

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSTGRADO DE ENDODONCIA

APLICACIÓN DE ESTRATEGIAS DE INGENIERÍA TISULAR
PARA LA REGENERACIÓN DE PULPA Y DENTINA

Trabajo especial presentado ante la
ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Odontólogo Eliana
Burguera Rincón para optar al título
de Especialista en Endodoncia

Caracas, Noviembre 2006

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSTGRADO DE ENDODONCIA

APLICACIÓN DE ESTRATEGIAS DE INGENIERÍA TISULAR
PARA LA REGENERACIÓN DE PULPA Y DENTINA

Autor:
Od. Eliana Burguera R

Tutor:
Dra. María Correnti

Caracas, Noviembre 2006

Aprobado en nombre de la Universidad Central de Venezuela por
el siguiente jurado examinador:

Firma_____

(Coordinador) (Nombre y Apellido)

Firma_____

(Nombre y Apellido)

Firma_____

(Nombre y Apellido)

Lugar y Fecha:_____

Observaciones:_____

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a la memoria de mi mamá y mi abuelo, quienes ya no me acompañan, así como a mi familia, mi papá, mi abuela y mis hermanos, quienes han sido a lo largo de mi vida un permanente apoyo y una motivación para el logro de todas mis metas.

A mi esposo por su amor, comprensión y apoyo incondicional durante la carrera.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. María Correnti, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica para el desarrollo de esta tesis, en un marco de confianza, afecto y amistad.

Al Dr. Ricardo Puertas por introducirme al mundo de la ingeniería genética, y al Dr. Carlos Bóveda por regalarme la idea de escribir este trabajo.

A Gisela Burguera por todo su esfuerzo en el aporte de referencias bibliográficas.

A la Dra. Mariela Fajardo, la Dra. Aurora Lasala y el Dr. Ángel Lasala (†), así como a todos mis profesores del postgrado por contribuir en mi formación profesional, que con gran capacidad y dedicación me impulsaron en todo tiempo.

Al Dr. Miguel Aznar y la Dra. Alba Villalobos, por estimularme a seguir creciendo intelectualmente. Es un orgullo que sean mis padrinos de promoción.

A la Dra. Maytte Marcano por enseñarme que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mi.

A mis compañeros y amigos del Postgrado, Catherine, Carolina, Mariana, María Silvia, por su amistad, compañerismo y apoyo. Especialmente a Patricia y a Juan por hacerme un poco más llevaderas las dificultades que encontraba en el camino. Gracias por los buenos y malos momentos.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
1. Ingeniería tisular.....	3
2. Elementos claves de la ingeniería tisular.....	4
2.1. Componente celular: Células madres.....	6
2.1.1. Células madre embrionarias.....	7
2.1.2. Células madre adultas postnatales.....	9
2.1.3. Células madres alteradas genéticamente.....	10
2.2. Andamiaje.....	11
2.3. Morfógenos.....	16
3. Desarrollo del complejo dentino-pulpar.....	18
3.1. Etapas del desarrollo dentario.....	19
3.2. Regulación molecular del desarrollo dentario.....	23
3.3. Diferenciación de odontoblastos.....	29
4. Terapia de células madre en medicina.....	31

	Página
5. Terapia génica.....	36
5.1. Técnicas para introducir genes en el interior de la célula.....	36
5.1.1. Métodos químicos.....	36
5.1.2. Métodos físicos.....	38
a) Método biolístico.....	38
b) Electroporación.....	39
c) Microinyección.....	39
d) Transfección de ADN desnudo.....	39
e) Vectores virales.....	40
5.2. Métodos de transferencia de genes.....	40
5.2.1 Método <i>in vivo</i>	41
5.2.2 Método <i>ex vivo</i>	41
6. Regeneración pulpar y Dentinogénesis reparativa.....	43
6.1 Células madres en la regeneración de pulpa y dentina	50
6.1.1 Órganos dentarios generados a partir de células madre de la pulpa dental.....	57
6.1.2 Bioingeniería de la pulpa dental.....	63

	Página
6.2 Andamiaje usados en la regeneración de pulpa y dentina.....	64
6.3 Morfógenos en la regeneración de pulpa dentina.....	71
6.3.1. Estudios <i>in vitro</i> de los efectos de morfógenos en la dentinogénesis reparativa.....	71
a) BMP-2.....	71
b) TGFβs y BMP7.....	72
6.3.2. Estudios <i>in vivo</i> de los efectos de morfógenos en la dentinogénesis reparativa.....	73
c) BMPs, TGFβ-1.....	74
d) Otros morfógenos.....	80
7. Terapia génica en la regeneración de pulpa y dentina.....	82
7.1. Método <i>in vivo</i> para la regeneración de pulpa y dentina.....	84
7.2. Método <i>ex vivo</i> para la regeneración de pulpa y dentina.....	88
8. Regeneración nerviosa.....	94
9. Regeneración vascular.....	100
IV. DISCUSIÓN.....	103
V. CONCLUSIONES.....	113
VI. REFERENCIAS.....	116

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Estrategias de la ingeniería tisular.....	5
Gráfico 2. Células madres embrionarias.....	8
Gráfico 3. Tipos de andamiajes.....	14
Gráfico 4. Etapas del desarrollo dentario.....	19
Gráfico 5. Estadíos tempranos del desarrollo dentario en molares de embriones humanos y de ratones.....	22
Gráfico 6. Regulación del molecular del desarrollo dentario.....	26
Gráfico 7. Nudos de Esmalte.....	27
Gráfico 8. Reparación posterior a la injuria.....	44
Gráfico 9. Elementos claves de la ingeniería tisular en la regeneración del complejo dentino-pulpar.....	49
Gráfico 10. Células madre de la pulpa dental o de la médula ósea.....	51
Gráfico 11. Células madre postnatales adultas humanas in vivo e in vitro.....	53
Gráfico 12. Células madre en dientes deciduos exfoliados transplantados en ratones inmunocomprometidos.....	55
Gráfico 13. Bioingeniería de estructuras dentarias a partir de brotes de dientes de rata.....	59
Gráfico 14. Odontogénesis a partir de células madre de ratón agregadas y recombinadas con el epitelio de un molar de ratón.....	61

Gráfico 15. Generación de un tejido similar a la pulpa dental <i>in vitro</i> a partir de fibroblastos derivados de la pulpa dental.....	63
Gráfico 16. Efectos de la dentina desmineralizada sobre las células pulpares.....	66
Gráfico 17. Diferentes respuestas de reparación entre las áreas coronal y radicular de pulpas expuestas inducida por BMP-7.....	79
Gráfico 18. Terapia génica <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> para la regeneración del complejo dentino-pulpar.....	83
Gráfico 19. Electroporación <i>in vivo</i> de Gdf11 en pulpas amputadas de perros.....	86
Gráfico 20. Sonoporación <i>in vivo</i> de Gdf11 en pulpas amputadas de perros.....	87
Gráfico 21. Método <i>ex vivo</i>	90
Gráfico 22. Terapia génica con método <i>ex vivo</i> para la formación del complejo dentino-pulpar.....	91
Gráfico 23. Formación de dentina tubular con una orientación óptima para las aplicaciones clínicas.....	92
Gráfico 24. Potencial de las células madre de la pulpa dental y de los morfógenos para la regeneración dental.....	93

RESUMEN

La regeneración dentaria representa un gran desafío para los científicos e investigadores en los campos de la biología y la ciencia de los materiales. Recientemente ha surgido la ingeniería tisular como un nuevo campo para el diseño y fabricación de nuevos tejidos para sustituir aquellos afectados por enfermedad o trauma. Las estrategias de la ingeniería tisular se enfocan en una tríada compuesta de células madres provenientes del tejido huésped, de moléculas de señalización que actúen como inductores de la morfogénesis y de un andamiaje, para acelerar o inducir regeneración biológica natural. En el campo de la endodoncia las investigaciones se han orientado hacia la regeneración del complejo dentino-pulpar por medio de la terapia de recubrimiento pulpar con moléculas biológicas o el transplante de células madre que promuevan la dentinogénesis regenerativa de la pulpa y la dentina en estudios *in vitro* e *in vivo* en animales. A la par se están desarrollando, por medio de ingeniería, órganos dentarios a partir de células madre de la pulpa dental. La terapia génica también se ha implementado con muy buenos resultados en la dentinogénesis regenerativa. Esta revisión se enfoca en los progresos recientes en esta área, en la discusión de los obstáculos y desafíos para su aplicación y en su utilidad clínica en endodoncia

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha crecido el interés científico en un campo novedoso de investigaciones biológicas: la ingeniería de tejidos. El fundamento de este campo está basado en la interrelación entre la ciencia de los materiales con el principio de biocompatibilidad. Su finalidad es la generación y regeneración de tejidos mediante integración de células, andamiajes naturales o sintéticos y señales específicas, entre otros mecanismos que serán referidos mas adelante.

Para la regeneración de tejidos se han desarrollado varias estrategias. En éstas se combina un material que sirva como andamiaje, con moléculas bioactivas que inducen la formación de tejidos, o con células cultivadas en el laboratorio.

Las moléculas bioactivas son, con frecuencia, proteínas o factores de crecimiento que están involucrados en la formación y remodelación de los tejidos. La hipótesis básica de esta estrategia es que la distribución local de un factor apropiado, a una dosis correcta, por un período definido de tiempo, pueda conducir al reclutamiento, proliferación y diferenciación de células del paciente de sitios adyacentes. Estas células pueden participar en la reparación o regeneración en el lugar anatómico requerido.

La estrategia basada en el uso de células cultivadas en laboratorio y colocadas en una matriz en el sitio donde se desea la regeneración o formación de un nuevo tejido, consiste en el

trasplante de células derivadas, por lo general, de una pequeña biopsia del tejido del espécimen. Estas son posteriormente expandidas en el laboratorio para permitir la ingeniería de una masa de tejido extenso, el cual proviene en parte de las células trasplantadas.

Ambas estrategias utilizan un biomaterial para llevar las moléculas o células al sitio anatómico apropiado, el cual además proporciona un soporte mecánico pues actúa como andamiaje para guiar la nueva formación del tejido. Los materiales sintéticos utilizados comúnmente son polímeros lácticos y glicólicos, que por sus propiedades biológicas de biocompatibilidad y propiedades físicas, como degradación y fuerza mecánica, los hacen de fácil manipulación. Un polímero natural, el colágeno tipo I, es utilizado con frecuencia por su relativa biocompatibilidad y capacidad de ser remodelado por las células. También se ha ensayado con otros polímeros utilizados en odontología como el alginato.

El campo de la ingeniería tisular ofrece un enorme potencial de aplicaciones clínicas en un futuro muy cercano.

El objetivo de esta revisión es facilitar una perspectiva general de los enfoques sobre ingeniería tisular, los progresos recientes en este campo, la discusión de los desafíos para su utilidad clínica en Endodoncia y el posible impacto en la práctica clínica

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

1. INGENIERÍA TISULAR

La ingeniería de tejidos es el campo que se encarga de la restauración funcional de la estructura y fisiología tisular para aquellos tejidos dañados o deteriorados ya sea por cáncer, enfermedad y/o traumatismos ⁽¹⁾.

El término ingeniería tisular, fue definido inicialmente por los asistentes a la primera reunión patrocinada por National Science Foundation (NSF) en 1988, como “la aplicación de los principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida, hacia la comprensión fundamental de la relación función-estructura en tejidos de mamíferos normales y patológicos, y el desarrollo de sustitutos biológicos para la reparación y regeneración del tejido o la función de un órgano”⁽²⁾.

En 1993 Langer y Vacanti ⁽³⁾ resumieron los desarrollos anteriores en este campo y definieron la ingeniería tisular como: “un campo interdisciplinario que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren los tejidos o la función de órganos”.

Según Bianco y Gheron ⁽⁴⁾, la ingeniería tisular, en un sentido clásico, implica el uso de células de órganos específicos para sembrarse en andamiajes *ex vivo*. La naturaleza de la ingeniería tisular basada en células, sirve para definirla y distinguirla de la

regeneración tisular guiada, en la cual el andamiaje es designado para estimular la regeneración solamente por las células residentes del sitio donde es transplantado.

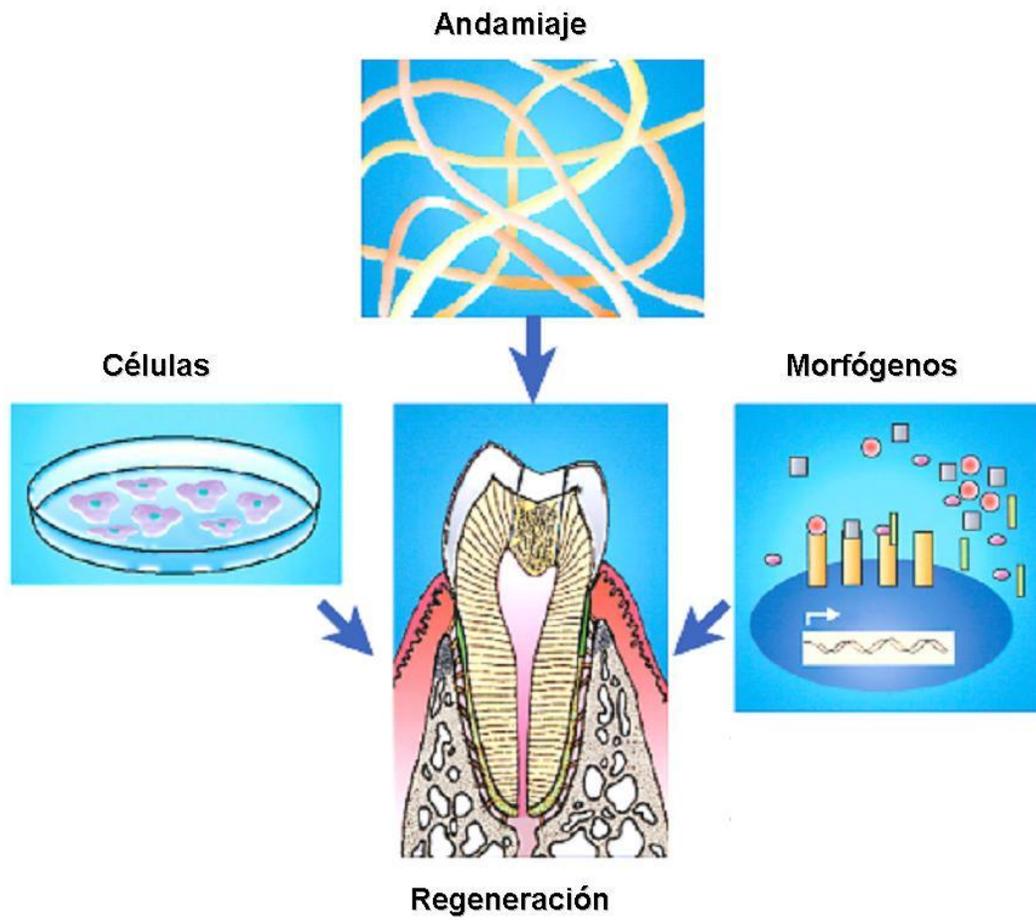
La ingeniería tisular ha emergido recientemente como una alternativa potencial al trasplante de tejidos o de órganos. Con esta tecnología la pérdida de un tejido o la falla de un órgano puede ser tratada ya sea por implantación de un sustituto diseñado biológicamente o alternativamente con sistemas de perfusión *ex vivo*. (2)

2. ELEMENTOS CLAVES DE LA INGENIERÍA TISULAR

Los enfoques actuales en la regeneración por medio de la ingeniería tisular se basan en la siguiente triada:

- 2.1. Estrategias para formar una estructura vital de células, tanto células autólogas completamente diferenciadas del tipo deseado, como células madre que han sido aisladas y expandidas *in vitro* para restaurar la función tisular,
- 2.2. Estrategias inductivas en las cuales se incorporen factores de crecimiento adicionales o morfógenos dentro del andamiaje/matriz para modificar el comportamiento celular,
- 2.3. El uso de un andamiaje tridimensional pasivo de matriz extracelular para proporcionar un ambiente local que sea conducente a la formación de nuevo tejido (1, 5, 6).

Gráfico 1. Diagrama de los estrategias de la ingeniería tisular



Tomado de Nakashima y Reddi 2003

2.1 COMPONENTE CELULAR: CÉLULAS MADRE

Una de las tesis actuales de la ingeniería tisular exitosa afirma que se requieren células madre embrionarias, fetales o postnatales, aisladas por protocolos complejos. Sin embargo, como se discutirá más adelante, existen hallazgos recientes que cuestionan esta afirmación (5).

Las células madre son células progenitoras indiferenciadas que mantienen este fenotipo por el ambiente y/o las poblaciones celulares adyacentes, hasta que son expuestas y responden a señales apropiadas. Tienen la capacidad de autorenovarse o autoreplicarse durante periodos prolongados sin envejecer. Poseen la propiedad de diferenciarse en múltiples células más especializadas que se originan en cualquiera de las capas germinativas, a lo largo de la vida del organismo (7, 8).

Las células progenitoras o precursoras son similares a las células madre porque mantienen el potencial de diferenciación y una alta capacidad de proliferación, pero han perdido la propiedad de autoreplicación, al contrario de las células madre (7, 8).

Investigaciones recientes sugieren la capacidad y el potencial de las células madre adultas de diferenciarse en un amplio espectro de fenotipos bajo circunstancias apropiadas. Esta característica ha sido denominada: “plasticidad de las células madre” y está provocada por la fusión de células madre con células endógenas específicas del tejido (9-11).

El reto en usar las células madre para la regeneración tisular es dirigir su diferenciación en la vía deseada. Además de su capacidad para diferenciarse en múltiples tipos de células, las células madre interactúan con el estroma del tejido en el sitio de la implantación, y en consecuencia repoblan el mismo con un tipo de célula específica. Esta propiedad, conocida como desplazamiento, se cree que es regulada por moléculas de señalización en el ambiente local (12).

Enfoques adicionales usados para conducir la diferenciación de células madre hacia el tipo de célula deseada, incluyen el co-cultivo con un aislamiento de la misma, el uso de condiciones de cultivo de células inductivas (por ejemplo, suplemento de medios con factores de crecimiento) y modificaciones genéticas (5).

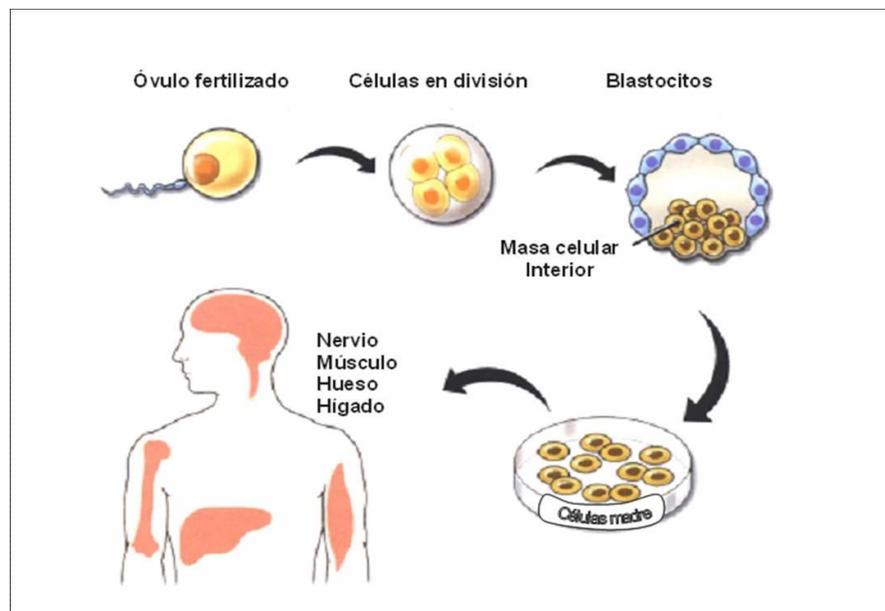
2.1.1. Células madre embrionarias

Desde el aislamiento inicial y caracterización de las células madre embrionarias humanas, ha habido un interés significativo en el uso potencial de estas células para la regeneración tisular. Las células madre fetales o embrionarias se derivan de la masa celular interior de blastocitos fetales y tienen la característica de ser pluripotenciales (5, 7).

En una percepción simple, un óvulo fertilizado representa el fundamento de las células madre, debido a que es totipotencial y puede desarrollarse en un organismo completo. (13).

En el desarrollo temprano, el óvulo fertilizado experimenta varias rondas de división celular rápida antes de que las células comiencen a especializarse. En el estadio de blastocitos del desarrollo, se comienza a desarrollar un compartimiento especializado denominado la masa celular interior. Las células de la masa celular interior han sido denominadas células madre embrionarias (13).

Gráfico 2. Células madres embrionarias



Las células madre embrionarias son derivadas de la masa celular interior de blastocitos embrionarios humanos. Se ha demostrado que estas células tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares y pudiesen reemplazar o regenerar tejidos. *Tomado de Krebsbach y Gehron Robey 2002*

A pesar de que las células fetales pareciesen tener un gran potencial en el campo de la ingeniería de tejidos, el entusiasmo respecto a su aplicación ha sido afectado por consideraciones

éticas, religiosas, políticas, e igualmente por la escasez de líneas celulares. Además existe la preocupación de la posibilidad de rechazo en el hospedero y la evidencia reciente que apunta al potencial de formación de teratomas y teratocarcinomas. Con el objeto de soslayar algunos de estos tópicos, se están explorando otras fuentes potenciales de células madre, como células madre derivadas de la placenta y de la sangre del cordón umbilical (5, 7, 14).

2.1.2. Células madre adultas postnatales

Las células madre adultas postnatales son multipotenciales, ya que por medio de estímulos apropiados, pueden inducir el desarrollo de un número de diferentes tipos de células dentro de un tejido específico, como osteoblastos, odontoblastos, adipositos y células neuronales (15).

Las fuentes potenciales de células madre postnatales incluyen células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea, derivadas del músculo, de la epidermis, de los nervios, del hígado y del tejido adiposo (7).

En estudios *in vitro*, las células madre adultas multipotenciales parecieran ser capaces de experimentar transdiferenciación para formar otro tipo de tejidos, aunque el significado de este fenómeno *in vivo* es incierto (8).

En conjunto las células madre adultas parecen estar potencialmente más limitadas, comparadas con las células madre embrionarias, pues son difíciles de recolectar en suficiente cantidad y requieren técnicas de aislamiento especializadas. (5, 7) Así como las células madre embrionarias, existe evidencia reciente que plantea la aparición de tumorigenicidad, lo que significa que se necesitan investigaciones adicionales para el uso difundido de células madre adultas para la regeneración tisular (5).

2.1.3. Células madre alteradas genéticamente

Hallazgos recientes cuestionan el dogma según el cual, tanto las células madre fetales como adultas son necesarias para la regeneración tisular exitosa. Ciertos tipos de células de mamíferos pueden ser inducidas a desdiferenciarse en células progenitoras, cuando son estimuladas con señales apropiadas. La población de células derivadas de fibroblastos aisladas de la grasa, dermis y encía, tienen un potencial significativo en la regeneración de tejidos duros, sólo cuando son suplementadas con factores de crecimiento específico, ya sea por alteración genética o a través del suplemento con proteínas recombinantes (5).

Edwards y cols. (16) encontraron que preparaciones relativamente inmaduras de células derivadas de fibroblastos, pueden servir potencialmente como fuentes de células plásticas diferenciadas para la regeneración de tejidos, cuando son

alteradas con moléculas de señalización y con la orientación de señales locales en el ambiente de cicatrización.

Estas células no son verdaderas células madre, ya que sólo son capaces de regenerar tejidos, cuando son alteradas genéticamente con factores de crecimiento específicos o morfógenos ⁽¹⁶⁾.

2. 2. ANDAMIAJE

El andamiaje es un soporte que proporciona un microambiente fisicoquímico y biológico tridimensional para el crecimiento y diferenciación celular, promoviendo la adhesión y migración celular. El andamiaje sirve como un transportador de morfógenos para la terapia de proteínas y como un portador de células para la terapia celular ⁽¹⁷⁾.

Se requiere una matriz biodegradable para facilitar la entrega de células a la zona de la herida, así como también para proporcionar un soporte tridimensional para preservar el espacio del defecto en anticipación de la formación de nuevo tejido ⁽⁵⁾.

El andamiaje ideal para la regeneración tisular debe ser relativamente fácil de manejar, aceptar la incorporación de células, admitir la difusión libre de células y factores de crecimiento, permitir el establecimiento de un lecho vascular para asegurar la supervivencia de las células implantadas,

inducir una respuesta inflamatoria mínima y por último ser biodegradable ⁽⁵⁾.

Sharma y Elisseeff en 2004 ⁽¹⁸⁾ agregan varias características para el andamiaje ideal como son: ser eficaz para el transporte de nutrientes, oxígeno y desechos. Debe ser degradado gradualmente y reemplazado por tejido regenerativo, manteniendo las características de la estructura tisular final. Debe tener biocompatibilidad, carecer de citotoxicidad y debe tener una adecuada resistencia física y mecánica.

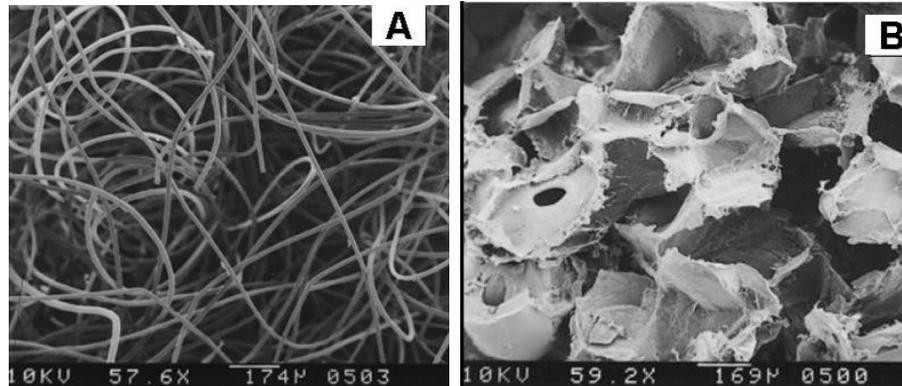
En contraste a las situaciones ortopédicas, en las cuales el andamiaje debe ser lo suficientemente fuerte para tolerar inmediatamente fuerzas biomecánicas considerables, la fortaleza puede ser de menor consideración cuando se regeneran defectos relativamente pequeños periodontales o dentales. Esto sin embargo no obvia la necesidad de considerar el resultado del efecto biomecánico de las fuerzas oclusales tanto en la dentición como en los tejidos subyacentes. Desde la perspectiva de los agentes de recubrimiento pulpar, así como para la regeneración periodontal, sería ventajoso tener una formulación maleable o inyectable, permitiendo que se adapte a la forma del defecto ⁽⁵⁾.

Una gran variedad de materiales han sido empleados como matrices en la ingeniería tisular ^(19, 20). Los polímeros naturales, como el colágeno y el glucosaminoglicano ofrecen una buena biocompatibilidad y bioactividad. Por otro lado los polímeros sintéticos pueden tener características fisicoquímicas determinadas, como ritmo de degradación, microestructura y

resistencia mecánica. Los materiales sintéticos comúnmente utilizados son el ácido (poli)láctico (PLA), el ácido (poli)glicólico (PGA) y sus copolímeros, el ácido (poli)láctico-co-glicólico (PLGA). Los hidrogeles sintéticos incluyen los polímeros basados en (poli)etilenglicol (PGE), y aquellos modificados con péptidos de adhesión de superficie celular, como la arginina, la glicina y el ácido aspártico (RGD), que pueden mejorar la adhesión celular y la síntesis de matriz dentro de la red tridimensional (19- 22). (Gráfico 3)

Los polímeros biodegradables sintéticos son materiales de andamiaje atractivos debido a que pueden ser producidos rápidamente con un amplio rango de propiedades reproducibles. Además, la degradación en el tiempo de estas matrices sintéticas puede ser designada para coincidir con la formación del nuevo tejido mediante células cultivadas. Esto puede permitir la formación de un tejido completamente natural, sin un cuerpo extraño permanente (22).

Gráfico 3. Tipos de andamiajes



A. Fotomicrografía de una malla basada en fibras de ácido poliglicólico utilizado como matriz o andamiaje. B. Fotomicrografía de una esponja porosa de ácido polilactoglicólico utilizado como matriz o andamiaje. *Tomado de Baum y Mooney. 2000*

Aunque los polímeros sintéticos han sido ampliamente utilizados, tienen algunas desventajas inherentes. Sus productos de descomposición pueden tener un efecto adverso en la cicatrización de la herida. ⁽¹⁹⁾ Además, las células añadidas necesitan ser sembradas dentro del material de matriz, lo cual requiere de cultivos de células *ex vivo* por períodos de tiempo prolongados. Adicionalmente estas células suelen tener la dificultad para adherirse al polímero ⁽⁵⁾.

El colágeno tipo I, un componente mayor del hueso, la pulpa dental, y el ligamento periodontal, es biocompatible y se ha demostrado que promueve la regeneración de defectos de tejido duro en diferentes modelos. No obstante, los sistemas basados en colágeno por si mismos, son estructuralmente débiles ⁽¹⁹⁾.

La naturaleza porosa de los geles de alginato, un polisacárido biodegradable, permite la migración de células y proteínas

reguladoras dentro de la red. Se ha sugerido que las modificaciones químicas diseñadas para acoplar la tasa de degradación del alginato a la formación de nuevo tejido, pueden aumentar significativamente la tasa de regeneración tisular (23).

Los andamiajes que contienen compuestos inorgánicos como la hidroxiapatita y el fosfato de calcio se emplean para potenciar la conductividad ósea (24).

Los constituyentes de la matriz extracelular juegan un rol en la mineralización, adhesión celular y la diferenciación. Existen métodos para mejorar las propiedades de los materiales de andamiaje por medio de la introducción de fragmentos biomiméticos (por ejemplo, la introducción de secuencias de péptidos de adhesión de integrinas tiene un potencial tremendo en el campo de la regeneración de tejidos) (25, 26).

Por otra parte, ningún material de matriz es adecuado para todas las situaciones. Podría ser que la mezcla de dos o más materiales, diseñados para tomar ventajas del mecanismo ideal y/o las propiedades biológicas de los componentes individuales pareciera convertirse en la opción más promisorio (5).

2.3. MORFÓGENOS/ FACTORES DE CRECIMIENTO

El término morfogen es usado para describir un tipo particular de molécula de señalización que actúa directamente en las células para inducir una respuesta celular distinguible en forma dependiente a la concentración (27).

Los morfógenos son moléculas de señalización secretadas extracelularmente que gobiernan la morfogénesis durante las interacciones epiteliales-mesenquimáticas (28,29).

La regulación tanto de la formación del diente así como del aparato de inserción periodontal es mediada por una compleja cascada de interacciones que involucran cuatro familias principales de proteínas: proteínas óseas morfogenéticas (BMPs, por sus siglas en inglés de Bone Proteins Morphogenetic), factores de crecimiento de los fibroblastos (FGFs, por sus siglas en inglés Fibroblast Growth Factor), y la familia de proteínas inhibitorias: proteínas sin alas o relacionadas con int (Wnts) y proteínas hedgehog (Hhs) (6, 28- 30).

De estas, las BMPs pareciesen ser determinantes como reguladoras de la formación de hueso y tejidos duros dentarios. Las BMPs son una familia de factores de crecimiento que ejercen su función, por la estimulación de la diferenciación de células precursoras no comprometidas en osteoblastos. Un número reciente de artículos ha revisado la actuación potencial de las BMP en la regeneración ósea humana (17, 31- 34).

La familia de las BMP puede ser dividida en cuatro subfamilias, primero las BMP2 y BMP4; segundo la BMP3 y

BMP3B, conocida como factor de crecimiento/diferenciación 10 (GDF10); tercero las BMP5, BMP6, BMP7 y BMP8 y por último GDF5, GDF6 y GDF7, también llamadas proteínas morfogenéticas derivadas del cartílago 1,2, y 3 ⁽⁶⁾.

Los mecanismos del desarrollo dentario, como son morfogénesis, histogénesis, citodiferenciación, así como las moléculas que se encuentran involucradas en estos procesos, son de gran importancia para el estudio de la regeneración dentaria o de la reconstitución de un órgano dentario debido a que estos mecanismos pareciesen ser similares.

3. DESARROLLO DEL COMPLEJO DENTINO-PULPAR

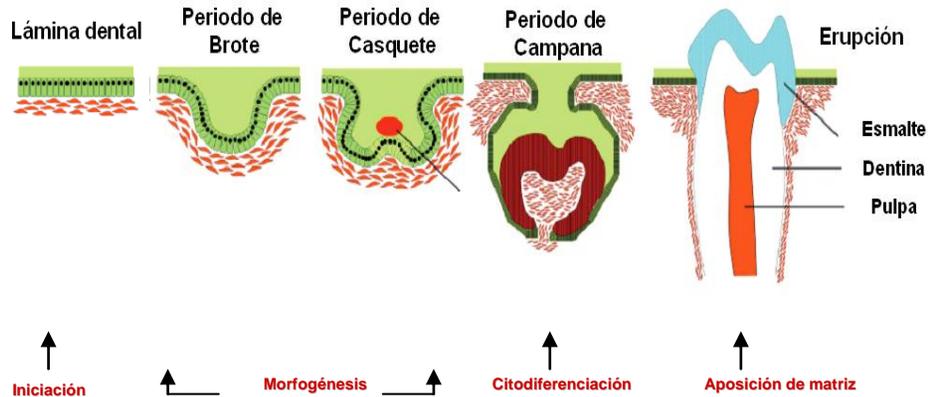
La dentina es un tejido conectivo mineralizado avascular único, que representa la mayor parte del diente. Está por debajo del esmalte en la corona y del cemento en la raíz, proporcionando un soporte estructural a estos tejidos y de elasticidad al diente. En el diente maduro, la dentina encierra un tejido conectivo blando, ricamente innervado y altamente vascularizado, la pulpa dental. La dentina y la pulpa se derivan de la papila dental, cuyas células migran al primer arco branquial desde el interior del ectomesénquima de la cresta neural craneal. Estos tejidos se mantienen íntimamente asociados durante el desarrollo y a lo largo de toda la vida del diente y por consiguiente, son referidos como el “complejo dentino-pulpar” (35).

A pesar de que el diente es un órgano único, los principios que dirigen su desarrollo son semejantes morfológicamente a los de otros órganos como pulmones, hígado, corazón, glándulas mamarias y folículo del cabello (35-38). El mecanismo central que regula la morfogénesis de esos órganos está dado por las interacciones entre el ectodermo y el mesénquima, dos tejidos con diferentes orígenes (35, 36). La morfogénesis dentaria es un proceso avanzado regulado por interacciones dinámicas, secuenciales y recíprocas entre los tejidos epiteliales y mesénquimáticos, específicamente entre el ectodermo derivado del epitelio estomacal y del mesénquima derivado de la cresta neural (6, 35, 36, 39, 40). En este proceso el ectodermo oral simple se engrosa, brota, crece, y se pliega para formar la forma compleja de la corona dentaria (6, 35-40).

3.1. ETAPAS DEL DESARROLLO DENTARIO

El desarrollo dentario ocurre en distintas etapas fácilmente reconocibles a nivel microscópico. Por consiguiente, las etapas de la odontogénesis son descritas por la apariencia histológica del órgano del diente, a saber: etapa de la lámina, de brote, de casquete y de campana. Sin embargo la literatura moderna utiliza una terminología funcional para describir la odontogénesis en cuatro fases: iniciación, morfogénesis, diferenciación celular o citodiferenciación y aposición de matriz (35).

Gráfico 4. Etapas del desarrollo dentario



Tomado de Nakashima y Reddi. 2003

La fase de iniciación comienza con el engrosamiento del epitelio oral y la formación de la *lámina dental* (6, 35, 37, 39, 41, 42). En ratones esto puede observarse al día 11 de la embriogénesis

(E11) marcando las posiciones de las formaciones dentales en la superficie oral del primer arco branquial. En los humanos esto ocurre a la sexta semana del desarrollo embrionario (35, 39). (Gráfico 5)

En la fase de morfogénesis, el epitelio de la lámina dentaria prolifera en sitios localizados, formando una serie de engrosamientos redondos o alargados denominados *brotos* que dan origen al nombre de esta etapa; estos se extienden hacia el mesénquima subyacente y se invaginan en éste. El mesénquima queda rodeado del epitelio dental formando la *papila dentaria*, que da origen a la pulpa y a los odontoblastos que forman la dentina (6, 35, 39, 42).

Las células periféricas del mesénquima dental comprenden el brote dentario y se extienden alrededor del epitelio dental formando el *órgano del esmalte*, que por invaginación presenta una forma de casquete, siendo éste el estado evolutivo denominado *estadio de casquete* (6, 39, 42).

La capa celular exterior del órgano del esmalte se denomina *epitelio externo del esmalte*, mientras que la interna se denomina *epitelio interno del esmalte*. Las células epiteliales del interior del órgano del esmalte están separadas por una sustancia intercelular compuesta por glucosaminoglucanos ácidos, producidos por las células epiteliales que se pueden distinguir en un retículo celular, *el retículo estrellado*. Las células del epitelio externo del esmalte son cúbicas, mientras que las células del

epitelio interno se transforman en cilíndricas, debido a que se diferencian en ameloblastos (41, 42).

Para este momento, la constante invaginación del órgano del esmalte le ha conferido una forma de campana, por lo que se habla del *estadío de campana* (6, 39, 42).

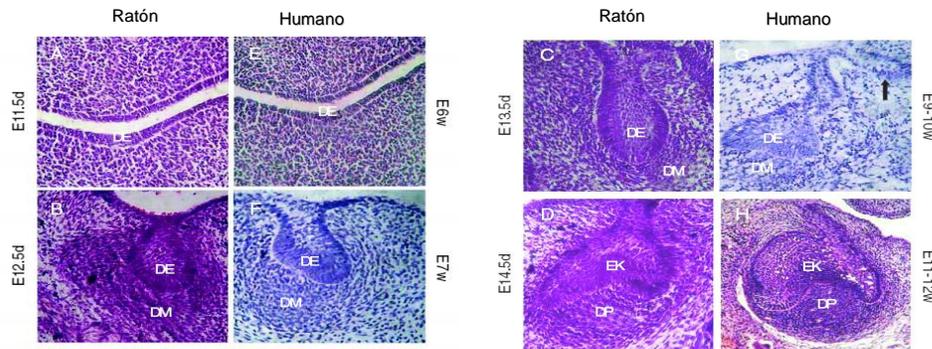
En la fase de citodiferenciación, las células mesenquimáticas de la papila dentaria cercanas al epitelio interno del esmalte, se diferencian poco después del desarrollo de los ameloblastos formando un estrato de células altas y cilíndricas, *los odontoblastos*, que forman una capa densa semejante a un epitelio: la *dentina* (6, 39, 42).

Con el engrosamiento de la capa de dentina, los odontoblastos retroceden hacia la papila dental, dejando una fina prolongación citoplasmática – *el proceso odontoblástico*- en la parte posterior de la dentina. La capa de odontoblastos persiste durante toda la vida del diente y constantemente produce predentina, que en una etapa ulterior se transforma en dentina. Las células restantes de la papila dental forman la pulpa del diente (41).

Entre tanto, las células epiteliales del epitelio dental externo se diferencian en *ameloblastos*, que son las células que forman el esmalte-. Estas células producen largos prismas de esmalte que se depositan sobre la dentina. La capa de contacto entre las capas de esmalte y de dentina se denomina unión amelodentinaria (41).

Luego de la formación de la corona del diente comienza el desarrollo de la raíz. A la altura del futuro cuello se pliegan los epitelios externo e interno del esmalte formando la *vaina radicular epitelial*, que da origen a la raíz. La vaina radicular crece hacia abajo y penetra en el mesénquima donde induce el desarrollo de odontoblastos, que dan origen a la dentina de la raíz. A medida que se forma la dentina radicular, desaparece la vaina radicular epitelial para producir la formación de una capa de cemento alrededor de la dentina. El cemento es producido por cementoblastos que se diferencian del mesénquima circundante y se pueden considerar osteoblastos modificados. El mesénquima circundante se ha diferenciado en una estructura semejante a una capsula que rodea todo el primordio dentario: el saco dentario. Junto a los odontoblastos, da origen a la membrana periodóntica. Esta es **la etapa de aposición de matriz** (6, 39, 42).

Gráfico 5. Estadíos tempranos del desarrollo dentario en molar en embriones humanos y de ratones



(A-D): (A) El germen dentario del molar de ratón en la etapa de lámina, (B) en la etapa temprana de brote, (C), en la etapa tardía de brote y (D) en la etapa de casquete. (E-H): (E) El germen dentario del molar humano en la etapa de lámina, (F) en la etapa temprana de brote, (G) en la etapa tardía de brote y (H) en la etapa de casquete. Abreviaciones: DE, epitelio dental; DM, mesenquima dental; DP, papila dental; EK, nudo de esmalte; *Tomado de Zhang y cols., 2005*

3.2. REGULACIÓN MOLECULAR DEL DESARROLLO DENTARIO

El uso de cultivos de órganos dentarios y técnicas recombinantes, así como la aplicación de métodos moleculares y genéticos modernos, significa un adelanto en la comprensión de los genes responsables de la morfogénesis dentaria ⁽³⁵⁾.

Los dos grupos principales de moléculas que están involucradas en el intercambio recíproco de información entre el epitelio y mesénquima del diente, son los factores de transcripción y los factores de crecimiento. Los factores de transcripción son proteínas que se unen al ADN cerca del comienzo de la región de transcripción del gen. Estos regulan la

expresión génica, ya sea facilitando o inhibiendo la unión de la enzima ARN polimerasa al ADN, involucrada en la iniciación y mantenimiento de la transcripción. Los factores de transcripción se encuentran rara vez en grandes cantidades y no son secretados fuera de la célula. En general, desempeñan funciones críticas celulares o específicas a los tejidos. (35).

Los factores de crecimiento son proteínas secretadas, que son capaces de unirse a receptores específicos en la superficie de la célula. Las interacciones subsecuentes con los componentes de la membrana citoplasmática, conducen a una serie de eventos intracelulares complejos (transducción de señales) que resultan en una expresión génica modificada, estos cambios activan el crecimiento y la diferenciación celular. La mayoría de los factores de crecimiento son sintetizados a niveles más altos que los factores de transcripción y desempeñan funciones versátiles. En muchos casos, las funciones de un factor de crecimiento se superponen con aquellas relacionadas al miembro de la familia a la cual pertenecen (35).

Existen numerosas moléculas de señales paracrinas de varias familias que están involucradas críticamente en el desarrollo dental embrionario ya que median la comunicación celular durante este proceso (36).

Los cambios moleculares en el mesénquima dental están afectados por las siguientes familias de moléculas: proteínas óseas morfogenéticas (BMPs), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), las familia de proteínas inhibitorias mutuamente:

proteínas sin alas o relacionadas con int (Wnts) y proteínas hedgehog (Hhs) (6, 35, 36, 39). Y también por moléculas transcripcionales como la Msx-1, Msx-2, y genes homeobox, Lef-1 y Pax9 (35). (Gráfico 6)

Otras moléculas de señalización incluyendo los genes notch, factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento de hepatocitos y familias de factores de crecimiento derivado de las plaquetas, pueden también influenciar el desarrollo dentario; sin embargo, todavía queda por ser dilucidada la naturaleza exacta de su intervención (35).

Aún cuando estas señales regulan principalmente las interacciones entre el ectodermo y el mesénquima, también median la comunicación dentro de cada capa de tejido (6, 36, 39).

Los genes regulados por las diferentes señales incluyen factores de transcripción y receptores de señales que regulan la capacidad de las células para responder a las siguientes señales, así como a nuevas señales que actúan recíprocamente, y en consecuencia continúa la comunicación entre células y tejidos (28, 43).

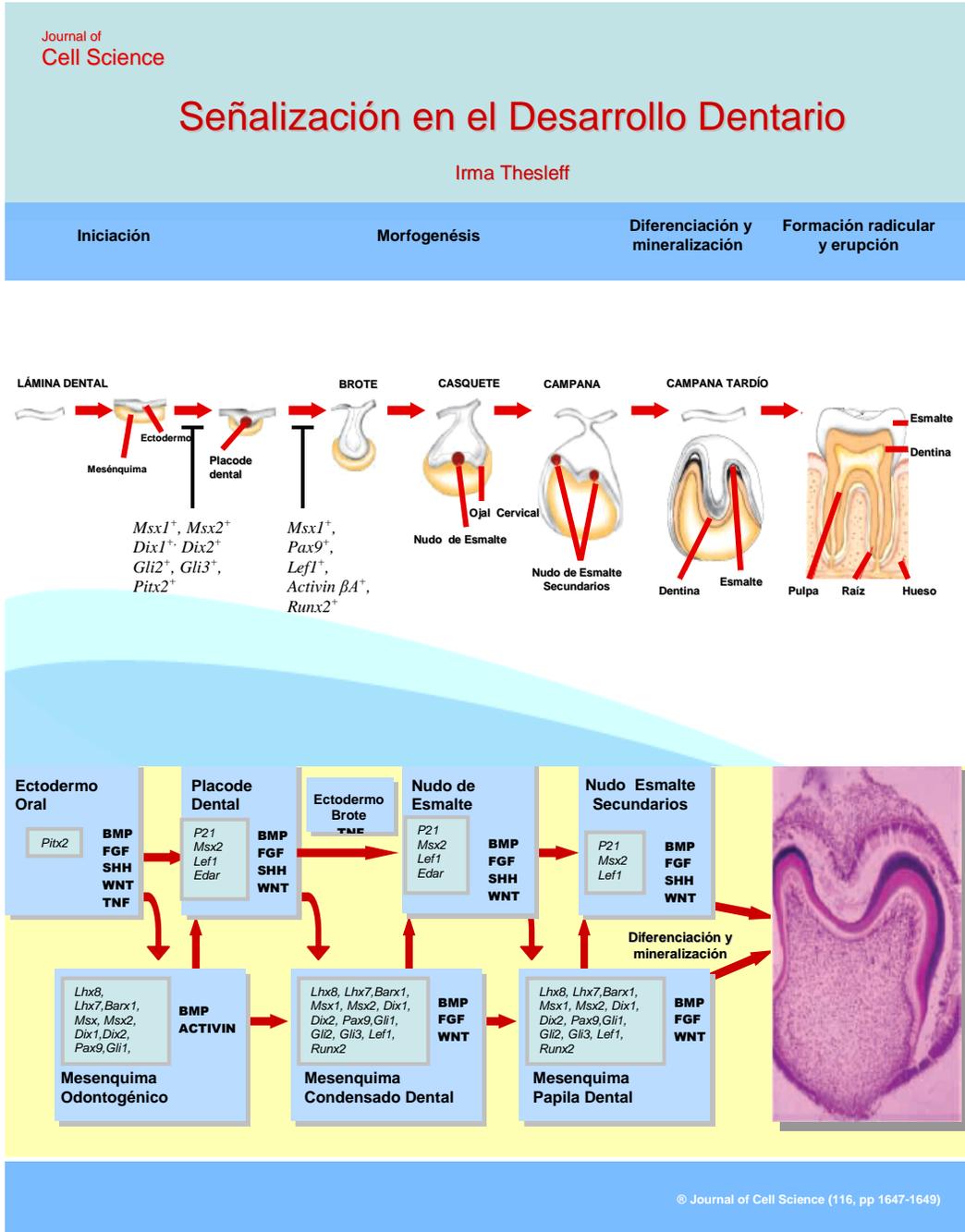
Las mismas señales son utilizadas secuencialmente durante todo el proceso de morfogénesis, y muchas señales a menudo muestran co-expresión. Un rasgo característico del desarrollo dentario es la aparición de centros de señalización transitoria en el epitelio durante los pasos claves de la morfogénesis. Estos

centros de señalización expresan más de diez moléculas de señales diferentes que incluyen Shs, BMPs, FGFs y Wnts. (36).

El primer centro de señalización aparece en el placoda dental cuando comienza el brote epitelial. Posteriormente, en la transición brote-casquete aparece otro centro de señalización, *el nudo del esmalte*. Éste regula la morfogénesis avanzada de la corona del diente y controla la iniciación de nudos de esmalte secundarios en los sitios de pliegos epiteliales que marcan la formación cuspídea (36, 39, 44- 46). (Gráfico 7)

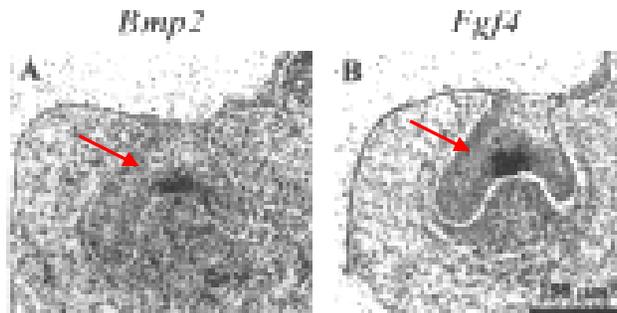
Las células del nudo del esmalte expresan, en patrones anidados, diferentes moléculas de señales que incluyen Shh, Bmp-2, Bmp-4 y Bmp-7; Fgf-3, Fgf-4, Fgf-9 y Fgf-20; Wnt-3, Wnt-10a y Wnt-10b. Las señales del nudo del esmalte afectan tanto a las células del epitelio como a las células del mesénquima, y así como las interacciones recíprocas entre el mesénquima y el epitelio son responsables del mantenimiento del nudo del esmalte, también lo son para la morfogénesis subsiguiente del epitelio. Las señales del nudo del esmalte también regulan el modelaje de la corona dentaria, ya que influyen en la iniciación de nudos de esmalte secundarios que expresan una mayor parte de las mismas moléculas de señales que los nudos de esmalte primarios. Estos se forman en una secuencia exacta y determinan los sitios donde la lámina epitelial se pliega y comienza el desarrollo de las cúspides. El desarrollo de éstas es regulado por señales de los nudos de esmalte primarios y secundarios previamente formados, junto a las señales mesenquimáticas (36).

Gráfico 6. Regulación del molecular del desarrollo dentario

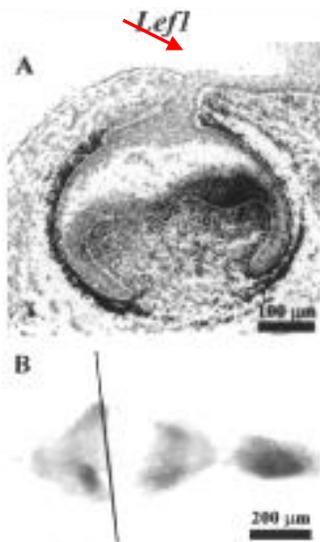


El dibujo esquemático ilustra el principio general del desarrollo de los organismos multicelulares, demostrando que las células y los tejidos se comunican por medio de moléculas de señales, las cuales son utilizadas reiterativamente durante la morfogénesis avanzada. La variación en la respuesta celular a las mismas señales, en diferentes tejidos y en diferentes momentos, es causada por las diferentes historias de las células, determinando su capacidad para recibir y responder a las señales. Sin embargo, la red de señalización que regula la morfogénesis dentaria es mucho más compleja que la representada en esta ilustración esquemática. *Tomado de Thesleff 2003*

Gráfico 7. Nudos de Esmalte



7.1 El nudo del esmalte primario expresa muchas moléculas de señalización como Bmp-2 y Fgf-4. Análisis de hibridación *In situ* de secciones al final del estadio de casquete del germen. *Tomado de Thesleff y cols. 2001.*



7.2 El nudo del esmalte secundario expresa muchas moléculas de señalización como familias de BMP, FGF, hedgehog, y Wnt. Además, algunos factores de transcripción como Lef1, son co-localizados con las señales (A) Sección de tejido en el periodo de campana mostrando la expresión de Lef1 en el nudo de esmalte secundario. (B) Hibridación *in situ* del germen dentario demuestra que la expresión de Lef-1 en el nudo del esmalte corresponde a la formación de las cúspides. Esta vista oclusal muestra 4 nudos de esmaltes secundarios en el segundo molar (derecha). La línea demuestra la localización de la sección en (A) *Tomado de Thesleff y cols. 2001*

3.3. DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS

La diferenciación de odontoblastos es iniciada en la punta de la cúspide en la capa más periférica de las células de la papila dental, las cuales se alinean en la interfase epitelial-mesenquimática y siguen tres pasos: inducción, competencia y diferenciación terminal ⁽³⁵⁾.

El primer paso comienza por medio de señales inductivas provenientes de las células epiteliales internas, en su mayoría miembros de la familia del factor de crecimiento transformador beta (TGF- β) tales como BMP-2, BMP-4 y TGF- β 1, las cuales quedan parcialmente aisladas en la lámina basal donde se alinean las células periféricas de la papila dental ⁽³⁵⁾.

El siguiente paso es la competencia, en la cual se ha completado un número determinado de divisiones celulares y las células expresan receptores de factores de crecimiento específicos ⁽³⁵⁾.

En la fase final de la división celular, sólo la capa más periférica de células subyacentes a la lámina basal responde a señales de epitelio dental interno para diferenciarse en odontoblastos. Así, la capa subodontoblástica de células de la papila dental, representa a las células de la papila dental, que son células competentes expuestas a la mismas señales inductivas que los odontoblastos diferenciados, pero carecen de la señal final ⁽³⁵⁾.

Los odontoblastos diferenciados son células postmitóticas las cuales son morfológicamente diferentes a las células de la pulpa dental. Debido a que la diferenciación ocurre en dirección apical, la forma redondeada a cuboidal de estas células cambia a una forma columnar alta. A nivel subcelular, las células adquieren un aparato sintético y secretor por medio del desarrollo de un retículo endoplasmático rugoso extendido y del aparato de Golgi junto con numerosos lisosomas. El núcleo se mueve al polo opuesto de la célula en una posición contraria al interior de las células de la papila dental para acomodar las organelas y para prepararse para la secreción de los componentes de matriz de dentina de manera apical y unidireccional. La repolarización del núcleo es uno de los signos de la terminación de diferenciación del odontoblasto (35).

4. TERAPIA DE CÉLULAS MADRE EN MEDICINA

La terapia de células madre puede ser definida como el tratamiento de la enfermedad por la movilización o trasplante de células madre autólogas o alogénicas en el hospedero. El principio fundamental de la terapia de células madre es que después que las células indiferenciadas son dirigidas al hospedero lesionado y migran hacia el sitio de la herida, estas se diferencian bajo la influencia de señales locales, en células de fenotipo apropiado (7).

Las células madre adultas son las primeras candidatas para la terapia celular en vista de que son fáciles de aislar y tienen un potencial amplio de diferenciación y proliferación *in vitro*. Gran cantidad de evidencia científica apunta al potencial terapéutico de estas células en estudios preclínicos y en modelos clínicos (7). La médula ósea es una fuente rica de estas células; también estas células han sido aisladas de la grasa (46), del músculo esquelético (47), de los dientes deciduos humanos (48), y del hueso trabecular (49).

El trasplante de células madre hematopoyéticas ha sido utilizado para el tratamiento de la leucemia y tumores (50).

Algunos ejemplos notables del uso terapéutico de las células madre mesenquimáticas de la médula ósea adulta han sido reportados recientemente.

Orlic y cols. en 2001 ⁽⁵¹⁾ demostraron que la dispensación local de células derivadas de la médula ósea puede generar un “novo miocardio”, lo que indica que la terapia de células madre puede ser de utilidad en el tratamiento de la enfermedad coronaria de las arterias.

Toma y cols. (2002) ⁽⁵²⁾ reportaron que las células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea humana, cuando son dispensadas por infusión en un ratón inmunocomprometido, se pueden injertar al miocardio normal y diferenciar en fenotipos de cardiomiocitos.

En concordancia con esta investigación Stamm y cols. 2003 ⁽⁵³⁾ demostraron la utilidad práctica de esta metodología en un estudio que involucró reparto de células de la médula ósea en la zona afectada en pacientes con infarto al miocardio. El resultado de este tratamiento fue la mejoría dramática en la función global del corazón.

Igualmente, Deb y cols. en 2003 ⁽⁵⁴⁾ describieron el injerto de cardiomiocitos derivados de la médula ósea en un corazón adulto seguido del trasplante de células de la médula ósea.

Las células madre de la médula ósea se han aplicado en la regeneración de hígado ⁽⁵⁵⁾, hueso ⁽⁵⁶⁾, riñón ^(57, 58), y sistema nervioso central ⁽⁵⁹⁾.

Por otro lado, ha habido mucho interés en las células madre nerviosas como agentes terapéuticos para reparar y regenerar el cerebro y la médula espinal ⁽⁵⁹⁾.

El concepto de regeneración del sistema nervioso central que recapitula el desarrollo neural normal, incluye:

- Recrecimiento de los axones de las neuronas dañadas.
- Reabastecimiento de las células nerviosas (neuronaes)
- Reconstrucción de las funciones nerviosas ⁽⁵⁹⁾.

Se han aislado células madre con la capacidad de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos de la médula espinal de ratas ⁽⁶⁰⁾.

Kim y cols. en 2002 ⁽⁶¹⁾ utilizando un modelo animal de enfermedad de Parkinson, encontraron que las células madre embrionarias pueden formar neuronas con dopamina, alentando el uso de las células madre embrionarias en la terapia de reemplazo celular de la enfermedad de Parkinson .

En el área de la medicina ortopédica, hay muchos ejemplos de aplicaciones que involucran el uso de células madre, tales como la fusión espinal ⁽⁶²⁾, la reparación de defectos focales en el cartílago articular ⁽⁶³⁾, y en defectos de craneotomía ⁽⁶⁴⁾.

Las células madre derivadas del músculo presentan propiedades tanto de las células madre hematopoyéticas como de los mioblastos, y potencian la regeneración de los vasos sanguíneos, músculo y hueso ⁽⁶⁵⁾.

Las células madre mesenquimáticas tienen la capacidad de migrar a sitios de heridas, por ejemplo, en fracturas óseas (66, 67), infarto de miocardio (68), lesión isquémica cerebral (69), lesiones de las articulaciones de la rodilla (70). Sin embargo, los mecanismos que guían el desplazamiento de células inyectadas o implantadas, permanecen inciertos.

La elección de la fuente de tejido está dirigida por la disponibilidad, así como también por el grado de caracterización de las células madre/progenitoras en términos de marcadores de superficie y vías de diferenciación y la consistencia de preparaciones. La inmunogenicidad generalmente débil de las células madre mesenquimáticas tiene amplias ventajas e implicaciones para la terapia celular alogénica (7).

El trasplante de riñón puede proporcionar una función renal completa en pacientes con insuficiencia renal, sin embargo tiene los riesgos de producir infecciones oportunistas y el desarrollo de malignidad debido al requerimiento de inmunosupresión por largos períodos. Así mismo, la disponibilidad de órganos para trasplante, es limitada. Para un tratamiento de reemplazo (o trasplante) renal más completo, se ha desarrollado un riñón bioartificial que consiste en un hemofiltro sintético en serie con un dispositivo de asistencia de túbulo renal (RAD) que contiene células humanas tubulares (71).

Otro enfoque potencial es la clonación terapéutica. Se han inyectado núcleos de células epiteliales (cutáneas) en un ovocito donante enucleado para formar cuerpos embrioides. Tras la

diferenciación en cardiomicitos con un cóctel específico de factores de crecimiento, se puede reinyectar en un paciente o emplear con un andamiaje biodegradable para generar un parche artificial para el corazón (72). No obstante, todavía queda un largo camino por recorrer hasta la creación de un corazón artificial funcional.

A pesar de que la información preclínica preliminar demuestra la seguridad y eficacia del tratamiento con células madre mesenquimáticas, todavía quedan muchas preguntas por contestar, tales como la farmacocinética de las células trasplantadas, los mecanismos de migración hacia el blanco, implantación, y diferenciación *in vivo*. La medicina clínica está entrando en una nueva era muy interesante. Estos enfoques terapéuticos de vanguardia proporcionarán oportunidades para el uso de células madre mesenquimáticas en una mayor variedad de aplicaciones (7, 10).

5. TERAPIA GÉNICA

La terapia génica ha sido utilizada recientemente como medio de dispensar genes que codifican para factores de crecimiento, morfógenos, factores de transcripción, y moléculas de la matriz extracelular dispensadas localmente, en células somáticas de individuos con un efecto terapéutico resultante. El gen puede estimular o inducir un proceso biológico natural por medio de la expresión de unas moléculas implicadas en la respuesta regenerativa para el tejido de interés (73).

El uso de la ingeniería tisular mejorada con genes potenciadores (GETE, por sus siglas en inglés Gene-enhanced tissue engineering), requiere que los genes sean introducidos dentro de las células por medio de algunas metodologías. Las diversas técnicas para introducir ácidos nucleicos dentro de las células, se pueden agrupar en las categorías químicas, físicas, y virales. Cuando se utilizan medios químicos o físicos, estos son ejemplo de transfección. Cuando se utiliza replicación incompetente de vectores virales, el término es transducción. La introducción de ADN por medio de tipos regulados o por replicación competente de vectores virales se denomina infección (5).

5.1 Técnicas para introducir genes en el interior de la célula

5.1.1 Métodos químicos: Utilizan sustancias tales como fosfato de calcio, dietilaminoetil-dextran, lípidos catiónicos, polímeros

orgánicos como polietilenimina PEI, proteínas como las integrinas, transferrinas y péptidos como sulfato de protamina para lograr la dispersión de genes dentro de las células ⁽⁵⁾. Cada una de estas sustancias presenta ventajas y desventajas individuales.

La co-precipitación de ADN con fosfato de calcio es de bajo costo, es un procedimiento fácil y presenta una eficacia razonable de transfección, sin embargo, entre sus desventajas se puede mencionar que presentan sensibilidad a la contaminación de preparaciones de ADN, cambios menores de pH, concentración de sal y temperatura, resultando a menudo en una pobre reproducibilidad. ⁽⁵⁾.

El dietilaminoetil-dextran presenta entre sus ventajas bajo costo, simplicidad y reproducibilidad, y entre sus desventajas la falta de utilidad para obtener transfección estable y lo más importante que es efectivo sólo para un número limitado de tipos celulares como los macrófagos ⁽⁵⁾.

Los lípidos catiónicos tienen la capacidad de transfección de un gran número de tipos celulares, así como una alta eficiencia en la transfección transitoria. Es de fácil manipulación y buena reproducibilidad; sin embargo son más costosos que el fosfato de calcio y dietilaminoetil-dextran. Otra desventaja es que se ha observado que algunas células primarias como neuronas, células dendríticas y células endoteliales no son efectivamente transfectadas y la transfección no resulta efectiva para aplicaciones directas *in vivo* en presencia de suero. Aun así, la

lipofección o transfección con lípidos es el método más popular para la transfección *in vitro* ⁽⁵⁾.

Los polímeros orgánicos son de fácil manejo y eficientes para la transfección en algunos tipos celulares, aunque en menor grado comparado con la lipofección y la aplicabilidad para el uso *in vivo*. Su mayor desventaja es el costo. Las proteínas y péptidos mejoran la eficiencia de transfección en cierto tipo de células aunque el proceso es muy costoso y complejo ⁽⁵⁾.

5.1.2 Métodos físicos y mecánicos de transferencia de genes:

Tienen como ventaja su simplicidad y además evitan el uso de sustancias químicas o proteínas virales que pueden potencialmente evocar una respuesta inmune. La desventaja de esta metodología es que los mismos son principalmente limitados a la expresión transitoria en la mayoría de los tejidos, excepto los músculos, donde se puede obtener una expresión por un período prolongado. Entre los métodos físicos se encuentran el biolístico o pistola de genes, la electroporación, la microinyección y la transfección de ADN desnudo ⁽⁵⁾.

a) Método biolístico: El ADN es revestido sobre partículas de metal y es disparado en las células a alta velocidad por fuerza electrostática o presión de gas, por esta razón este método es también denominado pistola de genes. La ventaja de este sistema es su simplicidad, no presenta limitaciones en el tipo celular transfectado, ni tiene límites en el tamaño y número de genes a transfectar. La desventaja principal es la baja eficiencia

de transfección ya que pocas células expresan el ADN. Además, existe la probabilidad de lesionar los tejidos cuando se usa *in vivo*. Este método es actualmente el más conveniente para las aplicaciones de inmunización de ADN ⁽⁵⁾.

b) Electroporación: Involucra el tratamiento de células con un pulso muy rápido de corriente de alto voltaje, que resulta en una perturbación de la membrana celular y la formación transitoria de poros. El ADN pasa a través de estos poros hacia el citoplasma. La ventaja de este sistema, es que se puede teóricamente trabajar con cualquier tipo celular, sin limitaciones en el tamaño de ADN. Entre las desventajas se encuentra que se requiere un esfuerzo significativo para optimizar la técnica (duración y fuerza del pulso) para cada tipo celular, por lo que se ha observado un alto grado relativo de muerte celular. Por otro lado la eficiencia de transfección es a menudo baja en comparación con otros métodos. Este método es aplicable en la mayoría de los estudios *in vitro*, y también se ha reportado en algunos estudios *in vivo* ⁽⁵⁾.

c) Microinyección: Es la inyección directa de ADN al núcleo de una célula usando una micropipeta de vidrio. Este método ha sido utilizado en células madre embrionarias y en otras líneas de cultivos celulares. Las ventajas de este sistema son: la alta eficiencia de transfección y la carencia de limitaciones en el tamaño de ADN inyectado. Tiene muchas desventajas: la necesidad de invertir en equipos especializados, entrenamiento del personal y el alto costo de la automatización del proceso, por esta razón la microinyección no es práctica para la mayoría de

las aplicaciones de transferencia de genes que requieren la producción de un gran número de células transfectadas ⁽⁵⁾.

d) Transfección de ADN desnudo: Es aplicable sólo a algunos tejidos, como el músculo, obteniéndose una transfección efectiva de células musculares *in vitro*. No obstante, este método no es muy efectivo en otros tipos de células o en estudios *in vivo*, posiblemente debido a la degradación de ADN previo al crecimiento celular ⁽⁵⁾.

e) Vectores virales: Son virus genéticamente alterados para eliminar la capacidad de provocar enfermedad sin perder su capacidad de infectar la célula. Los virus pueden replicar genes de interés junto con su propio genoma, mediante el uso de la maquinaria genética de la célula hospedera. Actualmente se están desarrollando adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple, y lentivirus ^(5, 74, 75). Cada sistema viral tiene sus fortalezas y debilidades.

5.2 Métodos de transferencia de genes

Para una terapia génica exitosa es esencial la ubicación precisa y transferencia eficaz de genes a células tisulares diana, la valoración rápida de la expresión de genes en los tiempos requeridos, y los niveles apropiados y la minimización de la toxicidad sistémica indeseable ⁽¹⁷⁾.

Para la terapia génica, se pueden emplear los métodos *in vivo* y *ex vivo* (17).

5.2.1 Método *in vivo*: El gen se libera sistémicamente al torrente sanguíneo o localmente a los tejidos diana por inyección o inhalación (74). Por ejemplo, muchos genes tales como los factores de crecimiento endoteliales vasculares (VEGF) angiopoyetina, factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) han sido transferidos directamente en los tejidos. Se ha demostrado en estudios preclínicos la eficacia de la estimulación de angiogénesis para mejorar la insuficiencia cardíaca y vascular de miembros (76).

5.2.2 Método *ex vivo*: Implica la manipulación genética de células *in vitro*, las cuales son subsecuentemente trasplantadas en la zona de regeneración. Por ejemplo, el desarrollo de una población celular pura de células mesenquimáticas transducidas con morfógenos o factores de crecimiento como genes que codifican para BMP, Sonic hedgehog (Shh), factor de crecimiento de tipo Insulina (IGF) son implantados en el sitio del defecto de cartílago o hueso (74, 77, 78).

Las células juegan un rol no sólo en el proceso de reparación sino también en la secreción de factores de crecimiento local para estimular a las células hospederas (79). La selección del método *in vivo* o *ex vivo* depende en las características morfológicas y fisiológicas del tejido diana, el vector utilizado, la naturaleza de la enfermedad y la seguridad del procedimiento (74).

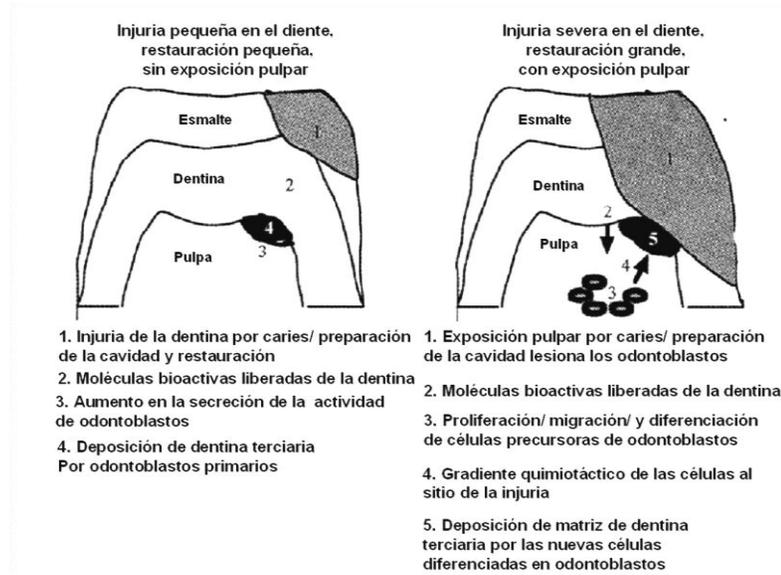
Los sistemas de dispensación no viral de plásmidos, péptidos, liposomas catiónicos, complejos de ADN-ligandos, pistola de genes, electroporación y sonoporación han sido desarrollados para abordar con seguridad preocupaciones como inmunogenicidad y mutagénesis insercional (74). La mayoría de los riesgos de la terapia génica puede producirse por el sistema vector, más que por el gen expresado (74). Para la aplicación clínica extendida todavía hay que esperar el desarrollo de vectores seguros, económicos, eficientes, simples de aplicar y con capacidad de expresar el nivel requerido de transgenes a largo plazo (78).

6. REPARACIÓN Y REGENERACIÓN DEL COMPLEJO DENTINO-PULPAR

Durante el desarrollo del diente, las interacciones entre las células epiteliales interiores del órgano del esmalte y las células mesenquimáticas de la papila dental inducen la diferenciación de ameloblastos y odontoblastos, cada uno de los cuales deposita matrices mineralizadas especializadas, el esmalte y la dentina, respectivamente. (6, 26, 35-41). Una vez formadas, estas matrices no experimentan remodelación, como ocurre con el hueso, el cual se remodela a lo largo de la vida postnatal. No obstante, después de la erupción del diente, la actividad secretora de los odontoblastos disminuye, aunque continúa produciendo dentina secundaria a un nivel más bajo. (35, 80).

El tejido pulpar puede ser capaz de repararse posteriormente a una agresión tal como la lesión en la dentina causada por trauma mecánico, exposición a agentes químicos o procesos de enfermedad. Estos estadíos de cicatrización de la pulpa se asemejan al de otros tejidos duros. Dependiendo de varios factores, las células odontoblásticas post-mitóticas sobrevivientes pueden segregar dentina terciaria denominada dentina reparadora (80). Alternativamente, las células de la pulpa dental pueden diferenciarse en células similares a odontoblastos bajo la influencia de factores de crecimiento específicos para luego formar dentina reparadora (81, 82). Esta dentina reparadora es una matriz mineralizada poco organizada que sirve como una barrera protectora para la pulpa dental (80).

Gráfico 8. Reparación posterior de la injuria



Tomado de Murray y cols. 2002

Los procedimientos clínicos para inducir la reparación pulpar, por medio del recubrimiento de la pulpa expuesta con diferentes materiales, ha sido ampliamente reportado en la literatura. Entre estos materiales el hidróxido de calcio ha sido “estándar de oro” para el recubrimiento pulpar. Es efectivo en promover la formación de puentes dentinarios sobre pequeñas exposiciones pulpares, y se cree que esto está relacionado a la combinación de su actividad antimicrobiana, atribuido a su alto pH y a la capacidad de estimular la formación de dentina terciaria, por la liberación de iones de calcio (83, 84).

No obstante, existen oponentes al uso del hidróxido de calcio para los procedimientos de recubrimiento pulpar directo, quienes citan, entre las causas del fracaso de este material, la porosidad de los puentes de dentina que produce, su pobre adhesión a la dentina y su inestabilidad para proveer un sellado a largo plazo contra la microfiltración ⁽⁸⁵⁾. También se ha referido que el hidróxido de calcio destruye una pequeña capa de tejido pulpar subyacente al sitio de aplicación, dejando una capa necrótica debido a su alto pH ⁽⁸⁶⁾. Además bajo algunas condiciones, crea cambios degenerativos tales como persistencia de la inflamación y calcificaciones distróficas en el tejido pulpar remanente ⁽⁸⁷⁾.

Hoy en día, nuevos materiales han sido propuestos para la terapia de recubrimiento pulpar, entre ellos los sistemas adhesivos utilizados para las resinas compuestas ⁽⁸⁸⁾. Sin embargo, el uso de materiales adhesivos de dentina con grabado ácido para recubrimiento pulpar es controversial ⁽⁸⁹⁾; y ha sido contraindicado. ⁽⁹⁰⁾

de Souza en el año 2000 ⁽⁹⁰⁾ realizó una revisión de la literatura existente acerca de la respuesta pulpar, seguida del grabado ácido total y la aplicación de resinas adhesivas en cavidades profundas o exposiciones pulpares. Al comparar la evidencia científica de la terapia de recubrimiento pulpar directo, en estudios en animales y humanos, encontró que muchos estudios evalúan la morfología y espesor de la capa híbrida, la resistencia de adhesión de la dentina y la capacidad de sellado de los sistemas adhesivos de dentina. No obstante, sólo pocos estudios *in vivo*, han evaluado la biocompatibilidad de los

sistemas adhesivos aplicados en la dentina profunda o directamente sobre la pulpa.

Varios estudios donde se utilizan dientes de monos o de ratas han reportado la cicatrización pulpar y formación de puentes de dentina con estos agentes. Este autor indica que los sistemas adhesivos con autograbado pueden ser útiles y seguros cuando son aplicados en la dentina ⁽⁹⁰⁾.

En contraste, se han reportado reacciones inflamatorias persistentes y retraso en la cicatrización pulpar, en pulpas humanas recubiertas con agentes adhesivos. Los resultados observados en dientes de animales no pueden ser directamente extrapolados a las condiciones clínicas en dientes humanos, por lo que el recubrimiento con agentes ácidos y resinas adhesivas pareciese estar contraindicado ⁽⁹⁰⁾.

Recientemente se ha propuesto el trióxido mineral agregado como material alternativo de recubrimiento pulpar. El MTA es un polvo que contiene finas partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, y óxido de silicato. Este material endurece en la presencia de humedad, previene la microfiltración, es biocompatible y promueve la formación de dentina reparadora ⁽⁹¹⁾.

Se ha encontrado que el MTA tiene la capacidad de inducir una frecuencia significativamente mayor de formación de puentes de dentina, con menor inflamación pulpar, y los puentes

formados presentan mayor espesor comparados con los formados con el hidróxido de calcio. (92, 93, 94)

Estudios *in vitro* (95) e *in vivo* (96) sugieren que el MTA puede ser más efectivo para inducir la formación de tejido duro que el hidróxido de calcio, posiblemente por medio de una reacción físico-química en la cual los iones de calcio liberados reaccionan con el fosfato de los tejidos para formar hidroxiapatita.

La posibilidad de usar una variedad de moléculas biológicas para la señalización de la reparación en procedimientos de recubrimiento pulpar y otros tratamientos ha ofrecido oportunidades importantes para el desarrollo de enfoques biomiméticos en la odontología restauradora. Una plétora de moléculas, incluyendo factores de crecimiento, proteínas de la matriz de dentina y otras moléculas de la matriz extracelular han sido evaluadas por sus contribuciones potenciales para la reparación de tejidos pulpares (84)

Estos estudios se han derivado en su mayoría a partir de observaciones de la matriz de dentina, la cual es auto-inductiva, obviando la necesidad del epitelio dental de enviar señales para la diferenciación de células similares a odontoblastos (84).

Las observaciones histopatológicas de dentinogénesis en la superficie de trozos de dentina, empujados dentro de la pulpa durante preparaciones cavitarias han dirigido estudios en los cuales se ha logrado la formación de dentina reparadora cuando

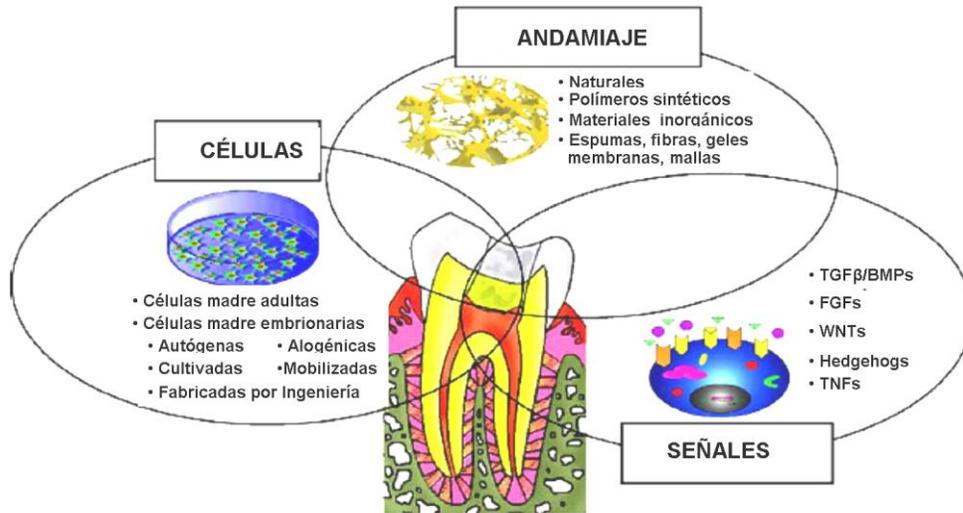
se implantó en pulpas expuestas matriz de dentina desmineralizada (84).

A pesar del progreso alcanzado en la comprensión de los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación de odontoblastos y la formación de puentes de dentina , el mecanismo exacto de la cicatrización, así como la naturaleza del tejido duro formado después de la exposición pulpar no ha sido bien descifrado (97)

Los tejidos pulpares contienen células madre/progenitoras que potencialmente se diferencian en odontoblastos como respuesta a morfógenos que pueden producir dentina reparadora (17).

Existen dos estrategias para regenerar dentina. En primer lugar se encuentra la terapia *in vivo*, donde las proteínas morfogenéticas óseas o los genes que codifican para éstas proteínas son aplicados directamente a la pulpa expuesta o amputada. En segundo lugar está la terapia *ex vivo* que consiste en el aislamiento de células madre/progenitoras del tejido pulpar, su diferenciación en odontoblastos inducida por el efecto de proteínas óseas morfogenéticas o por genes que codifican para éstas proteínas, que son finalmente trasplantadas de manera autógena para regenerar dentina (17)

Gráfico 9. Elementos claves de la ingeniería tisular en la regeneración del complejo dentino-pulpar.



La tríada consiste en células madre, andamiaje de matriz extracelular y morfógenos *Tomado de Nakashima M. 2005*

6.1. CÉLULAS MADRE EN LA REGENERACIÓN DE PULPA Y DENTINA

En los primeros intentos en la regeneración de dientes se han utilizado estructuras dentarias en desarrollo o estrategias de explantes de cultivos. Estudios recientes emplean enfoques de ingeniería tisular basados en células madre para la regeneración de estructuras dentarias ⁽³⁹⁾

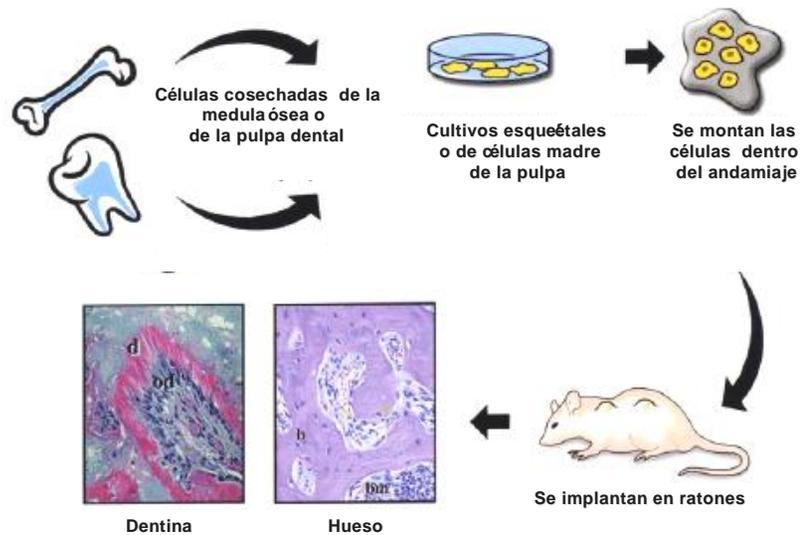
Estos estudios de trasplatación han demostrado que las células madre de la médula ósea y de la pulpa dental pueden formar hueso o dentina *in vivo* ⁽⁹⁸⁻¹⁰²⁾ Por medio de esta estrategia, las células madre son recolectadas de la médula ósea o de la pulpa dental, luego son expandidas en el laboratorio, cargadas en andamiajes o soportes apropiados, y localmente trasplantadas adentro de bolsas subcutáneas en ratones. El ambiente *in vivo* le permite a las células madre diferenciarse y formar tejidos como hueso o dentina ⁽¹³⁾. (Gráfico 10)

Utilizando la metodología desarrollada para aislar y caracterizar células madre del estroma de la médula ósea (BMSCs por sus siglas en ingles Bone Marrow Stromal Stem cells), Gronthos y *co/s.* en 2000 ⁽⁹⁸⁾ lograron aislar células madre de la pulpa dental (DPSCs por sus siglas en ingles Dental Pulp Stem Cells).

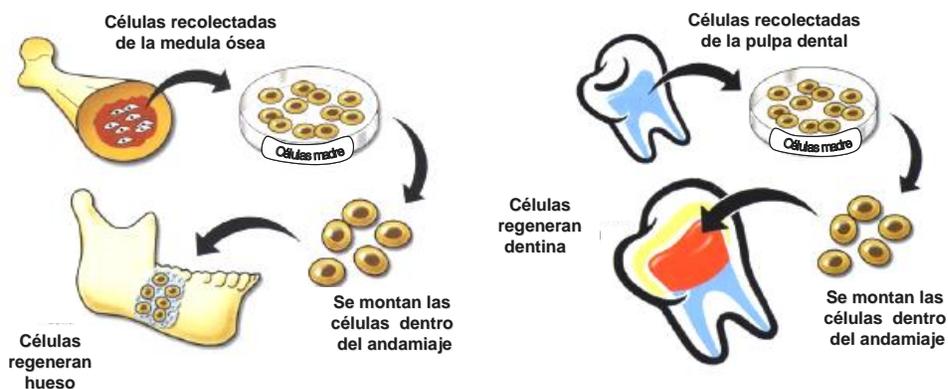
Estas células fueron caracterizadas por una morfología similar a los fibroblastos típicos, y al ser comparadas con células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea exhibieron

el mismo inmunofenotipo. Sumado a esto, ambas poblaciones celulares son capaces de formar depósitos calcificados *in vitro* (98).

Gráfico 10 (A y B) Células madre de la pulpa dental o de la médula ósea



(d) dentina, (od) odontoblastos, (b) hueso, y (bm) médula ósea



Tomado de Krebsbach P; Gehron Robey 2002

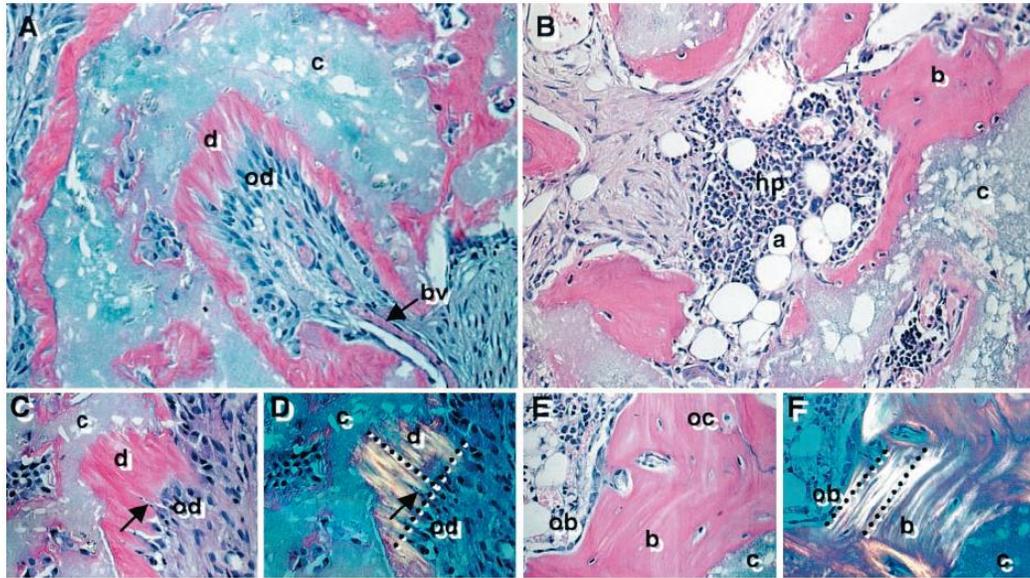
Usando un ensayo de eficiencia de formación de colonias que determina el número de CFU-F en las suspensiones de células de la médula ósea, estos autores demostraron que una población menor de células de la pulpa dental es clonogénica. Estas colonias de células pulpares surgieron en una frecuencia más alta en comparación con las BMSSCs ⁽⁹⁸⁾

Por otro lado, las DPSCs exhibieron una tasa de proliferación mayor comparadas con las BMSCs *in vitro* aun después de ser sub-cultivadas extensivamente ⁽⁹⁸⁾.

Adicionalmente, cuando son trasplantadas *in vivo* en ratones inmunocomprometidos, las DPSCs tienen la capacidad de generar tejidos similares al complejo dentino-pulpar, el cual está compuesto de una matriz mineralizada ⁽⁹⁸⁾. (Gráfico 11)

Shi y cols. ⁽⁹⁹⁾ en el año 2001 realizaron una comparación de las células madre de la pulpa dental humanas con las de la médula ósea, a través de análisis de microarreglos del perfil de expresión de genes de ADN, y encontraron que estas poblaciones precursoras diferentes, tienen niveles similares de expresión de genes en más de 4000 genes conocidos, con tan sólo algunas pequeñas diferencias.

Gráfico 11. Células madre postnatales adultas humanas *in vivo* e *in vitro*



Desarrollo potencial *in vivo*. Cortes transversales de los trasplantes de células DPSC (A, C, y D) y trasplantes de células BMSC, (B, E, y F) a las 6 semanas de post-trasplatación teñidas con hematoxilina y eosina. (A) En los trasplantes DPSC, las superficie del andamiaje (c) esta alineada con la matriz similar a dentina (d) alrededor de un tejido similar a la pulpa con vasos sanguíneos (bv) y la interfase de la capa de células similares a odontoblastos (od). (C) Una vista magnificada de la matriz de dentina (d) resaltando la capa similar a odontoblastos (od) y los procesos odontoblásticos (flecha). (D) La luz polarizada demuestra un alineamiento perpendicular (líneas punteadas) de las fibras de colágeno en la superficie que se esta formando. (B) En los trasplantes de BMSC, se ha formado hueso laminar (b) en la superficies del andamiaje (c) y rodeado de un órgano médula r hematopoyético vascular, (hp) con adipositos acumulados (a). (E) Una vista magnificada muestra que el nuevo hueso contiene osteocitos (oc), incrustados en una matriz calcificada, y osteoblastos (ob) alienado a la superficies óseas. (F) Con luz polarizada, las fibras de colágeno se observan depositadas paralelas a la superficie que se esta formando (líneas punteadas) Tomado de Gronthos, y cols. 2000

Sin embargo, a pesar de que el hueso y la dentina son similares en la composición de matriz de proteínas, la estructura de sus órganos es diferente. Batouli y cols. (100) en 2003, demostraron que las células madre de la médula ósea y las células madre de la pulpa dental, usan mecanismos regulatorios distintos para controlar la regeneración de tejidos.

Utilizando el mismo sistema de trasplante de células madre *in vivo*, investigaron los mecanismos de regulación diferencial de las células madre del estroma de la médula ósea y células madre de la pulpa dental (100).

En este estudio, se demostró que el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y la matriz de metaloproteinasa 9 (MMP-9), dos factores angiogénicos importantes, son expresados temporalmente en el compartimiento del tejido conectivo de los trasplantes de células madre de la médula ósea, previo a la formación de hueso medular. En contraste, se encontró que la sialoproteína dentinaria, una proteína de dentina altamente específica, es altamente expresada durante la dentinogénesis (100).

Además de distinguir la capacidad de autorenovación, diferenciación multilineal y eficacia clonogénica de las células madre de la pulpa dental humana, Gronthos y cols. 2002 (101) comprobaron que estas células tienen la capacidad de diferenciarse en adipocitos y células neurales

En otro estudio realizado por Pierdomenico y cols. ⁽¹⁰²⁾ en el año 2005 se logró la diferenciación osteogénica y adipocítica de las células madre de la pulpa dental. Sin embargo no se logró que estas células se diferenciaran en condroblastos.

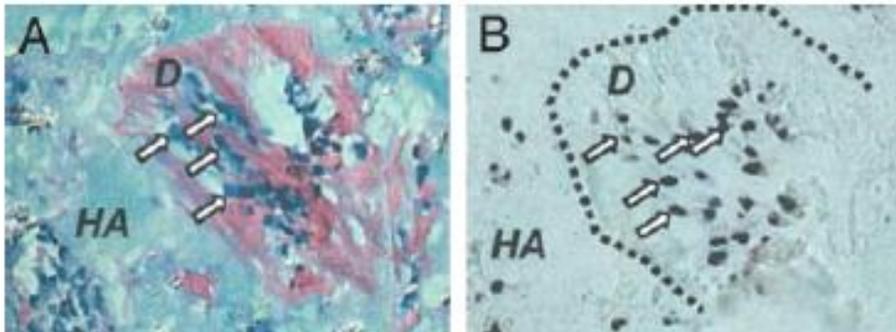
En humanos, la transición de los dientes deciduos a dientes permanentes es un desarrollo postnatal producido por procesos únicos y dinámicos. Miura y cols. en 2003 ⁽⁴⁸⁾ descubrieron que los dientes deciduos exfoliados humanos contienen células madre multipotenciales (SHED por sus siglas en inglés, Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth). Las células madre de los dientes deciduos exfoliados son diferentes a las células madre postnatales de la pulpa dental, ya que aún cuando son capaces de formar estructuras similares a la dentina, no son capaces de formar el complejo dentino-pulpar completo como lo hacen las células madre postnatales. Además, comparado con DPSC, las células SHED tiene una mayor tasa de proliferación, y son capaces de diferenciarse en una variedad de tipos celulares tales como células neurales y adipositos y odontoblastos. (Gráfico 12)

Las células madre de dientes deciduos son derivadas de una fuente de tejido muy accesible, además son capaces de proporcionar suficiente número de células para aplicaciones clínicas potenciales ⁽⁴⁸⁾.

Este estudio provee evidencia que indica que los dientes deciduos, son comparables al cordón umbilical en lo que refiere

a células madre ofreciendo una fuente excelente para las aplicaciones clínicas de la regeneración tisular ⁽⁴⁸⁾

Gráfico 12. Células madre en dientes deciduos exfoliados transplantados en ratones inmunocomprometidos



Después de 8 semanas de trasplatación, SHED son capaces de diferenciarse en odontoblastos (flechas abiertas) los cuales son responsable de la formación de la estructura similar a la dentina (D) en la superficie del andamiaje (A). *Tomado de Miura y cols. 2003*

Respecto al origen de las células madre progenitoras de la pulpa dental, la información se mantuvo sin dilucidar por mucho tiempo; no obstante, un estudio reciente llevado a cabo por Shi y Gronthos en 2003 ⁽¹⁰³⁾, utilizando varios marcadores de las redes de microvasculatura en células madre de la pulpa de terceros molares retenidos, proporciona evidencia experimental donde se sugiere que las células madre pulpares, están asociadas con las células del músculo liso y con los pericitos de los vasos sanguíneos pulpares. No obstante, faltan estudios que respalden la demostración de marcadores específicos en las vías de diferenciación de las células madre en la pulpa.

La migración de estas células madre recién proliferadas al sitio de la herida puede estar mediada por la lesión endotelial, como lo demostraron Mathieu y cols. en 2005 ⁽¹⁰⁴⁾ en su estudio, en el cual utilizaron fibroblastos pulpares humanos y células endoteliales venosas umbilicales humanas para evaluar la migración celular tras una agresión. Los resultados de este estudio sugieren que el daño endotelial está involucrado en el reclutamiento de células similares a odontoblastos en el sitio de la herida.

Los rasgos característicos de las células madre de capacidad de auto-regeneración y mantenimiento a lo largo de la vida de un organismo, pueden ser aprovechados al cultivar grandes cantidades de células madre pulpares *in vitro* para el uso terapéutico en endodoncia regenerativa. El éxito de las aplicaciones clínicas de células madre pulpares está limitada por las condiciones del cultivo y la naturaleza del micro-ambiente en que se mantienen y se expanden las células madre pulpares multipotenciales primitivas ⁽¹⁷⁾.

6.1.1. Órganos dentarios generados a partir de células madre de la pulpa dental

La ingeniería tisular es considerada uno de los enfoques más poderosos para reparar o reemplazar un tejido u órgano lesionado. A pesar de que no se ha logrado todavía la generación de un órgano dentario completo, la generación *in vitro* de un diente humano implantable a partir de células madre tendrá

implicaciones significativas y extremas para la práctica dental.

(115)

Modelos animales de generación de dientes *in vitro* suministrará las bases moleculares y celulares para la aplicación futura en humanos. (105) En este sentido, se han llevado a cabo estudios *in vitro* de generación de órganos dentarios. (106, 108-111)

Young *y cols.* (106), en el año 2002 realizaron una investigación utilizando andamiajes biodegradables, sembrados solo con suspensiones individuales celulares, disociadas de gérmenes dentarios de molares de mandíbulas de cerdos de 6 meses de edad. Se obtuvieron estructuras dentarias que contenían dentina, odontoblastos, una cámara pulpar muy bien definida, así como vaina epitelial de Hertwig y órgano del esmalte.

Aún cuando esta investigación es extremadamente prometedora, una de las desventajas de esta técnicas en su estado actual es la incapacidad de regular la forma y tamaño del tejido regenerado (107).

La bioingeniería reciente de estructuras de dientes complejas a partir de brotes de dientes de cerdos, sugiere el potencial para la regeneración de tejidos dentarios en mamíferos.

Otro estudio, en donde se utilizaron los métodos de bioingeniería aplicados en cerdos, fue llevado a cabo por Duailibi *y cols.* en 2004 (108). Se aplicaron suspensiones celulares

individuales de células de brotes dentarios de ratas previamente cultivados *in vitro* por 6 días. Los resultados demuestran que las células del brote dentario de ratones pueden ser utilizadas para diseñar, por bioingeniería, coronas complejas dentarias. Se concluye que los métodos de ingeniería de tejidos dentarios pueden ser utilizados para generar tanto tejidos dentarios de ratas o como de cerdos. (Gráfico 13)

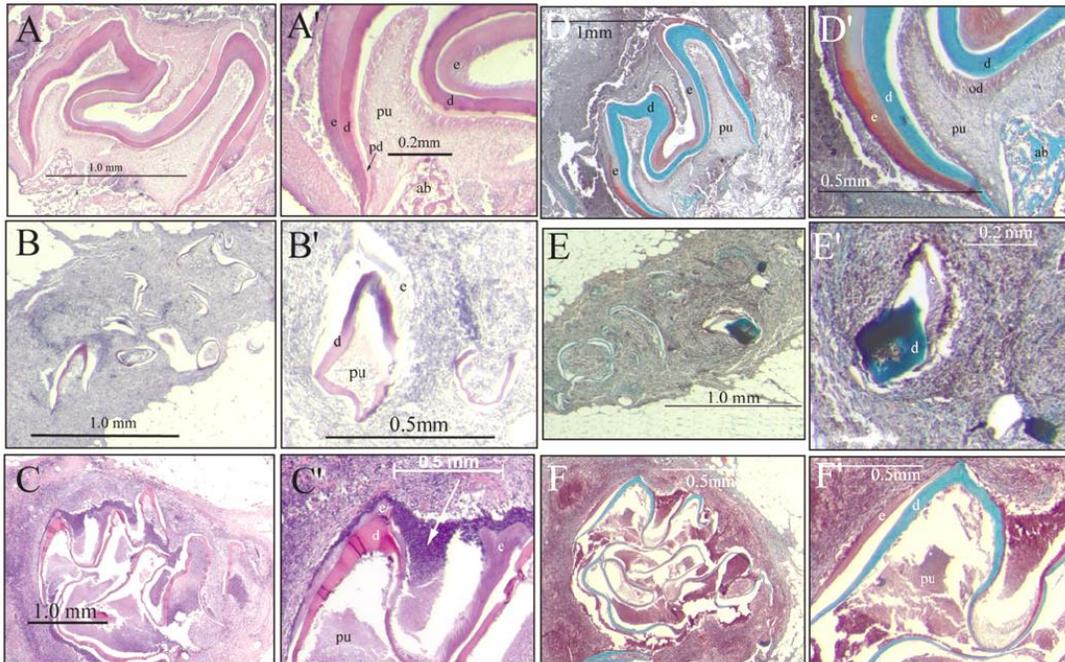
Tomando en cuenta esta premisa, la capacidad de generar sustitutos biológicos de tejidos autólogos humanos pudiese ser una valiosa herramienta clínica.

También ha sido demostrado que un andamiaje no es necesario para el desarrollo *ex vivo* de explantes dentarios. Reagregados disociados de gérmenes de molares de ratón son capaces de formar dientes bien diferenciados por debajo de las capsulas de riñón de ratón sin necesidad de andamiaje ⁽¹⁰⁹⁾.

Recientemente, Ohazama *y cols.* ⁽¹¹⁰⁾ en el año 2004 comprobaron que las células madre de ratón, tanto células madre neurales como células madre de la médula ósea, pudiesen ser inducidas para ser reprogramadas hacia un destino odontogénico que soporte la formación de dientes cuando se le suministran señales odontogénicas apropiadas.

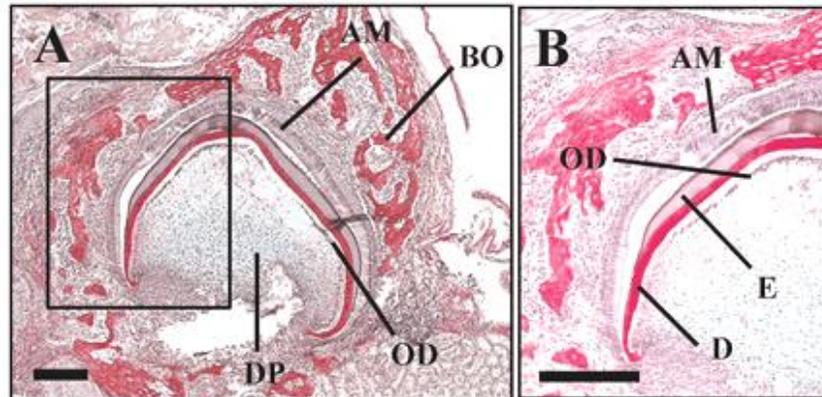
Estas células, cuando son de E10.5 de edad embrionaria, el cual posee el potencial odontogénico, pudieran responder a señales inductivas del epitelio dental e iniciar la odontogénesis que resulta en la formación del diente ⁽¹¹⁰⁾. (Gráfico 14)

Gráfico 13. Bioingeniería de estructuras dentarias a partir de brotes de dientes de rata



Análisis histológico de los implantes de 12 semanas de células de gérmenes dentarios de rata. Tejidos experimentales y control teñidos con hematoxilina y eosina. Control positivo intacto de implantes de gérmenes de rata de 4 días postnatales exhibieron dentina, esmalte y pulpa bien formados (A,A'). Células dentales sembradas en andamiaje de PGA (B,B') y PLGA (C,C') donde se observan tejidos de dentina, esmalte y pulpa. Se observó un infiltrado de linfocitos ocasional en los implantes dentales (C,C', flechas). La tinción de Goldner de los controles positivos de los implantes de gérmenes dentarios reveló una tinción azul para la dentina, una tinción roja para el esmalte inmaduro y una tinción gris para el esmalte maduro (D,D'). Los dientes generados por bioingeniería en andamiajes de PGA y PLGA exhibieron ambos una tinción azul para la dentina, mientras que en el andamiaje de PGA se produjo un esmalte maduro teñido de gris, y en el andamiaje de PLGA se generó una tinción roja y gris para el esmalte maduro (E,E',F,F'). Abreviaciones: (d) dentina; (e) esmalte; (em) matriz de esmalte; (pe) pre-esmalte; (pu) pulpa. Tomado de .T. Duailibi y cols. 2004

Gráfico 14. Odontogénesis a partir de células madre de ratón agregadas y recombinadas con el epitelio de un molar de ratón



Explantos recombinantes entre células derivadas de la médula ósea y el epitelio oral después de 12 días de desarrollo en una capsula renal. Todos los tejidos visibles son derivados del tejido donante, dado que el riñón hospedero no ofrece contribución celular al tejido. Abreviaciones: BO, hueso; Am, ameloblastos; DP, pulpa dental; OD, odontoblastos, E, esmalte; D, dentina. Escala: 80 μ m Tomado de: Ohazama y cols. 2004

Otro estudio similar, mediante el uso de explantes recombinantes de células madre de la médula ósea adulta y epitelio oral de embriones de ratón de E10.0 logró corroborar el potencial de formar estructuras inmaduras de tejidos similares a los dientes cuando son cultivados en capsulas de riñón (111).

En este estudio, Modino y cols. (111) diseñaron un diente *in vitro* por medio del apareamiento de los principios básicos de la odontogénesis y la capacidad inductiva de epitelio de embriones en desarrollo. El diente resultante pareció ser normal en tamaño y estuvo conectado al hueso subyacente.

Este experimento es una indicación de que es posible inducir la odontogénesis así como lograr la ingeniería de un diente a partir de células madre adultas de origen no dentario, pudiendo estos gérmenes de dientes en desarrollo ser implantados en el periodonto de los pacientes (111).

Estos estudios sustentan la idea de que los procesos odontogénicos pueden ser iniciados con células madre de origen no dental.

En una revisión bibliográfica realizada acerca las células madre en la ingeniería tisular, Bianco y Robey (4) en el año 2001 refieren que la aplicación de los enfoques de ingeniería tisular, basados en células madre para crear órganos y tejidos para trasplantes, requiere la comprensión y manipulación de los procesos de desarrollo que dirigen la formación de órganos y tejidos en los embriones, una fuente de células multipotenciales que pueden ser fácilmente cultivadas y la capacidad de un órgano rudimentario para formar un órgano completo en el ambiente adulto.

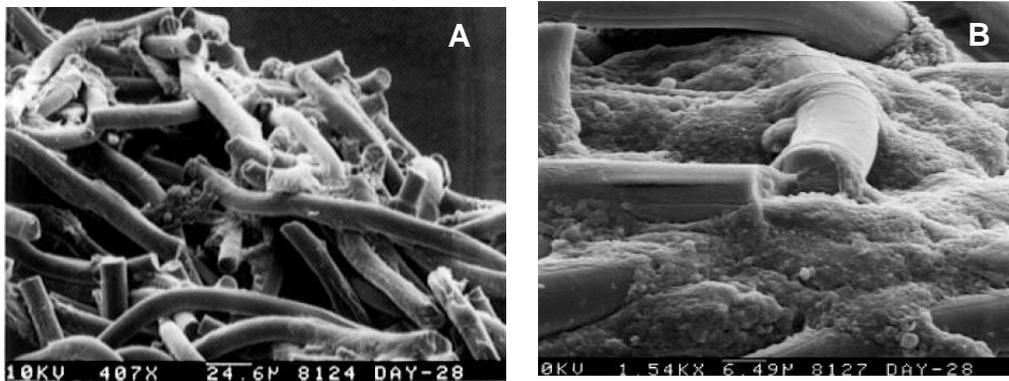
6.1.2. Bioingeniería de la pulpa dental

También se ha estudiado la generación de tejidos similares a la pulpa utilizando cultivos celulares y matrices sintéticas extracelulares (22, 112).

Mooney y cols. (22) en el año 1996, describen una técnica para lograr la generación de un tejido similar a la pulpa dental *in*

vitro. Mediante el uso de fibroblastos obtenidos de la pulpa dental humana adulta, y multiplicando estas células en cultivos, éstas fueron posteriormente sembradas en matrices sintéticas extracelulares. Los fibroblastos derivados de la pulpa dental lograron adherirse a las fibras del andamiaje, proliferaron y formaron un nuevo tejido en 60 días de cultivo, con células similares a la pulpa nativa. (Gráfico 15)

Gráfico 15. Generación de un tejido similar a la pulpa dental *in vitro* a partir de fibroblastos derivados de la pulpa dental



A. Fotomicrografía de fibroblastos derivados de la pulpa adheridos a polímeros de matrices. B. Fotomicrografía de fibroblastos derivados de la pulpa relleno los intersticios entre las fibras de polímeros después de 28 días en cultivo. Microscopio Electrónico de Barrido. Tomado de Mooney y cols. 1996

Posteriormente, Bohl y cols. (112), realizaron un estudio similar con fibroblastos humanos aislados de la pulpa dental humana utilizando tres tipos diferentes de matrices, logrando la ingeniería de tejidos similares a pulpa dental con una de las matrices.

La bioingeniería de la pulpa dental a partir de células cultivadas constituye un tema de relevancia en la regeneración de pulpa y dentina, y pudiese proveer una alternativa al tratamiento de conductos convencional en el futuro.

6.2. ANDAMIAJE UTILIZADOS EN LA REGENERACIÓN DE PULPA Y DENTINA

La matriz extracelular de dentina provee un soporte para la adhesión, proliferación y diferenciación de odontoblastos. El andamiaje, que es biomimético de matriz extracelular, debería permitir un transporte efectivo de nutrientes, oxígeno y desecho metabólico. La matriz de tejido regenerado reemplazará el andamiaje, mientras mantiene el aspecto morfológico de la arquitectura y organización del tejido final. El andamiaje debe ser biocompatible, no tóxico y tener características físicas y mecánicas óptimas. Funciona como portador o transportador de factores de crecimiento /diferenciación, tales como la familia de BMP para sustentar las actividades morfogenéticas ⁽¹⁸⁾.

. Algunas estrategias para la formación de dentina reparadora involucran la integración de andamiajes prefabricados convenientes para la dentinogénesis. Los andamiajes son fabricados a partir de polímeros naturales o sintéticos. Los primeros, tales como el colágeno y la fibroconectina, tienen las ventajas de buena citocompatibilidad y bioactividad. Los polímeros sintéticos permiten un control preciso sobre las

propiedades físico-químicas, como grado de degradación, porosidad, microestructura y propiedades mecánicas (18)

Varios estudios han utilizado matriz de dentina como andamiaje para la inducción de dentina reparadora, para formar una matriz tubular revestida con odontoblastos cuando se implanta matriz de dentina desmineralizada o matriz de dentina nativa en el tejido pulpar (113-115)

Tziafas y Kolokuris (1990) (113) demostraron que las interacciones de la matriz de dentina desmineralizada con las células pulpares constituye un modelo para la inducción experimental de la dentinogénesis secundaria y la diferenciación de células similares a odontoblastos

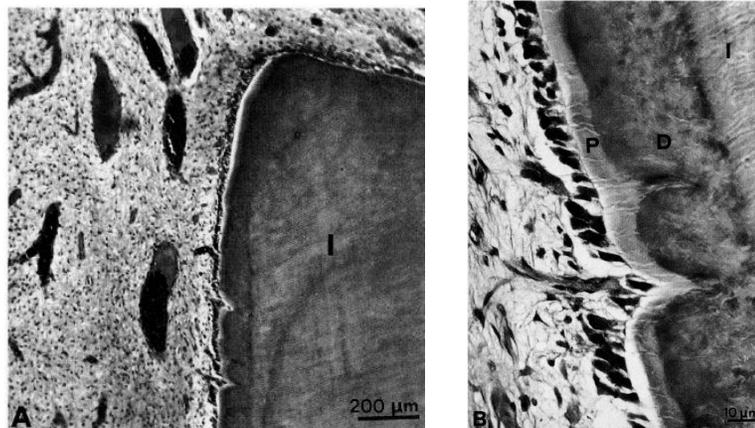
En este estudio, los autores evaluaron los efectos de la dentina desmineralizada sobre las células pulpares. La dentina autógena fue obtenida de coronas de molares primarios, la cual fue desmineralizada con ácido acético y posteriormente implantada en sitios pulpares o de la papila dental en dientes de perros en erupción. Se observó como la matriz implantada fue rodeada homogéneamente por dentina atubular, con una zona de predentina tubular y una capa de células similares a odontoblastos. En el área de la papila, la implantación de dentina exhibió la formación de una matriz similar al hueso (113). (Gráfico 16)

Se han obtenido resultados análogos utilizando extractos de matriz de dentina soluble, donde se observa la formación de

dentina reparadora similar a la dentina tubular primaria con células similares a odontoblastos, alineadas en la superficie de la dentina formada. (114)

Los componentes bioactivos presentes en la fracción de matriz de dentina soluble con EDTA, son capaces de inducir directamente la polarización celular y la secreción de matriz tubular al ser implantados en contacto con las células de la pulpa dental en sitios remotos de la capa de odontoblastos (115)

Gráfico 16. Efectos de la dentina desmineralizada sobre las células pulpares



A. Reacción del tejido pulpar a la implantación de dentina desmineralizada (I), luego de tres semanas. B. La matriz implantada es rodeada homogéneamente por dentina atubular (D) con una zona de predentina tubular (P) y una capa de células similares a odontoblastos. Tomado de Tziafas y Kolokuris. 1990

Las observaciones de estos estudios condujeron a otros estudios más detallados de moléculas específicas de la matriz de

dentina como fibroconectina ⁽¹¹⁶⁾, y la sialoproteína ósea ⁽¹¹⁷⁾ para evaluar sus efectos dentinogénicos durante la reparación

Tziafas y cols. ⁽¹¹⁶⁾, en 1992, investigaron la respuesta inicial de las células pulpares ectomesenquimáticas después de la implantación de tres diferentes tipos de matriz de dentina (dentina desmineralizada, dentina poco mineralizada y predentina) en la pulpa de perros. Concluyeron que la dentina inducida por dentinogénesis es iniciada por dos mecanismos, la inducción directa de células similares a odontoblastos y por la síntesis de matriz indirecta, la cual controla la polarización celular.

Estos autores sugieren que la fibroconectina juega un rol como mediador durante la iniciación de la dentinogénesis secundaria después de la inducción de las células pulpares por parte de la matriz de dentina. La fibroconectina es una glicoproteína adhesiva cuya presencia se ha correlacionado con el fenómeno de polarización durante la dentinogénesis primaria. Las conexiones biomecánicas entre la matriz implantada y la membrana plasmática de las células asociadas están mediadas por la fibroconectina. ⁽¹²⁶⁾,

La fibroconectina quizás pueda mediar las interacciones entre estos substratos y las células pulpares, y reorganizar el citoesqueleto durante la polarización de odontoblastos en el proceso de cicatrización de las heridas pulpares ⁽¹¹⁷⁾.

Nakashima en 1994 ⁽¹¹⁸⁾ realizó un estudio donde se utilizaron proteínas morfogenéticas con una matriz de dentina

desmineralizada inactivada extraída con 4M-guanidina-cloride como andamiaje obteniéndose la formación de dentina tubular.

Otro estudio análogo realizado por el mismo autor, al utilizar colágeno tipo I como andamiaje, sólo se formó osteodentina, dando indicios de que algunos otros componentes presentes en la matriz de dentina inactivada pudiesen ser necesarios para la diferenciación de los odontoblastos (119)

La sialoproteína ósea (BSP por sus siglas en inglés Bone SialoProtein) es una proteína osteogénica que se encuentra en la matriz extracelular del hueso y la dentina, aunque aparentemente no esta presente en la pulpa dental. Se ha sugerido que la BSP tiene varias funciones biológicas como modular la mineralización *in vitro*, ser un nucleador de la hidroxiapatita, mediar la inserción de las células, y tener gran afinidad por las fibras de colágeno. Además de ser capaz de inducir la diferenciación de células similares a osteoblastos a partir de células mesenquimáticas indiferenciadas (120).

Decup y cols. (120) en el año 2000, utilizaron un modelo *in vivo* en pulpas de ratas para comparar los efectos de la sialoproteína ósea (BSP) mezclada con gelatina/colágeno como transportador, con tres grupos de materiales; un grupo simulador donde sólo se rellenó la perforación pulpar con cemento de vidrio ionómero, otro grupo donde se implantó sólo el transportador y un tercer grupo donde se realizó el recubrimiento con hidróxido de calcio.

Los resultados de este estudio demostraron que la BSP estimula la diferenciación de células las cuales segregan una matriz extracelular organizada más eficiente que los otros materiales utilizados. Por lo tanto la sialoproteína ósea presenta propiedades bioactivas novedosas y es capaz de estimular el desarrollo de un tejido reparativo dentinario en la pulpa ocluyendo el sitio de la exposición pulpar. ⁽¹²⁰⁾

Six y cols. ⁽¹²¹⁾ en 2002, utilizando la misma metodología anteriormente descrita, compararon la sialoproteína ósea (BSP) con la BMP-7. Se encontró que la BSP produjo una estructura similar a la dentina de forma tubular homogénea, la cual relleno el tercio mesial de la pulpa coronal luego de un mes de la implantación. Estos autores refieren que, al BSP inducir la mineralización en la porción coronal, ésta pudiese ser utilizada como agente de recubrimiento pulpar.

Posteriormente los mismos autores, utilizaron comprimidos de colágeno que contenían diferentes dosis de BMP7, usando control colágeno sólo como agente de recubrimiento pulpar, encontrando que en este último grupo se obtuvo la formación de una osteodentina irregular, quedando algunas áreas no mineralizadas en el sitio de la exposición, y áreas no mineralizadas interglobulares que contenían remanentes pulpares ⁽¹²²⁾

Estos hallazgos sugieren que existe un prerrequisito en la superficie físico-química para la diferenciación de odontoblastos.

Sin embargo, los mecanismos que sustentan esta afirmación permanecen sin aclarar. (6)

La matriz extracelular sintética también puede servir como soporte o andamiaje potencial para la dentinogénesis reparativa

El hidrogel de alginato facilita la cicatrización de la herida pulpar debido a sus propiedades de hidratación y de entrega de factores de crecimiento como TGF β -1 para acentuar la capacidad regenerativa natural de la pulpa dental. (123)

Varios estudios de ingeniería de tejidos dentales han utilizado como andamiajes, polímeros sintéticos como ácido poliglicólico (PGA) (22, 106-108, 112), ácido polilactoglicólico (PLGA). (106, 108), hidrogeles de alginato (112) para la formación de estructuras dentarias

Bohl *y cols.* (112), en 1998 sembraron células pulpares en tres diferentes tipos de matrices sintéticas; un andamiaje fabricado de fibras de ácido poliglicólico (PGA), uno de colágeno tipo I, y uno de hidrogel de alginato para examinar cuál matriz es mejor para la formación de tejidos de la pulpa dental. Se obtuvo el mejor resultado con el andamiaje de ácido poliglicólico

El progreso adicional en los andamiajes para la endodoncia regenerativa depende de un microambiente tridimensional que estimule el comportamiento celular, incluyendo la polarización celular y la dispensación óptima de morfógenos, como la familia de las proteínas óseas morfogenéticas.

6.3. MORFÓGENOS EN LA REGENERACIÓN DE PULPA Y DENTINA

La presencia de factores de crecimiento en la matriz de dentina, y su rol presuntivo en la señalización durante la diferenciación de odontoblastos en la embriogénesis, también ha inducido que se lleven a cabo estudios relacionados con los efectos de TGF- β s, BMPs, FGFs e IGFs en la dentinogénesis reparativa. (118, 119, 124 -133)

6.3.1. Estudios *in vitro* de los efectos de morfógenos en la dentinogénesis reparativa

a) BMP-2

Se ha demostrado que la BMP-2 recombinante humana estimula la diferenciación de células pulpares adultas en odontoblastos en cultivos monocapa (124, 125) y en cultivos pellet tridimensionales (126).

Nakashima y *cols.* (124) en 1994 reportaron que el tratamiento de cultivos monocapa de células pulpares bovinas con BMP-2 recombinante humana estimuló la diferenciación de odontoblastos.

Saito y cols. ⁽¹²⁵⁾ en el año 2004 corroboraron la capacidad de la BMP-2 de acelerar la diferenciación de las células pulpares humanas en odontoblastos, utilizando PCR cuantitativo

Iohara y cols. ⁽¹²⁶⁾ en 2004 compararon un sistema tridimensional de cultivos de células pulpares porcinas con cultivos monocapa, para evaluar la eficacia de BMP2 en la diferenciación de células pulpares en odontoblastos. Obtuvieron una mayor sensibilidad para la BMP-2 en los cultivos tridimensionales que en los cultivos monocapa.

b) TGFβs y BMP7

Se ha observado un efecto similar de estimulación de diferenciación de células pulpares adultas en odontoblastos con TGFβ 1-3 y BMP7 en cortes de dientes cultivados ^(127, 128)

Sloan y Smith ⁽¹²⁷⁾ en 1999 utilizaron un modelo de cultivo de órganos, en el cual cortes de dientes de incisivos de roedores fueron cultivados después de ser embebidos en un medio a base de agar semisólido. Encontraron que TGFβ-1 y TGFβ-3 pueden estimular la secreción de matriz extracelular por los odontoblastos y ejercer efectos mitogénicos en las células pulpares. Además hallaron que TGFβ-3 pudiese tener efectos inductivos en las células pulpares.

Al usar el mismo modelo descrito anteriormente Sloan y cols. ⁽¹²⁸⁾ en el año 2000, reportaron que BMP-7 puede estimular la

actividad secretoria *in vitro* de los odontoblastos en el complejo dentino pulpar de ratas, dando la impresión de que esta respuesta reparativa es dosis dependiente, ya que mientras más alta la concentración de esta proteína, mayor estimulación de secreción de matriz.

Los estudios *in vitro* previos, han indicado el papel de los morfógenos como agentes inductivos; pueden estimular a las células mesenquimáticas de la pulpa dental a diferenciarse en odontoblastos y secretar matriz de dentina.

6.3.2 Estudios *in vivo* de los efectos de morfógenos en la dentinogénesis reparativa

También se ha reportado una cantidad de estudios *in vivo* por medio de la trasplatación de morfógenos en la pulpa dental de animales que promueven los procesos reparativos del complejo dentino-pulpar (118, 119, 129-133, 136)

a) BMPs, TGF β -1

Las BMP2, BMP4 y BMP7 recombinantes humanas inducen la formación de dentina reparativa/regenerativa *in vivo* (118, 119, 129-133, 136)

Nakashima (129) en 1990 fue uno de los primeros en investigar el efecto de la implantación de proteínas óseas morfogenéticas en la inducción de dentina reparadora. En su estudio, las

cavidades de pulpas amputadas de perros fueron recubiertas con BMP. La formación de dentina reparadora comenzó con una respuesta inmune mediada por células, seguida de la resorción de BMP y la proliferación de células mesenquimáticas junto con la invasión vascular. Se observó la formación de dentina tubular a las ocho semanas.

Siguiendo la misma línea de investigación, Nakashima ⁽¹¹⁸⁾ en 1994, examinó la hipótesis de que la BMP-2 y la BMP-4 inducen la formación de dentina en pulpas amputadas en perros. Las proteínas BMP-2 y BMP-4 recombinantes y el uso de matriz de dentina inactivada como transportador fueron utilizadas como agente de recubrimiento en pulpas amputadas.

A los dos meses, la pulpa amputada fue rellenada con dentina tubular en la parte más baja de la misma, y de osteodentina en la parte más alta. La cantidad de dentina formada fue notablemente menor cuando se aplicó la matriz de dentina sin ninguna proteína ósea morfogenética ⁽¹¹⁸⁾.

Estos hallazgos denotan que las proteínas recombinantes humanas BMP-2 y BMP-4 inducen la diferenciación de las células adultas pulpares en odontoblastos cuando son trasplantadas *in vivo* en animales ⁽¹¹⁸⁾.

En contraparte, Nakashima ⁽¹¹⁹⁾ en el mismo año, utilizó diferentes dosis de BMP-2, dosis únicas de BMP-4 y TGF β -1, para evaluar sus efectos en la regeneración pulpar y formación de dentina, pero esta vez utilizando una matriz de colágeno como transportador, y encontró que la implantación de BMP-2 y BMP-4

con matriz de colágeno no es tan efectiva para formar dentina tubular, sugiriendo que algunos otros componentes presentes en la matriz de dentina inactivada, pudiesen ser esenciales para la diferenciación de los odontoblastos.

Los resultados de este estudio, parecieran sugerir que existe una relación dosis dependiente para la BMP2, donde a mayor dosis mayor formación de tejido mineralizado. En base a esta premisa, se podría ejercer un control de los eventos de inducción de la dentinogénesis reparadora a través de la dosis dependencia, sin embargo esto requiere investigaciones futuras (119).

En los dientes implantados con 4 μg s de BMP-4 se observó un tejido de osteodentina. No se formó dentina tubular (119).

En los dientes implantados con TGF β -1, la matriz de colágeno permaneció en la cavidad y se observó poca proliferación de tejido pulpar, sugiriendo un posible efecto inhibitorio de TGF β -1 sobre la regeneración pulpar (119).

Otra proteína que se ha estudiado mucho en relación a la inducción de dentina reparadora es la BMP-7, también llamada proteína osteogénica OP-1 (130)

Rutherford y cols. (130) en 1993 llevaron a cabo un estudio experimental de recubrimiento pulpar en pulpas expuestas de molares y premolares, para determinar si la cantidad de formación de dentina reparadora estimulada por la OP-1 combinada con un transportador de matriz de colágeno, está

relacionada con la cantidad de proteína utilizada. Se comprobó la capacidad de la proteína recombinante humana OP-1, de preservar la vitalidad pulpar e iniciar la formación de dentina reparadora cuando es aplicada directamente sobre exposiciones pulpares mayores de 2 mm de diámetro en monos.

En este experimento las pulpas remanentes se mantuvieron vitales y se formó dentina reparadora en todos los dientes tratados con OP-1. La dentina recién formada reemplazó el espacio ocupado por la OP-1 con matriz de colágeno. La cantidad de formación de esta dentina fue proporcional a la cantidad de proteína aplicada. Por otro lado, cuando se comparó con el grupo tratado con Ca(OH)_2 se observó mayor proporción de dentina recién formada con la OP1 que con el Ca(OH)_2 ⁽¹³⁰⁾

Estos resultados demuestran que la proteína OP-1 puede jugar un papel importante en la dentinogénesis y si se combina con una matriz de colágeno puede ser efectiva como agente de recubrimiento pulpar ⁽¹³⁰⁾.

Aún cuando los resultados de este estudio muestran que la OP-1 con una matriz de colágeno puede inducir la formación de dentina reparadora independientemente de la extensión de la amputación de la pulpa coronal, pareciese posible que la pulpa radicular adulta no responda a la OP-1 de la misma manera que la pulpa coronal ⁽¹³¹⁾.

En base a esta premisa, Rutherford y cols. ⁽¹³¹⁾ en 1994 realizan otro estudio para evaluar la capacidad de la OP-1 para preservar la vitalidad pulpar e inducir la formación de dentina

reparadora, cuando es aplicado directamente en la superficie de pulpas radicales recién amputadas posterior a la pulpotomía coronal.

Se mantuvo la vitalidad de la pulpa radicular, así como se observó la formación de dentina reparadora. La mineralización completa se halló cerca del 75% después de un mes de cicatrización y en más del 95 % después de cuatro meses de cicatrización ⁽¹³¹⁾.

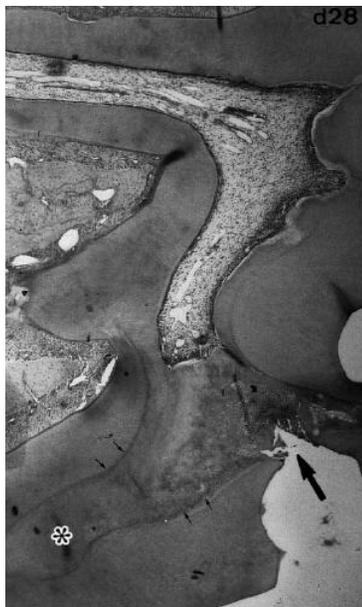
Estos hallazgos confirman el potencial de la proteína osteogénica recombinante OP-1 para formar dentina reparadora y mantener la vitalidad en la pulpa radicular. Sugiriendo un enfoque para tratar pulpas inflamadas, donde presumiblemente dientes con alguna extensión de cambios inflamatorios pre-existentes en la pulpa coronal, pudiesen ser restaurados satisfactoriamente por medio de la remoción de la pulpa coronal inflamada, produciéndose una cantidad limitada de formación de dentina reparadora a nivel de los orificios de entrada de los conductos y manteniendo así la vitalidad pulpar radicular ⁽¹³¹⁾.

Siguiendo esta misma línea de investigación, Six y cols. ⁽¹²²⁾ en el año 2002 estudiaron las diferentes respuestas de reparación entre las áreas coronal y radicular de pulpas expuestas de molares de rata inducida por la proteína ósea morfogenética BMP-7. Así mismo, evaluaron si esta reacción es dosis-dependiente, al utilizar tres dosis de esta molécula.

No detectaron diferencias entre las tres concentraciones de BMP-7 utilizadas, comprobando que la reacción de reparación no

es dosis-dependiente. A los 28 días de la implantación de BMP-7, se observó una mineralización heterogénea o la formación de un tejido de osteodentina, el cual relleno la porción coronal mesial de la pulpa. En el área de la pulpa radicular se observó la mineralización homogénea de la raíz mesial. Estos resultados enfatizan las diferencias biológicas de reparación entre las áreas coronales y radiculares de la pulpa dental, sugiriendo el potencial de esta molécula bioactiva para proveer una alternativa al tratamiento de conducto convencional ⁽¹²²⁾. No obstante, faltan más estudios que corroboren esta afirmación. (Gráfico 17)

Gráfico 17. Diferentes respuestas de reparación entre las áreas coronal y radicular de pulpas expuestas inducida por BMP-7



BMP 7 [1] día 28. La pulpa coronal mesial es rellena totalmente con una masa mineralizada heterogénea. El resto del tejido pulpar en la porción coronal se encuentra normal sin signos de inflamación. Una línea calciotraumática (flechas pequeñas) indican el límite de la dentina antes de la implantación de BMP-7. El sitio de la implantación se observa en la gráfica con flechas gruesas. También se observa dentina reparadora homogénea que rellena la porción coronal del conducto mesial (*). Tomado de Six y cols. 2002

En los estudios publicados de inducción de reparación de dentina utilizando proteínas morfogenéticas se han utilizado tejidos pulpares clínicamente sanos. Sin embargo, en circunstancias clínicas, muchos pacientes que pudiesen ser candidatos para terapias de recubrimiento pulpar presentan dientes vitales con una historia reciente de pulpitis con o sin síntomas clínicos.

Es por esta razón que Rutherford y Gu ⁽¹³²⁾ en el año 2000 llevan a cabo un estudio, utilizando un modelo animal de pulpitis reversible para evaluar los efectos de reparación dentinaria con la aplicación de BMP-7 en pulpas inflamadas, comparándolo con un grupo control de pulpas sanas.

Los hallazgos obtenidos en este estudio revelan que la aplicación de BMP-7 en dientes con pulpas inflamadas no indujo la reparación de dentina. ⁽¹³²⁾

b) Otros morfógenos

Tziafas y cols. ⁽¹³³⁾ en 1998 compararon los efectos del factor de crecimiento fibroblástico básico, (FGFb), el factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF)-II y el factor de crecimiento transformador TGF- β 1 en células pulpares posterior a su implantación en los sitios de exposición, en pulpas mecánicamente expuestas de molares y caninos de perros, utilizando el microscopio electrónico de transmisión

Este estudio demostró que la implantación intrapulpar de TGF- β 1, por periodos cortos de tiempo en los sitios de pulpas expuestas, puede inducir la diferenciación de células similares a odontoblastos, la estimulación de odontoblastos primarios y la formación de dentina reparadora en la vecindad inmediata al sitio de la implantación. En cambio FGFb y IGF-II no indujeron la formación de dentina reparadora, pero si estimularon la deposición de matriz osteotípica a distancia de los implantes (133).

Sin embargo, cuando se utiliza TGF- β 1 como agente de recubrimiento pulpar su utilidad es limitada como lo demostró Tziafas y cols. (134). en el año 2001 cuando realizó una serie de experimentos de recubrimiento pulpar a corto plazo en dientes de perros, para evaluar el potencial directo de inducción de diferenciación de células similares a odontoblastos del TGF- β 1 en substrato artificiales como filtros Milipore, gránulos de hidroxiapatita, hidróxido de calcio y titanio puro

El factor de crecimiento humano recombinante derivado de la insulina tipo I con una membrana de colágeno, induce la formación completa de puentes de dentina y la formación de dentina tubular (135).

Goldberg y cols. (136) en 2001 evaluaron los efectos de diferentes moléculas bioactivas: BMP-7, BSP, CaOH₂ y N-acetil cisterna (NAC) -un agente antioxidante- en la cicatrización de la herida pulpar utilizando un modelo *in vivo* de ratas.

Tanto BSP como BMP-7 fueron superiores al hidróxido de calcio en sus propiedades de inducción de mineralización, los cuales pareciesen haber procedido de mecanismos que involucran el reclutamiento de células que se diferencian en células similares a odontoblastos, produciendo una matriz extracelular mineralizada. En este estudio también se evidenció que NAC induce la formación de dentina reparadora ⁽¹³⁶⁾.

7. TERAPIA GÉNICA *IN VIVO* Y *EX VIVO* EN LA REGENERACIÓN DE PULPA Y DENTINA

La vida media de las BMPs como proteínas recombinantes es limitante y se requieren de altas concentraciones junto a un andamiaje óptimo durante la aplicación local a la pulpa expuesta para que se forme dentina reparadora (119).

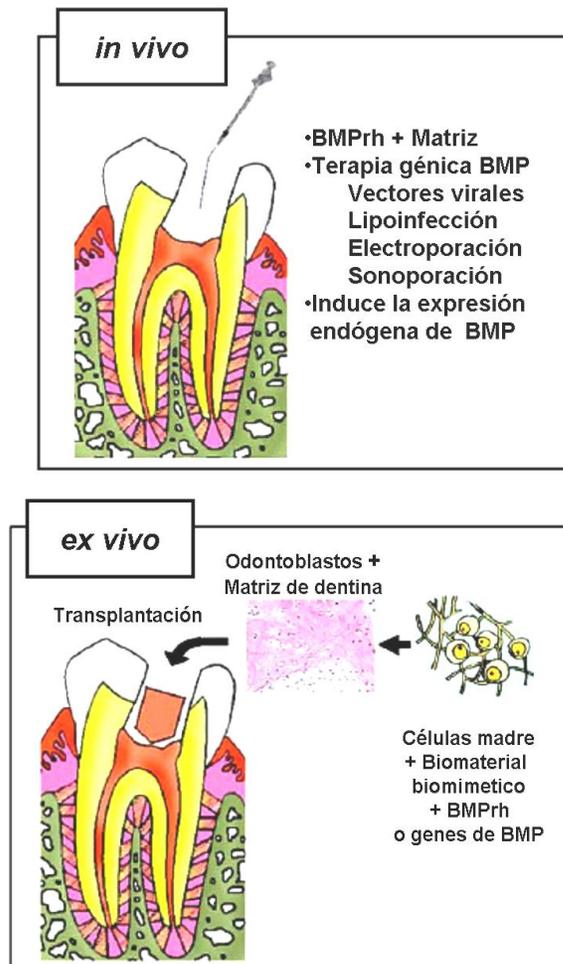
Los progresos recientes en la biología molecular permiten el reparto de las BMP por medio la terapia génica, superando las desventajas de la terapia con proteínas (17).

Las dos estrategias principales de la terapia génica pulpar para regenerar dentina se basa en el método *in vivo* y en el método *ex vivo* (17, 137).

En el método *in vivo*, el potencial natural de cicatrización de la pulpa dental es acentuado con la aplicación directa local de proteínas óseas morfogenéticas o genes que codifican para proteínas óseas morfogenéticas en la pulpa dental expuesta (137).

En el método *ex vivo*, las células madre de la pulpa dental son primero aisladas, tratadas con proteínas óseas morfogenéticas o genes de estas proteínas para diferenciarse en odontoblastos en la superficie del andamiaje y luego trasplantadas en la pulpa expuesta (137).

Gráfico 18. Terapia génica *in vivo* y *ex vivo*



Tomado de Nakashima 2005

Hasta ahora, sólo un pequeño grupo de investigaciones han utilizado enfoques de ingeniería tisular mejorada con genes en la regeneración de dentina y pulpa.

7.1 Terapia génica *in vivo* para la regeneración de pulpa y dentina

Rutherford ⁽¹³⁸⁾ en el año 2001, utilizó métodos virales para la transferencia de genes en pulpas de hurones inflamadas experimentalmente.

Para esto provocó una infección directa en pulpas inflamadas, al inocular un adenovirus recombinante que contenía un gen de Bmp7, y obtuvo pequeñas cantidades de masa pobremente organizada en algunos de los dientes donde el virus fue inyectado directamente, por lo que la infección *in vivo* con AdBMP-7 falló en producir dentina reparadora ⁽¹³⁸⁾.

Se han empleado métodos no virales en tejido pulpar ^(139, 140), teniendo en consideración ventajas como la producción estable de plásmidos de ADN complementario con un alto nivel de pureza, de fácil manipulación y con unos riesgos mínimos de replicación o incorporación; y con inmunogenicidad débil ⁽¹⁴¹⁾

El factor de crecimiento/diferenciación 11 (Gdf11) es un miembro nuevo de la familia BMP/TGF β , del cual se ha demostrado que se expresa en la diferenciación odontoblástica terminal, y además juega un rol en la diferenciación de las células madre de la pulpa dental en odontoblastos ⁽¹³⁹⁾.

Nakashima y cols. ⁽¹³⁹⁾ en 2002 investigaron si la transferencia de genes que codifican para el factor Gdf11 pudiese incrementar el potencial de cicatrización de los tejidos

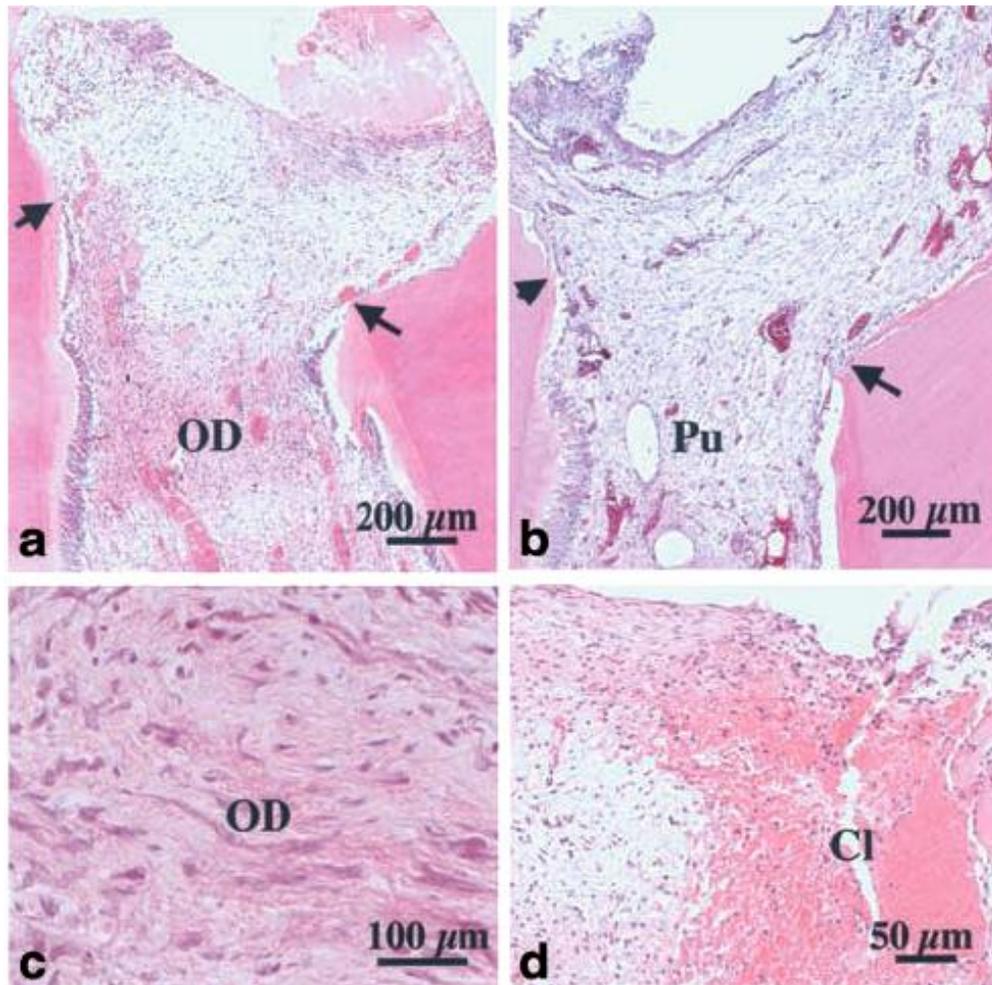
pulpares por medio de la inducción de la diferenciación de odontoblastos y la formación de dentina reparadora *in vitro*, utilizando un cultivo de órganos de la papila dental de ratones e *in vivo* a través de la transferencia por electroporación de genes.

Encontraron que el plásmido ADN complementario Gdf11 se transdujo eficientemente por electroporación dentro de células pulpares *in vitro* e indujo la expresión de sialofosfoproteína dentinaria (Dspp), el cual es un marcador de diferenciación para odontoblastos. (139)

La transferencia del gen Gdf11 *in vivo* en la pulpa amputada de perros indujo la formación de una matriz de osteodentina, la cual sólo contenía pocos túbulos dentinarios. El tejido de dentina recién formado recubrió la pulpa expuesta de forma incompleta y no homogénea. Además, adyacente al electrodo, se observó una laguna de eritrocitos en un coágulo de plasma, debido al daño térmico y por la invasividad al tejido por parte del electrodo (139). (Grafico 19)

El uso de la transferencia de genes mediada por ultrasonido, puede prevenir el daño térmico y la invasividad tisular asociada con el electrodo del sistema de electroporación. Se han desarrollado materiales activados acústicamente, microburbujas y agentes precursores gaseosos que aglutinan o atrapan el material genético. Se logra un efecto sinérgico con el uso de ultrasonido y microburbujas, ya que la energía ultrasónica puede ser utilizada para la cavitación de microburbujas y repartición local de genes al tejido (140).

Gráfico 19. Electroporación *in vivo* de Gdf11 en pulpas amputadas de perros

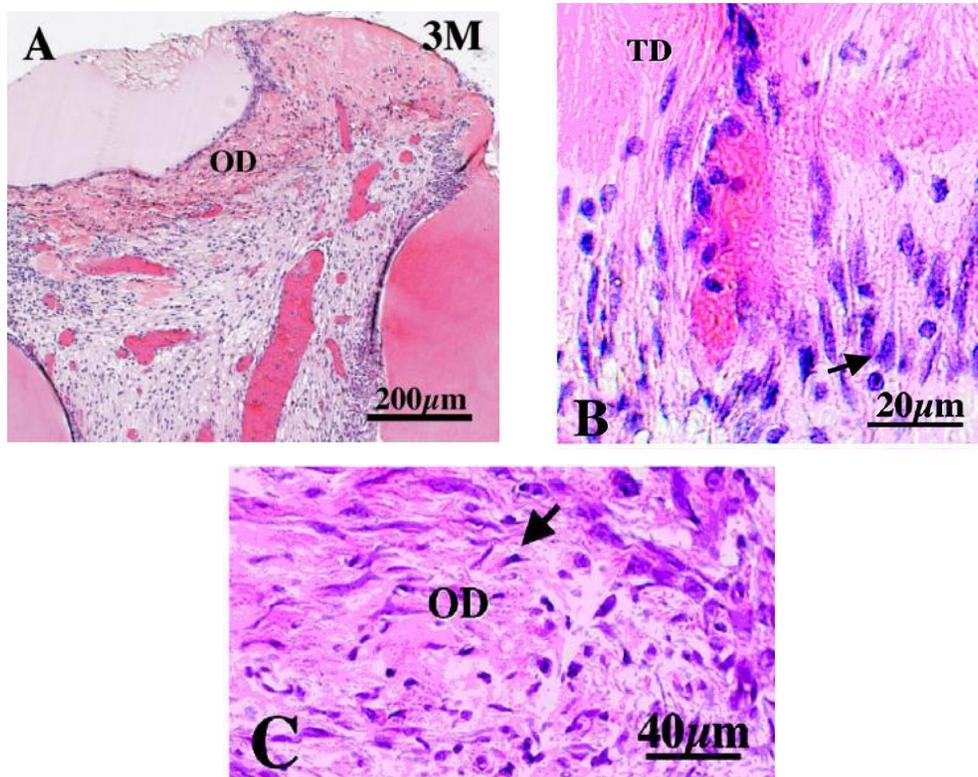


Al mes se observa la formación de una matriz gruesa de osteodentina (OD) (a, c) Por debajo del sitio de la amputación (flechas) en respuesta a la terapia génica con Gdf11. La dentina reparadora recién formada con matriz intercelular conteniendo pocos túbulos dentinarios (c). La proliferación del tejido pulpar en la cavidad encima del sitio de la amputación (a, b). No se formó matriz de osteodentina en el control (b). Tejido Pulpar (Pu). Coágulo de plasma (CI) inmediatamente adyacente al electrodo (d) Tomado de Nakashima y cols. 2002

Nakashima y cols. 2003 ⁽¹⁴⁰⁾ llevaron a cabo una investigación, donde optimizaron las técnicas de transfección de genes de Gdf11 para inducir la diferenciación de células madre de la pulpa dental en odontoblastos *in vitro* y la formación de dentina reparadora *in vivo*, por medio de la sonoporación con microburbujas en el tejido pulpar de perros.

La transferencia del gen Gdf11 mediada por ultrasonidos junto con microburbujas, indujo la diferenciación de células madre pulpares en odontoblastos *in vitro* y la formación completa de dentina reparativa *in vivo* ⁽¹⁴⁰⁾. (Gráfico 20)

Gráfico 20. Sonoporación *in vivo* de Gdf11 en pulpas amputadas de perros



La sonoporación *in vivo* de Gdf11 en la pulpa amputada de perros después de un mes. Se observa en A la formación de dentina tubular (TD) y osteodentina (OD) en la pulpa amputada B: Mayor magnificación de la dentina tubular recién formada. Se observan células similares a odontoblastos con un proceso celular alargado (flecha) C: Osteodentinoblastos (flecha) produciendo matriz alrededor de los mismos e incrustados en la osteodentina (OD). *Tomado de Nakashima y cols. 2003*

7.2. Terapia de génica *ex vivo* para la regeneración de pulpa y dentina

La terapia génica *in vivo* no tiene mucho efecto en la formación de dentina reparadora en casos de inflamación severa y la presencia de pocas células madre/progenitoras en el tejido pulpar ⁽¹³⁸⁾.

Una alternativa es la terapia con métodos *ex vivos*, utilizando el trasplante autógeno de células transfectadas con BMP en la pulpa expuesta.

El trasplante de fibroblastos dérmicos autólogos cultivados en un hidrogel de colágeno, transducidos con Bmp7, y utilizando un adenovirus recombinante, también indujo la formación de dentina reparadora en la pulpa expuesta con pulpitis reversible, en contraste a los resultados obtenidos con la terapia *in vivo* de transferencia de genes de Bmp7 directamente aplicados a la pulpa dental inflamada ⁽¹³⁸⁾.

Rutherford ⁽¹³⁸⁾ en 2001, examinó la hipótesis de que la transferencia de genes de BMP-7 pudiera inducir la regeneración del complejo dentino-pulpar en pulpas inflamadas. Fibroblastos dérmicos autólogos fueron cultivados en un hidrogel de colágeno, posteriormente fueron infectados *ex vivo* con adenovirus recombinante que contenía BMP7 y fueron transducidos en pulpas inflamadas de hurones.

Se observó la inducción de dentina reparadora y la aparente regeneración del complejo dentino pulpar en los dientes que recibieron la terapia *ex vivo* de fibroblastos transducidos con BMP7Ad ⁽¹³⁸⁾

Nakashima *y cols.* ⁽¹⁴²⁾ en 2004, utilizando un modelo de terapia génica *ex vivo*, desarrollaron un sistema de cultivo tridimensional de células madre pulpares autógenas electrotransfectadas con Gdf11. Estas células madre de la pulpa dental transfectadas con Gdf11 expresaron marcadores de diferenciación odontoblástica *in vitro*

Posteriormente fueron trasplantadas *in vivo* en pulpa de perros, demostrando que la terapia génica *ex vivo* estimuló inicialmente osteodentina y fue seguida por la formación permanente de dentina tubular en la pulpa expuesta ⁽¹⁴²⁾.

Las células transducidas con genes de BMP contribuyen directamente a la formación de matriz de dentina reparativa/regenerativa. Además, varios factores de crecimiento/diferenciación retenidos en la matriz del trasplante

pueden ser liberados gradualmente e inducir diferenciación de células pulpares hospederas ⁽¹⁴²⁾.

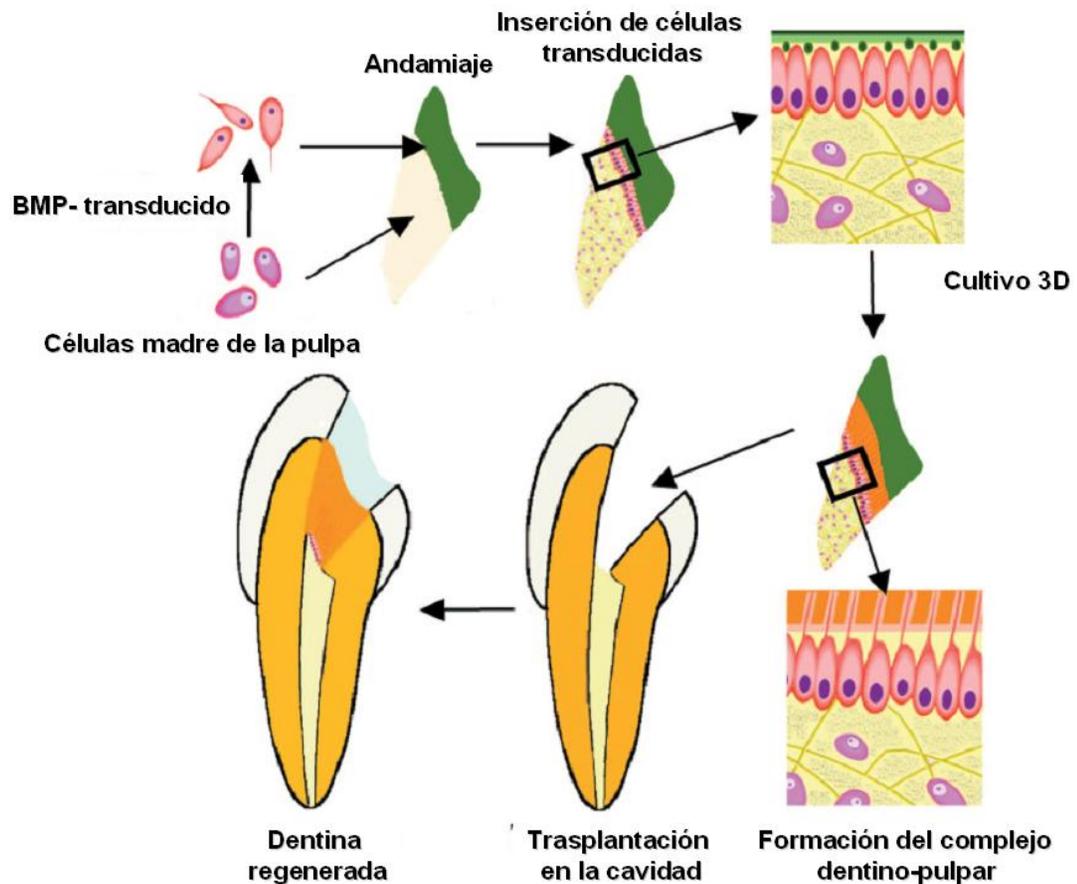
Gráfico 21. Método *ex vivo*



Una gran cantidad de deformación de osteodentina y dentina tubular después de 3 meses. Tomado de Nakashima y cols. 2004

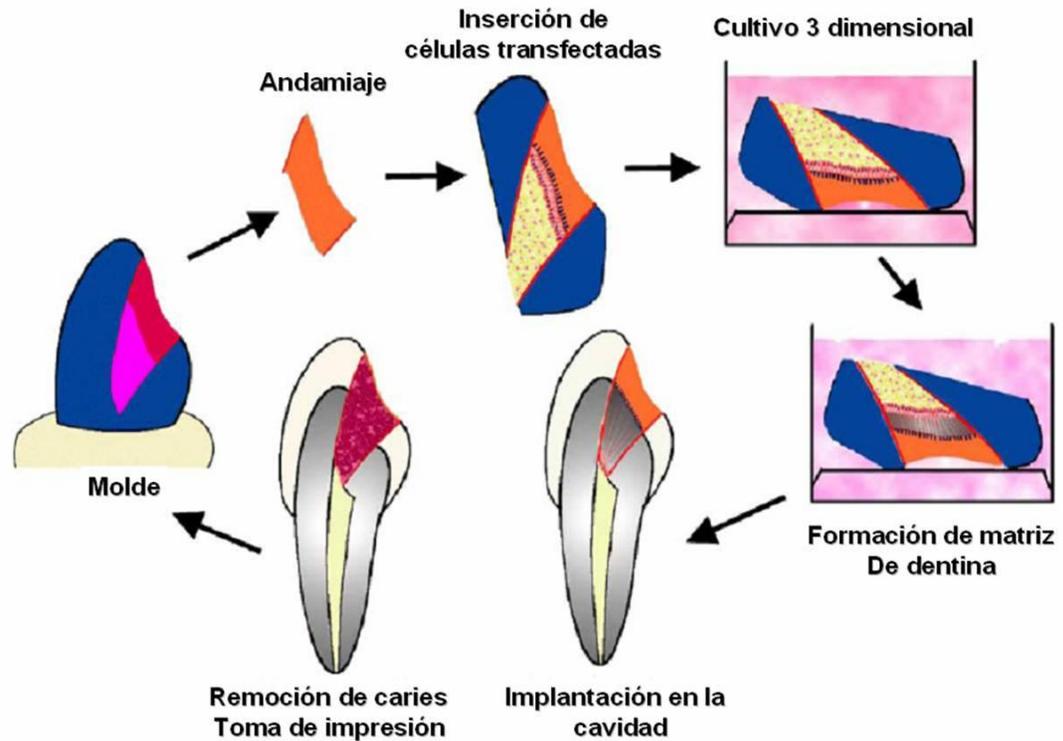
La respuesta biológica de las células del tejido pulpar a la terapia *ex vivo* de genes de BMP en presencia de pulpitis, demuestra lo promisorio de la terapia génica *ex vivo* en la regeneración/reparación de la dentina para aplicaciones clínicas en el tratamiento de endodoncia ^(17, 137) (Gráfico 21, 22, 23)

Gráfico 22. Terapia génica con método *ex vivo* para la formación del complejo dentino-pulpar



La formación del complejo dentino-pulpar a través de la terapia génica con método *ex vivo*. Las células madre pulpares son transducidas con genes de proteínas óseas morfogenéticas e insertadas en un andamiaje definido para diferenciarse en odontoblastos. Posteriormente son trasplantadas en la pulpa expuesta o en la cavidad de la pulpa amputada. *Tomado de Nakashima y Akamine 2005*

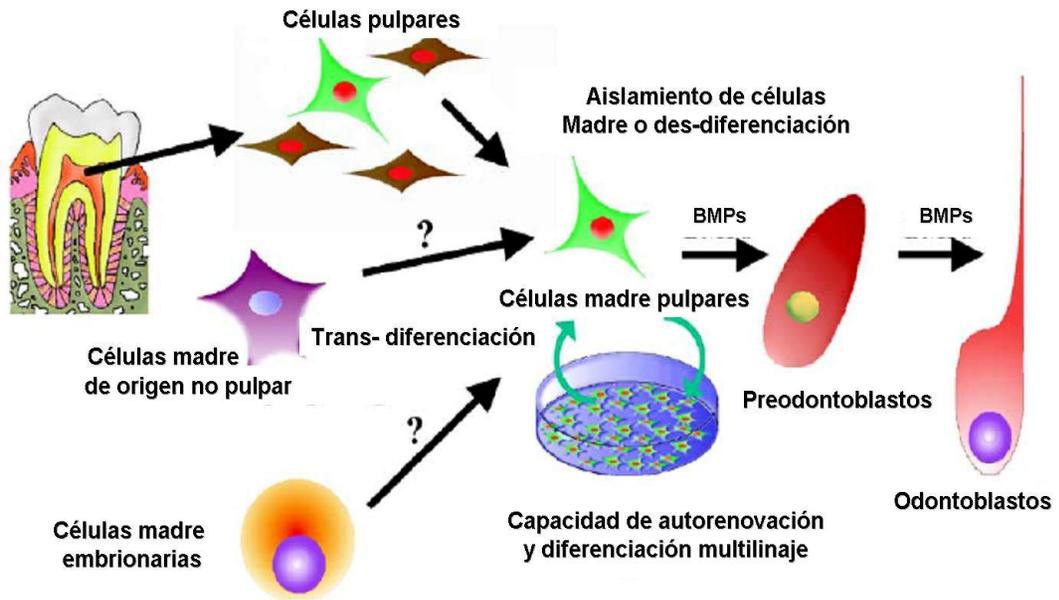
Gráfico 23. Formación de dentina tubular con una orientación óptima para las aplicaciones clínicas



Tomado de Nakashima 2005

La gran potencia de los genes que codifican para BMPs de provocar diferenciación de células pulpares, incluso en la pulpitis reversible, demuestra la utilidad de la terapia génica ex vivo en la formación de dentina reparadora/regenerativa para el tratamiento endodóntico clínico (137).

Gráfico 24. Potencial de las células madre de la pulpa dental y de los morfógenos para la regeneración dental.



Tomado de Nakashima 2005

Los principales retos de la terapia génica en la próxima década serán los requerimientos para demostrar que ésta puede proporcionar tratamientos costo-efectivos y seguros a largo plazo, en condiciones que de otra manera inducirían a la necrosis pulpar significativa (17)

8. REGENERACIÓN NERVIOSA

El papel que cumplen las fibras nerviosas en la regeneración de los dientes es complejo. Está afectado por la forma celular y por las funciones propias de las fibras nerviosas, las cuales se extienden distantemente desde los dientes hasta el cuerpo celular (localizado en el ganglio trigémino para las fibras sensitivas o en el ganglio cervical para las fibras simpáticas), y en su terminal en el sistema nervioso central. La historia es aún más complicada, debido a los diferentes tipos de fibras sensitivas presentes en el diente, cada una con diferentes funciones, localizaciones de los receptores sensoriales y los tipos de interacciones con la pulpa, dentina, células inmunes y vasculatura ⁽¹⁴³⁾.

También existen interacciones entre los nervios sensoriales y los nervios simpáticos. Las fibras nerviosas periféricas, incluyendo aquellas que se encuentran en el diente, secretan una variedad de agentes que afectan la homeostasis tisular, el flujo sanguíneo, la función de las células inmunológicas, la inflamación y la cicatrización. Las fibras nerviosas también se ajustan a sus propias funciones, citoquímica y estructura para acomodarse a las condiciones del tejido blanco. Estas interacciones bidireccionales tejido-nervio y neuroplasticidad, son especialmente prominentes en fibras sensoriales polimodales nociceptivas, las cuales son el mayor componente de la inervación dental ⁽¹⁴³⁾.

Todas las características de la implicación neural en la regeneración dentaria están afectadas por la edad, y están amplificadas por la infección, como se ha demostrado en estudios de reimplantación, trasplante o exposición pulpar en condiciones libres de microorganismos (144, 145).

El tejido periodontal puede ser completamente reconstituido durante la cicatrización si la infección es removida. Por el contrario, la reparación de los tejidos dentarios, no reproduce el tejido original de pulpa y dentina (143).

Los estudios de Inoue y Shimono (144) del 1992; Nishioka y cols. (145) del 1998, evidencian el reemplazo de células similares a odontoblastos, las cuales forman dentina reparadora que es soportada por una pulpa reparadora con formas celulares alteradas permanentemente, matriz de dentina, sistema vascular, inervación y soporte inmunológico. Esto sugiere que los objetivos alcanzables con la biomimética del diente están limitados a encontrar vías para la preservación de los odontoblastos originales primarios con su dentina y pulpa asociada o cuando estas células se han perdido, facilitar la producción de pulpa, dentina reparadora y su soporte vascular nervioso e inmune (153).

Las fibras nerviosas nociceptoras son participantes importantes en la preservación del diente, debido a que su advertencia de daño causa una disminución en el reflejo que limita la intensidad, extensión y duración de la agresión inicial. También facilitan la reparación por medio de la amplificación de

los mecanismos de inflamación, inmunológicos y de cicatrización (153).

La pulpa dental es un tejido conectivo ricamente innervado. El principal aporte nervioso entra a la pulpa a través del foramen apical junto con los elementos vasculares. Las fibras nerviosas prosiguen al área coronal, donde en su mayor parte terminan formando un plexo en la capa odontoblástica, predentina y a 0,1 milímetros de la dentina coronal. Las terminaciones de las fibras sensoriales son especialmente densas cerca de la punta de los cuernos pulpares, donde la sensibilidad es mayor, y luego disminuyen en gradiente hacia la unión corona-raíz, con menor cantidad de terminaciones nerviosas en la periferia de la pulpa radicular (143, 146).

El suplemento nervioso de la pulpa dental incluye tanto fibras nerviosas sensoriales como simpáticas. Hay tres tipos fibras sensoriales en la pulpa dental ($A\beta$, $A\delta$ y fibras C). En general, las fibras tipo A son mielinizadas y las fibras tipo C son amielínicas (143, 146).

Durante la maduración y el proceso de envejecimiento, los patrones neurales son mantenidos donde la dentina primaria y los odontoblastos sobreviven, con una atención fija en el complejo dentino-pulpar por debajo del esmalte. A medida que la pulpa envejece y la dentina secundaria y reparadora se acumula gradualmente, la innervación disminuye cambiando así su citoquímica (143, 146).

La localización citoquímica de neuropéptidos, el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF) y los neurofilamentos, varían con el tipo de fibra nerviosa (143, 146).

La secuencia temporal de la inervación de la pulpa dental depende de los gradientes de factores de crecimiento neurotróficos que emanan de las células pulpares. El factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), son expresados en la pulpa dental, como fue demostrado por Nosrat *y cols.* (147) en 2004 en un estudio *in vitro* en células de la pulpa dental de ratones y humanos.

Estos autores proponen que la pulpa dental es una fuente viable de células accesibles con posibles potenciales para el desarrollo de terapias de trasplante autóloga. También se demostró que una población de células pulpares derivadas de la cresta neural adquiere una morfología de neuronas clara y perfiles de expresión de proteínas *in vitro* indicando la presencia de una población celular en la pulpa dental con una capacidad de diferenciación neuronal que puede proveer beneficios adicionales cuando son injertados dentro del sistema nervioso central. (147)

Los nervios de la pulpa dental juegan un papel clave en la regulación del flujo y presión sanguínea, así como en el flujo del fluido dentinario (148-150) Sin embargo, no existe evidencia de

la regulación nerviosa en los fibroblastos pulpaes, la inflamación y la inmunidad (148, 151, 153).

La inervación pulpar tiene un rol crítico en la homeostasis de la pulpa dental. La invasión de células inmunitarias e inflamatorias en las zonas lesionadas de la pulpa está estimulada por los nervios sensoriales (146, 154)

La denervación sensorial resulta de una rápida necrosis de la pulpa expuesta por causa del flujo sanguíneo deteriorado, y la extravasación de células inmunes (148, 154-156).

La reinervación lleva a la recuperación de la dentina coronal. Las células de Schwann parecen liberar factores de crecimiento neurotrófico, importantes en la incorporación de nervios sensoriales y simpáticos durante la reinervación. De esa manera, las fibras nerviosas pulpaes contribuyen a la angiogénesis, extravasación de células inmunes y regulación de la inflamación para minimizar el daño inicial, manteniendo el tejido pulpar y fortaleciendo los mecanismos de defensa pulpar. (154)

La regeneración del tejido pulpar en un diente con una pulpa necrótica infectada con periodontitis apical, pudiese ser posible si el ápice se encuentra abierto por mas de 1,1 mm o presenta una apicectomía, o en el caso de avulsiones, si el diente es reimplantado dentro de los primeros 45 minutos, y es enjuagado con doxiciclina o minociclina antes del reimplante para desinfectarlo efectivamente (157, 158). El coágulo sanguíneo creado en el conducto actúa como matriz para el crecimiento de nuevo

tejido pulpar dentro del espacio del conducto radicular ⁽¹⁶⁷⁾. Una pregunta interesante sería cual es el origen del nuevo tejido pulpa, esta pregunta se mantiene sin respuestas.

Las BMPs juegan un papel importante en la formación de dentina reparadora/regeneradora, como se describió en la sección previa. Es de hacer notar que los miembros de la familia BMP tienen efectos pronunciados sobre la morfogénesis de las neuronas ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶²⁾

Así, es probable que puedan emplearse las BMPs para el tratamiento regenerativo de la pulpa y la dentinogénesis, ya que tienen efectos beneficiosos concurrentes en la regeneración nerviosa ⁽¹⁷⁾

El creciente interés en la ingeniería tisular del diente debe tener en cuenta las interacciones neuro-pulpares y la regeneración nerviosa. Las dificultades incluyen mecanismos nociceptivos, umbrales alterados de dolor en dientes inflamados y dolor dental, aunque no están limitadas sólo a estas ⁽¹⁶⁵⁾. Es por ello que se puede prolongar la vida de los dientes mediante la preservación de la pulpa y los odontoblastos, promoviendo la reparación y la regeneración por el estudio de las interacciones neuro-pulpares. El progreso reciente en las células madre/progenitoras dentales ^(98, 142) y los mecanismos de neurotrofismo de las células de la pulpa dental ⁽¹⁴⁷⁾; aseguran avances en la regeneración de nervios basados en las interacciones neuropulpares.

9. REGENERACIÓN VASCULAR

El sistema vascular en la pulpa dental juega un rol en la nutrición, en el suministro de oxígeno y como vía de eliminación de desechos metabólicos. Los elementos celulares de los vasos sanguíneos, como las células endoteliales, los pericitos y las células asociadas contribuyen a la homeostasis pulpar en conjunto con los nervios. Es por ello que la contribución vascular para la regeneración del complejo dentino-pulpar es inmensa. Las arteriolas entran en la cámara pulpar a través del foramen apical en conjunto con el aporte nervioso. Las arteriolas que se ramifican forman un plexo capilar por debajo de la capa de odontoblastos ⁽¹⁶³⁾.

Durante el desarrollo y la regeneración hay un aumento de la actividad vascular y del flujo sanguíneo. Existe una vía común de reacción vascular a estímulos variados, químicos y físicos, incluyendo los mecánicos y térmicos. Esta reacción incluye una inflamación local y la dilatación de los vasos sanguíneos y un aumento del flujo sanguíneo. La extravasación de leucocitos y el aumento de la permeabilidad vascular, es el sello de la respuesta vascular temprana ⁽¹⁶³⁾. La vasculatura pulpar juega un papel importante en la regulación de la inflamación y la subsiguiente reparación y regeneración de la dentina. Existe una asociación íntima de los elementos nerviosos con el suplemento vascular de la pulpa dental ⁽¹⁶⁴⁾ sugiriendo que los elementos neurales y vasculares se interrelacionan e involucran en la homeostasis pulpar

La vasculatura tiene una importancia crítica en la reparación y la regeneración. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es un regulador excelente de la angiogénesis y se sabe que aumenta la permeabilidad vascular ⁽¹⁷⁾.

Matsushita *y cols.* ⁽¹⁶⁵⁾ en 2000 llevaron a cabo un estudio para evaluar el efecto de VEGF producido por las células pulpares humanas. Se obtuvo que VEGF actúa directamente en las células de la pulpa dental de una manera autocrina, promoviendo la quimiotáxis, proliferación y diferenciación de las mismas

Roberts-Clark y Smith ⁽¹⁶⁶⁾, en el año 2000, demostraron que la matriz de dentina humana contiene factores de crecimiento angiogénicos como el VEGF, que pueden ser liberados después de una agresión contribuyendo a la respuesta reparativa del complejo dentino pulpar

La presencia de VEGF en la dentina y la respuesta de las células pulpares dentales a la VEGF, eleva la posibilidad de la presencia de células progenitoras endoteliales en la pulpa dental, junto a las progenitoras para odontoblastos y neuronas ^(98, 142, 167)

En vista de la importancia de las células progenitoras endoteliales en la vascularización durante la regeneración tisular, es muy probable que el VEGF y las células endoteliales vasculares sean críticos para la regeneración de dentina ⁽¹⁷⁾.

La utilidad de la terapia génica en la estimulación del crecimiento vascular, permite estimulación local de la vascularización durante la regeneración ⁽⁷⁶⁾. De hecho la terapia génica empleando miembros de la familia de BMP incluyendo BMP7 y GDF11, indujo exitosamente la regeneración del complejo dentino-pulpar ^(138, 142)

De esa manera, los avances recientes en la biología vascular, el VEGF, las técnicas de transferencia y la terapia génica serán de utilidad clínica potencial en odontología, especialmente en Endodoncia.

La aplicación de la ingeniería tisular en Medicina, específicamente en el campo de la odontología, se encuentra aún en investigación. A pesar de que la regeneración de estructuras dentarias todavía representa un gran desafío para los científicos e investigadores, será una realidad evidente dentro de los próximos 10 a 15 años; cuando los procedimientos clínicos pasen de ser restauradores para convertirse en regenerativos.

IV. DISCUSIÓN

Las investigaciones en el campo de la odontología se están enfocando en el desarrollo de nuevas estrategias clínicas efectivas que promuevan la regeneración de los tejidos bucales en casos de lesión o enfermedad de los mismos. Hasta ahora, los procedimientos clínicos para reemplazar y reconstruir tejidos se han destinado al alivio del dolor y a la restauración mecánica de la estabilidad y función, a través del uso de materiales restauradores sintéticos. Estos han sido exitosos por muchos años, sin embargo los mismos no reemplazan la estructura y función de los tejidos perdidos. La ingeniería tisular es considerada uno de los enfoques más prometedores para regenerar o reemplazar un tejido lesionado o dañado (168).

Una estrategia novedosa para restaurar la estructura dentaria afectada, está fundamentada en la biología, a través de procedimientos regenerativos. La regeneración de dentina y pulpa dental ha sido lograda en estudios animales y de laboratorio utilizando estrategias de ingeniería tisular (22, 48, 98-102, 112-142) En las últimas dos décadas, la ingeniería de tejidos ha ido evolucionando de la ficción a la ciencia.

De hecho, los reportes de casos clínicos aislados son consecuentes con el concepto de que ciertos tratamientos clínicos pudiesen evolucionar a procedimientos endodónticos regenerativos (157, 158). Sin embargo, son necesarias más investigaciones para desarrollar procedimientos clínicos regenerativos predecibles.

Un avance en la regeneración del complejo dentino-pulpar ha sido la demostración de poblaciones de células madre progenitoras de la pulpa dental. (98-102) No obstante, todavía no se conoce qué regula la transición abrupta de las células madre/progenitoras desde un estado latente a un estado activo en términos de proliferación, migración, diferenciación y secreción de la matriz, seguidos a la agresión del tejido pulpar. Estas interrogantes, al ser develadas, abrirán un camino en el uso terapéutico de células madre en la endodoncia regenerativa.

Estudios recientes de ingeniería de tejidos dentarios utilizando células del brote de dientes de animales por estrategias de bioingeniería, han demostrado el potencial exitoso de regeneración dentaria (106, 108-110). Las repercusiones clínicas reflejadas de estas investigaciones transformarán la odontología restauradora contemporánea, ya que se podrán obtener implantes dentarios biológicos propios del paciente los cuales sustituirán a los implantes de materiales sintéticos, eliminando el posible rechazo de los mismos por parte del organismo. El reto principal en relación a este punto es lograr el crecimiento completo de un diente con tamaño y morfología apropiados, que pueda ser funcional para su implante en la zona edéntula. A pesar de estas limitaciones, el progreso futuro en las técnicas de expansión de células madre/progenitoras y el control del linaje de odontoblastos que formen dentina constituirá un desafío interesante.

Otro enfoque en la regeneración de dentina y pulpa por medio de ingeniería tisular, es el uso de morfógenos o factores de crecimiento. Dada la presencia de estos factores en la matriz de dentina, y su relación en la señalización para la diferenciación de odontoblastos durante la embriogénesis, se han llevado a cabo estudios *in vitro* e *in vivo*, relacionados con los efectos de éstas moléculas de señalización en la regeneración del complejo dentino-pulpar (120-122, 124 -136).

Actualmente existe evidencia de que aún cuando se han perdido los odontoblastos debido a la caries dental, puede ser posible inducir la formación de nuevas células a partir del tejido pulpar utilizando moléculas bioactivas. Estas células similares a odontoblastos pueden sintetizar dentina reparadora (118-136).

Los estudios *in vitro* han comprobado el éxito de estas moléculas en lograr la diferenciación de odontoblastos en cultivos celulares. (124-126) Las investigaciones *in vivo* en modelos de animales están basadas en el recubrimiento pulpar con estas moléculas para promover la dentinogénesis reparativa (118, 119, 129-133, 136).

Aunque existe una cantidad de moléculas biológicas que pueden influenciar potencialmente la inducción de dentinogénesis reparativa y reparación pulpar, las estrategias desarrolladas se han dirigido hacia la investigación de grupos de moléculas potencialmente disponibles dentro de la pulpa después de la lesión, por mecanismos naturales de reparación y/o mecanismos que recapitulen los eventos del desarrollo dentario.

Estas estrategias podrían ser consideradas como guía para investigaciones futuras ⁽⁸⁴⁾.

Entre estas moléculas, los miembros de la familia del factor de crecimiento transformador beta (TGF β por sus siglas en inglés Transforming Growth Factor Beta), así como varias proteínas óseas morfogénicas (BMPs), han sido candidatos notorios para la inducción de dentina reparadora en experimentos de modelos *in vivo* de animales ^(119-122, 130-132, 133).

La implantación intrapulpar de TGF- β 1 logró inducir la diferenciación de odontoblastos y la formación de dentina reparadora en cercanía al sitio de la implantación ⁽¹³³⁾. Sin embargo, los hallazgos de Tziafas y cols. ⁽¹³⁴⁾ contradicen los resultados anteriores, por lo que la utilidad TGF- β 1 es limitada como agente de recubrimiento pulpar. Por otro lado pareciese que TGF β -1 ejerce efecto inhibitorio sobre la regeneración pulpar. ⁽¹¹⁹⁾, Por ello son necesarios más estudios que demuestren su posible aplicación como agente de recubrimiento pulpar para la regeneración de pulpa y dentina.

La implantación de BMP promovió la regeneración del complejo dentino pulpar al ser implantada en pulpas amputadas de perros ⁽¹²⁹⁾. Las BMP-2 y BMP-4 cuando fueron trasplantadas *in vivo* en animales, formaron dentina tubular en la parte más baja de la pulpa amputada, y osteodentina en la parte más alta ⁽¹¹⁸⁾. Sin embargo, al implantar BMP-4 en pulpas expuestas, el tejido formado presentó características de osteodentina y no de dentina tubular ⁽¹¹⁹⁾. Por su parte, la BMP-2 pudiese ser dosis

dependiente para la formación de tejido mineralizado por lo que se podría ejercer el control a través de la dosis dependencia de los eventos reparativos ⁽¹¹⁹⁾. Aún así, parece que la dosis dependencia no aplica para la BMP-7, ya que ha sido comprobado que en esta proteína, la reacción de reparación no es dosis-dependiente ⁽¹²²⁾.

La BMP-7 indujo la formación de osteodentina a lo largo de la porción coronal de la pulpa, ^(122, 130) incluyendo la oclusión total de las raíces de los dientes tratados. ^(122, 131) Estas observaciones destacan un aspecto importante de la dentinogénesis reparativa, a saber, que las regiones coronales y radiculares de la pulpa pueden proveer diferentes ambientes para la reparación. Las razones para estas diferencias no han sido aclaradas, pero su esclarecimiento pudiera contribuir beneficiosamente en el desarrollo de terapias endodónticas novedosas para uso clínico. Por lo que se sugiere un enfoque para tratar pulpas inflamadas, en dientes que con alguna extensión de cambios inflamatorios pre-existentes en la pulpa coronal pudiesen ser tratados satisfactoriamente por medio de la remoción de la pulpa coronal inflamada, produciéndose entonces una cantidad limitada de formación de dentina reparadora a nivel de los orificios de entrada de los conductos, manteniendo así la vitalidad pulpar radicular ⁽⁸⁴⁾.

Evidentemente, es necesario determinar cuan compatible es la extensión de la inflamación pulpar pre-existente con la inducción de formación de dentina reparadora por parte de estas moléculas. Además, se debe tomar en cuenta la regulación del

proceso de dentinogénesis, ya que la dentinogénesis reparativa plantea un problema en una situación endodóntica, a menos que el cierre apical sea adecuado para prevenir la difusión de la mineralización a áreas apicales ⁽⁸⁴⁾.

En una situación de reparación de la pulpa coronal, la restauración de la integridad estructural fisiológica del tejido, a través de una matriz de ortodentina tubular puede ser considerada preferiblemente; sin embargo, en una aplicación endodóntica, el sellado apical de los conductos radiculares es importante, por lo que un tejido reparativo menos permeable y más homogéneo es más favorable ⁽⁸⁴⁾.

Todavía se mantienen sin respuestas, preguntas claves en relación a la comprensión de los factores que regulan el complejo dentino-pulpar; por ejemplo, aún no se entiende muy bien como en condiciones normales fisiológicas la mineralización completa de la pulpa es prevenida, mientras la formación de dentina continúa ocurriendo en la periferia de la misma.

Estos tópicos hacen énfasis en la necesidad de un entendimiento de los mecanismos de acción de estas moléculas biológicas, antes de que puedan ser efectivamente explotadas para uso clínico.

A pesar del impresionante progreso de la ingeniería tisular en el tratamiento regenerativo de la dentina y pulpa dental, todavía restan numerosas dificultades; por ejemplo, la infección pulpar prolongada induce a cambios hemodinámicos severos, con la

consecuente inflamación, comprometiendo la vitalidad del complejo dentino-pulpar. Los estudios publicados de inducción de reparación de dentina utilizando proteínas morfogenéticas se han llevado a cabo en tejidos pulpaes clínicamente sanos. Solo un estudio ha sido llevado a cabo utilizando la terapia de proteínas en pulpas inflamadas, sin embargo los resultados de este estudio no lograron la reparación de dentina (132).

La terapia génica *in vivo* probablemente pueda ser efectiva para la regeneración en situaciones de recubrimiento pulpar, en la cual el tejido pulpar viable no infectado, de la porción apical con un adecuado número de células madre progenitoras, esté aún presente después de la remoción del tejido infectado (139, 140). En situaciones en que existe una inflamación avanzada de la pulpa coronal, la terapia *ex vivo*, en la cual las células enriquecidas con factores de crecimiento son trasplantadas dentro del diente, puede ser una alternativa viable (138, 142)

Información preclínica temprana ha demostrado la seguridad y eficacia de la terapia celular *ex vivo* y la terapia de genes de la familia de BMP. Sin embargo, se debe examinar la farmacocinética de las células pulpaes trasplantadas más detalladamente previo a su uso clínico. También deben evaluarse sistemáticamente la integridad y permeabilidad de la dentina reparadora formada (137).

Es notable mencionar que en las investigaciones recientes de Nakashima y cols. 2004 (142), no se observó ningún infiltrado inflamatorio y microfiltración del tejido pulpar, tres meses

después de la terapia génica *ex vivo* Esto demuestra la formación de una barrera física que protege la pulpa. La formación de dentina tubular con una orientación óptima puede suministrar una mejor barrera en relación a la permeabilidad.

La orientación de la dentina tubular es dependiente del andamiaje. Avances recientes en biomateriales novedosos, así como nanomateriales, pudiesen favorecer el progreso en esta materia. La capacidad de células madre de la pulpa tratadas con BMP recombinante o con genes que codifiquen para BMP transfectados, permite ventajas adicionales. El uso de las células madre en un andamiaje definido pudiese producir un complejo dentino pulpar funcional que pueda ser trasplantado en la pulpa expuesta. (137)

El amplio espectro de respuestas de la pulpa dental dificulta la regeneración nerviosa y vascular (143). Las células implantadas requerirán de una fuente de oxígeno y nutrientes para sostener su viabilidad. Por consiguiente, el ambiente local de la herida requiere la capacidad de desarrollar un lecho vascular, ya sea de los elementos restantes de la pulpa dental o en la presencia de un foramen apical patente. Adicional a la neovascularización, la restauración completa del complejo dentino-pulpar requerirá la regeneración de un suplemento nervioso pulpar (17). La familia de las BMP pareciese jugar un rol en la estimulación de la regeneración nerviosa (159-162), mientras que se ha demostrado que la angiogénesis esta regulada por VEGF (165, 166) Sin embargo faltan más estudios en esta área para lograr la regeneración de estas estructuras.

El campo de la Endodoncia ha experimentado avances significativos en las últimas décadas. Los cuales se han traducido en un aumento del éxito a largo plazo de la terapia endodóntica, haciendo los tratamientos más predecibles. La promesa de la ingeniería tisular en Endodoncia es infinita, donde el tratamiento regenerativo revolucionará el futuro de este campo de la odontología. No obstante, como es una nueva ciencia que se está desarrollando rápidamente, todavía existen grandes desafíos que deben ser superados en los próximos años para que se logren sus aplicaciones potenciales. Se requieren más investigaciones sobre células madre/progenitoras, morfógenos, nuevos andamiajes. También cómo lograr la regeneración en casos donde se ha perdido la vitalidad pulpar y exista evidencia de implicación periapical.

Ahora bien, los obstáculos no sólo yacen en el lado científico, sino también en la aplicación de esta tecnología. ^(168,169) Una vez que se haya entendido completamente como recrear nuevos tejidos viables y funcionales en el laboratorio, ¿cómo será trasladado este conocimiento al odontólogo y a la población de pacientes? Otro tópico importante es el costo de estas terapias. ¿Podrá la industria ser capaz de producir productos tisulares en una manera costo-eficiencia de forma que el paciente pueda costear este tipo de tratamientos? ^(168,169)

Además, para que la nueva tecnología alcance las masas, será necesario que los centros e institutos de atención de salud sean capaces de aplicar estos enfoques, por lo que se requerirá

programas de entrenamiento para que los clínicos, investigadores y educadores puedan utilizar estas terapias.

(168,169)

Por otro lado, se encuentra la preocupación ética en relación a la ingeniería tisular. Los cuestionamientos éticos incluyen la fuente de las células (células del paciente versus células donadas) y en el caso de células donadas, el tipo (células adultas versus células fetales). En adición, ¿en qué basamento se decidirá quien recibe estas nuevas terapias? De acuerdo a la necesidad, capacidad para costear el tratamiento, y otras interrogantes. (168,169)

No es necesario decir que existen diferentes perspectivas en relación a estas preguntas, basados en principios éticos, culturales, científicos e individuales. Sin duda alguna, la introducción de la ingeniería tisular en el campo de la odontología revolucionara la misma. Dentro de 20 a 25 años, la odontología que conocemos hoy en día será marcadamente diferente. (168,169)

V. CONCLUSIÓN

Los avances en la comprensión del desarrollo dentario en la biología molecular así como en la biología celular han sentado las bases para desarrollar estrategias para la regeneración de tejidos dentarios. La ingeniería tisular ha emergido recientemente con el objetivo de desarrollar sustitutos biológicos que mantengan, restablezcan o mejoren las funciones de diferentes órganos y tejidos. La aplicación de estrategias de ingeniería tisular en el campo de la Endodoncia se encuentra aún en investigación, no obstante, de acuerdo a la información disponible en la actualidad, se pueden hacer algunas afirmaciones:

1) La demostración de poblaciones de células madre progenitoras de la pulpa dental ha sido un avance en la regeneración del complejo dentino-pulpar, además estas células, han logrado la generación exitosa de coronas complejas de dientes. Asimismo se ha obtenido la generación de tejidos similares a la pulpa utilizando cultivos celulares y andamiajes sintéticos. También andamiajes naturales como el colágeno, la matriz de dentina, así como sus componentes han sido efectivos en la regeneración de dentina

2) El estudio de moléculas de señalización involucradas en la morfogénesis dentaria ha avanzado la comprensión de la participación de estas moléculas en la regeneración del complejo dentino-pulpar. La posibilidad de utilizar estas moléculas

biológicas para la señalización de la reparación en procedimientos de recubrimiento pulpar ha ofrecido avances importantes en el desarrollo de enfoques regenerativos en la odontología restauradora. Se ha logrado la diferenciación de odontoblastos en estudios *in vitro* con algunas de estas moléculas. Asimismo, estudios *in vivo* por medio de la trasplatación de morfógenos en la pulpa dental de animales han mostrado resultados muy prometedores en la formación de dentina reparadora.

3) Las investigaciones publicadas de inducción de la regeneración de dentina utilizando terapia de proteínas, se han llevado a cabo en tejidos pulpares clínicamente sanos. En casos de inflamación pulpar irreversible de la pulpa coronal, la terapia génica *in vivo* mediante la aplicación local de genes que codifican para los morfógenos en la pulpa dental expuesta, pudiese ser efectiva en la endodoncia regenerativa. En situaciones en que existe una inflamación avanzada de la pulpa coronal, la terapia *ex vivo*, en la cual células madre pulpares son transducidas con genes que codifican para estas proteínas para inducir diferenciación en odontoblastos y luego estas células son trasplantadas en la pulpa expuesta o en la pulpa amputada pareciese ser una alternativa prometedora para la regeneración del complejo dentino pulpar en estos casos.

4) A pesar del impresionante progreso de la ingeniería tisular en el tratamiento regenerativo de la dentina y pulpa dental, todavía restan numerosas dificultades. Hasta la fecha, la regeneración nerviosa y vascular de la pulpa dental no ha sido

lograda eficazmente. Sin embargo hay indicios de la familia de las BMP pareciese jugar un papel en la estimulación de la regeneración nerviosa, y la VEGF pudiese estar involucrada en angiogénesis.

5) La aplicación de estrategias de ingeniería tisular para la regeneración de pulpa y dentina es muy prometedora; no obstante las mismas deben ser sujetas a evaluaciones cuidadosas en investigaciones preclínicas bien diseñadas y en ensayos clínicos a largo plazo antes de su introducción en la práctica clínica.

VI. REFERENCIAS

1. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotech.* 1998;16:247–52
2. Chapekar M: Tissue engineering. Challenges and opportunities. *J Biomed. Mater Res.* 2000; 53: 617-20,
3. Langer, R and Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*; 1993;260:920-6;
4. Bianco P and Geron Robey P. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001;414:118-21.
5. Edwards P y Manson J. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (1) overview and practical considerations. *Head and Face Medicine* 2006, 2:12
6. Nakashima M, and Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotech* 2003;21:1025–32
7. Barry F: Biology and clinical applications of Mesenchymal stem cells. *Birth Defects Research (Part C)* 2003;69:250-56.
8. Friel R, van der Sar S, Mee PJ: Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Advan Drug Del* 2005;57:1894-1903
9. Wagers AJ, Weissman 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116:639-48
10. Vassilopoulos G, Russell DW. Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. *Curr Opin Genet Devel* 2003;13:480–5.

11. Camargo FD, Chambers SM, Goodell MA. Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. *Cell Prolif* 2004;37:55– 65.
12. Vats A, Tolley NS, Bishop AE, Polak JM: Embryonic stem cells and tissue engineering: delivering stem cells to the clinic. *J R Soc Med* 2005; 98:346-50.
13. Krebsbach P. and Gheron Robey P; Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Therapeutics for Craniofacial Regeneration. *Journal of Dental Education* 2002;66(6):766-73.
14. M, Uribe. Logros del Proyecto Genoma Humano. Impacto en la medicina en: Bello A, Cavazza M, Correnti M, Uribe M, de Vargas A, Benaím V, Plata L. La transformación genética de la humanidad ¿Jugar a Dios para cosechar poder? Publicidad Gráfica León. 2002. 1° edición, Caracas.
15. Krause DS: Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Therapy* 2002;9:754-58.
16. Edwards PC, Ruggiero S, Fantasia JE, Burakoff R, Moorji SE, *et al.* Sonic hedgehog gene-enhanced tissue engineering for bone regeneration. *Gene Therapy* 2005;12:75-86.
17. Nakashima M, and Akamine A, The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J of Endodon* 2005; 31:10; 711-18.
18. Sharma B, Elisseff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann Biomed Engl* 2004;32:148 –59.
19. Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:591-98.
20. Hutmacher DW, Goh JC, Teoh SH. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Ann Acad Med* 2001;30:183-91

21. Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2002;23:4315–23.
22. Mooney D, Powell C, Piana, J and Rutherford B. Engineering Dental Pulp-like Tissue *in vitro* *Biotechnol. Prog.* 1996;12,865-68
23. Stabler C, Wilks K, Sambanis A, Constantinidis I. The effects of alginate composition on encapsulated BTC3 cells. *Biomaterials* 2001;22:1301-310.
24. Jadowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:409–23.
25. Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:126-36.
26. Garcia AJ, Reyes CD. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J Dent Res* 2005;84:407-13.
27. Tabata T and Takei Y. Morphogens, their identification and regulation. *Development* 2004;131:703-12.
28. Thesleff I, Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Intl Rev Cytol* 2002; 217:93–135.
29. Ohazama A, Sharpe PT. TNF signalling in tooth development. *Curr Opin Genet Devel* 2004;14:513–9.
30. Cobourne MT, Sharpe PT. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol* 2003;48:1-14
31. Ebara S, Nakayama K. Mechanisms for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity. *Spine* 2002; 27:S10-S15.

32. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European J Endocrinol* 2000;142:9-21.
33. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthopaed Rel Res* 2002; 395:110-20.
34. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic protein. *Spine* 2002;27:S2-S8.
35. D'Souza R. Development of the pulpodentin complex in Hargreaves KM, Goodis HE, eds. *Seltzer and Bender's dental pulp*. Chicago: Quintessence, 2002:13-40
36. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis, *Journal of Cell Science* 2003;116:1647-48.
37. Pispa, J., and Thesleff, I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev. Biol.* 2003;262,195-205.
38. Plikus M, Zeichner-David M, Mayer J, Reyna J, Bringas P, et al. Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. *Evolution and Development* 2005;7(5):440–57.
39. Du CH, Moradian-Oldak J. Tooth regeneration: challenges and opportunities for biomedical material research. *Biomedical Materials* 2006;1(1):R10-R17.
40. Mitsiadis T, Rahiotis C. Parallels between Tooth Development and Repair: Conserved Molecular Mechanisms following Carious and Dental Injury. *J Dent Res* 2004; 83(12):896-902.
41. Sadler T.W. *Langman Embriología Médica con Orientación Clínica*. 8º Edición. Editorial Panamericana. 2001 Pag 364-67
42. Geneser F. *Histología*, Ed. Panamericana. 3ra Edición, 2000.

43. Jernvall, J. and Thesleff, I. Reiterative signaling and patterning in mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.* 2000; 92:19-29.
44. Chai, Y. and Slavkin, H.C. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. *Microsc. Res. Tech.* 2003;60:469–79.
45. Thesleff I, Keränen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblasto differentiation *Adv Dent Res* 2001;15:14-18
46. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, *et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189:54–63.
47. Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J..Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 2002;9:642–47.
48. Miura M, Gronthos S, Zhao M, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5807–12.
49. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, *et al.* Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002;20:1060–69.
50. Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Int Med* 2002;162:1558–66.
51. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410: 701–05.
52. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93–98.

53. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, *et al.* Autologous bone-marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45–46.
54. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003;107:1247–9.
55. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168 –70.
56. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng* 2004;32:160 –5.
57. Imai E, Ito T. Can bone marrow differentiate into renal cells? *Ped Nephrol* 2002;17: 790–4.
58. Poulosom R, Alison MR, Cook T, *et al.* Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(Suppl 1):S48 –54.
59. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 2002;69:698 –707.
60. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 2000;20:8727–35.
61. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418:50–56.
62. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, *et al.* Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow derived cells. *Clin Orthop* 2003;407:102–118.

63. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, *et al* Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385–86.
64. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, *et al* Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation* 1998;66:1272–1278.
65. Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, *et al*. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 2000;150:1085–100.
66. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, *et al*. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop Rel Res* 2000;379(Suppl):S71–90.
67. Devine MJ, Mierisch CM, Jang E, Anderson PC, Balian G. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model. *J Orthop Res* 2002;20:1232–9.
68. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, *et al*. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thoracic Surg* 2002;73:1919 –25.
69. Wang L, Li Y, Chen J, *et al*. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol* 2002;30:831– 6.
70. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3464 –74.
71. Humes HD, Weitzel WF, Fissell WH. Renal cell therapy in the treatment of patients with acute and chronic renal failure. *Blood Purif* 2004;22:60 –72.
72. von Harsdorf R, Poole-Wilson PA, Dietz R. Regenerative capacity of the myocardium: implications for treatment of heart failure. *Lancet* 2004;363:1306 –13.

73. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery *in vivo*: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 1999; 5:753–9.
74. Jüllig M, Zhang WV, Stott NS. Gene therapy in orthopaedic surgery: the current status. *ANZ J Surg* 2004;74:46 –54.
75. Naldini L, Blomer U, Gallay P, *et al.* *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;272:263–7.
76. Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003;9:694 – 701.
77. Franceschi RT, Yang S, Rutherford RB, Krebsbach PH, *et al.* Gene therapy approaches for bone regeneration. *Cells Tissues Organs* 2004;176:95–108.
78. Parikh SN. Gene therapy: principles and clinical applications in orthopedics. *Orthopedics* 2004;27:294 –303.
79. Grande DA, Mason J, Light E, Dines D. Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(Suppl 2):111– 6.
80. Smith, A.J, Cassidy, N, Perry, H, Begue-Kirn, C, *et al.* Reactionary dentinogenesis *Int. J. Dev. Biol.* 1995; 39:273– 280,
81. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 1985;64:530–40.
82. Tecles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, *et al.* Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* 2005; 50:103- 108.
83. Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA. Cox CF: Analysis of pulpal reactions to restorative procedures,

materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:509-520

84. Goldberg M. and Smith Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:13-27
85. Holland R, de Souza V, de Mello W, *et al.* Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide. A histological study. *J Am Dent Assoc* 1979;99:472-5
86. Schroeder U. Effects of calcium-hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 1985;64:541-48
87. Seltzer S, Bender IB. *The dental pulp*. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1985
88. Schuurs A, Gruythuysen R., Wesselink P. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review *Dent Traumatol* 2000; 16:240-50
89. Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the "total etch" technique in vital pulp capping in primates *Am J Dent* 1998;11:45-54
90. de Souza C. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dental Materials*, 2000; 16:188-197.,
91. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endodon* 1999;25:197-205.
92. Abedi HR, Torabinejad M, Pitt Ford TR. The use of mineral trioxide aggregate cement (MTA) as a direct pulp capping agent *J Endodon* 1996;22:199.
93. Ford P, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* 1996;127:1491-4.

94. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001;17:163-6.
95. Ham KA, Witherspoon DE, Gutmann JL, Ravindranath S, Gait TC, Opperman LA: Preliminary evaluation of BMP-2 expression and histologic characteristics during apexification with calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate. *J Endodontol* 2005;31:275-279
96. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I: Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endodont* 2005; 31:97-100
97. Andelin W, Shabahang S, Wright K, and Torabinejad M: Identification of Hard Tissue After Experimental Pulp Capping Using Dentin Sialoprotein (DSP) as a Marker. *J Of Endodon* 2003; 29: 646-50
98. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13625-30
99. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001; 29:532-9.
100. Batouli S., Miura M., Brahim J., Tsutsui T.W., Fisher L.W., *et al.* Comparison of Stem-cell-mediated Osteogenesis and Dentinogenesis *J Dent Res* 2003; 382:976-981,
101. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S: Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81:531-535.
102. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, *et al.*: Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplant* 2005;80:836-842.

103. Shi S, Gronthos S: Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in bone marrow and dental pulp. *J Bone Mineral Res* 2003;18:696-704
104. Mathieu S, El-Battari A, Dejou J, About I: Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. *Arch Oral Biol* 2005; 50:109-113.
105. Zhang Y, Chen Z, Song Y, Liu C, Chen Y. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells *Cell Research* 2005;15(5):301-16,
106. Young CS, Terada S, Vacanti JP, *et al.* Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002; 81:695-700
107. Honda J, Sumita Y, Kagami H, Ueda M: Histologic and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol* 2005; 68:89-101.
108. Duailibi M, Duailibi S, Young C, Bartlett J, Vacanti J, and Yelick P. Bioengineered Teeth from Cultured Rat Tooth Bud Cells. *J Dent Res* 2004;83(7):523-528,
109. Yamamoto H, Kim EJ, Cho SW, Jung HS. Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo. *J Electro Microsc* 2003; 52:559-66.
110. Ohazama A, Modino SCA, Miletich I, and Sharpe P.T: Stem-cell-based Tissue Engineering of Murine Teeth *Dent Res* 2004;83(7): 518-522,
111. Modino SA, Sharpe PT: Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol* 2005;50:255-258.
112. Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998;9(7):749-64.
113. Tziafas D and Kolokuris I Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *J Dent Res* 1990; 69:75–81.

114. Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV *In vivo* morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J Biol Buccale*.1990;18:123–29.
115. Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith A.J, Lesot H, Komnenou A, And Ruch J. V.: induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after *in vivo* implantation of dentine matrix components *Archs Oral Biol*. 1995; 40:883-93
116. Tziafas D, Kolokuris I, Alvanou A, Kaidoglou K. Short-term dentinogenic response of dog dental pulp after its induction by demineralized or native dentine, or predentine. *Arch Oral Biol* 1992; 37:119–128
117. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000; 28:77–92;
118. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic protein (BMP)-2 and -4. *J Dent Res* 1994;73:1515–22.
119. Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of the dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Archs Oral Biol* 1994;39:1085–9.
120. Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues J-J, Salih E, *et al*. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Invest* 2000; 4:110–119
121. Six N, Decup F, Lasfargues J-J, Salih E and Goldberg M: Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J of Mat Sci* 2002;13: 225-232.
122. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M: Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone

morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). Arch Oral Biol 2002;47:177-187.

123. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair *in vitro*. Connect Tissue Res 2002; 43:387–90.
124. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor- β , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. Dev Biol 1994; 162:18 –28.
125. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. J Endod 2004;30:205– 8
126. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. J Dent Res 2004; 83:590 –5.
127. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1–3 *in vitro*. Arch Oral Biol 1999; 44: 149 –56.
128. Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by BMP7 *in vitro*. Arch Oral Biol 2000; 45:173–7.
129. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dogs by bone morphogenetic proteins-. Arch Oral Biol 1990; 35:7 493–97
130. Rutherford RB, Waahle J, Tucker M, Rueger D, Charrette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. Arch Oral Biol 1993;38:571–76.,
131. Rutherford RB, Spangberg L, Tucker M, Rueger D, Charette M. The time-course of the induction of reparative

dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. Arch Oral Biol 1994;39:833– 8

132. Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. Eur J Oral Sci 2000;108:202– 6.
133. Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A Effects of recombinant fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- β 1 on dog dental pulp cells *in vivo*. Arch Oral Biol 1998; 43:431–44;
134. Tziafas D, Belibasakis G, Veis A, and Papadimitriou S. Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. Adv Dent Res. 2001;15: 96-100.
135. Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A. Pulp-capping with recombinant human insulin- like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. Adv Dent Res 2001;15:108 –12
136. Goldberg M, Six N, Decup F, *et al.* Application of bioactive molecules in pulpcapping situations. Adv Dent Res 2001;15:91–5.
137. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16(3);369–376
138. Rutherford RB. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. Eur J Oral Sci 2001;109:422– 4.
139. Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, Akamine A. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). Gene Ther 2002;9:814–8.
140. Nakashima M, Tachibana K, Iohara K, Ito M, Ishikawa M, Akamine A. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. Human Gene Ther 2003;14:591–

141. Ng KY, Liu Y. Therapeutic ultrasound: its application in drug delivery. *Medicinal Res Reviews* 2002;22:204 –23.
142. Nakashima M, Iohara K, Ishikawa M, *et al*. Stimulation of reparative dentin formation by ex vivo gene therapy using dental pulp stem cells electrotransfected with Growth/differentiation factor11 (Gdf11). *Human Gene Ther* 2004;15:1045–53.
143. Byers MR, Suzuki H, Maeda T. Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc Res Tech* 2003;60:503–15
144. Inoue T, Shimono M.. Repair dentinogenesis following transplantation into normal and germ-free animals. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88 (Suppl): 183–194.
145. Nishioka M, Shiva T, Ueno K, Suda H.. Tooth replantation in germ-free and conventional rats. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14:163– 173.
146. Byers M and Närhi M: Nerve supply of the pulpodentin complex and responses to injury in Hargreaves KM, Goodis HE, eds. *Seltzer and Bender's dental pulp*. Chicago: Quintessence, 2002:151-179
147. Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons *in vitro*; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci* 2004;19:2388 –98..
148. Olgart LM. The role of local factors in dentin and pulp in intradental pain mechanisms. *J Dent Res* 1985;64:572– 8.
149. Kim S, Liu M, Simchon S, Dorscher-Kim JE. Effects of selected inflammatory mediators on blood flow and vascular permeability in the dental pulp. *Proc Finnish Dent Soc* 1992; 88(Suppl 1):387–92.
150. Vongsavan N, Matthews B. Changes in pulpal blood flow and in fluid flow through dentine produced by autonomic

and sensory nerve stimulation in the cat. Proc Finnish Dent Soc 1992; 88 (Suppl 1):491–7.

151. Bongenhielm U, Haegerstrand A, Theodorsson E, Fried K. Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. Regul Pept 1995;60:91– 8.
152. Raab WH. Temperature related changes in pulpal microcirculation. Proc Finnish Dent Soc 1992;88(Suppl 1):469 –79.
153. Kerzoudis NP, Olgart L, Edwall L. Involvement of substance P but not nitric oxide or calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation in rat incisor pulp and lip. Arch Oral Biol 1994;39:769 –74.
154. Fristad I. Dental innervation: functions and plasticity after peripheral injury. Acta Odontol Scand 1997;55:236 –54.
155. Byers MR, Taylor PE. Effect of sensory denervation on the response of rat molar pulp to exposure injury. J Dent Res 1993;72:613– 8.
156. Holland GR. Experimental trigeminal nerve injury. Crit Rev Oral Biol Med 1996;7: 237–58.Olgart LM. Neural control of pulpal blood flow. Crit Rev Oral Biol Med 1996;7:159– 71..
157. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? J Endodon 2004;30:196 –200.
158. Ritter ALS, 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 Traumatol 2004;20:75–84.
159. Lein P, Guo X, Hedges AM, Rueger D, Johnson M, Higgins D. The effects of extracellular matrix and osteogenic protein-1 on the morphological differentiation of rat sympathetic neurons. Int J Dev Neurosci 1996;14:203–15.

160. Adler J, Jayan A, Melia CD. A method for quantifying differential expansion within hydrating hydrophilic matrixes by tracking embedded fluorescent microspheres. *J Pharm Sci* 1999;88:371–7.
161. Mabee PC, Mehler MF, Kessler JA. Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci* 1999; 19:7077– 88.
162. White PM, Morrison SJ, Orimoto K, Kubu CJ, Verdi JM, Anderson DJ. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic development changes in sensitivity to instructive differentiation signals. *Neuron* 2001;29:57–71
163. Tjäderhane L. The mechanism of pulpal wound healing. *Aust Endod J* 2002;28:68– 74..
164. Iijima T, Zhang J. Three-dimensional wall structure and the innervation of dental pulp blood vessels. *Microsc Res Tech* 2002;56:32– 41.
165. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dental Res* 2000;79:1596–603.
166. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archs Oral Biol* 2000;45:1013– 16..
167. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003;58:390–8.
168. Kaigler D, Money D. Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of Dental Education*. 2001;65(5):456-62
169. Baum B and Mooney D. the impact of tissue engineering on dentistry. *JADA* 2000;131:309- 18.

