



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Identificación de colágeno tipo I y III en pulpa de dientes temporales y permanentes mediante análisis histoquímico utilizando la técnica de Picro-Sirius Red

Frankamilo Garzón Godoy

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología, Especialidad en Endodoncia
Bogotá, Colombia

2016

Identificación de colágeno tipo I y III en pulpa de dientes temporales y permanentes mediante análisis histoquímico utilizando la técnica de Picro-Sirius Red

Frankamilo Garzón Godoy

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Endodoncia

Director:

Jairo Sarmiento Marín – Profesor asociada Facultad de Odontología Unal

Línea de Investigación:

Análisis de la expresión de marcadores osteoclásticos en cultivos de osteoblastos

Grupo de Investigación:

Metabolismo óseo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de odontología, Especialidad en Endodoncia
Bogotá, Colombia

2016

*La noche es más oscura justo antes del
amanecer.*

¡Sonríe!

Agradecimientos

A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia en especial al Posgrado de Endodoncia y a sus docentes por haberme permitido especializar en tan hermosa rama de la odontología. A los docentes mis más sinceros agradecimientos por la paciencia y conocimiento brindado. A cada uno de ellos le aprendí cosas que me servirán por el resto de la vida.

Al doctor Jairo Sarmiento Marín por su orientación y confianza otorgada para realizar este trabajo.

A mi apreciada doctora Ángela María Acero Barbosa, mi gran amiga y mamá adoptiva, por todas esas charlas motivacionales y el gran apoyo que me ha prestado durante todo este tiempo.

A mis padres por los valores que me hacen ser la persona que soy. A ellos y a mis hermanos que recuerden siempre que el esfuerzo que aplico cada día es para ofrecerles un mejor futuro. A los demás miembros de mi familia gracias por el apoyo durante todo este tiempo.

A mis amigos por el apoyo en el proceso. A Julio y Andrea que a pesar de los inconvenientes en el camino, me ofrecieron su amistad y lealtad. Gracias

.

Resumen

El colágeno es uno de los principales componentes del tejido pulpar en la dentición humana. Aunque se ha establecido en los dientes permanentes que el tipo I se encuentra en un 56% y el tipo III en un 42% aproximadamente, datos relacionados con su contenido en los dientes deciduos no son específicos. **Objetivo:** Mostrar diferencias y similitudes mediante análisis histoquímico del colágeno presente en la pulpa de dientes deciduos y permanentes por medio de la tinción Picro-Sirius Red de pacientes que asisten a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación HOMI. **Materiales y Métodos:** 10 tejidos pulpares de dientes permanentes y 14 de dientes deciduos fueron obtenidos para el procesamiento y tinción con Picro-Sirius Red con el fin de realizar su observación bajo el microscopio de luz polarizada Nikon BX51. **Resultados:** se evidenció bajo luz polarizada la presencia de haces de fibras colágenas tipo I en colores entre amarillo y rojo y la presencia de colágeno tipo III como fibras de menor tamaño en un color de blanco a verde. **Conclusiones:** cualitativamente se observó un predominio de colágeno tipo III en el tejido pulpar de los dientes temporales mientras que en los permanentes fue más notorio el tipo I.

Palabras clave: collagen, tooth deciduous, dental pulp, permanent dentition.

Abstract

Collagen is one of the principal components of the pulp tissue in the human dentition, Although Has been established in permanent teeth the type I is 56% and type III approximately 42%, data related to the deciduous teeth are not specific. **Objective:** Show differences and similarities by histochemical analysis of collagen present in the pulp of deciduous and permanent teeth through Picro-Sirius Red patients staining attending the School of Dentistry National University of Colombia and the HOMI Foundation. **Materials and Methods:** 10 pulp tissues of permanent teeth and 14 deciduous teeth were obtained for processing and staining Picro-Sirius Red in order to perform its observation under the light microscope polarized Nikon BX51 **Results:** was evident under polarized light presence of collagen fiber bundles type I color between yellow and red and the presence of collagen type III as fibers smaller in color from white to green **Conclusions:** we could see qualitatively a predominance of type III collagen in the tissue pulp of deciduous teeth was observed while the permanent was mostly type I

Palabras clave: collagen, tooth deciduous, dental pulp, permanent dentition.

Contenido

Agradecimientos.....	V
Resumen.....	VII
Abstrac.....	VIII
Lista de figuras.....	XI
Introducción.....	1
1. Generalidades dentición temporal y permanente.....	3
2. Colágeno	7
3. Materiales y métodos.....	13
4. Resultados	15
5. Discusión.....	23
6. Conclusiones y recomendaciones	27
6.1 Conclusiones	27
6.2 Recomendaciones	27
7. Bibliografía	29

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Sección transversal de molares temporales y permanentes.....	5
Figura 1-2: Zonas morfológicas de la pulpa.....	6
Figura 2-1: Localización de los genes responsables de la formación del colágeno tipo I y tipo III.....	8
Figura 2-2: Esquema de la síntesis de colágeno.....	10
Figura 3-1: Diente permanente completo y deciduo con media raíz reabsorbida seccionados y con el tejido pulpar expuesto listo para la recolección.....	14
Figura 4-1: Control de piel visto bajo luz transmitida y luz polarizada	
Figura 4-2: Corte histológico de tejido pulpar de diente deciduo teñido con Picro-Sirius Red a 4x bajo luz transmitida y luz polarizada.....	16
Figura 4-3: Corte histológico de tejido pulpar de diente permanente teñido con Picro-Sirius Red a 4x bajo luz transmitida y luz polarizada.....	17
Figura 4-4: Muestra observada bajo luz transmitida, muestra observada bajo luz polarizada y muestra rotada 90 grados donde se evidencia el cambio de color de las fibras alrededor del fragmento dentinal.....	18
Figura 4-4: Dentina y tejido pulpar teñid con Picro-Sirius Red en un diente deciduo visto bajo luz transmitida y luz polarizada y un diente permanente visto bajo luz transmitida y luz polarizada.....	19
Figura 4-6: Diente deciduo sin proceso de reabsorción fisiológica teñido con Picro-Sirius Red a 40x visto bajo luz transmitida y luz polarizada y diente deciduo en proceso de reabsorción fisiológica que compromete hasta el tercio medio radicular teñido con Picro-Sirius Red a 40x bajo luz transmitida y luz polarizada.....	20
Figura 4-7: Premolar de adulto de 23 años de edad con tinción de Picro-Sirius Red a un aumento de 20x bajo luz transmitida y luz polarizada. Tejido pulpar de incisivo central superior de paciente de la tercera de edad con tinción de Picro-Sirius Red a 40x bajo luz transmitida y luz polarizada.....	21

Introducción

El diente es una estructura altamente compleja. En su interior podemos encontrar un tejido especializado compuesto por células, vasos linfáticos y sanguíneos, y un gran número de fibras. Éste tejido recibe el nombre de pulpa dental. Las células allí presentes son capaces de producir algunas proteínas que no se encuentran en ningún otro tejido del cuerpo y un gran número de proteínas estructurales de tipo colágeno que cumplirán ciertas funciones en el mantenimiento de sus procesos fisiológicos (1).

El ser humano cuenta con dos denticiones, una temporal, primaria o decidua que aparece en las primeras etapas de la vida hasta aproximadamente los 12 años de edad en donde se realiza el último recambio de estos dientes por los pertenecientes a la segunda dentición: la dentición permanente, la cual estará por el resto de la vida (2).

La exfoliación de los dientes deciduos está acompañada de una serie de eventos los cuales producirán la atrofia del tejido pulpar y la reabsorción radicular con el fin de dar paso a la erupción del diente permanente (2).

Se pueden encontrar múltiples diferencias entre ambos grupos de dientes como por ejemplo el grosor de los tejidos duros, los tamaños totales de cada diente en relación a sus sucesores e incluso la inervación (1, 3), mientras que al hablar de colágeno, al ser éste una proteína tan importante, llegando a ocupar entre el 26% y 32% del peso de la pulpa en seco (4), no se encuentran datos de su porcentaje en la pulpa de los dientes deciduos lo cual genera incertidumbre sobre la presencia y función de esta proteína, en especial el tipo I y III que resultan ser los más abundantes en este tejido en la dentición permanente.

Se ha observado que en los dientes permanentes, a nivel pulpar, se encuentra colágeno tipo I y tipo III en porcentajes de 56% y 42% respectivamente mientras que a nivel de dentina (un tejido altamente mineralizado) el colágeno tipo I predomina en un 98% de su componente orgánico (5) mientras que tipo III no está presente en este tejido (6). En los dientes temporales la información disponible al respecto no ha sido bien descrita.

Algunos estudios han analizado la expresión de genes en la pulpa de dientes permanentes y deciduos encontrando una expresión diferencial para algunos de éstos dependiendo la dentición analizada (7, 8). La expresión de colágeno fue analizada por Kaukua y colaboradores encontrando una mayor expresión del gen COL1A1 (gen que codifica para el colágeno de tipo I) en la pulpa de los dientes permanentes. Datos relacionados con el colágeno de tipo III no son específicos para la dentición decidua (7).

Debido a la poca información relacionada con la distribución del colágeno tipo I y III (en la dentición temporal principalmente) se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué distribución histológica tendrá el colágeno tipo I y III en el tejido pulpar de los dientes deciduos y permanentes de pacientes que asisten a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación HOMI?

Aunque existen varias tinciones para identificar colágeno, la tinción con Picro-Sirius Red es la única que permite identificar colágeno tipo I y III al mismo tiempo al ser observada bajo microscopio de luz polarizada dando un tono amarillo-rojo para el tipo I (fibras gruesas) y verde para el tipo III (fibras finas o delgadas) mientras que bajo luz transmitida ambos tipos de colágeno se aprecian en un tono rojizo (9). Esta técnica fue utilizada por Abrahão y colaboradores para observar la presencia de colágeno en gérmenes dentales permitiendo ver esta proteína en tejidos que al ser teñidos con Tricrómico de Masson no había sido identificada (10). De igual manera Picro-Sirius Red ha sido útil para estudiar las características del colágeno en tumores benignos y malignos de glándulas salivares encontrando un predominio del colágeno tipo I en tumores malignos y de colágeno tipo III en el adenoma pleomórfico (tumor benigno) (11).

El objetivo general de este trabajo fue: describir posibles diferencias mediante análisis histoquímico del colágeno presente en la pulpa de dientes deciduos y permanentes por medio de la tinción Picro-Sirius Red de pacientes que asisten a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación HOMI.

Los objetivos específicos planteados son:

- identificar mediante análisis histoquímico la presencia y el tipo de colágeno de la pulpa de los dientes permanentes de los paciente que asisten a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación HOMI
- identificar Mediante análisis histoquímico la presencia de colágeno en la pulpa de los dientes temporales que asisten a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación HOMI
- Comparar mediante análisis histoquímico diferencias y similitudes entre la expresión de colágeno de los dientes temporales y permanentes

El siguiente trabajo analizó la presencia de colágeno tipo I y III en la pulpa de los dientes deciduos y permanentes por medio de histoquímica utilizando para ello la coloración Picro-Sirius Red la cual es específica para estos dos tipos de colágeno y permite su diferenciación bajo microscopio de luz polarizada.

1. Generalidades dentición temporal y permanente

Los humanos al igual que la mayoría de los mamíferos, se caracterizan por tener dos tipos de denticiones, una primaria constituida por 20 piezas dentales (la cual también recibe el nombre de dentición temporal, decidua, dientes de leche o caducos) y una dentición secundaria o permanente, constituida por 32 elementos (16 por cada maxilar) (2).

La morfogénesis dental es un proceso el cual es regulado por interacciones secuenciales y reciprocas entre el epitelio y el mesénquima en donde actúan moléculas de señalización paracrina la mayoría de ellas pertenecientes a las familias Wnt, Hedgehog, Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y Factor de crecimiento transformante β (TGF β) de la cual hacen parte las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Durante este proceso el ectodermo oral se engrosa, proyecta y pliega para dar forma al complejo que dará origen a la corona del diente (12). La participación de genes también es necesaria para el desarrollo normal de la dentición. Genes Msx1 y 2 se expresan a nivel de la línea media en la región que dará origen a los incisivos mientras que para la zona de molares se han identificado los genes Dlx1, 2, 5 y 6 además del gen Barx1. La ausencia de estos genes no permitirá la formación de los respectivos dientes de la zona donde actúan (13).

El proceso de formación del diente comprende varios estadios: iniciación, morfogénesis, diferenciación y maduración. Luego de estos estadios el diente inicia su formación radicular y entra en proceso de erupción (12). Los dientes están formados por una serie de tejidos mineralizados, incluyendo tres capas externas mineralizadas localizadas en la periferia del diente: el esmalte, la dentina y el cemento. Estas capas rodean un tejido blando no mineralizado localizado en la parte interna del diente, la pulpa dental (5).

Es posible identificar tres etapas en la dentición humana. La dentición primaria comprende la aparición de los dientes deciduos aproximadamente al sexto-séptimo mes de vida postnatal hasta el inicio del recambio de éstos por los dientes permanentes (aproximadamente a los 6 años); un periodo entre la dentición primaria y permanente, la dentición mixta, en la que es posible apreciar tanto dientes deciduos como permanentes en boca y que dura de los 6 a 12 años de vida; y por último, la dentición permanente la cual se inicia con la aparición del primer molar permanente por detrás del segundo molar deciduo (sexto año de vida), se establece de los 17 a 21 años de edad con la aparición del tercer molar y acompaña a la persona, si ésta tiene un buen cuidado de su salud oral, hasta el final de la vida (2).

En el paso de la dentición primaria a la permanente, el tejido pulpar experimenta cambios muy acelerados en el proceso de exfoliación o caída del diente deciduo. Existe, en primer lugar, una marcada disminución del aporte sanguíneo, lo que origina una progresiva atrofia

pulpar. Con posterioridad, los monocitos de la sangre circulante dan origen a las células resorptivas, denominadas odontoclastos y osteoclastos. Los primeros son los encargados de la resorción de todos los tejidos dentarios mineralizados, mientras que los fibroblastos pulpares comienzan a actuar como fibroclastos y a eliminar progresivamente la matriz extracelular del tejido pulpar y de las fibras (fibrinólisis) del ligamento periodontal. Los osteoclastos y, en parte, los osteocitos son los responsables de la destrucción del hueso alveolar (2).

La reabsorción de los tejidos duros del diente deciduo está a cargo de células que tienen estructura y función similares a los osteoclastos: odontoclastos. El tejido periodontal se desorganiza por completo, los fibroblastos cesan la síntesis de colágeno y hay degradación del mismo. Las fibras periodontales se liberan del hueso y del cemento. Los vasos sanguíneos se comprimen localmente, lo que acelera el mecanismo de reabsorción. Se observa un marcado descenso del epitelio de unión, por pérdida del aparato de sostén, lo que conlleva a la movilidad del diente facilitando así su exfoliación (2).

La pulpa dental desde el punto de vista histológico ofrece el aspecto de un tejido de granulación o atrofia pulpar, debido a ello, en general, la exfoliación es un proceso indoloro. Sin embargo, no se conoce con exactitud como ocurre la eliminación de los tejidos blandos. Todos estos mecanismos de resorción, sumados a las fuerzas generadas por el desarrollo de los gérmenes dentales permanentes producen la caída del diente deciduo. La función de la pulpa no se halla comprometida mientras no se encuentre en comunicación directa con el medio externo o bucal aun cuando el piso de la cámara pulpar estuviese en proceso de resorción fisiológica (2).

En cuanto a la anatomía, se han identificado las siguientes diferencias entre los dientes temporales y permanentes (Figura 1-1) (1, 3):

1. Los dientes deciduos son más pequeños en todas sus dimensiones respecto a los permanentes correspondientes.
2. El grosor del esmalte y la dentina son menores en los dientes deciduos.
3. La anatomía de la cámara pulpar de los dientes deciduos se asemeja mucho a la de la superficie de la corona, pero sus pulpas son mayores que las de los permanentes.
4. Los cuernos pulpares, en especial los mesiales de los dientes deciduos, están más cerca de la superficie externa del diente que en los permanentes.
5. Las coronas de los dientes deciduos son más anchas en sentido mesodistal respecto a su longitud, que en los dientes permanentes.
6. La corona de los dientes deciduos tiene una mayor constricción en la zona cervical que en los permanentes.
7. Los dientes deciduos, a diferencia de los permanentes, tienen superficies de contacto anchas y planas.
8. Las raíces de los dientes deciduos son más largas, más delgadas y más estrechas en comparación con las de los permanentes.

9. Las raíces de los molares deciduos comienzan su ensanchamiento más cerca de la zona cervical, y en la zona apical se encuentran más separadas que las raíces de los dientes permanentes.
10. Las raíces de los dientes deciduos presentan agujeros apicales mayores que las de los permanentes. Esto conlleva a que comparativamente el riego sanguíneo sea mayor en deciduos que en permanentes. Esta diferencia explica la elevada incidencia de reacciones inflamatorias en dientes deciduos.
11. La densidad de inervación de los dientes deciduos es menor que en los permanentes. Esta característica podría explicar el por qué los dientes deciduos sean algo menos sensibles a las técnicas restaurativas. Además, debe tenerse en cuenta que con la reabsorción de los dientes temporales se produce una degeneración de las células nerviosas y del resto de células de la pulpa.



Figura 1-1: Sección transversal de molares deciduos (derecha) y permanentes (izquierda)
Tomado de Cohen. Vías de la Pulpa (1)

Histológicamente la pulpa es un tejido conectivo laxo especializado el cual se encuentra encerrado dentro de los conductos radiculares y la cámara pulpar por lo cual, con el pasar de los años, va disminuyendo de tamaño debido a la aposición permanente de dentina por parte de los odontoblastos. Se compone de materia orgánica en un 25% y agua el 75% restante (3). El componente orgánico comprende células (odontoblastos, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, células mesenquimatosas indiferencias, mastocitos), fibras (colágenas, reticulares y de oxitalano) y sustancia fundamental (compuesta por glucosaminoglucanos, proteoglucanos, colágeno, elastina, interleucina-1, fibronectina) (3). La pulpa y la dentina funcionan como una unidad (1). En dientes permanentes los odontoblastos y las células de Höhl forman la capa de la periferia de la pulpa (5). Los odontoblastos se encargan de producir dentina y la pulpa necesita de la

protección ofrecida por la dentina y el esmalte. Es por esto que se habla de un complejo pulpo-dentinal y no de cada tejido por separado (1).

Se pueden identificar varias capas conformando la pulpa dental entre las cuales encontramos (de la periferia al centro) (figura 1-2) (1):

- La capa odontoblástica: inmediatamente luego de la predentina compuesta por los cuerpos de los odontoblastos.
- Zona pobre en células o capa de Weil: formada principalmente por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y finas prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos
- Zona rica en células: la cual presenta un elevado número de fibroblastos y algunos macrófagos, células dendríticas y células mesenquimatosas indiferenciadas o células madre
- La pulpa central: la cual es la masa central de la pulpa en donde se encuentran los vasos sanguíneos y nervios de mayor tamaño y en donde se destaca la presencia de fibroblastos.

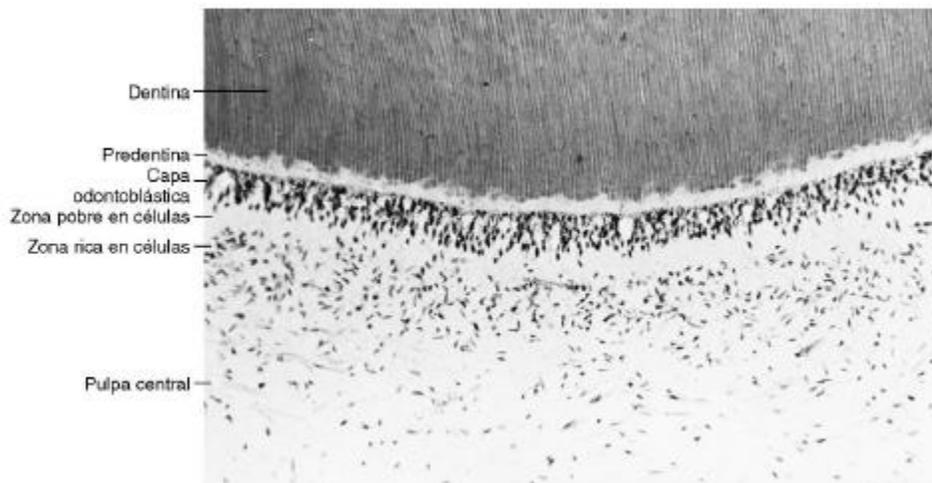


Figura 1-2: Zonas morfológicas de la pulpa. Tomado de Cohen. Vías de la pulpa (1)

Las células de la pulpa dental están implicadas en la secreción y reorganización de la matriz extracelular rica en colágeno. Los fibroblastos estromales pulpares (llamados también pulpoblastos) constituyen la población celular más abundante de la pulpa; adicionalmente podemos encontrar células progenitoras (células stem), neuronales, vasculares y del sistema inmune e incluso, células no residentes (células multipotentes indiferenciadas las cuales residen principalmente en la médula ósea y llegan a la pulpa a través del foramen apical) (5).

2. Colágeno

En la pulpa encontramos dos tipos de proteínas estructurales: el colágeno y la elastina. Las fibras de elastina están confinadas a las paredes de las arteriolas y, contrario al colágeno, no forman parte de la MEC (1).

El colágeno comprende un tercio de la proteína total de los seres humanos. Más de 28 diferentes tipos de colágeno se han identificado (además de proteínas con dominios de colágeno) los cuales se nombran en números romanos del I al XXVIII y se clasifican en distintos grupos como fibrilares (en donde podemos encontrar el tipo I, III y V, entre otros), formadores de redes (como el tipo IV), colágeno asociado a fibrillas con triple hélice interrumpida o FACIT (tipo IX, XII entre otros) y demás grupos (14-16).

El colágeno está conformado por tres cadenas polipeptídicas, designadas como $\alpha 1$ o $\alpha 2$, dependiendo de la composición y secuencia de sus aminoácidos (1). Cada cadena tiene una repetición de tripletas Gly-XY en donde la glicina ocupa cada tercera posición y las posiciones X y Y aunque pueden ser reemplazadas por cualquier aminoácido, son con frecuencia ocupadas por prolina (28%) y 4-hidroxiprolina (38%) respectivamente (15), siendo la tripleta GlyProHyp la más común (10.5%) en el colágeno (16). De hecho, un cuarto de los aminoácidos de colágeno fibrilar cadena α son residuos de prolina de los cuales el 50% son 4-hidroxilados (17).

En la pulpa de los dientes humanos, la cantidad de colágeno es del 26% y 32% del peso desecado en premolares y molares respectivamente (4). El colágeno tipo I y el tipo III son los principales subtipos de colágeno de la pulpa de los dientes permanentes y se encuentran en 56 % y 41 a 42.6 % respectivamente dejando un 2% para el colágeno tipo V (5). El colágeno tipo I es la principal proteína del tejido conectivo de piel, hueso, dentina, tendones y numerosos tejidos más. Está compuesto por 2 cadenas polipeptídicas iguales llamadas $\alpha 1$ y una cadena ligeramente diferente llamada $\alpha 2$. Por su parte, el colágeno tipo III está compuesto por 3 cadenas $\alpha 1$ idénticas. Éste representa el 10 a 50% del colágeno total en los tejidos adultos tales como grandes arterias, pulmones, hígado y piel (18).

Los genes responsables de la síntesis del colágeno tipo I son COL1A1 (responsable de la formación de la cadena $\alpha 1$) y COL1A2 (responsable de la formación de la cadena $\alpha 2$) localizados en los cromosomas 17q21.33 (brazo largo del cromosoma 17 en la posición 21.33) y 7q21.3 (brazo largo del cromosoma 7 en la posición 21.3) respectivamente mientras que el encargado de la producción del colágeno tipo III es el gen COL3A1 localizado en el cromosoma 2q32.2 (brazo largo del cromosoma 2 en la posición 32.2) (figura 2-1) (19).

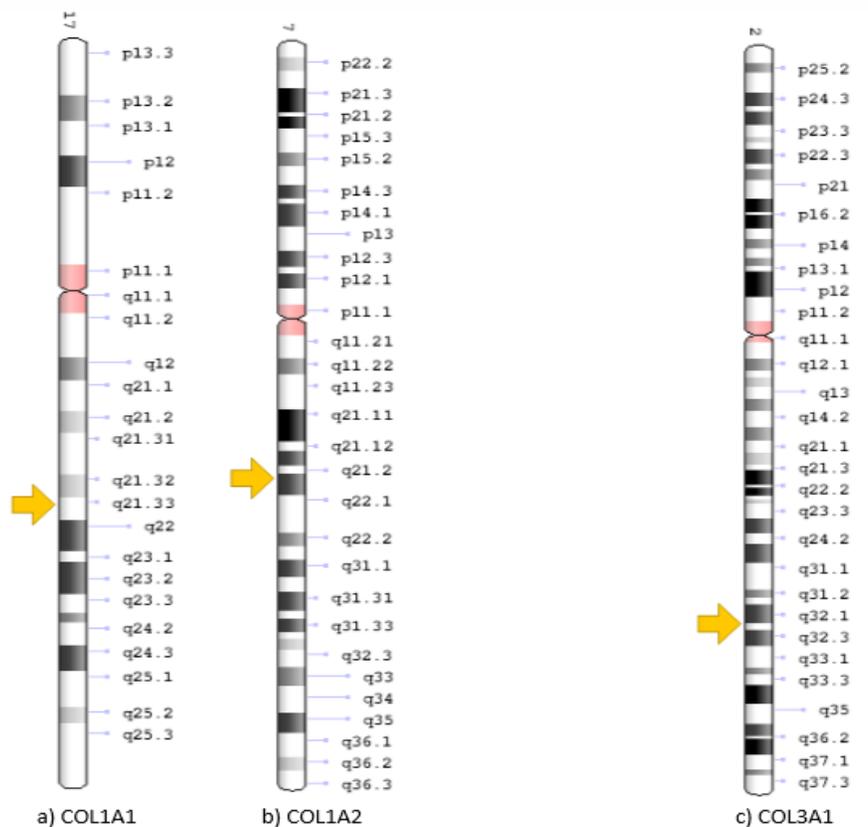


Figura 2-1: Localización de los genes responsables de la formación del colágeno tipo I (a y b) y tipo III (c). Tomado de Genetic Home Reference – National Library of Medicine (21)

A nivel pulpar, el colágeno tipo I es sintetizado por los odontoblastos, osteoblastos y fibroblastos, estos últimos también se encargan de la síntesis del colágeno tipo III (1). El procolágeno inicia su formación en el retículo endoplásmico (ER) en donde chaperonas (como la chaperona colágeno-específica HSP47) y enzimas ayudan a su plegado y trimerización. Los extremos C-terminales juegan un papel importante en el plegamiento del procolágeno ya que permiten la asociación entre cadenas de procolágeno monoméricas y determinan la selectividad de la cadena. La asociación entre las cadenas de procolágeno es precedida por la formación de enlaces disulfuro entre los extremos C-terminales (también llamados C-propeptidos) individuales los cuales continuarán su plegamiento en sentido C-N terminal (20).

La propagación de la triple hélice del colágeno necesita ciertas modificaciones como por ejemplo la actividad de la peptidilprolina cis-trans isomerasa (PPI) (necesaria para convertir la prolina a la forma trans) (22) y la prolil-4-hidroxilasa (P4H) (encargada de convertir la

prolina en hidroxiprolina) (23). Otro aminoácido que se puede encontrar hidroxilado en las moléculas de colágeno es la lisina la cual requiere alguna hidroxilasa perteneciente a la familia de las lisil hidroxilasas para llevar a cabo esta función (24). La hidroxilación de estos aminoácidos estabiliza la estructura de la triple hélice y aumenta su temperatura de desnaturalización (25).

Una vez conformada la triple hélice, la molécula de procolágeno pasa del ER al aparato de Golgi no sin antes adquirir la unidad terminal de aminoácidos conocida como telopeptido (Extremo N-globular y C-propeptidos) (1, 20). Este transporte de ER a Golgi requiere la acción de los complejos multiproteicos COPII y COPI (coat complex protein). COPII está involucrado en la exportación de carga desde el ER mientras que COPI, por su parte, media el transporte retrogrado de las proteínas residentes del ER y las etapas posteriores de transporte del ER a Golgi (26). Cuando estas moléculas llegan al aparato de Golgi, son glucosiladas y almacenadas en vesículas secretoras (1).

Las vesículas se transportan hasta la membrana plasmática, y se secretan mediante un proceso de exocitosis hacia el medio extracelular, con lo que se libera el procolágeno. Fuera de la célula, el telopeptido terminal se escinde por una enzima hidrolítica (procolágeno N y C proteinasa) (27) , y las moléculas de propocolágeno comienzan a unirse para formar fibrillas de colágeno. Se cree que la agregación de propocolágeno está mediada de algún modo por los glicosaminoglicanos (GAG). La conversión del colágeno soluble en fibras insolubles es el resultado del entrecruzamiento de las moléculas de propocolágeno (figura 2-2) (1).

Cuando los odontoblastos son lesionados y destruidos, las células que los reemplazan expresan genes específicos para colágeno tipo I y III mientras que las células que forman la dentina reparativa sintetizan colágeno tipo I pero no tipo III (5).

Un estudio sobre la expresión de genes de colágeno durante el desarrollo de los molares de rata encontró ARNm de colágeno tipos I y III en los odontoblastos en desarrollo (28). Las concentraciones de ARNm de colágeno tipo I aumentaron al progresar la diferenciación de los odontoblastos, mientras que la expresión de los genes del colágeno tipo III disminuyó al avanzar la dentinogénesis. Además de esto, el ARNm de colágeno tipos I y III se detectó en las células mesenquimatosas de la pulpa dental (1).

Se ha observado que los genes que codifican proteínas de la matriz extracelular, como colágeno tipo I (COL1A1) y fibronectina fueron expresados de forma diferencial a favor de las células de la pulpa de los dientes permanentes. Genes relacionados con la diferenciación celular también se encontraban en mayor proporción en pulpa de los dientes permanentes mientras que genes relacionados con la proliferación celular, mitosis y división estaban altamente expresados en los dientes deciduos. De igual manera se ha observado

que la capacidad de regeneración del tejido humano es mucho mayor durante la primera infancia en comparación con las posteriores etapas de la vida (7).

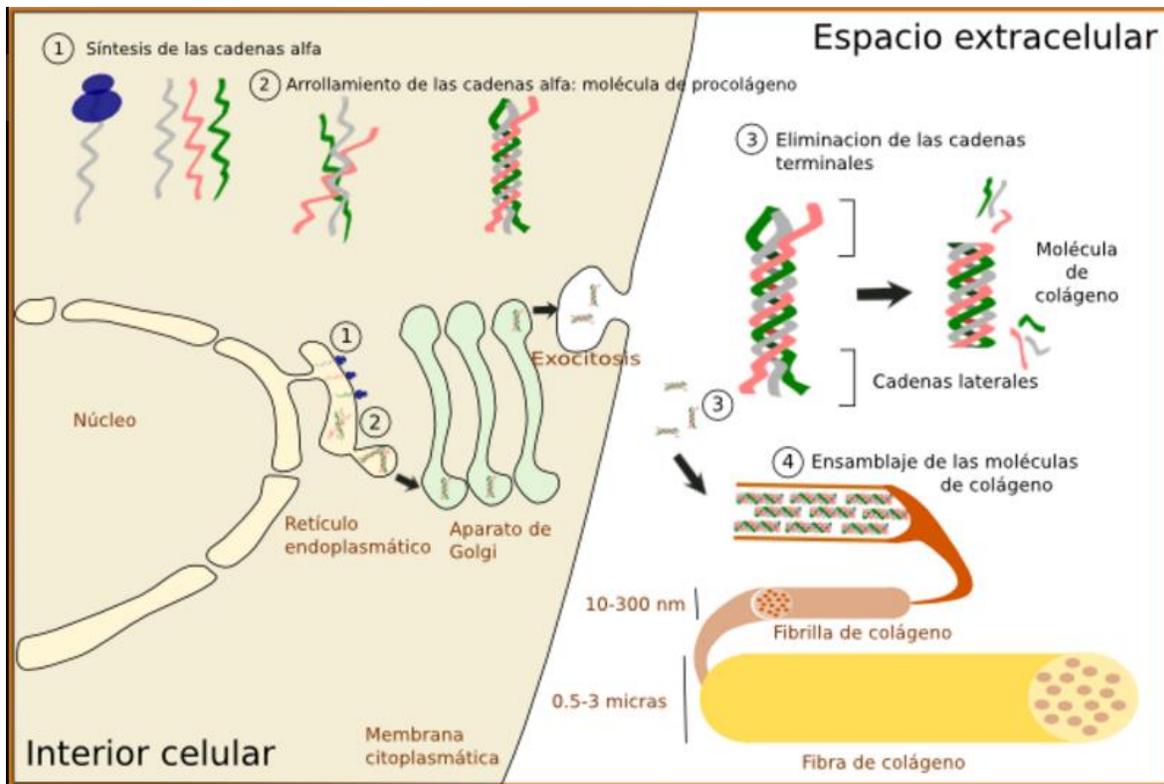


Figura 2-2: Esquema de la síntesis de las fibras de colágeno

Tomado de <http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/imagenes/colageno2.png>

Kim J-H y colaboradores por medio de microarrays de ADN compararon las expresiones génicas de la pulpa de los dientes de ambas denticiones encontrando que 263 genes de 28869 (1,10%) presentaban diferencias significativas entre los tejidos. Mientras que 43 genes de la pulpa de dientes deciduos se expresaban más del doble en comparación con el tejido pulpar permanente, este último a su vez presentaba 220 genes que se expresaban 2 o más veces en comparación con el tejido pulpar de los dientes deciduos entre los cuales sobresalían aquellos relacionados con la transducción de señales, la comunicación celular, la trasmisión sináptica nervio a nervio y ciertas proteínas de unión a calcio (8).

Existen técnicas histológicas específicas para ver fibras colágenas en los tejidos como lo son el método de impregnación argéntica de Pearson, el tricrómico de Masson y una en especial que permite diferenciar bajo microscopia de luz polarizada fibras colágenas de tipo I y III llamada Picro-Sirius Red (9, 29), técnica que podría ser útil al momento de querer

observar la presencia de estos tipos de fibras en las pulpas de los dientes deciduos y permanentes. Con Picro-Sirius Red las fibras de colágeno muestran birrefringencia gracias a que las unidades submicroscópicas de la luz polarizada se orientan en dirección al eje de la fibra lo cual permite apreciar el colágeno tipo I en un tono amarillo-naranja-rojo y las fibras de tipo III en un tono verdoso(11).

Al ser el colágeno una proteína tan importante, el siguiente estudio observó la presencia de colágeno tipo I y III en las pulpas de dientes deciduos y permanentes utilizando la técnica de tinción Picro Sirius Red. A continuación se explicara el método empleado para recolección de muestras y análisis de las mismas.

3. Materiales y métodos

La muestra consistió en 10 pulpas de dientes permanentes y 14 pulpas de dientes deciduos. El tamaño de la muestra se determinó con base en el tamaño de la muestra de otros estudios similares a este (3,4).

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia. Según la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud el estudio fue una investigación con riesgo mínimo, dado que las muestras fueron obtenidas de dientes cuya extracción estuvo indicada por motivos distintos a los del estudio. Se obtuvo un consentimiento informado el cual fue firmado por parte de los adultos que participaron en la investigación. En el caso de menores de edad, el consentimiento informado fue firmado por los padres o acudientes del niño o adolescente. Igualmente se obtuvo el asentimiento informado por parte de los menores de edad.

La extracción del diente, la obtención de la pulpa y el procesamiento de la muestra fue realizada por personal idóneo en el campo correspondiente y en las condiciones de bioseguridad pertinentes dentro de las clínicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y la Fundación HOMI.

Se respetó la autonomía, confidencialidad y privacidad de las personas que participaron en el estudio. La muestra no fue rotulada con datos del paciente. Solo se realizó lo que fue informado al paciente.

El tejido pulpar de los dientes permanentes se obtuvo de dientes cuya extracción estaba indicada (principalmente por razones ortodónticas), se encontraban vitales, no presentaban procesos cariosos y su formación radicular estaba completa. El tejido pulpar de dientes deciduos se obtuvo de dientes cuya extracción estaba indicada (dientes que durante el inicio de la erupción del permanente sucesor aún se mantenían en boca y dientes indicados para extracciones seriadas con el fin de dar espacio a los permanentes), se encontraban vitales, no presentaban procesos cariosos y presentaban máximo 2/3 de reabsorción radicular. Dientes deciduos y permanentes que presentaran algún tipo de alteración anatómica, caries o enfermedad periodontal fueron excluidos.

Una vez realizada la exodoncia se procedió a crear una franja con ayuda de una fresa de diamante montada en una pieza de alta velocidad con irrigación por todo el eje axial del diente de vestibular a lingual/palatino iniciando por el extremo apical de la superficie vestibular hasta rodear completamente el diente en su eje axial. El operador revisaba constantemente la cercanía con el tejido pulpar con el fin de no afectarlo durante la preparación. Una vez completada la franja, con ayuda de una 7A se procedió a ejercer

palanca dentro de la ranura a nivel coronal con el fin de generar la separación de los dos fragmentos y exponer así el tejido pulpar (figura 3-1).



Figura 3-1: diente permanente completo (a) y deciduo con media raíz reabsorbida (b) seccionados y con el tejido pulpar expuesto listo para la recolección

Una vez obtenido el tejido pulpar, éste se almacena en un vial que contenía formaldehído al 10%, se rotuló la muestra y se envió al laboratorio de patología de la Universidad Nacional de Colombia y se realizó el procesamiento en bloques de parafina. Las muestras fueron teñidas con Picro-Sirius Red siguiendo el protocolo estandarizado por el laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia el cual es el mismo que se encuentra en la página www.abcam.com (29).

Se procedió a observar las muestras en el microscopio Nikon BX51 con los sistemas ópticos para luz transmitida y polarizada por 4 observadores independientes posterior a calibración y de manera cualitativa se analizaron y compararon las muestras de dientes deciduos y permanentes. Las imágenes fueron capturadas mediante el programa Infinity Capture utilizando la cámara Infinity 1-3c. del laboratorio de microscopia de la facultad de geología de la Universidad Nacional de Colombia.

4. Resultados

Las placas de las muestras procesadas fueron observadas bajo el microscopio de luz polarizada Nikon BX51 y las imágenes capturadas gracias a la cámara Infinity 1-3C mediante el programa Infinity Capture. Los 4 observadores fueron calibrados observando cortes histológicos de piel como control positivo la cual fue teñida con Picro-Sirius red y se observó tanto con luz transmitida como con luz polarizada a diferentes magnificaciones (figura 4-1).

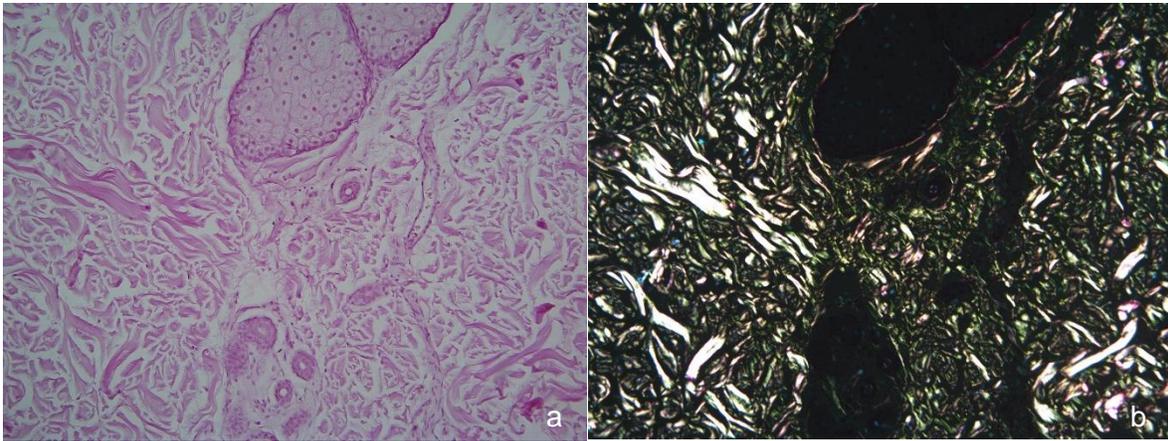


Figura 4-1: control de piel visto a 20x bajo luz transmitida (a) y luz polarizada (b)

Una vez calibrados los observadores, se procedió a observar las muestras primero bajo luz transmitida seguido de la luz polarizada, siempre haciendo la comparación histológica que nos daba la luz transmitida con lo encontrado bajo luz polarizada (figura 4-2 y 4-3) y se observó, con el fin de hacer comparación, a magnificaciones de 20x y 40x en algunas laminas. Aunque los observadores observaron muestras por los oculares del microscopio directamente, la comparación final fue realizada por los 4 observadores en las fotos realizadas de cada placa en la pantalla de un computador.

Para realizar la lectura se tuvo en cuenta el parámetro de los controles positivos de piel donde se observaron haces de fibras de colágeno tipo I en una determinada proporción comparada con haces muy pequeños que por descarte y al no tener la organización característica del tipo I bajo la luz polarizada, se determinó que correspondían a colágeno tipo III u otro tipo de éste.

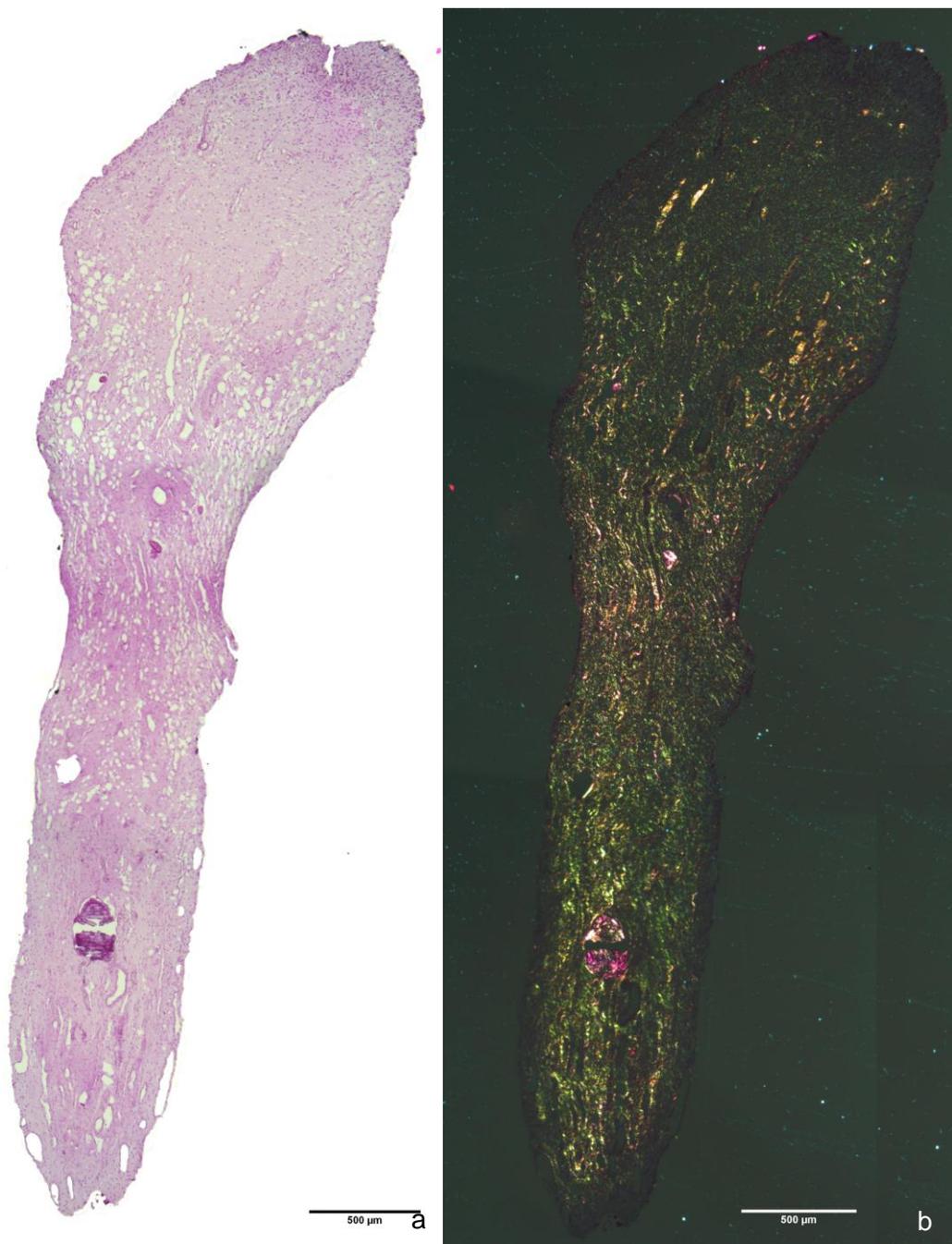


Figura 4-2: corte histológico de tejido pulpar de diente deciduo teñido con Picro-Sirius Red a 4x bajo luz transmitida (a) y luz polarizada (b)

Después de observar bajo microscopio, se procedieron a ver las imágenes en el computador colocando una imagen perteneciente al tejido pulpar de los dientes deciduos al lado de una imagen de la muestra del grupo de los permanentes al mismo aumento.

Bajo luz transmitida los cortes adquirieron un color característico rojizo e histológicamente, descrito por los histólogos y patólogos presentes, se determinó que los haces de mayor diámetro y organización correspondían a colágeno tipo I. Previamente se identificaron las zonas histológicas de la pulpa (en los cortes que lo permitieron) descritas en los libros.

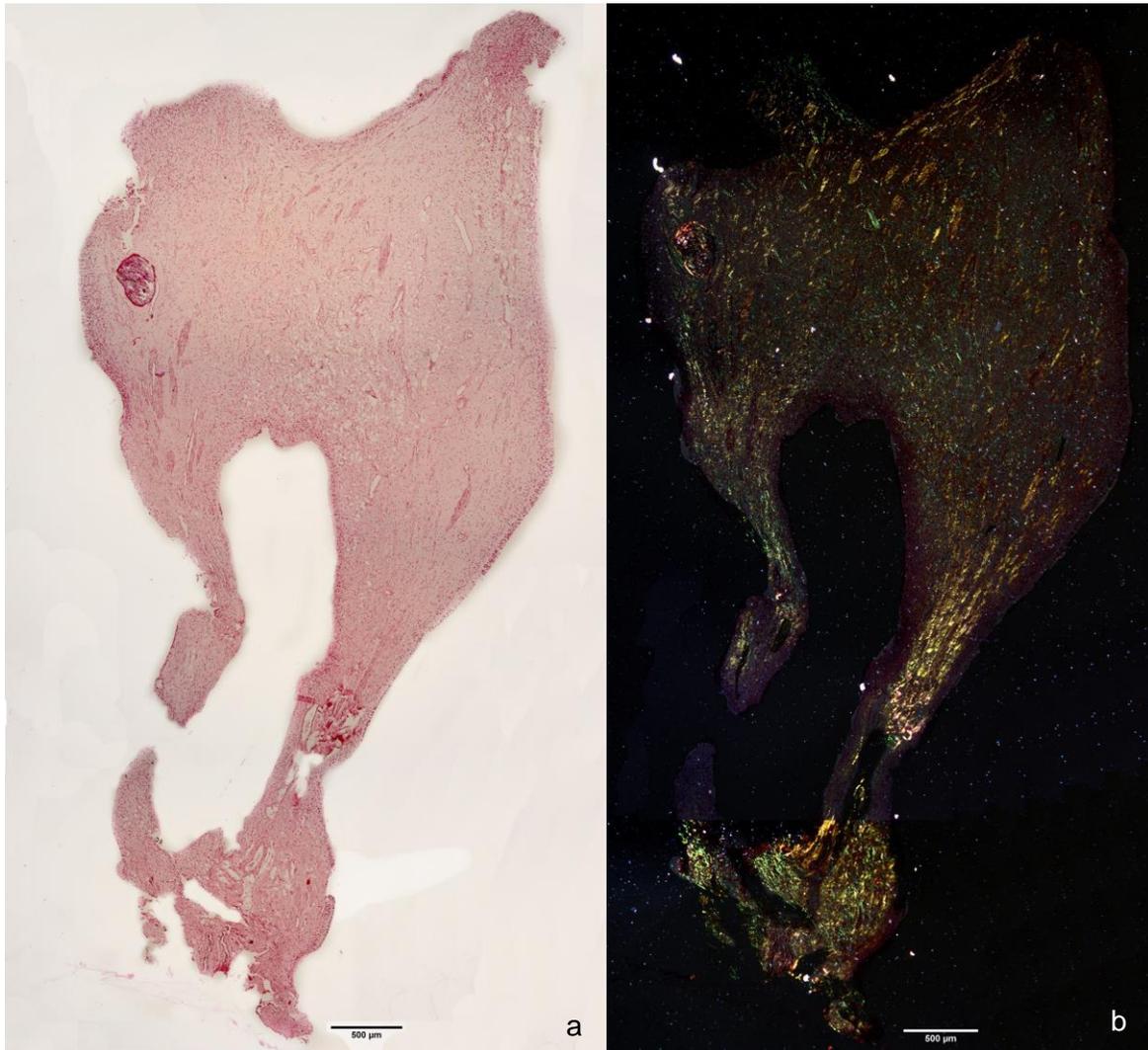


Figura 4-3: corte histológico de tejido pulpar de diente permanente teñido con Picro-Sirius Red a 4x bajo luz transmitida (a) y luz polarizada (b)

Una vez seleccionado un campo específico se pasó a luz polarizada observando la diferencia de colores en tonos ubicados entre el amarillo y el rojo correspondiente, según la técnica y lo determinado por los observadores bajo luz transmitida, a colágeno tipo I. En otras zonas del campo con menos organización y en menor tamaño, estructuras que mostraban un color blanco verdoso correspondiente a colágeno tipo III. Se pudo determinar

también que al rotar el porta objetos con el fin de girar el campo, el eje de luz cambiaba haciendo cambiar el color de las estructuras analizadas en el momento pero, al volver a observar la muestra bajo luz transmitida, se podía determinar que la muestra correspondía a una estructura más o menos organizada y así ser catalogada como colágeno tipo I o III independientemente del cambio de color (Figura 4-4).

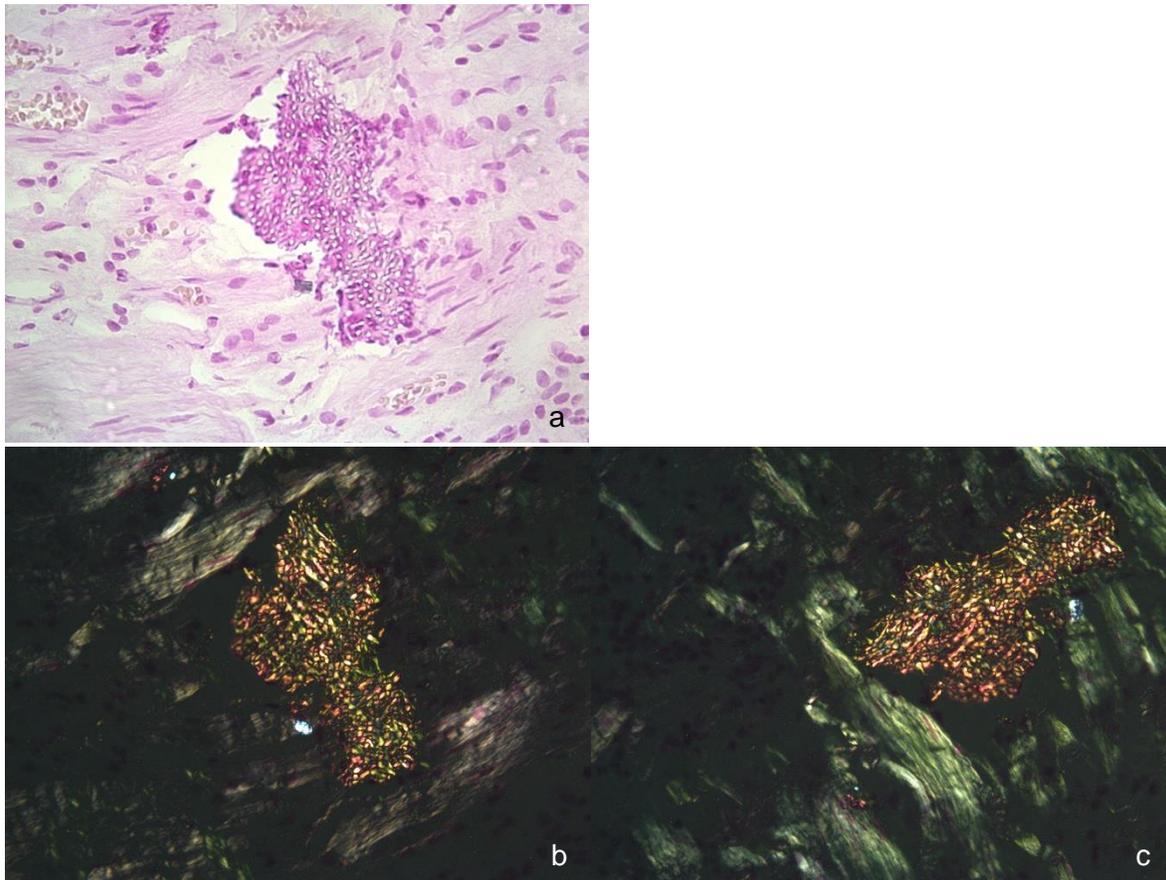


Figura 4-4: a) muestra observada bajo luz transmitida; b) muestra observada bajo luz polarizada; c) muestra anterior rotada 90 grados donde se evidencia el cambio de color de las fibras alrededor del fragmento dentinal.

Al realizar la observación de las placas se descartaron algunas de éstas por presentar errores durante el procesamiento (doblesces o fallas en la fijación) o que al momento de la observación bajo el microscopio no permitían identificar correctamente las estructura del tejido pulpar por lo cual la muestra final fueron 8 tejidos pulpares de dientes deciduos y 8 de dientes permanentes.

La mayoría de los tejidos pulpaes de dientes permanentes fueron premolares de pacientes entre 18 y 25 años de edad con extracción indicada por el ortodoncista tratante (7 en total) y un central superior de una paciente adulto mayor cuya extracción fue indicada con fines restaurativos.

Los dientes temporales correspondieron a niños entre 5 y 12 años de los cuales 7 tenían formación radicular completa y uno se encontraba en proceso de reabsorción fisiológica la cual ya había comprometido 2/3 de la raíz. En todos los casos se realizaron extracciones seriadas con el fin de brindar espacio para la erupción de los dientes permanentes.

Algunas muestras presentaban bajo luz polarizada un color azul lo cual correspondía a un arteificio de la lámina. Se ignoró ese color.

Bajo luz transmitida se pudieron identificar estructuras como vasos sanguíneos incluso a mayor aumento, células endoteliales. Algunas muestras presentaban fragmentos de tejido mineralizado con forma tubular correspondiente a dentina los cuales posteriormente, bajo luz polarizada, se teñían con un color rojo debido a su alto contenido de colágeno tipo I (figura 4-5).

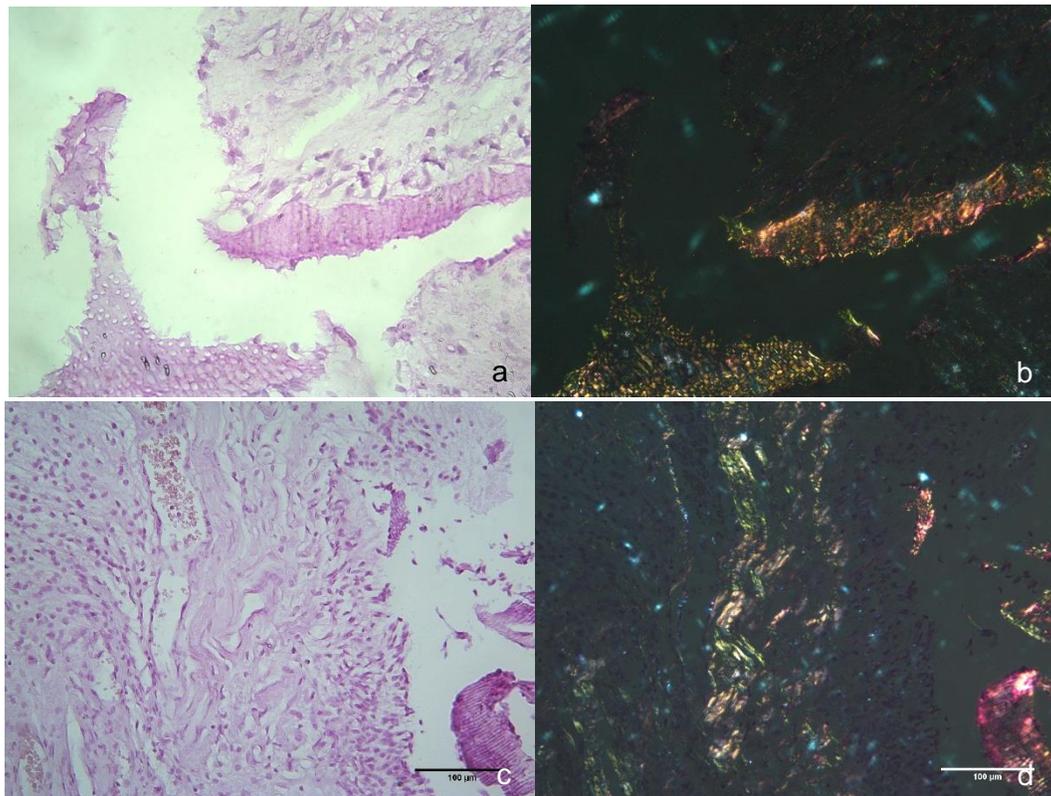


Figura 4-5: Dentina y tejido pulpar teñido con Picro-Sirius Red en un diente deciduo visto bajo luz transmitida (a) y luz polarizada (b) y un diente permanente visto bajo luz transmitida (c) y luz polarizada (d).

Bajo luz polarizada, al observar algunas muestras, se apreciaba en el tejido pulpar de los dientes deciduos fibras finas color verde correspondientes a colágeno tipo III (figura 4-6) mientras que en dientes permanentes se apreciaban mas fácilmente fibras de mayor calibre color amarillo-anaranjado correspondiente a colágeno tipo I (figura 4-7).

A un aumento de 40x se observó en el tejido pulpar de los dientes deciduos haces de fibras colágenas delgadas las cuales, por su composición y comparación con la histología, correspondían a colágeno tipo III observadas en color verde (figura 4-6). Este patrón fue observado incluso en la muestra correspondiente al diente deciduo en proceso de reabsorción fisiológica (Figura 4-6d) mientras que el colágeno tipo I fue más evidente en los dientes permanentes (Figura 4-7) y se hizo más notorio en la pulpa del incisivo superior de la persona adulto mayor (Figura 4-7d).

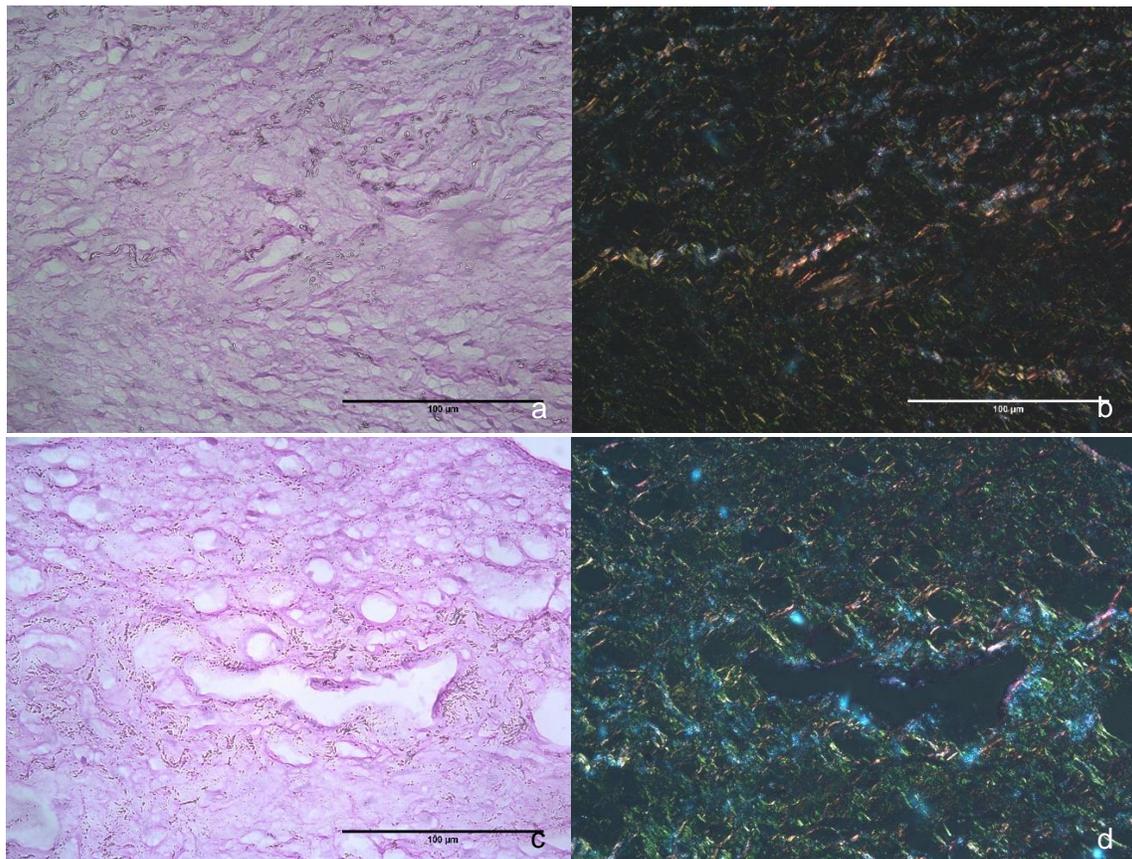


Figura 4-6: Diente deciduo sin proceso de reabsorción fisiológica teñido con Picro-Sirius Red a 40x visto bajo luz transmitida (a) y luz polarizada (b); diente deciduo en proceso de reabsorción fisiológica que compromete hasta el tercio medio radicular teñido con Picro-Sirius Red a 40x bajo luz transmitida (c) y luz polarizada (d).

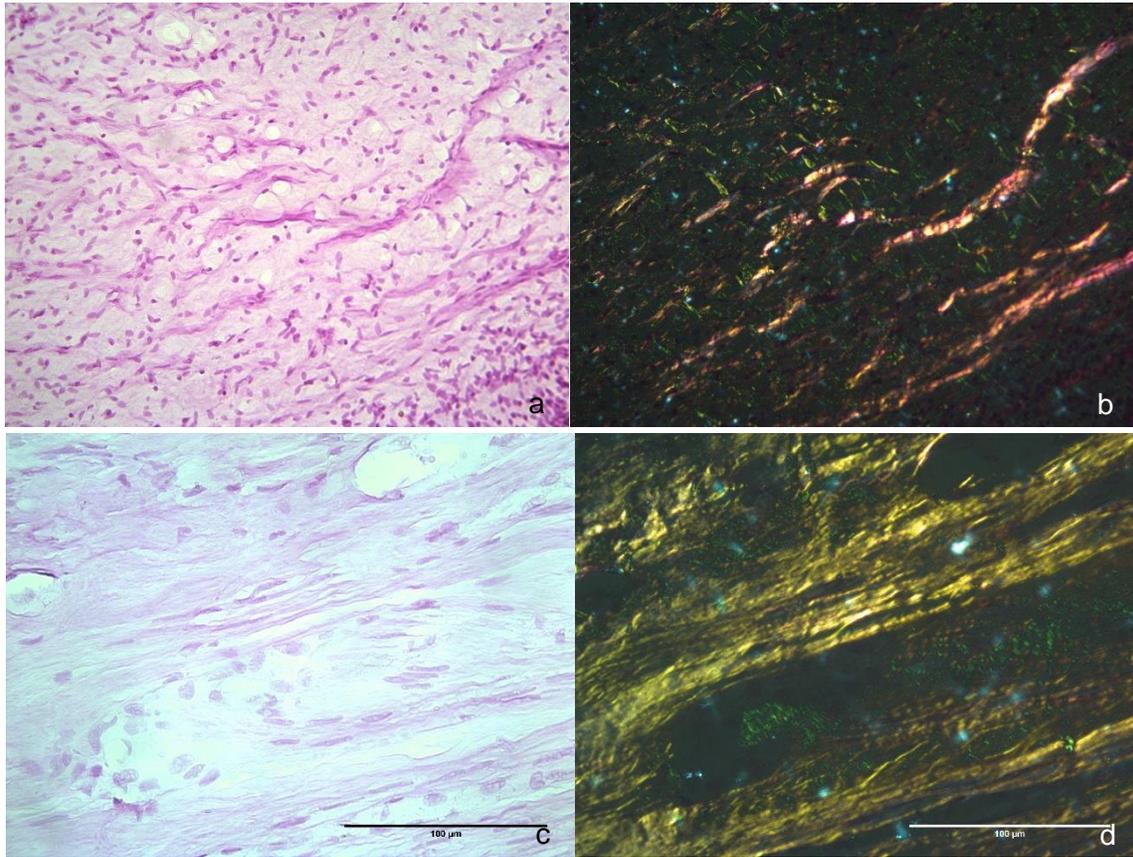


Figura 4-7: Premolar de adulto de 23 años de edad con tinción de Picro-Sirius Red a un aumento de 20x bajo luz transmitida (a) y luz polarizada (b). Tejido pulpar de incisivo central superior de paciente de la tercera de edad con tinción de Picro-Sirius Red a 40x bajo luz transmitida (c) y luz polarizada (d)

5. Discusión

La técnica Picro-Sirius Red permitió observar la presencia de colágeno tipo I y III en los tejidos pulpaes de dientes deciduos y permanentes por medio de microscopia de luz polarizada, similar a lo encontrado por el doctor Abrahão y colaboradores los cuales mostraron que la tinción con Picro-Sirius Red permitía identificar colágeno tipo I y III en la papila apical de gérmenes dentales luego de que anteriormente no observaran colágeno con otra coloración específica para ésta proteína como lo es el tricrómico de Masson (10).

En este estudio se observaron las muestras a nivel coronal, tercio medio y apical (cuando fue posible) en vista de lo encontrado por Van Amerongen y colaboradores los cuales observaron tanto en terceros molares como en premolares una mayor disposición de esta proteína a nivel del tercio medio y la menor cantidad a nivel del tercio coronal (4).

Realizar la captura de las imágenes con el programa Infinity Capture facilitó la comparación cualitativa de las muestras a diferentes aumentos ya que permitía a todos los observadores dar su opinión y discutir al mirar todos una misma zona o estructura al tiempo, contrario a la vista directa en el microscopio el cual solo permitía un concepto a la vez sobre lo que se estaba observando.

A pesar de ser un análisis cualitativo, los 4 observadores coincidían en que el tejido pulpar de las dos denticiones presentaba una distribución distinta, histológicamente hablando, asociado principalmente al patrón de organización que presentaban las fibras colágenas, sin la identificación en este punto del tipo al que pertenecía.

Aunque el principal criterio clínico para la elección de las muestras era que el diente estuviera sano, en algunas zonas del tejido pulpar de los dientes permanentes se observó una gran acumulación de zonas que por su morfología podrían corresponder a un infiltrado inflamatorio asociado a algún proceso crónico por un evento traumático o la agresión generada por el movimiento ortodóntico

Aunque Picro-Sirius Red está diseñada para ser observada principalmente bajo luz polarizada, bajo luz transmitida es posible observar algunas diferencias entre los tejidos. Cualitativamente, haces de fibras colágenas de mayor diámetro y organización correspondiente a colágeno tipo I, predominaron en el tejido pulpar de los dientes permanentes. El colágeno tipo III, aunque era difícil de identificar por su tamaño, se podía observar en una distribución con forma de malla por el entrecruzamiento de haces de fibras delgadas, hallazgo que fue más predominante en el tejido pulpar de los dientes deciduos comparado con el de los permanentes.

Otros hallazgos cualitativos bajo luz transmitida fue la presencia de un gran número de vasos sanguíneos y mayor componente celular en el tejido pulpar de los dientes deciduos, comparado con el de los permanentes. Este análisis histológico podría correlacionar el tejido pulpar de los dientes permanentes con un tejido mucho más estable en cuanto a su metabolismo debido a la estructura más organizada de los haces de fibras colágenas.

Se observó con una mayor facilidad las zonas histológicas del tejido pulpar en los dientes permanentes comparado con los deciduos. De igual manera, sin luz polarizada, se hicieron evidentes fragmentos de dentina los cuales fueron utilizados como control positivo para identificar colágeno tipo I bajo luz polarizada debido a la alta presencia de esta proteína en ese tejido (98% (5)).

Al pasar a observar los mismos campos bajo luz polarizada, el tono rojizo y fondo blanco que se apreciaba bajo luz transmitida desaparece y aparece una imagen completamente distinta debido a los cambios en la luz y su dirección y los efectos birrefringentes pasando a observar ahora un fondo oscuro con colores en las fibras colágenas que van de un amarillo a rojo para el colágeno tipo I y blanco verdoso para el tipo III. Podemos especular que el corte de las muestras en los bloques de parafina al ser de 5 micras podría llegar a afectar el paso de la luz polarizada pero esto no ha sido descrito ni comprobado.

En algunas muestras se observaron sombras de color azul las cuales fueron catalogadas como artificios y no se tuvieron en cuenta para el análisis de las imágenes.

Al ver bajo luz polarizada se pudo identificar haces de fibras colágenas tipo I al comparar el hallazgo histológico bajo luz transmitida en colores que se encontraban entre el amarillo y el rojo. Las fibras de tipo III al ser más delgadas, de menor calibre y tamaño y al presentar esta disposición en forma de malla y no de haces como el tipo I resulto ser más difícil de identificar bajo luz transmitida pero al pasar a luz polarizada era evidente su presencia al ser observadas con colores que iban desde el blanco hasta el verde.

Cabe insistir en la disposición organizada en haces de gran tamaño del colágeno tipo I y en la distribución dispersa y no en sitios localizados, en mallas o entrecruzadas y de menor tamaño del colágeno tipo III.

Al hacer la comparación cualitativa y subjetiva de ambas muestras (tejido pulpar de dientes permanentes y deciduos) se pudo observar un mayor predominio de haces de fibras colágenas tipo I en el tejido pulpar de los dientes permanentes con respecto a los dientes deciduos. Esto puede corresponder, de acuerdo a la histología, a un cuadro de tejido conectivo laxo con mayor adaptación al medio. De igual manera esto podría ser una explicación a la larga durabilidad del tejido pulpar de los dientes permanentes comparada con la corta durabilidad (en cuanto a la relación de vida) del tejido pulpar de los dientes

deciduos necesariamente acompañado de otros factores diferenciales que produzcan esta diferencia en vida y funcionalidad entre ambos tejidos pulpares.

Un análisis cualitativo de las muestras analizadas permitió ver una distribución equitativa con un ligero predominio de colágeno tipo I en la pulpa de los dientes permanentes lo cual concuerda con lo registrado en la literatura (5). Sin embargo, al analizar el tejido pulpar del incisivo central superior perteneciente a la paciente adulto mayor es evidente el predominio de fibras colágenas tipo I, esto puede estar asociado a una mayor actividad fibroblástica de los fibroblastos remanentes en el tejido pulpar (30). Morse señala que conforme avanza la edad el número de fibroblastos va disminuyendo, fenómeno que va acompañado de un aumento en el número de fibras colágenas pero no por el aumento en la producción de éstas si no por la reducción en la capacidad de degradación de estas fibras (31).

Al analizar el tejido pulpar de los dientes deciduos se observa una gran diferencia en cuanto a la presencia de colágeno tipo I y III siendo este último el predominante, muy por encima de lo encontrado en los dientes permanentes. Sabemos por el estudio de Kaukua que el gen relacionado con la formación del colágeno tipo I (COL1A1) se expresa mayormente en el tejido pulpar de los dientes permanentes en comparación con los deciduos (7).

La calibración de los observadores fue difícil para el estudio debido a la birrefringencia que presentan las fibras colágenas dependiendo el ángulo en el que sean vistas. Este desafío óptico se hace evidente en la figura 4-5d en la cual se evidencia un haz identificado como tipo I principalmente por su tamaño, en la cual las fibras orientadas en cierta dirección muestran un color amarillo-anaranjado descrito para este tipo de fibras pero al recorrer la fibra y observar haces en una dirección perpendicular, el tono adquirido por estas fue el correspondiente al colágeno tipo III (verdoso). Aunque puede haber presencia de colágeno tipo I y III en una misma zona, el tamaño de la fibra indica ser un haz de colágeno tipo I.

En la figura 4-4 se hace evidente nuevamente esta alteración en el color producida por la disposición de las fibras al momento de analizarse. Note como la muestra presenta un fragmento de dentina en su interior el cual presenta una mezcla de tonos amarillos-naranjas pero con alguna presencia de puntos verdes lo cual en un primer momento, debido a lo indicado por la tinción, correspondería a colágeno tipo III pero al revisar la literatura y no encontrar presencia de este tipo de colágeno en la dentina, es evidente que la disposición desordenada de estos túbulos dentinales está produciendo ese patrón multicolor en la imagen.

En la literatura revisada no se encontró información alguna sobre la observación de las muestras a diferentes ángulos por lo cual pone en duda el uso clínico para la detección de colágeno en algunas patologías tumorales ya que de basarse solo por el color, se podría estar identificando colágeno tipo I cuando en realidad es tipo III (o viceversa).

En las muestras observadas, basados en el color y el tamaño de las fibras se hizo evidente un predominio cualitativo del colágeno tipo III en los dientes deciduos. El tejido pulpar de los dientes permanentes presento cualitativamente un ligero equilibrio entre colágeno tipo I y III inclinándose un poco más hacia el tipo I, lo cual concuerda con la literatura revisada.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- La tinción histológica Picro-Sirius Red permitió identificar la presencia de colágeno tipo I y III en las pulpas de los dientes deciduos y temporales
- El tejido pulpar de los dientes permanentes presenta bajo luz transmitida una mayor presencia de haces de fibras colágenas de mayor tamaño y más organización de las capas histológicas en comparación al tejido pulpar de los dientes deciduos
- La luz polarizada permitió observar un mayor predominio de colágeno tipo I en el tejido pulpar de los dientes permanentes mientras que en los deciduos predominó el colágeno de tipo III
- Al observar cualitativamente el tejido se ve el predominio del colágeno tipo III en el tejido pulpar de los dientes deciduos
- En el tejido pulpar de los dientes permanentes se observa cualitativamente una distribución similar entre el colágeno tipo I y III siendo el tipo I un poco más abundante
- Todas las observaciones realizadas en este estudio son descriptivas y cualitativas

6.2 Recomendaciones

- Realizar un estudio cuantitativo que permita esclarecer los porcentajes de colágeno en las pulpas de los dientes deciduos
- Debido al fenómeno de birrefringencia presente al momento de ver las muestras con Picro-Sirius Red bajo luz polarizada se hace necesario confirmar los hallazgos obtenidos con pruebas complementarias de inmunohistoquímica
- Independientemente del tipo de colágeno, es evidente su abundante presencia a nivel de todo el tejido pulpar lo cual lo hace una proteína de bastante interés para futuras investigaciones

7. Bibliografía

1. Hargreaves KM, Berman LH, Cohen S. Cohen. Vías de la Pulpa. 10 ed 2011. 1082 p.
2. Ferraris MEG. Histología y embriología bucodental 2002. 482 p.
3. Sahli CC, Aguadé EB. Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas 2014. 1088 p.
4. van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. Archives of oral biology. 1983;28(4):339-45.
5. Goldberg M. The Dental Pulp: Biology, Pathology, and Regenerative therapies 2014. 281 p.
6. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists. 1993;4(5):679-728.
7. Kaukua N, Chen M, Guarnieri P, Dahl M, Lim ML, Yucel-Lindberg T, et al. Molecular differences between stromal cell populations from deciduous and permanent human teeth. Stem cell research & therapy. 2015;6:59-73.
8. Kim JH, Jeon M, Song JS, Lee JH, Choi BJ, Jung HS, et al. Distinctive genetic activity pattern of the human dental pulp between deciduous and permanent teeth. PloS one. 2014;9(7):1-7.
9. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. The Histochemical Journal. 1979;11(4):447-55.
10. Abrahão IJ, Martins MD, Katayama E, Antoniazzi JH, Segmentilli A, Marques MM. Collagen analysis in human tooth germ papillae. Brazilian Dental Journal. 2006;17:208-12.
11. Samar ME, Ávila RE, Asis OG, Fonseca I, Corball A. Identificación de Colágeno I y III con Picrosirius Red/ Polarización en el Estroma de Tumores Salivales. International journal of odontostomatology. 2012;6:59-64.

12. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *Journal of cell science*. 2003;116(9):1647-8.
13. Schwabe GC, Opitz C, Tinschert S, Mundlos S, Sharpe PT. Molecular Mechanisms of Tooth Development and Malformations. *Oral Biosci Med*. 2005;1:77-91.
14. Malhotra V, Erlmann P. The pathway of collagen secretion. *Annual review of cell and developmental biology*. 2015;31:109-24.
15. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *Journal of cell science*. 2007;120(12):1955-8.
16. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:929-58.
17. Hudson DM, Eyre DR. Collagen prolyl 3-hydroxylation: a major role for a minor post-translational modification? *Connective tissue research*. 2013;54:245-51.
18. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *The New England journal of medicine*. 1979;301(1):13-23.
19. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Human mutation*. 1997;9(4):300-15.
20. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of cell science*. 2005;118(7):1341-53.
21. National Library of Medicine. Genetics Home Reference [Internet]. [citado 20 de octubre de 2016]. Recuperado a partir de: Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene>
22. Davis JM, Boswell BA, Bachinger HP. Thermal stability and folding of type IV procollagen and effect of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase on the folding of the triple helix. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(15):8956-62.
23. Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2003;22(1):15-24.
24. Mercer DK, Nicol PF, Kimbembe C, Robins SP. Identification, expression, and tissue distribution of the three rat lysyl hydroxylase isoforms. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;307(4):803-9.

25. Berg RA, Prockop DJ. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochemical and biophysical research communications*. 1973;52(1):115-20.
26. Duden R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Molecular membrane biology*. 2003;20(3):197-207.
27. Leung MK, Fessler LI, Greenberg DB, Fessler JH. Separate amino and carboxyl procollagen peptidases in chick embryo tendon. *The Journal of biological chemistry*. 1979;254(1):224-32.
28. D'Souza RN, Bachman T, Baumgardner KR, Butler WT, Litz M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *Journal of dental research*. 1995;74(2):702-9.
29. ab150681-Picro-Sirius Stain Kit (website).pdf [Internet]. [citado 20 de octubre de 2016]. Recuperado a partir de: [http://www.abcam.com/ps/products/150/ab150681/documents/ab150681-Picro-Sirius%20Stain%20Kit%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/150/ab150681/documents/ab150681-Picro-Sirius%20Stain%20Kit%20(website).pdf).
30. Gomez PA, Cabrini RL. Anatomic variations of the root canal of the rat according to age. *Acta odontologica latinoamericana : AOL*. 2004;17(1-2):39-42.
31. Morse DR. Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1991;72(6):721-45.