioactivas se puede regenerar el complejo pulpo-dentinario, logrando la formación de un sello que proteja y mantenga la vitalidad pulpar del tejido remanente, preservando las funciones pulpares. En diversos estudios han empleado moléculas bioactivas *in vivo* después de haber realizado comunicación pulpar con el propósito de evaluar la reacción del complejo pulpo-dentinario y la formación de dentina terciaria. Estos estudios reportaron la aplicación de BMP-7 (101), BMP-2, CGRP (102), BSP (103), entre otras moléculas.

Recientes investigaciones se han centrado en el desarrollo de compuestos peptídicos miméticos o en la identificación de dominios funcionales dentro de las proteínas. Se ha demostrado que existen varias ventajas al emplear péptidos y no la proteína completa, ya que al ser una molécula de menor tamaño presenta mejor estabilidad, evita el proceso de degradación proteolítica y por lo tanto una menor respuesta inflamatoria (13). Siendo una buena opción terapéutica. Estudios previos han establecido el potencial del péptido 1 de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p1) para promover el depósito de sales de calcio y fosfato, participa en la nucleación de cristales de hidroxiapatita (14), también se ha demostrado que promueve la formación de nuevo tejido óseo *in vivo* (13). Por lo que el péptido sintético CEMP1-p1 es una opción adecuada en tratamiento de comunicación pulpar. Se han utilizado una amplia variedad de modelos animales, como ratas, gatos, perros y monos. La mayoría de los estudios se realizaron en molares de rata realizando comunicación pulpar. Es bien sabido que para obtener éxito en la terapia pulpar vital y en general cualquier tratamiento endodóntico, es necesario el control de contaminantes presentes en la cavidad bucal mediante el aislamiento absoluto de la zona a tratar. A diferencia de otros estudios, se confeccionó un aditamento que permitió aislar el molar del resto de la boca, obteniendo un área de trabajo limpia, con mejor iluminación y de fácil desinfección.

Tanto en el grupo control positivo de MTA como en el grupo experimental CEMP1-p1 a las 4 semanas encontramos la formación y depósito de dentina terciaria tipo osteodentina. A pesar de ser una dentina irregular y atubular con inclusiones celulares y tejido necrótico, este

tejido ha demostrado buenos resultados clínicos (104, 105). Análisis histológicos previos realizados en Terapia Pulpar Vital *in vivo*, sugieren que la presencia del tejido neoformado corresponde a material parecido al cemento, osteodentina, dentina o hueso (106, 107).

Se encontraron cambios inflamatorios leves en ambos grupos (MTA y CEMP1-p1), ya que, al no haber material inerte siempre se esperarán cambios inflamatorios o degenerativos.

Se demostró que tanto el péptido CEMP1-p1 como el MTA permiten la expresión de proteínas relacionadas con la mineralización como DMP1, AMG, DSP y BSP a las 4 semanas. DMP1 tiene una función importante en la diferenciación de osteoblastos y biomineralización. Además de considerarse un marcador dentinario (19). AMGN es un componente de matriz dentinaria, que promueve la condrogénesis y osteogénesis en sitios ectópicos de implantación (108, 109). DSP es considerado un marcador fenotípico de la dentina. Regula la expresión de DMP1 durante la dentinogénesis y su presencia es crítica para la mineralización de la dentina (19). BSP se considera un marcador tardío de diferenciación de osteoblastos (110), es un componente de tejidos mineralizados como el hueso, dentina y cemento (111). Induce la adhesión y migración de células endoteliales, así como adhesión y diferenciación de osteoblastos (112).

Estas proteínas están presentes en hueso y otros tejidos, y se aceptan como indicativo en tejidos mineralizados. En nuestro estudio se produjo diferenciación hacia un fenotipo de células mineralizantes, obteniendo un resultado satisfactorio para los procedimientos clínicos destinados a restaurar la integridad funcional de los tejidos dentales dañados. A pesar de no haber regeneración de morfología similar a la fisiológica de la dentina.

En cuanto a limitantes del estudio, en este estudio no se pesó o cuantificó la cantidad de MTA preparado que se llevó a la cavidad, es importante controlar esta variable, ya que la cantidad de péptido sí se pesó, pudiendo esto favorecer los resultados del grupo control positivo. Además, al ser un estudio piloto, únicamente se realizó el análisis descriptivo de los resultados histológicos y de inmunofluorescencia. También en este estudio únicamente evaluamos la biocompatibilidad del péptido CEMP1-p1. Por lo que se necesitan estudios futuros enfocados a evaluar la actividad antibacteriana, así como las propiedades físicas y químicas del péptido CEMP1-p1 cuyos resultados puedan cuantificarse mediante análisis estadístico.

12. CONCLUSIONES

De acuerdo con nuestros resultados, el péptido CEMP1-p1 es una molécula bioactiva, que permite la formación de dentina terciaria del tipo osteodentina con una reacción inflamatoria leve, manteniendo la vitalidad de la pulpa dental y la integridad de los tejidos periapicales, similar al tejido formado por el estándar de oro en endodoncia y grupo control positivo MTA. Se rechaza la hipótesis planteada, ya que el péptido de CEMP1-p1 indujo formación de tejido del tipo osteodentina, con expresión de marcadores moleculares dentinarios pero también propios del hueso. A pesar de esto, se puede considerar un buen candidato para la Terapia Pulpar Vital en casos de exposición pulpar, buscando mantener a largo plazo la mayor cantidad de estructura dental remanente.

RELEVANCIA CLÍNICA

Encontramos que el péptido 1 de la proteína de cemento 1 (CEMP1-p1) es un buen candidato en procedimientos clínicos de Terapia Pulpar Vital destinados a preservar el tejido pulpar remanente y restaurar la integridad funcional de los tejidos dentales dañados, a pesar de no haber obtenido regeneración de morfología similar a la fisiológica de la dentina.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 2003;31:3-23.
2. Aguilar P, Linsuwanont P. Vital Pulp Therapy in Vital Permanent Teeth with Cariously Exposed Pulp: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*. 2011;37(5):581-7.
3. Asgary S, Eghbal MJ, Fazlyab M, Baghban AA, Ghoddusi J. Five-year results of vital pulp therapy in permanent molars with irreversible pulpitis: a non-inferiority multicenter randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*. 2015;19(2):335-41.
4. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A review of current and a call for action. *Journal of Endodontics*. 2007;33(4):377-90.
5. Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan AS. Isolation of human tumor-cells that produce cementum proteins in culture. *Bone and Mineral*. 1992;18(1):15-30.
6. Paula-Silva FWG, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, da Silva LAB, Kapila YL. Calcium Hydroxide Promotes Cementogenesis and Induces Cementoblastic Differentiation of Mesenchymal Periodontal Ligament Cells in a CEMP1-and ERK-Dependent Manner. *Calcified Tissue International*. 2010;87(2):144-57.
7. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nunez J, Gaitan L, et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biology International*. 2012;36(2):129-36.
8. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2012;227(2):649-57.
9. Serrano J, Romo E, Bermudez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, et al. Bone Regeneration in Rat Cranium Critical-Size Defects Induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *Plos One*. 2013;8(11).
10. Chen XF, Liu Y, Yang J, Wu WL, Miao LY, Yu YJ, et al. The synthesis of hydroxyapatite with different crystallinities by controlling the concentration of recombinant CEMP1 for biological application. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 2016;59:384-9.

11. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontology* 2000. 2015;67(1):211-33.
12. Sugamori Y, Mise-Omata S, Maeda C, Aoki S, Tabata Y, Murali R, et al. Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling. *Bioessays*. 2016;38(8):717-25.
13. Correa R, Arenas J, Montoya G, Hoz L, Lopez S, Salgado F, et al. Synthetic cementum protein 1-derived peptide regulates mineralization in vitro and promotes bone regeneration in vivo. *Faseb Journal*. 2019;33(1):1167-78.
14. Montoya G, Correa R, Arenas J, Hoz L, Romo E, Arroyo R, et al. Cementum protein 1-derived peptide (CEMP 1-p1) modulates hydroxyapatite crystal formation in vitro. *Journal of Peptide Science*. 2019;25(10).
15. Gómez-Ferraris M, Campos A. In: Panamericana EM, editor. *Histología y Embriología Bucodental*. 2 ed. Madrid- España2002. p. 83-110.
16. Patten B. *Human embryology*. 3 ed. Nueva York: McGraw-Hill; 1968.
17. Carlson BM. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. In: DRK, editor. 6 ed. Barcelona, España: Elsevier Health Sciences; 2019. p. 294-334.
18. Chiego DJ. *Principios de histología y embriología bucal*. 4 ed. España: Elsevier; 2014. p. 101-12.
19. Almaguer A, José V. *Ecología oral*. In: José V, editor. México: Manual Moderno; 2017. p. 24-36.
20. Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, et al. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Diseases*. 2014;20(1):25-34.
21. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: Embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2001;12(5):425-37.
22. Smith AJ, Lumley PJ, Tomson PL, Cooper PR. Dental regeneration and materials - a partnership. *Clinical Oral Investigations*. 2008;12(2):103-8.

23. Tomson PL, Grouer LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *Journal of Dentistry*. 2007;35(8):636-42.
24. Murray PE, Smith AJ, Windsor LJ, Mjor IA. Remaining dentine thickness and human pulp responses. *International Endodontic Journal*. 2003;36(1):33-43.
25. Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *Journal of Endodontics*. 2016;42(1):47-56.
26. Couve E. Ultrastructural-changes during the life-cycle of human odontoblasts. *Archives of Oral Biology*. 1986;31(10):643-51.
27. George CH, Kendall JM, Evans WH. Intracellular Trafficking Pathways in the Assembly of Connexins into Gap Junctions. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(13):8678-85.
28. Tanaka T. The origin and localization of dentinal fluid in developing rat molar teeth studied with lanthanum as a tracer. *Archives of Oral Biology*. 1980;25(3):153-62.
29. Bishop MA, Yoshida S. A permeability barrier to lanthanum and the presence of collagen between odontoblasts in pig molars. *Journal of Anatomy*. 1992;181:29-38.
30. Turner DF, Marfurt CF, Sattelberg C. Demonstration of physiological barrier between pulpal odontoblasts and its perturbation following routine restorative procedures - a horseradish-peroxidase tracing study in the rat. *Journal of Dental Research*. 1989;68(8):1262-8.
31. Gotjamanos T. Cellular organization in subodontoblastic zone of dental pulp .2. Period and mode of development of cell-rich layer in rat molar pulps. *Archives of Oral Biology*. 1969;14(9):1011-+.
32. Fitzgerald M, Chiego DJ, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Archives of Oral Biology*. 1990;35(9):707-15.
33. Tokita Y, Sunakawa M, Suda H. Pulsed Nd : YAG laser irradiation of the tooth pulp in the cat: I. Effect of spot lasing. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2000;26(4):398-404.
34. Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, T Hanks C, Noer JE. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *Journal of Endodontics*. 2006;32(10):951-5.

35. El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, et al. Human odontoblasts express functional thermo-sensitive TRP channels: Implications for dentin sensitivity. *Pain*. 2011;152(10):2211-23.
36. Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Romeas A, Vincent C, Bleicher F, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *Journal of Dental Research*. 2008;87(3):256-61.
37. Lesot H, Osman M, Ruch JV. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Developmental Biology*. 1981;82(2):371-81.
38. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TTT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiology and Immunology*. 2007;22(1):5-13.
39. Okiji T, Morita I, Sunada I, Murota S. Involvement of arachidonic-acid metabolites in increases in vascular-permeability in experimental dental pulpal inflammation in the rat. *Archives of Oral Biology*. 1989;34(7):523-8.
40. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1998;9(2):179-200.
41. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Matsumoto A, Kobayashi C, Suda H. An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. *Journal of Dental Research*. 1992;71(5):1196-202.
42. Sakurai K, Okiji T, Suda H. Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: An immunohistochemical study. *Journal of Dental Research*. 1999;78(10):1596-608.
43. Hahn CL, Falkler WA, Siegel MA. A study of t-cell and b-cell in pulpal pathosis. *Journal of Endodontics*. 1989;15(1):20-6.
44. Zero DT, Fontana M, Martinez-Mier EA, Ferreira-Zandona A, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, et al. The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries Scientific advances in the United States. *Journal of the American Dental Association*. 2009;140:25S-34S.
45. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):17030.

46. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology-Sgm.* 2003;149:279-94.
47. Vanhoute J. Bacterial specificity in the etiology of dental-caries. *International Dental Journal.* 1980;30(4):305-26.
48. Gibbons RJ, Socransky SS. Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques - its relation to dental caries and microbial ecology of the oral cavity. *Archives of Oral Biology.* 1962;7(1):73-&.
49. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI. Strains of streptococcus-mutans and streptococcus-sobrinus attach to different pellicle receptors. *Infection and Immunity.* 1986;52(2):555-61.
50. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology.* 2001;183(12):3770-83.
51. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002;40(3):1001-9.
52. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology.* 2008;46(4):1407-17.
53. Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, et al. Acid Production by Oral Strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. *Caries Research.* 2009;43(2):83-91.
54. Conry JP, Messer LB, Boraas JC, Aeppli DP, Bouchard TJ. Dental-caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Archives of Oral Biology.* 1993;38(11):937-43.
55. Tencate JM, Featherstone JDB. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 1991;2(3):283-96.
56. Langeland K. Tissue-response to dental-caries. *Endodontics & Dental Traumatology.* 1987;3(4):149-71.
57. Ricucci D, Siqueira JF, Li YY, Tay FR. Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. *Journal of Dentistry.* 2019;86:41-52.

58. Ghoddusi J, Forghani M, Parisay I. New approaches in vital pulp therapy in permanent teeth. *Iran Endod J.* 2014;9(1):15-22.
59. About I, Laurent-Maquin D, Lendahl U, Mitsiadis TA. Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *American Journal of Pathology.* 2000;157(1):287-95.
60. Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Human odontoblast cell numbers after dental injury. *Journal of Dentistry.* 2000;28(4):277-85.
61. Yamagishi VTK, Torneck CD, Friedman S, Huang GTJ, Glogauer M. Blockade of TLR2 Inhibits *Porphyromonas gingivalis* Suppression of Mineralized Matrix Formation by Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Endodontics.* 2011;37(6):812-8.
62. Mass E, Zilberman U. Long-term radiologic pulp evaluation after partial pulpotomy in young permanent molars. *Quintessence International.* 2011;42(7):547-54.
63. Asgary S, Eghbal MJ, Ghoddusi J, Yazdani S. One-year results of vital pulp therapy in permanent molars with irreversible pulpitis: an ongoing multicenter, randomized, non-inferiority clinical trial. *Clinical Oral Investigations.* 2013;17(2):431-9.
64. Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF. Pulp capping of carious exposures: Treatment outcome after 5 and 10 years: A retrospective study. *Journal of Endodontics.* 2000;26(9):525-8.
65. Bjorndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Nasman P, et al. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *European Journal of Oral Sciences.* 2010;118(3):290-7.
66. Al-Hezaimi K, Salameh Z, Al-Fouzan K, Al Rejaie M, Tay FR. Histomorphometric and Micro-computed Tomography Analysis of Pulpal Response to Three Different Pulp Capping Materials. *Journal of Endodontics.* 2011;37(4):507-12.
67. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and (BMP)-4. *Journal of Dental Research.* 1994;73(9):1515-22.
68. Yildirim S, Can A, Arican M, Embree MC, Mao JJ. Characterization of dental pulp defect and repair in a canine model. *American Journal of Dentistry.* 2011;24(6):331-5.

69. Cooper PR, McLachlan JL, Simon S, Graham LW, Smith AJ. Mediators of Inflammation and Regeneration. *Advances in Dental Research*. 2011;23(3):290-5.
70. Sundell JR, Stanley HR, White CL. Relationship of coronal pulp stone formation to experimental operative procedures. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*. 1968;25(4):579-&.
71. Enkel B, Dupas C, Armengol V, Adou JA, Bosco J, Daculsi G, et al. Bioactive materials in endodontics. *Expert Review of Medical Devices*. 2008;5(4):475-94.
72. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TRP. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials*. 2005;21(4):297-303.
73. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*. 2007;40(6):462-70.
74. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*. 2008;41(5):408-17.
75. Nandini S, Ballal S, Kandaswamy D. Influence of glass-ionomer cement on the interface and setting reaction of mineral trioxide aggregate when used as a furcal repair material using laser Raman spectroscopic analysis. *Journal of Endodontics*. 2007;33(2):167-72.
76. Torabinejad M, Hong CU, Ford TRP, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *Journal of Endodontics*. 1995;21(8):403-6.
77. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Ford TRP. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *International Endodontic Journal*. 2005;38(11):834-42.
78. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Ford TRP. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*. 2004;37(10):699-704.
79. Saidon J, He JN, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LSW. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*. 2003;95(4):483-9.
80. Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *Journal of Endodontics*. 1995;21(11):537-9.

81. Abbasipour F, Rastqar A, Bakhtiar H, Khalilkhani H, Aeinehchi M, Janahmadi M. The nociceptive and anti-nociceptive effects of white mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*. 2009;42(9):794-801.
82. Masuda YM, Wang X, Hossain M, Unno A, Jayawardena JA, Saito K, et al. Evaluation of biocompatibility of mineral trioxide aggregate with an improved rabbit ear chamber. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2005;32(2):145-50.
83. Tunca YM, Aydin C, Ozen T, Seyrek M, Ulusoy HB, Yidiz O. The effect of mineral trioxide aggregate on the contractility of the rat thoracic aorta. *Journal of Endodontics*. 2007;33(7):823-6.
84. Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *Journal of Dental Research*. 2002;81(8):541-6.
85. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Carmona BR, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*. 2006;38(3):409-19.
86. Cuisinier FJG, Glaisher RW, Voegel JC, Hutchison JL, Bres EF, Frank RM. Compositional variations in apatites with respect to preferential ionic extraction. *Ultramicroscopy*. 1991;36(4):297-305.
87. Romo-Arevalo E, Arzate H, Montoya-Ayala G, Rodriguez-Romero A. High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. *Febs Letters*. 2016;590(1):129-38.
88. Villarreal-Ramirez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chavez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarria I, et al. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;384(1):49-54.
89. Nunez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Munoz F, Arzate H, Villalobos C, et al. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *Journal of Periodontal Research*. 2012;47(1):33-44.
90. Carmona-Rodriguez B, Alvarez-Perez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone

and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;358(3):763-9.

91. AA K. The effect of hydrocortisone plus polyantibiotics upon the damaged and infected dental pulp of rat molars.: *J Dent Res*; 1958. p. 886–901

92. CG M. Experimental cavity preparations in the molar of the rat. In: I S, editor.: *J Dent Res* 1955. p. 429–34

93. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Laboratory Animals*. 2010;44(1):1-6.

94. A W, RC P. A comparison of pulp responses of two different materials in the dog and the rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 1981. p. 648–52.

95. Slayton RL, Urquhart O, Araujo MWB, Fontana M, Guzman-Armstrong SG, Nascimento MM, et al. Evidence-based clinical practice guideline on nonrestorative treatments for carious lesions A report from the American Dental Association. *Journal of the American Dental Association*. 2018;149(10):837-+.

96. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with Mineral Trioxide Aggregate: a randomized controlled trial. 2008. *Int Endod J*. 2009;42(5):422-44.

97. Masuda-Murakami Y, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, et al. Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochem*. 2010;112(5):452-8.

98. Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Kakoei S, Samiee M. A comparative study of using a combination of calcium chloride and mineral trioxide aggregate as the pulp-capping agent on dogs' teeth. *J Endod*. 2011;37(6):786-8.

99. Gibson I, Rosen DW, Stucker B. *Additive Manufacturing Technologies: Rapid Prototyping to Direct Digital Manufacturing*. Additive Manufacturing Technologies: Rapid Prototyping to Direct Digital Manufacturing. 2010:1-459.

100. Chua CK, Leong KF, Lim CS. *Third edition rapid prototyping Principles and Applications introduction*. Rapid Prototyping: Principles and Applications, 3rd Edition. 2010:1-23.

101. da Silva LA, de Paula e Silva FW, Leonardo MR, Assed S. Pulpal and periapical response of dogs' teeth after pulpotomy and use of recombinant human bone morphogenetic protein-7 as a capping agent. *J Dent Child (Chic)*. 2007;74(2):79-84.
102. Kline LW, Yu DC. Effects of calcitonin, calcitonin gene-related peptide, human recombinant bone morphogenetic protein-2, and parathyroid hormone-related protein on endodontically treated ferret canines. *J Endod*. 2009;35(6):866-9.
103. Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili Majd E, Lasfargues JJ, et al. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res*. 2001;15:91-5.
104. Ricucci D, Loghin S, Lin LM, Spångberg LS, Tay FR. Is hard tissue formation in the dental pulp after the death of the primary odontoblasts a regenerative or a reparative process? *J Dent*. 2014;42(9):1156-70.
105. Dammaschke T, Nowicka A, Lipski M, Ricucci D. Histological evaluation of hard tissue formation after direct pulp capping with a fast-setting mineral trioxide aggregate (RetroMTA) in humans. *Clin Oral Investig*. 2019;23(12):4289-99.
106. Ritter ALD, Ritter AV, Murrah V, Sigurdsson A, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dental Traumatology*. 2004;20(2):75-84.
107. Wang XJ, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GTJ. Histologic Characterization of Regenerated Tissues in Canal Space after the Revitalization/Revascularization Procedure of Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*. 2010;36(1):56-63.
108. Nebgen DR, Inoue H, Sabsay B, Wei K, Ho CS, Veis A. Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovine dentin (bCIA) as a low-molecular-mass amelogenin polypeptide. *Journal of Dental Research*. 1999;78(9):1484-94.
109. Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei KR, Wang L, Wang XS, et al. Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(52):41263-72.
110. Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G, Hofbauer LC. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2002;84(4):725-35.

111. Fisher LW, McBride OW, Termine JD, Young MF. Human-bone sialoprotein - deduced protein-sequence and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(4):2347-51.
112. Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha 2 beta 1 integrin interaction. *Journal of Cellular Physiology*. 2000;184(2):207-13.