



UNIVERSIDAD DE GRANADA

2009

**ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE INDUCCIÓN,
TRANSDIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS
EN LA CEMENTOGÉNESIS HUMANA**

**DOCTORANDO: CARMEN CARDA BATALLA
DIRECTOR: PROF. DR. AMANDO PEYDRÓ OLAYA**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carmen Carda Batalla
D.L.: GR 2308-2009
ISBN: 978-84-692-3112-8

El trabajo titulado

**“Estudio de los procesos de inducción,
transdiferenciación y
apoptosis en la cementogénesis humana”**

que se presenta en esta memoria, ha sido realizado por la licenciada en Odontología Dña. Carmen Carda Batalla bajo mi supervisión.

Dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL.

Y para que conste a los efectos oportunos, realizamos esta declaración en Valencia a 1 de abril de 2009.

Amando Peydró Olaya
Catedrático de Universidad

Al mestre i al amic
Als que fan de la meva vida un goig

A los Profesores Ricardo Colombo, Catedrático de Ortodoncia de la Universidad de la Plata (Argentina); Ambrosio Bermejo, Catedrático de Medicina Bucal de la Universidad de Murcia; José Vicente Pascual, Profesor Asociado de Cirugía Bucal de la Universidad de Valencia; a los Doctores Assumpta Carrasquer y José Luis Sánchez, que desinteresadamente nos han proporcionado los especímenes dentarios de estudio.

Al Profesor Ermanno Bonucci por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio de la Università de la Sapienza (Roma) y su equipo, particularmente a la Profa. Silvestrini y la Profa. Ballanti, por haberme introducido en las técnicas necesarias para el estudio de la apoptosis y morfométricas, respectivamente.

A las compañeras del laboratorio Elena Carcelen y Carmen Beitia.

A Dr. Guijarro por llegar tan rápido de discípulo a maestro; constato día a día que me enseña más de lo que yo me empeño en que aprendiera.

A la Dra. Paloma Botella por su estudio estadístico.

A mi familia por haberlo no solo permitido sino además propiciado.

A mi padre por el referente que significo.

A mi maestro el profesor Peydró Olaya, por todo.

1. INTRODUCCIÓN	1-44
1.1. Los dientes en la Antigüedad y Renacimiento	3
1.2. Estructura microscópica de los dientes	12
1.3. El descubrimiento del cemento	15
1.4. Caracteres generales del cemento	21
<u>1.4.1. Componentes estructurales del cemento</u>	21
1.4.1.1. Células del cemento	22
1.4.1.2. Matriz extracelular	24
<u>1.4.2. Tipos de cemento</u>	25
1.4.2.1. Cemento acelular o primario	25
1.4.2.2. Cemento celular o secundario	25
1.4.2.3. Cemento acelular afibrilar	26
1.4.2.4. Cemento intermedio	26
1.5. Cementogénesis	27
<u>1.5.1. Henle y Mandl</u>	29
<u>1.5.2. Hertwig</u>	29
<u>1.5.3. von Brunn</u>	32
<u>1.5.4. von Ebner</u>	34
<u>1.5.5. Mummery</u>	36
<u>1.5.6. Gottlieb</u>	37
<u>1.5.7. Schour</u>	39
<u>1.5.8. Bosshardt y Schroeder</u>	40
2. OBJETIVOS	45-46
3. MATERIAL Y MÉTODOS	47-52
3.1. Muestras	47
3.2. Procesado para estudio estructural	47
<u>3.2.1. Microscopia óptica</u>	47
<u>3.2.2. Estudio del inmunofenotipo</u>	48
<u>3.2.3. Microscopia electrónica</u>	48
<u>3.2.4. Estudio de la apoptosis (TUNEL)</u>	49
3.3. Estudio morfométrico	49

3.4. Estudio del crecimiento radicular.....	51
4. RESULTADOS	53-86
4.1. Aspectos generales.....	54
4.2. El diafragma del epitelio radicular	54
4.3. La vaina epitelial.....	62
4.4. La capa cementoide celular.....	77
4.5. Restos de Malassez.....	80
5. DISCUSIÓN.....	87-98
6. CONCLUSIONES	99-100
7. BIBLIOGRAFÍA.....	101-111

La patología del periodonto de inserción, junto con la caries, son las enfermedades más frecuentes en la clínica odontostomatológica. Ambas destacan por su elevada incidencia y por el hecho de que un diagnóstico tardío y/o un inadecuado planteamiento terapéutico frecuentemente comporta la pérdida dentaria. Hasta hace pocos años la patología periodontal iba únicamente orientada a detener la progresión de la enfermedad y restaurar odontológicamente o mediante prótesis las pérdidas producidas. Pero en la actualidad se han desarrollado con extraordinario éxito terapéuticas regenerativas que, progresivamente, complementan planteamientos tradicionales. Pues bien, en el centro de la terapéutica periodontal y para poder plantear adecuadamente la regeneración biológica del cemento, estructura encargada de fijar en la superficie radicular los fascículos del ligamento periodontario, nos encontramos ante la necesidad de conocer cuál es el origen y cómo es el proceso de formación en los dientes humanos.

En histología dental general y humana en particular, se considera que el epitelio radicular de Hertwig, originado a partir del asa cervical del órgano dentario, dirige la formación de la raíz, determinando su número, forma y tamaño. Este es un conocimiento básico de la histología y en lo que hace en referencia a la diferenciación de los odontoblastos, a partir de células papilares periféricas, para formar la dentina radicular parece ser un hecho bien fundamentado (Thomas y Collar, 1988).

Sin embargo, la contribución de la vaina radicular epitelial en la cementogénesis temprana, en particular en la diferenciación de los primeros cementoblastos, no es solo una cuestión más

problemática sino también más especulativa y no definitivamente aclarada (Ten Cate, 1996).

"La formación del cemento en el diente durante su desarrollo es precedida por la deposición de dentina a lo largo de la vertiente interna de la vaina de Hertwig. Una vez iniciada la formación de la dentina, la resorción de la vaina radicular permite a la dentina recién formada establecer contacto directo con el tejido conjuntivo del folículo dental. Las células que derivan de este tejido conjuntivo son las responsables de la formación del cemento" (Baskar, 1991). Los párrafos anteriores del clásico el texto de Orban actualizado por Baskar en 1991, acompañadas de una imagen del trabajo clásico de Gottlieb (1942), son el resumen de la opinión más generalizada sobre la cementogénesis.

Más recientemente Dieckwisch, en su excelente publicación de 2001, que incluye también una revisión de los preparados de la colección de Gottlieb, afirma: "nuestros estudios y la revisión de la literatura, confirmaron la teoría clásica de que el cemento es un derivado del tejido conjuntivo del folículo dental, que se forma tras la desintegración del epitelio radicular" (Dieckwisch, 2001).

2

En contraposición una segunda interpretación propone para la cementogénesis que deriva a partir de las células epiteliales radiculares (Stahl y Slavkin, 1972; Slavkin, 1976). Los estudios morfológicos ultraestructurales de dientes de roedores realizados por el grupo de Thomas (Thomas y Kollar, 1988; MacNeil y Thomas, 1993), así como los del grupo de Bosshardt sobre dientes humanos, de roedores y porcinos (Bosshardt, 1993, 1998, 2003 y 2004) se ha sugerido que las células productoras del cemento podrían originarse a partir de células del epitelio radicular mediante transformación epitelio-mesenquimal.

Esta transformación epitelio-mesenquimal tendría lugar de una manera gradual en roedores y cerdos. En humanos lo único que afirma Bosshardt, se evidencia en cuanto a las células relacionadas con la formación de cemento es un exclusivo fenotipo mesenquimal. Sin que se evidencie relación directa con el epitelio (Bosshardt, 1998)

Sin embargo aunque esta suposición fuera cierta, permanece sin aclarar de donde se originan los primeros precementoblastos (Bosshardt y Schroeder, 1996). En humanos no existen estudios convincentes que puedan inequívocamente confirmar el origen de estas células (Bosshardt y Schroeder, 1996; Ten Cate, 1996; Garant, 2003).

1.1. Los dientes en la Antigüedad y Renacimiento

El conocimiento de la estructura de los dientes, la caracterización de sus componentes, su origen y formación, han sido temas de interés para los científicos en todos los tiempos. En la Ciencia Antigua, con su carácter esencialista y deductivo, encontramos numerosas evidencias demostrativas. Así en los textos hipocráticos hay abundantes referencias relacionadas con los dientes, hasta el punto de dedicarles específicamente uno de sus tratados, el titulado "*De dentitione*" (sobre la dentición, sobre la erupción dentaria), redactado en forma de sentencias cortas o aforismos, destacando los accidentes o trastornos que con frecuencia acompañan a la erupción de los primeros dientes (Guerini, 1909).

En "*De structura hominis*", se expone el planteamiento fisiológico-estructural hipocrático del organismo humano, basado en los cuatro humores cardinales (sangre, pituita, bilis amarilla y bilis negra), a su vez fundamentados en los cuatro elementos de

Empedocles (tierra, agua, aire, fuego) y sus cualidades (calido, seco, húmedo y frío). La visión humoral del organismo, posee grandes posibilidades para la interpretación fisiológica normal (eucrasia) o los estados patológicos (discrasias), pero menos para los análisis estructurales. En "*De carnibus*", se indica de forma precisa que los dientes, junto con las muelas, son treinta y dos. Evidentemente es el número de dientes de la dentición humana permanente, pero existe una dentición primaria caduca previa, bien conocida por los autores hipocráticos, cuyo número de dientes no se indica. Conocían que los dientes inician su formación intrauterino, cuando el individuo, el embrión, aún está en el seno materno. Así en el tratado "*De carnibus*", se afirma: los primeros dientes (formados intrauterino) crecen por la alimentación de leche materna (derivando de ahí la denominación de dientes de leche, que aún perdura en el presente) pero los dientes que se forman después que estos primeros se pierden, lo hacen de los alimentos, es decir de la comida y de la bebida. En cuanto a su estructura, en el texto se considera a los dientes como grasa endurecida, y su formación se describe iniciada desde una producción gelatinosa de los huesos de la cara (maxilares) y de las mandíbulas, cuyo componente graso es secado por calor y abrasado en su parte superior, haciéndose la indicación de que los dientes se hacen mas duros que los demás huesos porque no hay nada frío en ellos (Nasmyth, 1839).

Hemos señalado que no se menciona el número de dientes de la primera dentición. Esta indeterminación, como ocurre con otros detalles anatómicos, muy posiblemente se relaciona con la falta de estudios basados en la disección de cadáveres, y principalmente obtenidos en la observación de animales. En el libro de Epidemias, en la descripción, al parecer, de una estomatitis

ulcerosa, se utiliza una nomenclatura dental técnica muy precisa, basándose en un ordenamiento numérico por cuadrantes, semejante a la utilizada habitualmente en la actualidad. Es un sistema numeral cuyo ordenamiento comienza a partir del incisivo lateral considerándolo el diente primero y nominando al incisivo central como "el anterior" (*euprosthioi*) sin incluirlo en la numeración. De esta forma el diente segundo es el canino, los señalados como terceros y cuartos son los premolares, y los quintos, sextos y séptimos, los molares. El tercer molar además de ser denominado "el séptimo" (*septimus = hébdomos*), en otra parte del texto es denominado como diente de la sapiencia (*odóntes sophronistéres*). Nuestra denominación de muela del juicio es sin duda una derivación de aquella. Al parecer incide en la nomenclatura un deseo de ligarla al número siete. Y en el texto se indica que los dientes que primero aparecen caen a los siete años y los dientes que se originan luego, lo hacen entre los siete y catorce años, y en el cuarto periodo de siete años (*hébdomad*) a muchas personas les aparecen los dientes de la sapiencia. Esta preferencia por el siete, también se observa en otros textos Hipocráticos y es posible que sean herencia Babilónica, donde era número mágico, como también lo era en la antigua China.

La otra fuente importante de datos sobre estructura dentaria en la antigüedad son la obras de Aristóteles, autor que prestó notable atención a los dientes, tanto humanos como del mundo animal. Aristóteles también admite, como los médicos hipocráticos, los humores cardinales: sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra, así como sus cualidades (seco, húmedo, frío y cálido) para explicar la estructura orgánica, fundamentado todo ello en los cuatro componentes substanciales del mundo o elementos de Empédocles (Ustrell, 2000). Pero al leer sus tratados, se tiene la

impresión de que rehuye definirse sobre la naturaleza de los dientes. En el tratado de las partes, Aristóteles define los criterios que permiten clasificar las estructuras que componen el organismo. Su concepto de parte similar o parte homogénea (aquella cuyas porciones son iguales en todo), tiene vigencia en la actualidad y se ve reflejada en nuestros conceptos tisulares. En general, no tuvo dificultad para clasificar las partes simples del organismo. Así, como partes homogéneas, blandas y húmedas, consideró a la sangre, la grasa, la carne, y todas las partes análogas a estas; y como partes homogéneas, secas y duras, al cartílago, el tendón, el hueso, la uña, el pelo, etc.

Respecto a los dientes sus aportaciones quedan, en la mayoría de las ocasiones, como meras cuestiones enumerativas de las partes del organismo. Definió y caracterizó con minuciosos detalles al hueso como parte homogénea, señalando que todos los huesos dependen de uno solo y constituyen un sistema continuo, como las venas, no existiendo ningún hueso aislado de los otros, señalándolo además como punto de partida lo forma la columna vertebral. Para Aristóteles, los huesos surgen de un principio único y ningún hueso existe por si mismo, sino que "o bien es como parte de un continuo o bien está en contacto y ligado a este continuo, para que la naturaleza se sirva de él tanto como de un hueso único, tanto como de dos y divididos para facilitar la flexión".

Los dientes, evidentemente no son parte del sistema continuo del esqueleto, y por ello cuando obligadamente debe definirse, los señala como huesos, pero añadiendo su carácter de huesos especiales, únicos, porque no pueden ser cincelados y también porque están en parte llenos y en parte vacíos. Así en los textos hipocráticos, los dientes unas veces son de naturaleza ósea y otras no lo son. Se justifica su naturaleza ósea por generarse en

el interior de los huesos maxilares; pero haciendo constar su carácter secundario, pues se producen cuando las mandíbulas están formadas; e indicando que deben ser renovados, porque se originan cuando el cuerpo ya está conformado.

En cuanto a la formación de los dientes, Aristóteles considera que se forman a partir de los huesos: en cambio las uñas, los pelos y cosas semejantes provienen de la piel. Pero indica que los dientes no tienen la misma naturaleza del hueso, porque los huesos aparecen todos en el primer estadio de la formación y ninguno después, mientras que los dientes aparecen mas tarde. Por eso también, después de haberse perdido los primeros dientes, pueden crecer unos nuevos, porque los dientes están en contacto con los huesos pero no están unidos en una pieza con ellos. El argumento que posiblemente le resultó más convincente para señalar que los dientes siguen la naturaleza del hueso es porque en los negros, como los etíopes y otros parecidos a ellos, los dientes son blancos, como el hueso, mientras que las uñas son negras como lo es precisamente la piel.

Tras Aristóteles, existe un enlentecimiento en la adquisición de nuevos conocimientos relacionados con la estructura de los dientes que perdura hasta el Renacimiento. Solo en las obras de Galeno, producidas quinientos años después de las de Aristóteles, encontramos algún detalle de interés. Claudio Galeno (Pérgamo, Asia Menor, 131-216), médico con una amplia formación filosófica y matemática, desarrollo una gran actividad como escritor. Sus obras en conjunto forma una enciclopedia del saber médico de su época. Particularmente dedicó gran atención al conocimiento morfológico del cuerpo humano, considerándose su obra como una compilación del saber anatómico griego, al que Galeno añadió sus propias observaciones que le acreditan como gran anatómico. No

disecó cuerpos humanos, sus observaciones se fundamentan en el estudio de animales, por lo que introdujo algunos errores que perduraron hasta los siglos XVI y XVII. Referido a los dientes, sigue a Aristóteles, considerando a los dientes como huesos, pero como novedad, fue el primer autor que habló de la inervación dentaria. Galeno consideraba tres tipos de nervios: blandos, sensitivos, originados del cerebro; duros, motores, originados de la médula espinal; y nervios intermedios sensitivo-motores, originados de la médula oblonga. Los nervios rodeando a los dientes los describe como nervios blandos, de carácter sensitivo, derivados del tercer par (diferenciaba siete pares craneales y su tercer par corresponde al trigémino). El diente para este autor, está rodeado de nervios, por ser necesario para evitar ser lesionado o destruido y porque los dientes, con la lengua y otras partes de la boca, están destinados para la percepción de los sabores.

El Renacimiento, en principio un movimiento que intentó resucitar los valores culturales de la antigüedad, pronto resultó un cambio reactivo en relación con los criterios teológicos y autoritarios que imperaron en la Edad Media, produciéndose un descubrimiento del hombre y el mundo, así como la manifestación de un individualismo libre y crítico. En relación con los planteamientos científicos significó la transición entre la ciencia antigua, fundamentada en criterios esencialistas y deductivos, hacia los modernos postulados de la ciencia moderna, que de manera progresiva va siendo transformada en notativa e inductiva. No es un cambio brusco, sino un cambio gradualmente desarrollado. Los científicos dejan de manejar verdades incontestables, para establecer teorías explicativas de la realidad. Cuando una teoría explica los datos acumulados, es una teoría verificable. La adquisición de datos cobra protagonismo.

El estudio anatómico del organismo humano fue tema principal de investigación en el inicio de la Edad Moderna. Recordemos que la anatomía humana hipocrática, compendiada magistralmente por Galeno, no se basaba en la disección de material humano, sino en el estudio de animales. Los nuevos tiempos significaron un cambio radical: los anatómicos estudiaron con intensidad la morfología del organismo humano con la disección minuciosa de cadáveres. Sin duda el autor inicialmente mas destacado fue Andreas Vesalio, cuyo libro "*De humani corporis fabrica*" (1543) significa la descripción de la realidad indiscutible de la morfología del cuerpo humano, y la corrección de los errores anteriores acumulados por su inadecuada obtención. Sin embargo no estuvo acertado Vesalio en las cuestiones odontológicas y si bien indicó la cavitación de los dientes humanos, lo cual era una cierta novedad, consideró que los dientes de reposición se formaban a partir de las raíces de los dientes primarios.

En contraposición, y siguiendo una trayectoria semejante a la de Vesalio, pero con particular acierto en relación a los dientes humanos, fueron muy importantes las investigaciones de Falopio y de Eustaquio; que se realizan casi al mismo tiempo, se confirman y mutuamente se complementan. Falopio, en 1562, precisamente en el año de su muerte, publicó en Venecia las "*Observationes anatomicae*", señalando la falsedad de la opinión de Vesalio al indicar la formación de los dientes de reposición a partir de las raíces de los dientes primarios. Falopio es el primer autor que explícitamente habla de folículo dentario, es decir de la estructura situada internamente en los maxilares que rodea al diente antes de su erupción (saco dentario y su contenido). De manera paciente

y meticulosa estudió la odontogénesis, evidenciando el desarrollo de los primeros dientes en sus comienzos intrauterino, después de la formación de los maxilares, y de los secundarios, que aparecen cuando los primeros se pierden, después de los siete años. Falopio indica que los dientes al nacimiento, todavía son imperfectos, sin raíces, completamente encerrados en los alveolos y formados por dos sustancias distintas, una ósea y hueca, otra interna blanda y húmeda. La primera significa la corona y la segunda la futura raíz que progresivamente se irá endureciendo hasta constituir la porción radicular del diente. De esta manera Falopio marca el inicio de las investigaciones sobre la formación de los dientes, que dejan de ser huesos como había sido indicado por tantos autores.

También Falopio destaca por ser el autor que tempranamente junto a Fernel, consideró que el humor, un sustancia fluida, no puede concebirse como el elemento biológico fundamental en la constitución del organismo. También afirma que la evidencia derivada de una sistemática y minuciosa disección del cuerpo humano, demuestra que ligamentos, músculos, nervios y estromas viscerales están compuestos en último extremo por estructuras filamentosas, por finas fibras, pareciendo todo indicar que las fibras son las unidades básicas elementales de la materia orgánica. Pero la "fibra" de Fernel y de Falopio, es decir el "elemento fibra", no es un hilo visible, por fino que éste pueda parecer; es un elemental hilo concebido mas por la razón que por los sentidos. Es un hilo de materia que ya no puede descomponerse en otros mas sutiles y cuya agrupación longitudinal, es la que da lugar a los filamentos, es decir a las finas fibrillas que se consiguen visualizar por la minuciosa y extremada disección del organismo. Tres formas de organización de estas fibras elementales son básicamente concebibles: la longitudinal,

que origina fibras visibles y cordones; la bidimensional, organizadas como los hilos de urdimbre enlazados con la trama, que origina "tejidos" (*texturae*); y la tridimensional originando las masas sólidas. En este sentido, Falopio es el creador de la noción de tejido, entendido este en el más directo y textil sentido de la palabra.

Recogiendo las investigaciones de Falopio, sobre los dientes y su formación, Eustaquio publica en Venecia un libro titulado "*Libellus de dentibus*" en 1573, el primer tratado escrito sobre la anatomía de los dientes, representando además un gran adelanto en esta línea de investigación. En los trece capítulos del libro, se trata la anatomía, la fisiología y el desarrollo de los dientes de una forma admirable. Eustaquio no solo indica lo escrito por los autores anteriores, sino también lo que en sus pacientes observaciones e investigaciones ha descubierto en humanos y animales, tanto en sujetos adultos como en niños de diversas edades, en recién nacidos y en fetos abortivos. Completa los caracteres del ligamento peridentario descrito por Falopio, y señala la presencia de una segunda sustancia a nivel de la corona dentaria. Es decir, es el primer autor que indica la existencia del esmalte. Describe que los fetos a término, enterrados en cada mandíbula presentan dos incisivos, un canino y tres molares, en parte óseos y en parte mucosos, bastante grandes para ocupar el alveolo correspondiente. Cuando cuidadosamente elimina los incisivos y caninos, observa debajo de estos igual número de incisivos y caninos mucosos de menor tamaño, encerrados en alveolos mucho más pequeños, pero correspondiéndose en posición con sus congéneres. Respecto a los molares, describe tres en cada lado pero no encuentra otros. Indica, que aunque no tenga toda la

certeza visual, es muy probable que tanto los dientes temporales como los permanentes se originen durante la vida fetal.

1.2. Estructura microscópica de los dientes

La invención del microscopio por Zacarias Jansen, según los holandeses, o por Galileo, según los italianos, probablemente se realizó en la transición de los siglos XVI-XVII, significando un gran avance para las ciencias morfológicas conceptualmente fundamentadas en la teoría fibrilar. El microscopio hizo posible la observación de detalles estructurales hasta entonces invisibles por examen visual directo, produciéndose pronto grandes descubrimientos con su utilización.

Así Marcelo Malpigio, considerado el fundador de la anatomía microscópica, estudió e hizo notables descubrimientos en animales y plantas. Numerosas estructuras histológicas las conocemos aún hoy unidas a su nombre. En relación con la estructura dentaria, Malpigio confirmó la existencia de los dos componentes mineralizados, esmalte y hueso dentario o marfil, comparándolos respectivamente con la corteza y la medula de las plantas. En su "*Anatome Plantarum*" describió a la parte interna, al marfil como un hueso laminado formado por filamentos fibrosos y tendinosos estructurados en una especie de red (Nasmyth, 1839), y también en esta misma obra describió y dibujó al esmalte como una sustancia fibrilar, denominándola "*substantia ossea filamentosa*" y también "*crusta candida filamentosa*", indicando que el esmalte termina en la raíz. A nivel de la raíz de los dientes señaló la existencia de una corteza superficial, la cual consideró que se trataba de un depósito tártrico compuesto de filamentos (Henle, 1843). Muy posiblemente su apreciación fue la correcta,

pero por desgracia no profundizó en su observación que posiblemente le hubiera llevado a descubrir el cemento, lo cual habría anticipado el descubrimiento del cemento dentario casi dos siglos.

La interpretación estructural fibrilar del esmalte y del hueso dentario de Malpigio, en consonancia con la Teoría Fibrilar de Fernel y Falopio, la encontramos reflejada prácticamente en todas las descripciones de los autores que estudiaron los dientes al microscopio durante los siglos XVII y XVIII. Pero en general no fueron estudios sistematizados que de manera progresiva detallaran, cada vez mejor, la estructura microscópica dentaria. Los microscopios eran instrumentos muy imperfectos. La mecánica micrométrica y la microtomía eran muy rudimentarias, los objetivos introducían en la observación importantes aberraciones cromáticas y esféricas. La iluminación presentaba grandes dificultades. Recordemos que Javier Bichat criticaba los estudios microscópicos citando a las reuniones de microscopistas como grupo de individuos que encerrados en una habitación a oscuras por donde penetra un rayo de luz, cada cual al mirar por el microscopio ve las cosas a su manera.

En contraste con los importantes avances que la microscopia aportó durante la época pre-celular al conocimiento estructural del esmalte, pocos autores describieron detalles importantes en relación con el marfil o dentina. Consideración aparte, sin embargo, merecen los estudios realizados por el gran genio de la microscopía van Leewehoeck (1632-1723), cuyos microscopios simples de gran potencia el mismo fabricaba. Este autor comunicó que el marfil de los dientes humanos presenta tubos rectos, transparentes y delgados, que tienen su origen en la

cavidad interna y se extienden hasta la periferia, con trayectoria serpenteante. Tubos cuyo diámetro es 600 o 700 veces menor que el de un cabello, así como la presencia de una fibrilla en el interior de cada uno de estos túbulos. Pero todo ello fue olvidado a lo largo de los siguientes ciento sesenta años.

En la segunda mitad del siglo XVIII, un extraño en el mundo de la odontología, el cirujano John Hunter, publicó el libro "The Natural History of the Teeth", resumiendo en él la totalidad de los conocimientos científicos odontológicos, de igual forma como Aristoteles lo había hecho en la antigüedad. Este tratado tuvo un gran significado, propiciando el gran desarrollo que la ciencia odontológica tuvo en el siglo XIX (Hoffmann-Axthelm, 1981).

En relación con la estructura, según Hunter, el diente está formado por dos componentes: esmalte y hueso, pues sometiendo el diente al fuego, separa el uno del otro, observando que el hueso se destruye más rápidamente. Indica que el esmalte, solo se observa en el cuerpo del diente y allí rodea al hueso o sustancia interna, la cual se prolonga formando la raíz o raíces. Considera el esmalte, formado por sustancia terrosa.

Para demostrar que esta desprovisto de sustancia orgánica, somete a animales a un régimen alimentario con el que consigue que los huesos en general y el marfil de los dientes se colorean de rojo, pero el esmalte permanece incoloro. En consecuencia concluye que los jugos nutritivos no penetran en el esmalte. En cuanto a la sustancia que compone la porción mas grande del diente, esta se comporta como la del hueso, aunque es mas dura y compacta.

1.3. El descubrimiento del cemento

Como ya hemos indicado, hasta el siglo XVIII, se consideraba a los dientes estructuralmente formados por marfil, o hueso dentario, cubierto de esmalte a nivel de la corona, pero se desconocía la existencia del cemento que cubre la raíz de los dientes, y existió una cierta controversia en relación con el descubrimiento de este tercer tejido mineralizado del diente. No cabe ninguna duda, pues existe evidencia documentada, que el cirujano Jacques Tenon en 1767 describió en los dientes del caballo, una tercera sustancia que designó como "cortical" o "cortical ósea" y que más tarde el gran naturalista francés Georges Cuvier denominó "cemento". Esta estructura asemeja una envoltura ósea, de color grisáceo, menos dura que el marfil, que cubre el esmalte de la corona como lo haría una corteza que lo revistiese y se replegase en sus recovecos.

Y también hay la prueba documental, que años después de Tenon, en 1783, el anatómico francés Exupere Joseph Bertin describe sobre las raíces de los dientes humanos la existencia de la misma cortical ósea, interpretando que esta cubierta radicular es esmalte que tras recubrir la corona se prolonga sobre la raíz, error que se extendió entre anatómicos de gran prestigio, como se refleja en el siguiente fragmento tomado de la anatomía médica de Antonio Portal: "los dientes se componen de dos sustancias diferentes; a saber, la esmaltada y la huesosa (esmalte y marfil). La esmaltada es conocida por todos los anatómicos, y nadie ignora que se da este nombre a la sustancia blanquecina, que se ve en la superficie exterior del diente. La sustancia externa, dice Bertin, es una corteza o capa que reviste enteramente el diente, desde la extremidad de la raíz hasta la corona inclusive; pero Winslow ha

observado que el esmalte del diente es mucho mas espeso en su cuerpo que en las raíces. Sin embargo todas las elevaciones que se ven sobre el cuerpo de los dientes son producidas por una sola sustancia esmaltada. Según Bertin el esmalte que reviste el cuerpo parece compuesto de tres especies de fibras radiadas, descritas ya por Winslow, paralelas y oblicuas; las del cuello al parecer son transversas. Para distinguir esta dirección particular de las fibras he puesto a macerar muchos dientes de jóvenes en ácido nítrico; dulcificado con agua, y las fibras se han hecho mas visibles; pero no he descubierto mas que dos capas, una compuesta de fibras circulares y otra longitudinales, y me ha parecido que solamente la primera era la que se prolongaba hasta las raíces" (Portal, 1806).

Es evidente, que la presencia de un tercer tejido, diferente del esmalte y del marfil, en la estructuración de los dientes, fue indicado por Tenon en 1767; y también que se tenía conocimiento de la existencia de un tejido mineralizado cubriendo a la dentina radicular. Pero la demostración microscópica del cemento radicular de los dientes humanos fue realizada en 1835, en la lectura de las tesis de Fraenkel y Raschkow, dos discípulos del gran histólogo y embriólogo checo Purkinje, entonces catedrático de fisiología en Praga, y por Retzius en 1836 (Nasmyth, 1839; Denton, 1939).

Cuando hacemos referencia a la Teoría Celular, se citan con todo merecimiento los nombres de Schleiden (1836) en relación con el mundo vegetal y de Schwann (1837) en relación con el animal, pero se silencian otros que en gran medida propiciaron sus planteamientos. Entre estos gigantes de la ciencia histológica pre-celular, están el ya citado Jan Evangelista Purkinje, junto con Johannes Müller, Catedrático de fisiología en Berlin y Jacob Henle, Catedrático de anatomía de Zurich. Pero Purkinje fue quien en

relación con la histología dental tuvo mayor importancia, porque su invención del micrótopo, para obtener secciones micrométricas de los tejidos blandos y de las técnicas de cortes por desgaste, para la obtención de cortes transparentes de tejidos mineralizados, significó un avance decisivo. Con Purkinje quedó establecido que en la estructura de los dientes, en sus variadas formas, tres sustancias entran en su composición: marfil, esmalte y cemento.

Así, cuando en 1841 Jacob Henle publica el primer gran tratado de histología humana, de acuerdo con las premisas de la teoría celular planteada por Schleiden y Schwann, tratado que afortunadamente para nuestra histología casi de inmediato se publicó traducido al español, señala: "Purkinje presume que la capa cortical de la raíz debe su origen a la osificación del folículo" (Henle, 1843), y al describir la formación de la raíz y con ella el cemento de los dientes humanos, con precisión indica: "las raíces no principian a desarrollarse hasta la época del nacimiento, cuando está ya terminada la formación de la corona. La pulpa dentaria y el folículo se prolongan hacia el fondo del alveolo; y esta porción de la pulpa se osifica entonces de dentro afuera, aplicándose a su superficie el folículo, que al osificarse se convierte en capa de cemento" (Henle, 1843).

En 1874, Oscar Hertwig publicó sus investigaciones en relación con la odontogénesis en ciertos anfibios y su relación con el desarrollo del cráneo. En su extenso y minucioso trabajo, Hertwig describe la relación existente entre la prolongación del epitelio del órgano del esmalte y la superficie en formación de la raíz dentaria, proponiendo que para esta prolongación, que ya no forma esmalte, se aplique la denominación de vaina radicular epitelial (Hertwig, 1874).

La denominación de vaina epitelial de la raíz dentaria, "*Epithelscheide der Zahnwurzel*", con sus variantes vaina epitelial, vaina radicular, o vaina radicular epitelial, fue utilizada, y ampliamente difundida por Albert von Brunn. Sus trabajos sobre la formación de la raíz dentaria, realizados en diversos mamíferos, fundamentalmente en roedores, tuvieron una gran repercusión (von Brunn 1887, 1891), aceptándose prácticamente de manera unánime su interpretación de los datos histológicos. Este autor indicó que sus investigaciones le habían conducido al convencimiento de que el epitelio interno de la vaina radicular, prolongación del órgano del esmalte es el responsable de inducir la formación de dentina radicular, por transformación de las células papilares relacionadas con dicha vaina en odontoblastos, y que cuando no existe vaina epitelial no hay odontoblastos ni formación de dentina.

Su razonamiento fue prácticamente admitido de manera universal por la comunidad científica, pues parece no encerrar ninguna posibilidad de error. Dejando aparte la formación del esmalte, para simplificar el análisis de la odontogénesis, es evidente que la formación de la sustancia propia del diente, es decir la dentina, se inicia con la formación de la dentina coronaria, producida por odontoblastos originados de células papilares situadas frente a las células del epitelio interno del órgano del esmalte.

Al finalizar la formación de la dentina coronaria el proceso se continúa con la formación de dentina radicular producida por odontoblastos originados de células papilares situadas frente a las células del epitelio interno de la vaina radicular. Luego parece indiscutible que la dentina es inducida primeramente por las

células internas del órgano del esmalte y luego, cuando finaliza la formación de la corona, son las células internas del epitelio de la vaina radicular (pues esta no es otra cosa que la prolongación del órgano del esmalte), las responsables de inducir la diferenciación de los odontoblastos y de que se produzca la dentina radicular.

En opinión de von Brunn, el hecho de que sobre la dentina de la corona se produzca esmalte por secreción de las células internas del epitelio transformadas en ameloblastos, es una cuestión secundaria. La brillantez de la interpretación de von Brunn del significado de las estructuras que se evidencian en los estudios histológicos de la odontogénesis radicular, y en particular la extraordinaria importancia de la vaina radicular, condujeron a que el termino vaina epitelial se difundiera y se conozca en la actualidad como vaina de Hertwig, autor que propuso este termino para denominar a la prolongación del órgano del esmalte no productor de esmalte.

Las investigaciones de von Brunn y las comprobaciones que otros autores realizaron, condujeron a que el papel de la vaina radicular como director de la formación de la dentina radicular fuese universalmente admitido en el mundo científico y que actualmente continúe siéndolo. Pero, en su trabajo de 1891, von Brunn indica: "con gusto quise añadir a esta comunicación la vaina epitelial de los dientes humanos. Desgraciadamente no he tenido hasta ahora la oportunidad de examinar material humano suficientemente fresco. Los ápices de los dientes incisivos de leche de un niño de 1 año y 3/4, cuya cabeza había permanecido largo tiempo en alcohol no fueron adecuados para encontrar en los extremos apicales la presencia de una vaina epitelial, porque los detalles histológicos a causa de la maceración no eran

reconocibles" (von Brunn, 1891). Hubiera sido lógico pensar que se subsanaría esta pequeña deficiencia. Pero ni von Brunn que falleció poco tiempo después en 1896, ni tampoco von Ebner, quien en su tratado de histología e histogénesis de los dientes incluye una representación gráfica de una raíz humana en formación, pudo comprobar la presencia de la vaina radicular en relación con la superficie de la dentina radicular en formación de los dientes humanos (von Ebner, 1909), pero "tanto von Brunn como von Ebner estaban convencidos de que la vaina radicular estaría en relación con la superficie en formación de la dentina radicular si hubiesen dispuesto de material humano en buenas condiciones" (Mummery, 1924).

Existe por tanto un total convencimiento de los histólogos. la raíz dental se forma por deposición de dentina en relación con la vaina radicular, la cual actúa físicamente como un molde, y la formación del cemento radicular se produce a partir de tejido folicular, cuando una vez formada la dentina de la raíz, desaparece la vaina radicular y las células del saco dentario producen cemento. A este respecto es interesante leer lo que el gran histólogo dental Charles Tomes indica cuando el siglo XIX está finalizando: "en esas criaturas que poseen cemento solo sobre la raíz de los dientes, los osteoblastos que se calcifican en cemento son proporcionados por el saco dentario. Se indica que la capa interna del saco dentario es responsable de la formación de cemento, y que la capa externa, conjuntamente con el tejido conectivo circundante, se convierten en periostio alveolo-dentario, pero yo no he podido ver todo esto en la práctica. En los dientes humanos las partes de la pared o saco folicular cesan de ser distinguibles diferentemente en un periodo comparativamente

temprano, y la importancia de esto no necesita descripciones detalladas" (Tomes, 1899).

1.4. Caracteres generales del cemento

En los dientes humanos, el cemento forma una delgada capa de tejido mineralizado cubriendo las raíces de los dientes, extendiéndose sobre la dentina radicular, y en ocasiones también algo sobre el esmalte en la región cervical. Es un tejido conjuntivo mineralizado, cuya dureza y estructura son semejantes a las del hueso, poseyendo ambos una composición química similares. Crece por aposición, formando capas, posee laminillas, y cuando presenta células, estas se alojan en lagunas. A diferencia del hueso, el cemento no posee vascularización ni inervación propia, y carece de capacidad remodelativa, siendo en general más resistente que el hueso a la resorción (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009; Nanci, 2006).

1.4.1. Componentes estructurales del cemento

Al igual que todos los tejido conjuntivos, el cemento posee un componente celular representado por cementoblastos y cementocitos, y una matriz extracelular, el cementoide.

Esta matriz esta constituida fundamentalmente por material colagénico, estructurado en fibras e inmerso en una sustancia rica en componentes no fibrilares tanto de tipo proteico como glucidico.

Y después de la deposición de la matriz orgánica se induce un proceso de mineralización de la misma, transformándose el cementoide en matriz de cemento.

1.4.1.1. Células del cemento

La celularidad del cemento es variable en función de su localización y periodo de formación. Son células del cemento:

a- Cementoblastos

Son las células formadoras el cemento, localizadas en su superficie externa, en relación con las fibras del ligamento peridentario y sus células fibroblásticas. Debido a esta topografía existe frecuentemente dificultades para distinguir, de manera precisa, a los fibroblastos de los cementoblastos. Su morfología activa característica es la de células cuboideas intensamente basófilas, siendo las inactivas aplanadas con núcleos de cromatina condensada.

En las raíces en desarrollo existe una capa de cementoblastos activos en toda su extensión, pero en los dientes con las raíces completamente formadas, habitualmente, solo se encuentran cementoblastos activos a partir de tercio medio o únicamente en el tercio apical, es decir en las zonas cementógenas donde hay deposición de cemento tras la erupción dentaria. Entre los cementoblastos activos y el cemento mineralizado, es habitual observar una delgada capa de sustancia cementoidea, cemento inmaduro o precemento, que representa la deposición más reciente de matriz orgánica donde aún no se han precipitado las sales minerales. Este cementoide posee carácter eosinófilo y asemeja estar atravesado por fibras del ligamento periodontal. La morfología ultraestructural de los cementoblastos es indicativa de su elevada actividad de síntesis. En los cementoblastos no se detecta actividad fosfatasa alcalina, a diferencia de la gran positividad que los osteoblastos presentan para esta enzima.

b- Cementocitos

Son células dotadas de finas y largas prolongaciones, incluidas en la matriz mineralizada del cemento. Concretamente están alojadas en cavidades denominadas lagunas o cementoplastos y de cuya superficie irradian conductillos calcóforos. Los cementocitos típicos presentan 10-20 prolongaciones citoplásmicas, que se extienden por los canalículos en todas direcciones, pudiendo ramificarse y también establecer contacto con las prolongaciones de células vecinas. La mayoría de las ramificaciones tienden a dirigirse hacia la superficie externa en dirección al ligamento periodontal, donde se localizan los vasos sanguíneos más próximos.

Los cementocitos en general poseen un núcleo pequeño picnótico y citoplasma acidófilo. Ultraestructuralmente se comprueba que presentan escaso desarrollo de orgánulos citoplásmicos. Son frecuentes las lagunas aparentemente vacías, próximas a la dentina, que se interpretan como zonas donde las células han degenerado completamente.

c- Cementoclastos

Son otras células que pueden encontrarse en relación con el cemento, y que son capaces de producir la resorción de tejidos mineralizados. Se localizan en la proximidad de la superficie cementaria externa y presentan caracteres comparables a los osteoclastos.

En condiciones normales estas células están ausentes, puesto que el cemento no se remodela. Sin embargo, aparecen en la resorción de los dientes deciduos, y también en patologías resortivas o en dientes con aplicación de fuerzas ortodóncicas excesivas.

c- Células epiteliales

En numero y disposición variable, aparecen pequeños islotes de células epiteliales inmersas en la superficie del cemento, incluso entre la matriz cementoide o de los fascículos del ligamento periodontal que en el se insertan. Clásicamente se consideran restos vestigiales de la vaina epitelial que rodea la raíz dentaria durante su proceso formativo. Se denominan Restos de Malassez.

1.4.1.2. Matriz extracelular

La matriz extracelular del cemento contiene aproximadamente un 50 % de componente inorgánico, presentado como cristales de hidroxiapatita de fosfato tricálcico, cuyos tamaños son menores que los de la dentina o del esmalte. La disposición de estos cristales de hidroxiapatita es similar a la del tejido óseo, alojándose tanto en el interior de las fibras colágenas, como entre ellas. Además hay también carbonatos de calcio y oligoelementos entre los que se detectan sodio, potasio, hierro, magnesio, azufre y fluor.

La matriz orgánica del cemento, significa el 20 %, estando formada por fibras de colágena y sustancia fundamental. Las fibras de colágena son principalmente de tipo I, constituyendo el 90% de la fracción proteica cementaria. Es habitual diferenciar dos tipos de fibras: intrínsecas y extrínsecas.

Las fibras intrínsecas son las formadas por los cementoblastos; las extrínsecas son haces de fibras del ligamento periodontal incorporadas al cemento, el cual se deposita alrededor de ellas. La sustancia fundamental la integran los complejos proteoglicanos, los glicosaminglicanos y las glicoproteínas, muy

similares a las del tejido óseo. El agua constituye el 30% residual del cemento.

1.4.2. Tipos de cemento

Las diferentes variedades de cemento son el resultado de un porcentaje variable de células y fibras en su organización histológica.

1.4.2.1. Cemento acelular o primario

Recibe esta denominación el primer cemento que se forma, iniciándose su formación antes de que el diente erupcione. Se produce lentamente, lo cual facilita que las células retrocedan a medida que secretan la matriz cementoidea, no quedando incluidas como cementocitos.

El cemento acelular o primario se presenta predominantemente en el tercio cervical, pero puede cubrir la raíz entera como una capa muy delgada, de unos 50 micrómetros adyacentes a la dentina. Principalmente consiste en haces de fibras altamente mineralizadas. En él predominan las fibras extrínsecas, asociadas a las fibras intrínsecas dispuestas entre ellas.

1.4.2.2. Cemento celular o secundario

Su formación se inicia cuando ya el diente entra en oclusión, siendo su velocidad formativa mayor que la del cemento primario; por ello, con frecuencia, algunos cementoblastos quedan incluidos en la matriz, transformándose en cementocitos. Esta característica justifica su denominación como cemento celular.

Se localiza, por lo general, a partir del tercio medio o apical de la raíz, donde suele ser el único tipo de cemento presente. El

cemento celular, posee una importante proporción de fibras intrínsecas. Su crecimiento continuo de manera aposicional sobre la superficie dentaria determina con frecuencia un carácter laminado, existiendo zonas más mineralizadas, las laminillas, así como líneas incrementales hipomineralizadas, quedando entre ambas los cementocitos. En la matriz extracelular del cemento celular se han identificado los proteoglicanos versican, decorina, biglican y lumican, compuestos no descritos en el cemento acelular.

1.4.2.3. Cemento acelular afibrilar

Como su denominación indica no contiene ni fibras ni cementocitos. Es el producto de la mineralización de una matriz orgánica que contiene colágena afibrilar elaborada y depositada por cementoblastos sobre la superficie del esmalte.

Se presenta con cierta frecuencia en los niveles cervicales donde el cemento se extiende sobre el esmalte. Se origina cuando ya ha concluido la maduración pre-eruptiva del esmalte, antes que el diente erupción ó durante la erupción, por la desaparición del epitelio reducido y permitiendo que células del saco dentario establezcan contacto directo con el esmalte superficial y depositen sobre el matriz afibrilar colagénica.

Los islotes y las proyecciones de cemento acelular afibrilar, son considerados en general como defectos del desarrollo. Su frecuencia incrementa en casos de erupción defectuosa o en los trastornos de la formación del esmalte (amelogénesis imperfecta).

1.4.2.4. Cemento intermedio

Se ha descrito repetidamente la presencia una capa intermedia de cemento en la superficie de las raíces situada entre la capa más superficial de la dentina radicular, la llamada capa

granular de Tomes y el cemento dentario. Esta delgada capa asemeja al esmalte aprismático que cubre la dentina del manto.

Habitualmente se describe como una capa amorfa de material no colagénico que no contiene ni procesos odontoblásticos ni cementocitos. Debido a su estrecha similitud de esta capa con el esmalte aprismático, se ha sugerido que el cemento intermedio es formado por las células de la vaina radicular epitelial. La capa se mineraliza algo más que la dentina adyacente o el cemento dentario. El cemento intermedio funciona probablemente para sellar la superficie de la sensible dentina radicular.

1.5. Cementogénesis

En los dientes en general y en los humanos en particular, el inicio de la cementogénesis se produce en relación con la formación de la raíz, y el comienzo de la rizogénesis dentaria se produce cuando casi ha finalizado la formación de la corona (Diamond y Appelbaum, 1944) y el diente aún se encuentra en el interior de los maxilares, sin haber comenzado su erupción. Del órgano dentario se origina el epitelio radicular de Hertwig, el cual prolifera y crece entre los tejidos papilar y folicular. La producción de dentina radicular por odontoblastos originados de células papilares periféricas cerca de la superficie interna del epitelio radicular, se considera que ocurre de forma similar a como se produce la formación de la dentina coronaria. Es decir, las células próximas al epitelio interno, se diferencian en odontoblastos y producen matriz de dentinaria, la cual pronto se mineraliza.

Pero así como en la corona el esmalte evidentemente se produce por ameloblastos, diferenciados de las células del epitelio interno del órgano dentario, que secretan matriz de esmalte depositándolo sobre la superficie dentinaria; en la formación de la

raíz el origen formativo del cemento y el papel del epitelio radicular en dicha formación son cuestiones problemáticas que actualmente carecen de respuestas satisfactorias (Slavkin, 1976; Thomas, 1995; Bosshardt y Schroeder, 1996; Bosshardt, 2005; Ten Cate, 1996).

La opinión clásica, y aún en la actualidad predominante, es considerar al cemento como un derivado folicular (Henle, 1843; Diekwisch, 2001; Garant, 2003), en consecuencia su formación solo es posible cuando el epitelio radicular permita el acceso de células foliculares a la superficie de la dentina (von Brunn, 1891; Gottlieb, 1942; Diekwisch, 2001).

Histológicamente, tres zonas son diferenciadas en el epitelio radicular: la zona del diafragma entre los tejidos papilar y folicular; la porción asociada con la superficie externa apical de la raíz en crecimiento o vaina propiamente dicha, ambas (diafragma y vaina propia) de carácter laminar, y por último la extensión coronaria de la vaina, habitualmente conocida como restos epiteliales de Malassez.

Todos los autores que se han ocupado del tema en sus investigaciones coinciden en describir el carácter laminar continuo del epitelio radicular en la zona del diafragma; y la mayoría considera que los restos epiteliales que en los cortes histológicos habituales aparecen como aisladas agrupaciones celulares, forman en conjunto una red anastomótica de cordones epiteliales; pero de la zona de la vaina propiamente dicha, es decir de la zona de epitelio radicular en relación con el extremo apical de la raíz en crecimiento, donde se forma la dentina radicular y sobre la que se inicia la formación del cemento, existe una gran variabilidad de descripciones.

A continuación describiremos cronológicamente las aportaciones más significativas en el estudio de la formación del cemento.

1.5.1 Henle y Mandl (1843)

Jacob Henle, refiriéndose al diente humano y expresando su acuerdo con Purkinje, señala que una vez finalizada la formación de la corona se inicia la formación de la raíz. La pulpa dental y el folículo se prolongan hasta el fondo del alveolo, la pulpa se osifica de dentro afuera, formando la dentina y a su superficie se aplica el folículo, que al osificarse se convierte en capa de cemento (Henle, 1843).

Al igual que Henle, Louis Mandl, también señala a la membrana interna del folículo dentario como formadora de la capa ósea que cubre a las raíces de los dientes. Indica que el desarrollo de la raíz se produce hacia el final de la vida fetal por el crecimiento del bulbo hacia el fondo, y que la erupción dentaria parece estar determinada por la presencia y crecimiento de las raíces (Mandl, 1843).

1.5.2. Hertwig (1874)

Para Oscar Hertwig, discípulo de Haeckel y profesor de la Universidad de Berlín, los dientes no son otra cosa que papilas cutáneas o mucosas osificadas, y el diente final, con sus tres tejidos calcificados, es el particular desarrollo de tres esbozos: del mesénquima de la papila dentaria se forma el marfil, de la membrana epitelial se forma el esmalte, y del tejido conjuntivo del

entorno mediante osificación directa tiene su procedencia el cemento (Hertwig, 1874).

En sus investigaciones sobre la formación de los dientes en diversos anfibios, Hertwig observó que la formación de la raíz dental se produce en relación con la prolongación epitelial del órgano del esmalte, para la que propuso para ella la denominación inespecífica de vaina epitelial dentaria, como ya habíamos comentado.

Hertwig indica que la formación de los dientes en los anfibios, como en todos los vertebrados, participan células del ectodermo y del mesodermo. Según este autor primeramente se forma una capa de células cilíndricas (membrana del esmalte), que depositan el esmalte, después una papila celular, producen dentina sobre la superficie de la anterior (capa odontoblástica).

El cemento en parte se forma tanto directamente como secreción de un esbozo celular (membrana cementaria), como por osificación del tejido conectivo que rodea al diente.

Al esquematizar el proceso formativo radicular (Figura 1), Hertwig indica que al finalizar la formación de la corona comienza la de la raíz y con ella la cementogénesis.

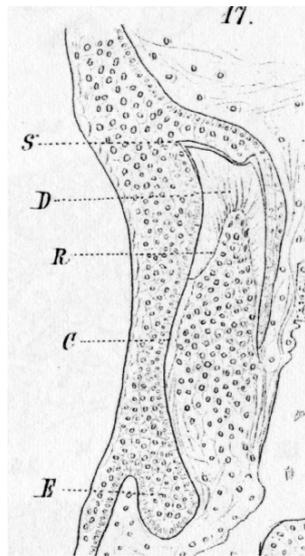


Figura 1

Esquema del proceso de formación de raíz dentaria según los trabajos de Hertwig

Según este autor, mediante un crecimiento hacia abajo de la vaina epitelial se alarga la raíz. Afirma también que en el lado interior de la vaina epitelial surge una capa delgada de una sustancia fundamental homogénea. La banda homogénea es el esbozo del cemento, al menos la superior, limitada también por la vaina epitelial dentaria. Las células fusiformes limitantes son los elementos, desde los cuales la secreción del cemento se efectúa como la de los osteoblastos.

Por tanto cuando Hertwig propuso el término de vaina radicular para nominar a la extensión de la membrana del esmalte, también describió que el esbozo del cemento mas temprano, lo observó en relación con la superficie interna de la vaina radicular, señalando la participación en la cementogénesis del tejido conjuntivo en relación con esta superficie interna.

1.5.3. von Brunn (1891)

En las investigaciones de von Brunn, la formación del cemento es una cuestión adicional, secundaria. Lo fundamental para este autor, fue el haber establecido que el epitelio del órgano dentario o del esmalte, es el responsable no solo de la iniciación del la dentinogénesis coronaria, sino también de la dentinogénesis radicular, porque el diente es fundamentalmente dentina (von Brunn, 1887 y 1891). Así indica: "esta investigación fue así diseñada para aumentar mi convicción de que cuando no existe vaina epitelial no hay odontoblastos ni dentinogénesis" (von Brunn, 1891).

Pero evidentemente la raíz del diente no solo se compone de dentina, pues también el cemento es un constituyente radicular dentario, y si el epitelio actúa como un molde para la formación de la dentina radicular, necesariamente debe liberar esa superficie para que el cemento se forme sobre ella. Así, von Brunn indica: "en la porción mas antigua de la raíz neoformada, el epitelio es sustituido (reemplazado) por tejido conectivo del saco dentario, que el marfil probablemente fija directamente sobre su superficie con sustancia interfibrilar cementante; sin embargo, en el borde más bajo la vaina epitelial se mantiene y crece rápidamente en forma de tubo sobre el extremo de la raíz; mientras siga la formación de odontoblastos y dentina, siempre se repite la atrofia de la porción superior del epitelio" (von Brunn 1891).

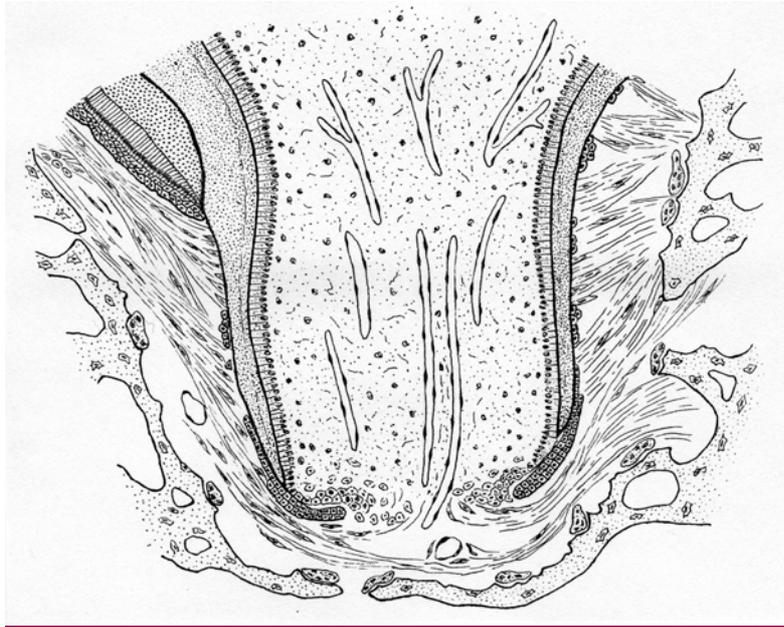


Figura 2

Esquema del proceso de formación de raíz dentaria según los trabajos de von Brunn

Así para von Brunn el epitelio es necesario para la formación de la dentina pero su atrofia y desaparición son esenciales para la formación del cemento. Una reproducción de la representación grafica que incluye en su publicación de 1887, se corresponde con nuestra figura 2. Sus estudios fueron realizados en diversos animales, principalmente roedores. Intentó comprobar sus observaciones en material humano, sin embargo según su propia indicación no pudo comprobar en el material de que dispuso la presencia del epitelio en relación con la raíz en formación.

1.5.4. von Ebner (1909 y 1922)

Victor von Ebner, profesor de Histología de Viena, al igual que von Brunn consideró al órgano del esmalte como determinante de la forma del diente entero, no solo de la corona sino también de las raíces. Como indica en su tratado de histología, en el capítulo del desarrollo de los tejidos dentarios, el órgano del esmalte no solamente comprende la parte superior formadora de esmalte, como se creía anteriormente, sino también una vaina compuesta por los epitelios adamantinos externo e interno, la cual se alarga cuando la dentina se desarrolla y forma enteramente la raíz o las raíces a excepción de una pequeña porción de la punta radicular compuesta solo por cemento (von Ebner, 1909, 1922).

Según este autor, la vaina epitelial no formadora de esmalte, después de que la dentina ha sido producida, es secundariamente atravesada y desalojada por el tejido conjuntivo del saco dentario, y entonces sustituida por la formación de cemento. Mediante este proceso, el avance de la vaina epitelial es lo primero y la diferenciación de los odontoblastos queda retardada detrás de los límites que envuelve la vaina epitelial (von Ebner, 1909, 1922).

En la cuarta edición de su tratado de histología de 1922 se añade un grabado no incluido en la tercera edición de 1909, donde se esquematizan los caracteres histológicos observados en el corte axial del extremo radicular aún abierto de un segundo molar superior de leche de un niño de dos años y medio. Es interesante señalar que en la leyenda del pie de este grabado, que reproducimos como figura 3, se indica que la superficie de la dentina de la raíz en crecimiento, está directamente relacionada con tejido "formador de cemento" y restos de la vaina epitelial ("Zementbildner und Reste der Epithelscheide"), continuados

apicalmente por la vaina epitelial. Sin embargo debemos destacar que no se diferencia de forma inequívoca lo que se describe como vaina ("Zementbildner") y lo que corresponde a los restos epiteliales, ni tampoco se observan signos indicativos o que sugieran su relación de los elementos del tejido conjuntivo.

Evidentemente en el preparado de von Ebner, a juzgar por su representación, están muy preservados los tejidos que lo integran, pero se detectan pocas evidencias de que la vaina epitelial después de que la dentina haya sido producida, sea "secundariamente atravesada y desalojada por el tejido conjuntivo del saco dentario y entonces sustituida por la formación de cemento".

Es muy posible que para von Ebner supuso un gran esfuerzo incorporar este extraordinario grabado de los caracteres histológicos de la formación de la raíz en un diente humano en crecimiento, sin existir en el texto una descripción detallada del mismo.

En el tratado de Histología de Mummery se indica que von Brunn no pudo encontrar la vaina en los dientes humanos y que los preparados de dientes humanos realizados por el profesor von Ebner también fallaron en revelarlo (Mummery, 1924).

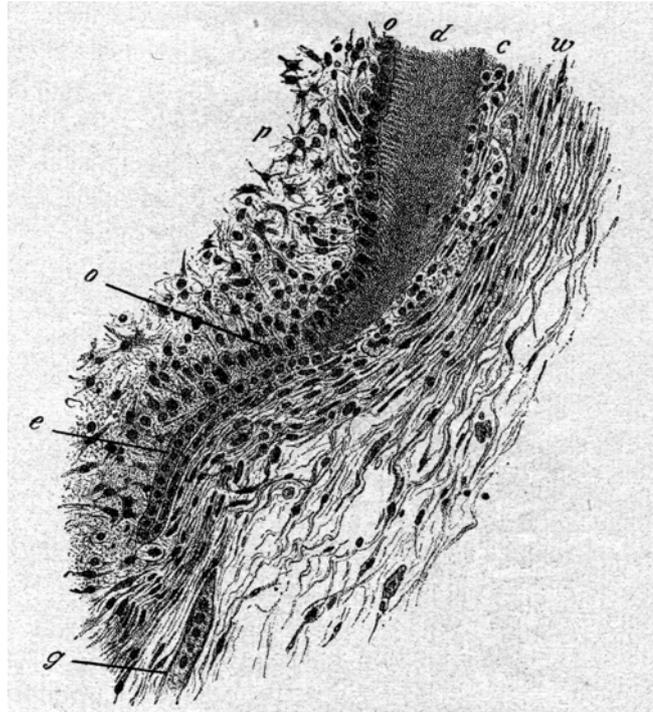


Figura 3

Esquema del proceso de formación de raíz dentaria según los trabajos de von Ebner

1.5.5. Mummery (1924)

Según Mummery, en los dientes humanos jóvenes con raíces formándose, la vaina de Hertwig se observa al lado de la raíz paralela a su superficie pero no en el contacto con ella. Es una banda más o menos continua, frecuentemente ordenada como una red (clara, perceptible, definida, inequívoca), tanto que el diente en esta etapa está encerrado en una red epitelial de mallas abiertas. La vaina acompaña a la raíz en formación, y como en la porción apical se acerca más estrechamente a la dentina; la

disposición en red no es vista, pero presenta dos capas de células epiteliales en mutuo contacto (Mummery, 1924).

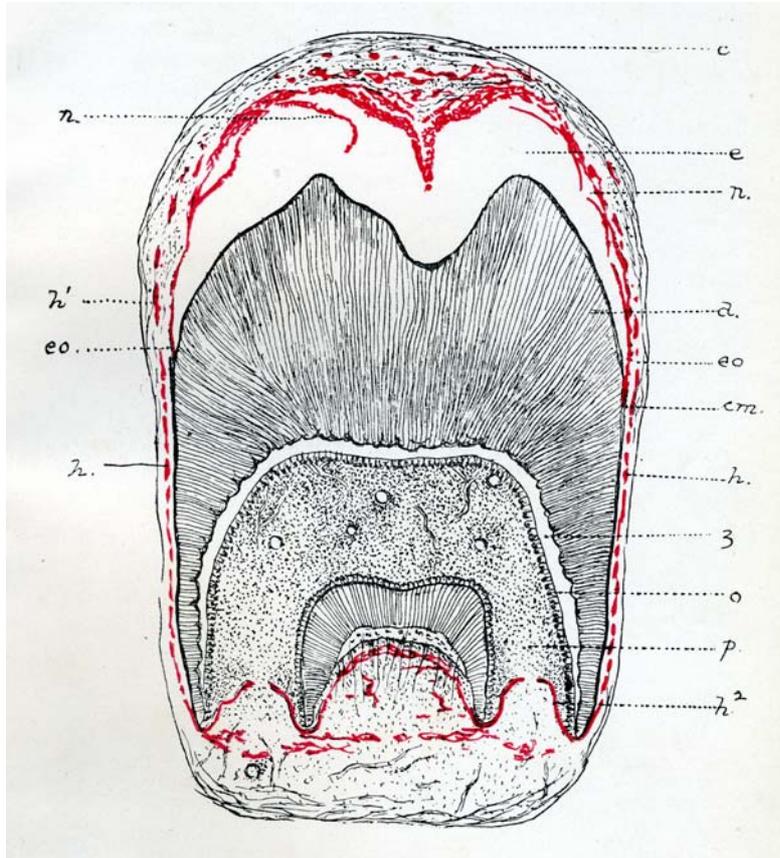


Figura 4

Esquema del proceso de formación de raíz dentaria según los trabajos de Mummery

1.5.6. Gottlieb (1942)

En 1942 Bernhard Gottlieb publicó un trabajo con el título de Biología del Cemento, indicando en el que para comprender correctamente la importancia del cemento en la fijación del diente, debemos reconsiderar algunos hechos embriológicos. La dentina

radicular es depositada sobre la vaina epitelial de Hertwig. Esta capa epitelial separa a la dentina del tejido conectivo circundante. Si ésta fuera disposición final, la raíz terminada estaría cubierta por una capa continua del epitelio y la pulpa en el agujero apical sería la única conexión con el tejido conectivo del cuerpo seria con la pulpa en el agujero apical. Pero afortunadamente, la capa epitelial se separa muy pronto de la superficie de la dentina. El tejido conectivo aparece entre el epitelio y la dentina y comienza a depositarse el cemento.

En el tratado de Histología y Embriología Oral de Balint Orban, publicado en 1944, de cuyo capítulo dedicado al cemento es autor Emmmerich Kotanyi (profesor de la Escuela Dental de la Loyola University de New Orleans, y también como Orban discípulo de Gottlieb), desarrolla detalladamente las conclusiones de Gottlieb. Así utilizando como evidencia una microfotografía de este autor, relacionándola con la publicación anteriormente citada, describen la cementogénesis indicando: la vaina epitelial radicular de Hertwig, que es de particular importancia en el desarrollo de la raíz, forma el molde en el cual se deposita la dentina radicular. Por lo tanto, la nueva dentina formada, en esta región, está cubierta primeramente por el epitelio, y está separada por él del tejido conectivo circundante.

El cemento es formado por este tejido conectivo pero no puede ser depositado en la superficie externa de la dentina radicular mientras la vaina epitelial lo separa de la dentina. Un contacto entre el tejido conectivo y el diente se logra por la invasión de tejido conectivo a través de las capas epiteliales. Por este proceso la vaina epitelial pierde su continuidad pero persiste como una red de cordones epiteliales que se sitúa a corta distancia de la superficie radicular.

Los remanentes de la vaina epitelial son denominados "restos epiteliales" de Malassez. Cuando se ha logrado la separación del epitelio de la superficie de la dentina radicular, el tejido periodontal establece contacto con la superficie radicular y se deposita el cemento. En el primer estadio de la formación del cemento dos elementos tisulares pueden observarse. Primero, células del tejido conectivo (fibroblastos) que se agrupan en una sola capa a lo largo de la superficie externa de la dentina. Estas cambian de plana en células cuboidales y son los cementoblastos. Al mismo tiempo el segundo elemento tisular, fibras de pre-colágena (argirofilas), pueden ser observadas perpendiculares a la superficie y adosarse a la superficie externa de la dentina. Estas fibras pronto asumen un carácter colagénico y se convierten en una parte de la matriz del cemento (Kotanyi, 1944).

1.5.7. Schour (1944)

Isaac Schour en colaboración con Maury Massler, en el tratado de Orban indican que la diferenciación de los odontoblastos y la formación de la dentina se producen de manera inmediata al alargamiento del epitelio radicular. Y al mismo tiempo, según estos mismos autores, el tejido conjuntivo folicular prolifera y rompe la continuidad del epitelio radicular transformándola en una red cordonal. Las células conjuntivas se transforman en cementoblastos y se inicia el primer depósito de cemento. El hecho de que no se pueda demostrar lo atribuyen a la rapidez con la que ocurren los hechos. Se ilustran estas ideas en la figura 5 que reproduce sus esquemas.

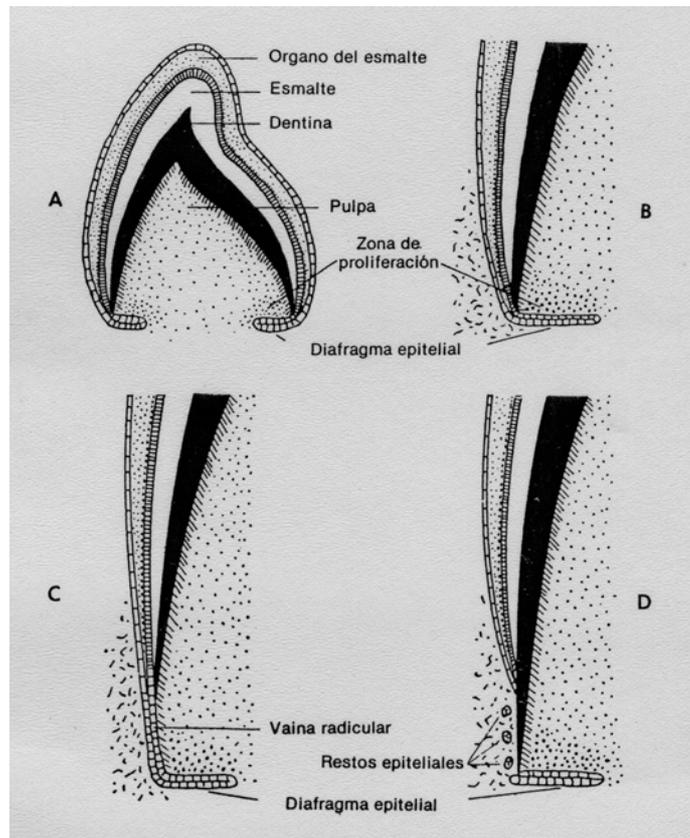


Figura 5

Esquema del proceso de formación de raíz dentaria según los trabajos de Schour y Massler

1.5.8. Bosshardt y Schroeder (1991-2008)

Los caracteres microscópicos y ultraestructurales del inicio de la cementogénesis radicular humana ha sido particularmente estudiado por el grupo de investigadores encabezado por los profesores Schroeder y Bosshardt, utilizando dientes bicuspideos procedentes de pacientes jóvenes sometidos a tratamientos ortodóncicos (Bosshardt y Schroeder 1991, 1992, 1996; Bosshardt et al, 1998). Estos autores dedican mucha atención a los

caracteres que acompañan a la formación inicial de los cementos acelular de fibras extrínsecas y celular de fibras intrínsecas, pero mucho menor al epitelio radicular. A nuestro juicio, el dato más importante aportado es que en los dientes humanos aún en crecimiento, la cementogénesis inicial y la formación de la dentina radicular están íntimamente interrelacionadas. Puntualizando que durante la formación radicular, el adosamiento inicial de cualquier variedad de cemento en relación con matriz dentinaria recientemente depositada, ocurre muy próximo al extremo apical (Bosshardt y Schroeder, 1996).



Figura 6

Esquema del proceso de formación de raíz dentaria según los trabajos de Bosshardt

En relación con el epitelio radicular, de manera repetitiva y solo con ligeras variantes se indica: las células internas de HERS (Vaina radicular epitelial de Hertwig) cubren solo la superficie mas apical de la matriz de dentina recientemente depositada no mineralizada, mientras la capa celular externa se separa de la superficie mas apical y continua por una distancia variable en dirección coronaria (habitualmente unos 100 micrometros). Una membrana basal rodea las capas interna y externa de HERS (Bosshardt y Schroeder 1991, 1992, 1996; Bosshardt et al 1998).

En nuestra opinión, es sorprendente que un epitelio biestratificado con una membrana basal en sus superficies interna y externa, pueda transformarse normalmente en un epitelio monoestratificado, formado únicamente por la continuación de la capa externa, la cual solo presenta en su superficie externa una membrana basal. Estos autores continúan su descripción indicando: "coronal a la intacta capa celular interna de HERS, el espacio entre la superficie de la dentina y la capa interna de HERS esta ocupada con células basófilas alargadas teñidas intensamente. Estas parecen fibroblastos manifiestan un retículo endoplásmico rugoso, y están conectadas unas a otras por uniones parecidas a desmosomas. Inmediatamente coronal a la terminación de las células epiteliales internas de HERS. Lo cual ocurre solo a 10-39 micrometros de ARE (Extremo de avance radicular), estas células parecidas a fibroblastos primeramente proyectan numerosos procesos citoplásmicos hacia la matriz dentinaria. Estos procesos penetran contactando y entre las fibrillas dentinales" (Bosshardt y Schroeder 1996).

En nuestra opinión estos autores están describiendo como normal un material que presenta una defectuosa preservación del

componente epitelial. Que el defecto se repita en todos sus especímenes, no justifica poderlo considerar representativo de una realidad biológica.

Por tanto en estos momentos sigue vigente la teoría clásica, que podría resumirse secuencialmente en las siguientes fases:

- (a) proliferación de la vaina radicular de Hertwig;
- (b) diferenciación de odontoblastos de células de la papila dental;
- (c) deposición de matriz dentinaria y mineralización;
- (d) degeneración de la vaina epitelial radicular;
- (e) interacciones entre la dentina mineralizada y las células mesenquimales del saco dentario, resultando la diferenciación de cementoblastos;
- (f) y deposición inicial de matriz cementaria por cementoblastos derivados del mesénquima y subsiguiente mineralización.

Por todo lo expuesto y estando por aclarar el origen y mecanismo de formación del cemento dentario hemos planteado el presente trabajo de investigación para optar al título de doctor en Odontología. Se trata de un estudio estructural de las raíces de los terceros molares humanos, cuando se encuentran aproximadamente al 70-90 % de su longitud total, y va particularmente dirigido a la fase inicial de la cementogénesis humana.

- (1) Estudiar a nivel óptico y electrónico el epitelio radicular de Hertwig y su relación con la dentina radicular con intención de evidenciar, a nivel del diafragma, el papel inductor sobre la papila mesenquimática.
- (2) Analizar epitelio radicular de Hertwig en la zona de la vaina, para poder detallar si allí se producen cambios citológicos en relación al diafragma, tanto a nivel estructural como ultraestructural.
- (3) Detallar la relación entre la dentina recién formada y la inicial formación del cemento radicular.
- (4) Evidenciar la relación entre las diferentes regiones del epitelio radicular de Hertwig (el diafragma, la vaina y el área de Malassez) y los mecanismos por los cuales se modifica su estructura, con el estudio particular de su inmunexpresión, su capacidad de división y la posible muerte celular programada.
- (5) Y realizar un estudio morfométrico de la disposición espacial de los restos epiteliales que persisten a lo largo de raíz dentaria incluidos en el ligamento periodontal.

El presente es un estudio de carácter descriptivo sobre la cementogénesis humana.

Las muestras han sido procesadas en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

3.1. Muestras

Los especímenes estudiados consisten en la porción apical de las raíces de 24 terceros molares humanos normales en vías de desarrollo (70-90% de su probable longitud apical), exodonciados por motivos de ortodóncicos o quirúrgicos. Se trataban de 16 mujeres y 8 varones, con edades comprendidas entre 16 y 20 años. Los molares recién extraídos fueron sumergidos en solución fijadora tamponada y procesados de manera diferenciada para su posterior estudio a nivel óptico y electrónico.

3.2. Procesado para estudio estructural

Las piezas dentarias fueron remitidas al Departamento de Patología, en donde fueron procesadas y estudiadas.

3.2.1. Microscopia óptica

Después de una inicial fijación durante 4 horas con formol tamponado al 10%, el extremo radicular en crecimiento se separó de la porción más coronaria de la raíz, se lavó con tampón (solución de fosfato Sorensen, pH 7,4 a 4 grados centígrados) y se desmineralizó utilizando EDTA al 10% durante 2 a 4 semanas. Y se procedió a incluirlas en parafina para posteriormente realizar los

cortes seriados de 5 μm . Las tinciones empleadas para su posterior visualización y estudio fueron:

1. Hematoxilina-eosina.
2. Tricrómico de Masson.

3.2.2. Estudio del inmunofenotipo

El estudio inmunohistoquímico de la vaina radicular se realizó mediante anticuerpos frente a citoqueratina AE1/AE3 (1:50) (DakoCytomation) y el Ki67 (1:100) (DakoCytomation) con los correspondientes controles de mucosa oral y ganglio linfático respectivamente.

3.2.3. Microscopia electrónica

Inmediatamente después de la extracción, el ápice dentario fue fijado en el 2.5 % gluteraldehído (tamponado en la solución de fosfato Sorensen, pH 7,4 a 4 grados centígrados) durante 4 horas. Después de esta inicial fijación, el extremo radicular en crecimiento se separó de la porción más coronaria de la raíz, se lavó con el mismo tampón y se desmineralizó utilizando EDTA al 10% durante 2 a 4 semanas. Posteriormente se fragmentó cuidadosamente obteniendo fragmentos tronco-cónicos del tejido blando por medio de secciones radiales en el sentido ápico-coronal y a rebanadas con secciones transversales o tangenciales. Los fragmentos fueron postfijados en tetróxido de osmio al 1%, durante 2 horas, y tras lavado, se deshidrataron con concentraciones crecientes de acetona. Finalmente los bloques de tejido se incluyeron en Epon 812 (TAAB lab., Inglaterra).

Cada fragmento constituye un bloque que se cortó tratando de obtener una visión longitudinal del ápice en el crecimiento. Los

cortes semifinos (1micra) se tiñeron con azul de Toluidina para el control con microscopía de luz, y aquellas zonas que presentaban diferentes etapas iniciales del desarrollo radicular se seleccionaron y cortaron para el estudio ultraestructural.

Los cortes ultrafinos se realizaron con un cuchilla de diamante y un ultramicrotomo Reichert (Leica, Illinois), se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963), y se examinaron en un microscopio electrónico Jeol Jem 1010 (Tokio, Japón) trabajando a 60 kilovoltios.

3.2.4. Estudio de la apoptosis (TUNEL)

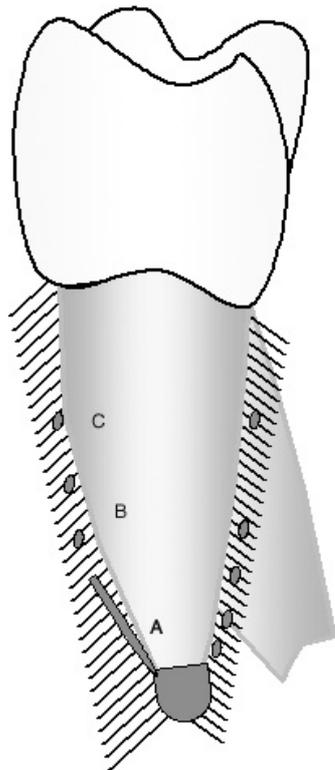
Se realizó así mismo sobre el material incluido en parafina. Las secciones fueron desparafinizadas y se realizó una digestión con proteinasa K (20µg/ml) a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena (H₂O₂ al 3% tampon tris salino durante 20 minutos) y procesadas por el método modificado de TUNEL usando el Kit TdT FragEL™ de Amersham. Se utilizó control un ganglio linfático con una linfadenitis reactiva. Estos estudios se realizaron en el Laboratorio de Profesor Ermanno Bonucci en la Università de la Sapienza de Roma.

3.3. Estudio morfométrico

El estudio de la distribución de los restos epiteliales de Malassez y su continuidad con HERS se realizó en el Laboratorio de Profesor Ermanno Bonucci en la Università de la Sapienza de Roma. Se utilizaron cortes seriados de 3 micras de las raíces de cinco molares en desarrollo, que fueron fotografiados a 20

aumentos y posteriormente analizados con el programa de histomorfometría "Image analysis system 2000" (Roma, Italy).

Las diferentes áreas se numeraron como zona A la más próxima a la vaina y por tanto hacia apical, la siguiente área estudiada fue denominada B, y era la zona C la más coronal, tal como se detalla en el esquema que se adjunta a continuación.



Habia especímenes que presentaban las tres áreas, mientras que en otros casos la región apical motivo de estudio solo permitió estudiar las dos primeras.

Los parámetros estudiados fueron: la longitud radicular (LR), el número de restos epiteliales de Malassez (NERM), el área de los mismos (AERM), su longitud (LERM), la distancia a la

superficie radicular (DRE) y la superficie radicular cubierta por restos de Malassez (LERM/LR).

Los resultados de este estudio de distribución de los restos epiteliales fue analizada por un experto estadístico mediante un análisis de varianzas (ANOVA), y la correlación entre dos variables mediante un test de Spearman. En el caso en los que existía correlación los resultados se sometieron a un modelo de regresión simple.

3.4. Procesado para estudio del crecimiento radicular

Se realizaron fotografías macroscópicas y radiografías tipo aleta de mordida para el estudio macroscópico de las piezas dentarias y de su mineralización, una vez extraídas.

El estudio cuantitativo del crecimiento radicular se ha realizado sobre imágenes ortopantomográficas digitalizadas de los maxilares pertenecientes a los jóvenes a los que se les ha realizado la exodoncia de los terceros molares. Hemos comparado las imágenes previas con las inmediatamente anteriores a la exodoncia y calculado el crecimiento observado en relación al tiempo transcurrido.

Como resumen de nuestros resultados destacamos que en las secciones semifinas del material representativo y bien preservado (o con artefactos mínimos), fácilmente pueden ser diferenciadas al microscopio, las clásicas tres zonas del epitelio radicular de Hertwig conocidas como diafragma, vaina y red o restos de Malassez.

La dentinogénesis más temprana, como elaboración polarizada de matriz dentinaria, y la cementogénesis inicial, como formación de un tejido celular cementoideo sobre la superficie dentinaria aún no mineralizada, se observan directamente relacionadas con células papilares periféricas, situadas frente a la superficie interna del epitelio radicular.

La zona del diafragma, como epitelio radicular libre que se extiende apicalmente, separando a los tejidos papilar y folicular, es la más fácil de identificar y delimitar, porque no establece relación con la superficie externa de la raíz. La iniciación de la zona propia de la vaina coincide con la relación directa del epitelio radicular con la superficie de la raíz en formación.

No obstante esta transición no siempre corresponde con el extremo de avance de la raíz. La porción más apical de la raíz en crecimiento, frecuentemente está exclusivamente solo relacionada con odontoblastos, y en ocasiones existe una discordancia relativamente importante entre el punto más apical de la raíz en formación y la relación inicial del epitelio radicular con la raíz en crecimiento.

Por otra parte, la transición vaina-red, como transición entre una estructura laminar continua con una lamina perforada, o una red de cordones epiteliales entrelazados, es la más difícil de establecer. No existe dificultad cuando la sección es coincidente

con la interrupción focal de la continuidad. En este caso la simplificación relativa del epitelio, que no es ya epitelio regular, es el criterio principal para su caracterización.

Pocas modificaciones se encuentran en el epitelio de la zona propia del diafragma, que en general muestra una organización bilaminar. No obstante y en contraste, en la zona propia de la vaina, sin perder el carácter laminado continuo, se detectan notables cambios citológicos y arquitectónicos.

Estos cambios comprenden principalmente: la presencia de una capa intermedia entre las capas interna y externa, modificaciones en las células de la capa interna, la importante afectación apoptótica o apoptotic-like de gran número de células, así como un fenómeno de transdiferenciación epitelio-mesenquimal.

La red de Malassez se continúa con la zona de la vaina, de manera más densa hacia apical y haciéndose progresivamente más laxa hacia coronal.

4.1. Aspectos generales

El crecimiento radicular cuantificado en nuestros especímenes ha sido de 0,94 milímetros anuales de media, y la desviación estándar observada era de 0,51 mm/año.

En nuestras secciones de control, como se observa en la figura 7, existe un eje central de dentina que se afila hacia el extremo de la raíz en crecimiento, el epitelio radicular de Hertwig, acompañado internamente por odontoblastos y tejido primitivo pulpar, constituyendo la papila dentaria, y por fuera por una

cantidad variable del tejido conjuntivo folicular. En estas secciones semifinas de la punta de raíz en crecimiento, tanto la dentinogénesis inicial como cementogénesis temprana, están en relación con el epitelio radicular.

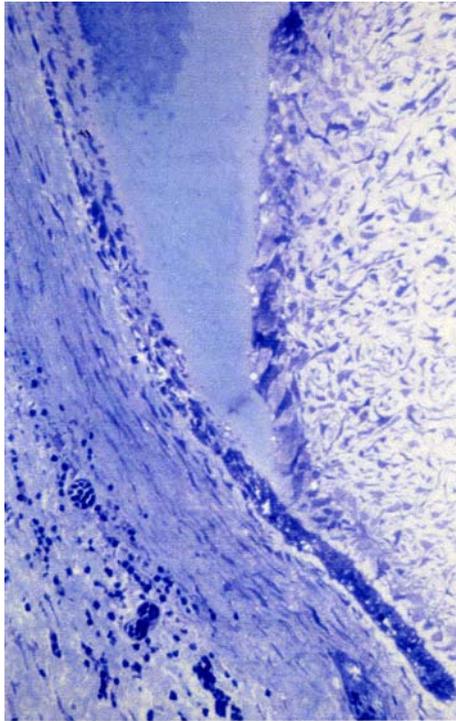


Figura 7

Corte semifino, teñido con azul de toluidina, que muestra a microscopia óptica el extremo distal de raíz en desarrollo de un tercer molar. Observamos a ambos lados la formación y mineralización de la dentina con lo que queda encerrada en su interior la papila mesenquimática transformada en pulpa primitiva. Por fuera de la dentina aparece la vaina epitelial radicular que incluso en el corte aparece continua (6,3 x)

El epitelio interno del diafragma, desde la zona apical, establece relación estrecha con las células pulpo-papilares periféricas, las cuales adquieren progresivamente morfología odontoblástica y segregan la primera matriz orgánica de dentina. Casi inmediatamente a la formación de esta primera predentina, sobre esta matriz no mineralizada, y en relación con la capa celular interna del epitelio radicular modificado, se forma una capa superficial de tejido celular cementoideo.

Así pues, la formación de cemento se inicia a pocas micras del extremo de la raíz en crecimiento y determina un rápido incremento de grosor sobre la dentina recién elaborada. La capa externa de la vaina epitelial acompaña la interna desde el extremo apical del diafragma hasta el extremo de crecimiento radicular y se extiende coronariamente sin interrupción, en relación con la zona de transformación cementoidea.

4.2. El diafragma del epitelio radicular

56

Histológicamente a la sección longitudinal el diafragma es una masa sólida, alargada, de elementos epiteliales. Las células son planas o cúbicas y se disponen en dos, o más capas estrechamente relacionadas.

Tanto las células de las capas internas como las externas, y en su caso las células intermedias, muestran un aspecto similar con ribosomas abundantes (polisomas), mitocondrias, escaso retículo endoplásmico rugoso y algunos aislados tonofilamentos.

Las células están unidas por desmosomas y uniones tipo nexó (uniones GAP), alternando con pequeños y numerosos

espacios intercelulares, dilatados, y ocupados por un material de baja electrodensidad (Figura 8 A).

Una membrana basal continua separa la vaina radicular de la pulpa dental primitiva (membrana basal interna) así como de las células del folículo dental propio (membrana basal externa). La membrana externa es una membrana basal típica: tiene un grosor de 60-110 nm, con una lámina lucida y una lámina densa, con las características fibrillas de anclaje que irradian hacia el tejido conjuntivo folicular subyacente. Así mismo esta provista de numerosos hemidesmosomas (Figura 8 F).

La membrana basal interna también esta formada por una lámina lucida y un lamina densa, pero esta última esta en relación con numerosísimas fibras aperiódicas, de 15-20 nanómetros de diámetro aproximadamente y 0.5-1 micras de longitud, orientadas perpendicularmente a la lamina densa (Figura 8 F).

El límite entre la membrana basal interna y la externa puede situarse a nivel de la punta del diafragma o situarse hacia la parte externa en una longitud variable. El cambio de la membrana basal interna y externa básica puede producirse en la superficie de una misma célula (Figura 8 B).

La parte media del diafragma epitelial habitualmente consiste únicamente en dos capas adyacentes, epitelio interno y externo, con la eventual presencia de células irregulares interpuestas (Figura 8 C).

El epitelio interno esta constituido por células cuboidales altas o cilíndricas, con espacios intercelulares dilatados, siendo

algunos de ellos reflejo de la irregularidad de la superficie y contiene fibras del conjuntivo folicular (Figura 8 C).

Sin embargo las células están íntimamente relacionadas con las adyacentes mediante uniones zonulares y desmosomas (Figura 8 E). En estas áreas se detectan numerosos filamentos citoplásmicos que se insertan en el material densificado asociado a la cara interna de la membrana. Los núcleos son centrales y el citoplasma es rico organelas: abundantes ribosomas libres, mitocondrias y filamentos intermedios.

El epitelio externo consiste en una única capa de células planas, con amplios espacios intercelulares, muy irregulares. Las uniones intercelulares entre células internas y externas son escasas o nulas, por lo que con frecuencia el epitelio interno y externo aparece separado con un material grumoso, homogéneo y de escasa densidad (Figura 8 D).

En relación con la zona preodontoblástica de la papila, el epitelio externo era similar al de la parte media, pero en el epitelio interno se desarrolla una compleja organización. Las células incrementan su altura y los núcleos se polarizan desplazándose hacia una posición más profunda, lejos de la membrana basal.

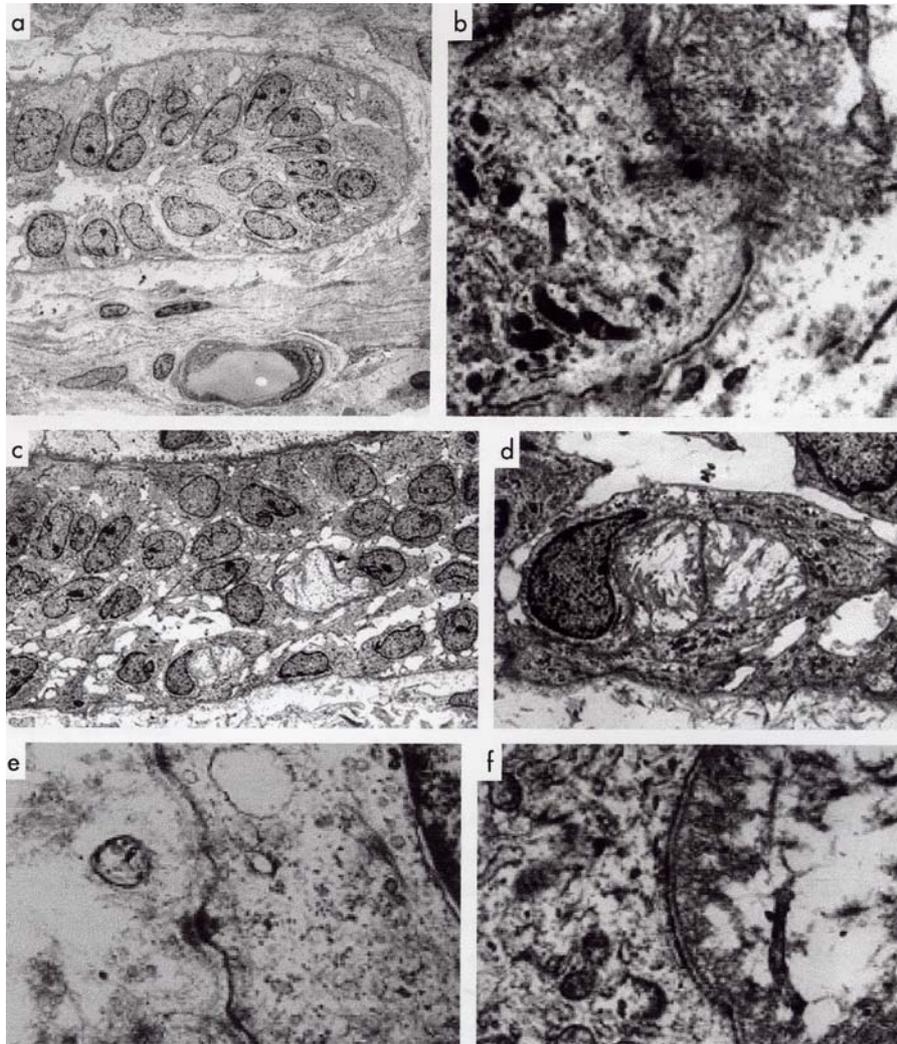


Figura 8

Ultraestructura de HERS. En A: zona de la punta, inflexión del epitelio externo al interno. En B: basal fina a nivel externo y engrosada en el interno. En C: zona del diafragma, con espacios intercelulares con material de baja densidad, junto con otros delimitados por basal y llenos de colágena en la imagen D. En E: uniones intercelulares. En F: hemidesmosomas de las células externas. En G: basal interna muy engrosada, escasos hemidesmosomas y un material fibrilar aperiodico perpendicular a la lamina densa (A y C 1000x, B, E y F 50000x, D 2500x)

El tejido de la primitiva pulpa dentaria (relacionado con la punta y la zona de media del diafragma epitelial) esta constituido por abundantes células, densamente dispuestas, indiferenciadas o de aspecto mesenquimal. Se trata de células de morfología estrellada, con numerosas extensiones citoplásmicas y un escaso citoplasma rodeando al núcleo, casi carente de organelas.

Estas células papilares, o células primitivas pulpares, forman una red con numerosos contactos intercelulares y no muestran ninguna orientación especial o pruebas de alineamiento con respecto a las células del epitelio interno de la vaina radicular.

Los procesos citoplásmicos de las células periféricas establecen estrechos contactos con las fibrillas aperiódicas y también con la lámina densa de la membrana basal interna (Figura 9 B).

En relación con la porción coronaria del diafragma epitelial de Hertwig, las células de origen ectomesenquimático que ocupan las posiciones más periféricas de la papila presentan una progresiva diferenciación odontoblástica. Los también conocidos como preodontoblastos, adoptan una forma más cilíndrica y presentan una polaridad estructural, presentando numerosos procesos citoplásmicos orientados hacia la membrana basal interna.

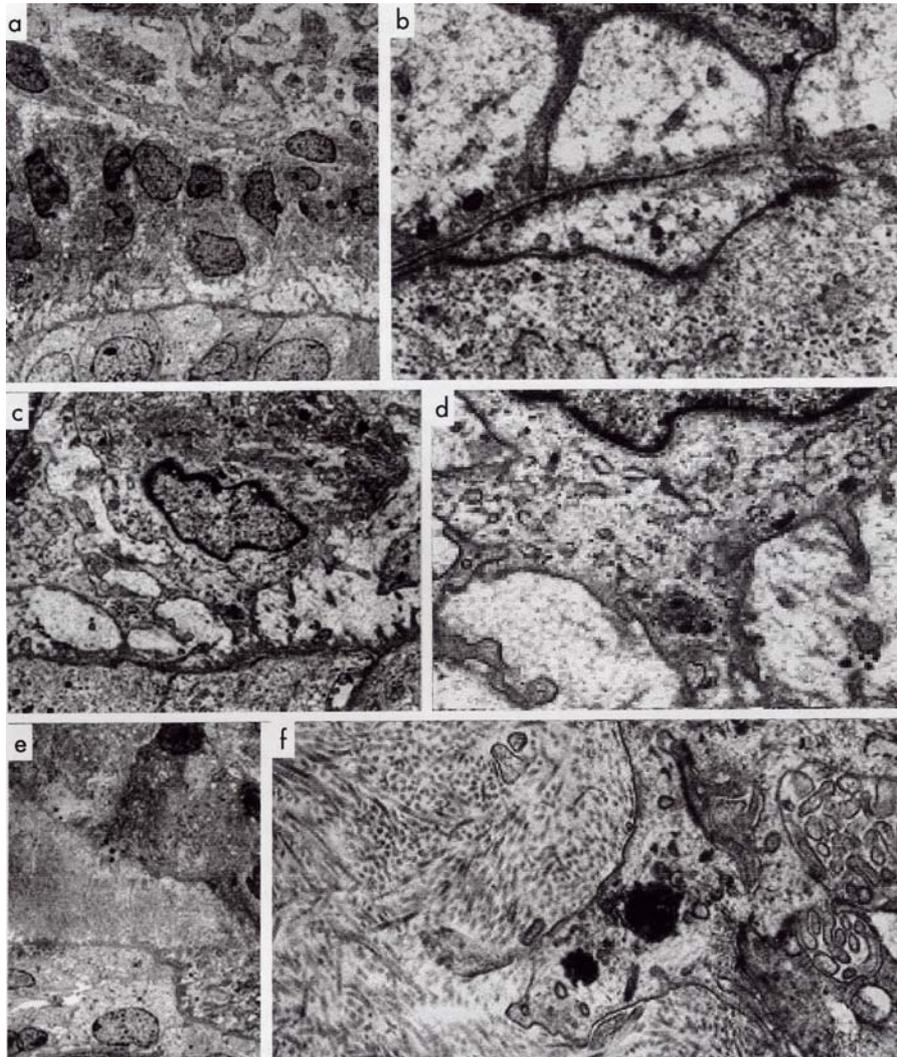


Figura 9

Proceso de inducción que determina la dentinogénesis. En A: inducción del epitelio sobre las células de la papila hacia preodontoblastos, con múltiples expansiones tal como se evidencia en la imagen B. En C y D: aumento de organelas y polarización hacia el extremo celular próximo al epitelio interno. En E y F: inicio de la fase secretora activa de matriz, la polarización se hace mas evidente, se alarga la prolongación odontoblástica y se observan los gránulos electrodensos (A y E 800x, B 50000 x, C 5000x, D y F 25000x)

También las células epiteliales internas en esa zona inductora, pueden evaginar pequeñas proyecciones entre el material de la membrana basal. Como resultado de esta polarización de las células preodontoblásticas se sitúa el polo con diferenciación secretora próximo al epitelio interno y el núcleo se desplaza hacia el polo opuesto.

En la región secretora se evidencia un gran aumento de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y el notable desarrollo del aparato de Golgi en el área supranuclear. Las mitocondrias se distribuyen por todo el citoplasma si bien el extremo distal de la célula básicamente carece de organelas. Al mismo tiempo, se observa una mayor densidad celular y los odontoblastos se disponen más estrechamente unidos, incrementándose las uniones GAP y los desmosomas.

La porción periférica o externa del diafragma epitelial se acompaña de una cantidad variable del tejido conjuntivo del folículo dental propio, y en íntima relación con la porción apical del diente extraído. Los elementos más evidentes son las células foliculares, alargadas, y dispuestas ordenadamente, de forma que su eje mayor se orienta paralelamente a la membrana basal externa. Se caracterizan por presentar largos procesos citoplásmicos, pequeños complejos Golgi, numerosos ribosomas libres, aisladas cisternas del retículo endoplásmico rugoso, y escasas mitocondrias.

La membrana basal externa que rodea a las células epiteliales externas es continua e permanece intacta desde el inicio del epitelio radicular a nivel de la punta del diafragma.

4.3. La vaina epitelial

La dentinogénesis temprana radicular se produce por la secreción de matriz elaborada por los primeros odontoblastos relacionados con la superficie interna del extremo coronario del diafragma epitelial. En relación con la superficie libre de las células internas del diafragma epitelial se produce una progresiva transformación de las células papilares primeramente a la morfología de preodontoblastos y finalmente de odontoblastos.

Así, los primeros odontoblastos totalmente diferenciados presentan un polo apical en crecimiento, claramente diferenciado de los odontoblastos tempranos o juveniles. Los odontoblastos maduros o secretores, son células columnares (5-7 micras de ancho por 15-25 micras de alto), con una distribución polarizada de sus organelas citoplásmicas, y provistas de una prolongación apical única y dilatada, el proceso odontoblástico o fibra de Tomes.

El núcleo se encuentra en la porción distal del citoplasma, el aparato de Golgi se localiza apicalmente al núcleo, rodeado por numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso de disposición paralela a la superficie.

Entre el cuerpo de célula y el proceso odontoblástico, existe una línea de demarcación marcada por la barra terminal de los filamentos citoplásmicos asociados a la *fascia adherens* que mantiene unidas a estas células. También se evidencia gránulos secretores densos, de tipo multivesicular, y vesículas cubiertas que son frecuentes en el área terminal del cuerpo celular, cerca del proceso odontoblástico.

A nivel de la relación de las células epiteliales internas del diafragma y el primer odontoblasto secretor completamente diferenciado, la distancia entre el extremo distal de la expansión odontoblástica y la membrana basal es mínima (menos de 2

micras), y en este punto la matriz asociada muestra una cantidad muy escasa de colágeno.

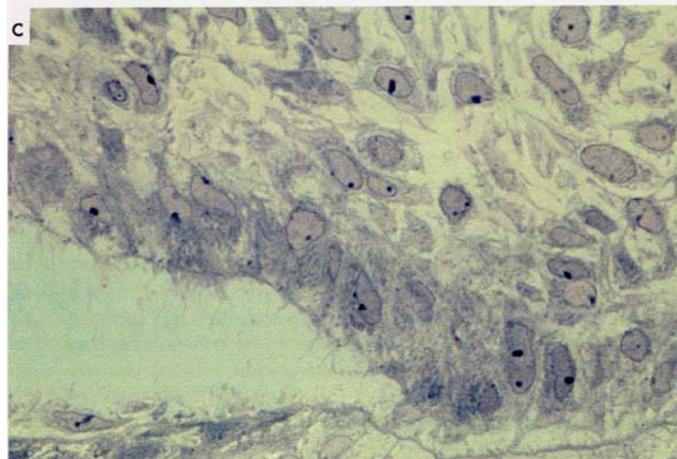
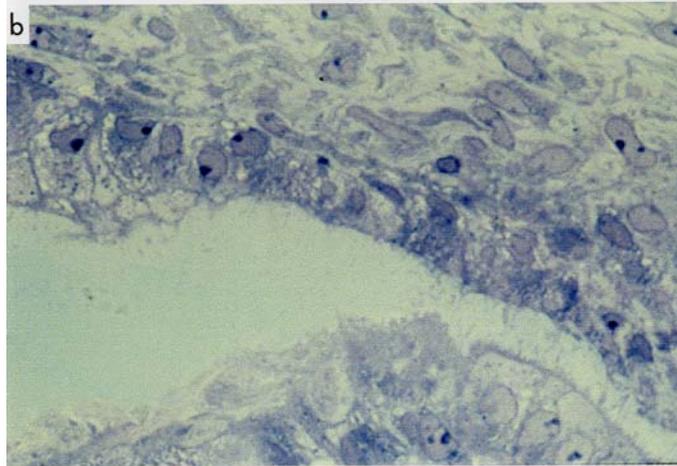
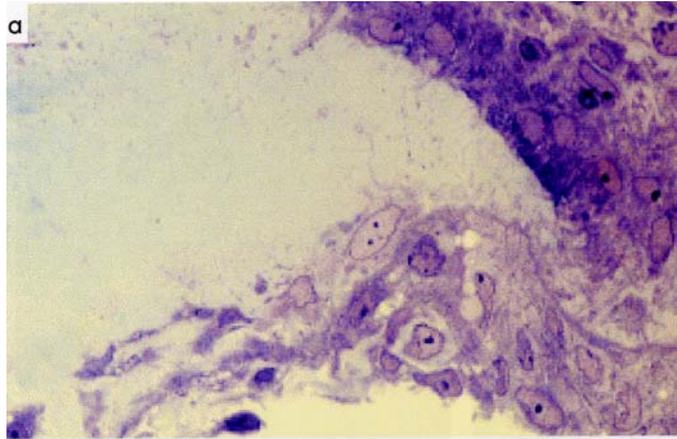
La reciente formación de la matriz de predentina determina un incremento de la distancia entre las superficies externas e internas, con un aspecto triangular cuyo vértice constituye el extremo de la raíz en crecimiento, de forma que progresivamente los cuerpos de los odontoblastos se separan cada vez más del epitelio interno, y su citología y organización se modifica drásticamente.

Así mismo se inician las modificaciones de las células del epitelio interno que comportan cambios progresivos desde un modelo epitelial columnar hasta alcanzar una organización estratificada irregular integrada por elementos de apariencia conectiva separados con una matriz colagénica (Figura 10).

Figura 10

64

Observamos en tres cortes semifinos el aspecto de la transición epitelio mesenquimal en la vertiente superficial del ARE. Progresivamente los cuerpos de los odontoblastos se separan cada vez más de las células epiteliales internas en las que observamos una modificación drástica, pasan desde un modelo epitelial columnar a alcanzar una organización estratificada irregular integrada por elementos de apariencia conectiva separados con una matriz colagénica (azul de toluidina a 60x)



Al principio las células epiteliales internas cubren la matriz dentinaria externa y conservan su aspecto estructural: una capa epitelial única, compuesta por elementos prismáticos, densamente empaquetadas con uniones específicas (Figura 11 A). Pero esto solo se mantiene en unas cuantas células adyacentes porque pronto se transforman, aparecen una serie de modificaciones que afectan tanto al citoplasma celular como a la membrana basal. Por ello la morfología lineal regular de la superficie interna de la vaina epitelial, con su membrana basal, y la fina capa de dentina del manto, se transforman en una estructura ondulada y más irregular.

El compartimento más afectado es la red de microfibrillas aperiodicas de la membrana basal interna, que se desintegran rápidamente. Mientras que los componentes laminares, lucidos y densos, permanecen en relación a la superficie celular en la mayoría de los casos (Figura 11 B).

Las células de forma rápida y progresiva transforman su apariencia epitelial hacia un carácter secretor, de tipo mesenquimático-conjuntivo. Los citoplasmas incrementan la cantidad de microfibrillas, con un incremento de la densidad citoplásmica. Simultáneamente aumentan las organelas relacionados con la secreción, fundamentalmente las cisternas de retículo y el aparato de Golgi. Las mitocondrias son numerosas y los núcleos son, preferentemente, de cromatina condensada (Figura 11 C).

De forma progresiva y sin perder los contactos intercelulares típicos de las células epiteliales, continúan su transformación hacia elementos del aspecto fibroblástico, mostrando diferentes grados de maduración.

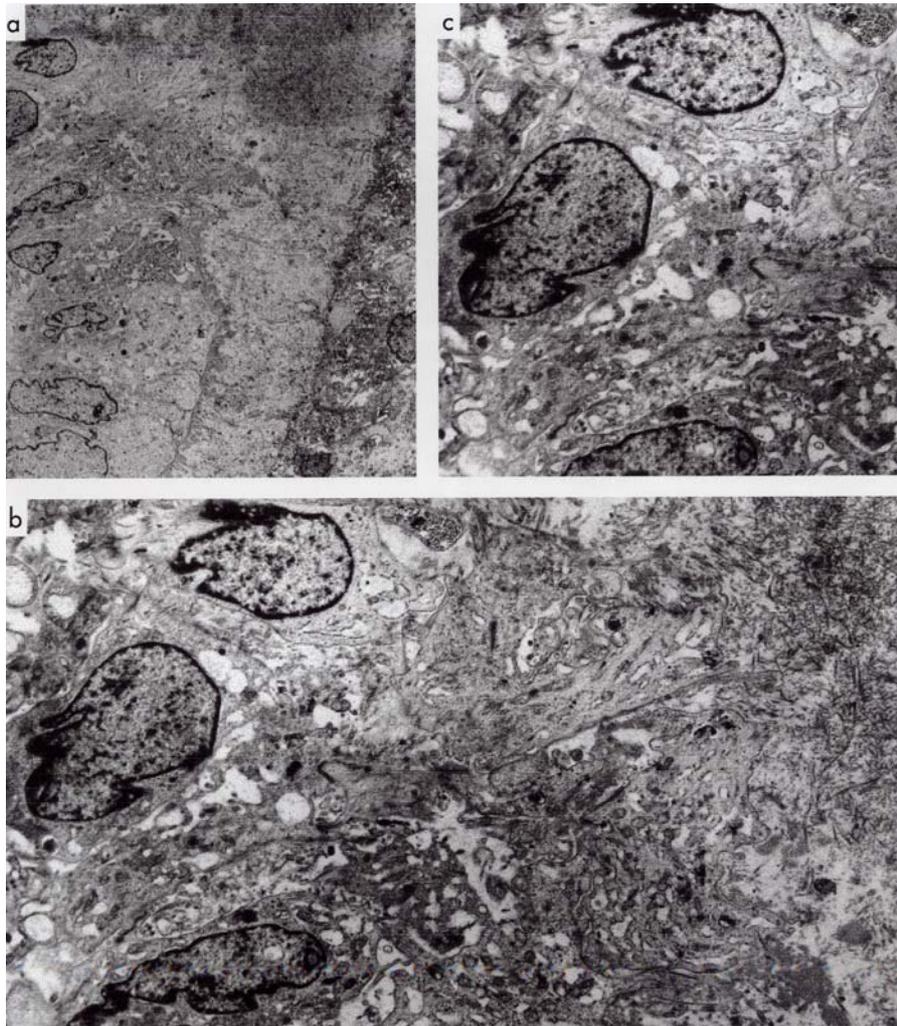


Figura 11

En este corte ultrafino de la zona de la vaina, vemos el epitelio interno compuesta por elementos prismáticos, densamente empaquetadas con uniones específicas cubriendo la matriz dentinaria externa en la imagen A. Ya en su porción mas hacia coronal, detalle en la imagen B, vemos un cambio brusco, con desintegración de la membrana basal interna, estando preferentemente afecto el compartimento microfibrilar. Las células transformadas han incrementado sus organelas. En la imagen C, un detalle del inicio de la síntesis de colágeno que se observa ya entre las células (A 5000x, B 15000x y C 40000x)

Podemos encontrarnos células con citoplasma pálido, gran cantidad de ribosomas libre y núcleo de cromatina laxa (aspecto juvenil) junto a otras células que muestran un citoplasma denso, gran desarrollo de las cisternas de retículo endoplásmico rugoso, y los núcleos irregulares de cromatina condensada (aspecto secretor conectivo) (Figura 12 A).

La mayoría de los contactos intercelulares presentan un carácter de relaciones directas sin diferenciaciones específicas, pero con mucha frecuencia se observan amplias uniones específicas constituidas por densificaciones de las membranas y un gran desarrollo del citoesqueleto fibrilar (Figura 12 B).

Inicialmente se preservan las relaciones de proximidad celular pero son cada vez más numerosos los espacios intercelulares. Primero sin ningún tipo de material estructurado en el intersticio, pero incrementando progresivamente las fibras y la sustancia fundamental que existe entre las células (Figura 12 C).

La zona que hemos estudiado con más insistencia es la que existe entre las células epiteliales internas del extremo coronario de la vaina radicular epitelial y los primeros cementoblastos. En nuestros casos la longitud de esta zona es escasa, y varía entre 40 y 50 micras.

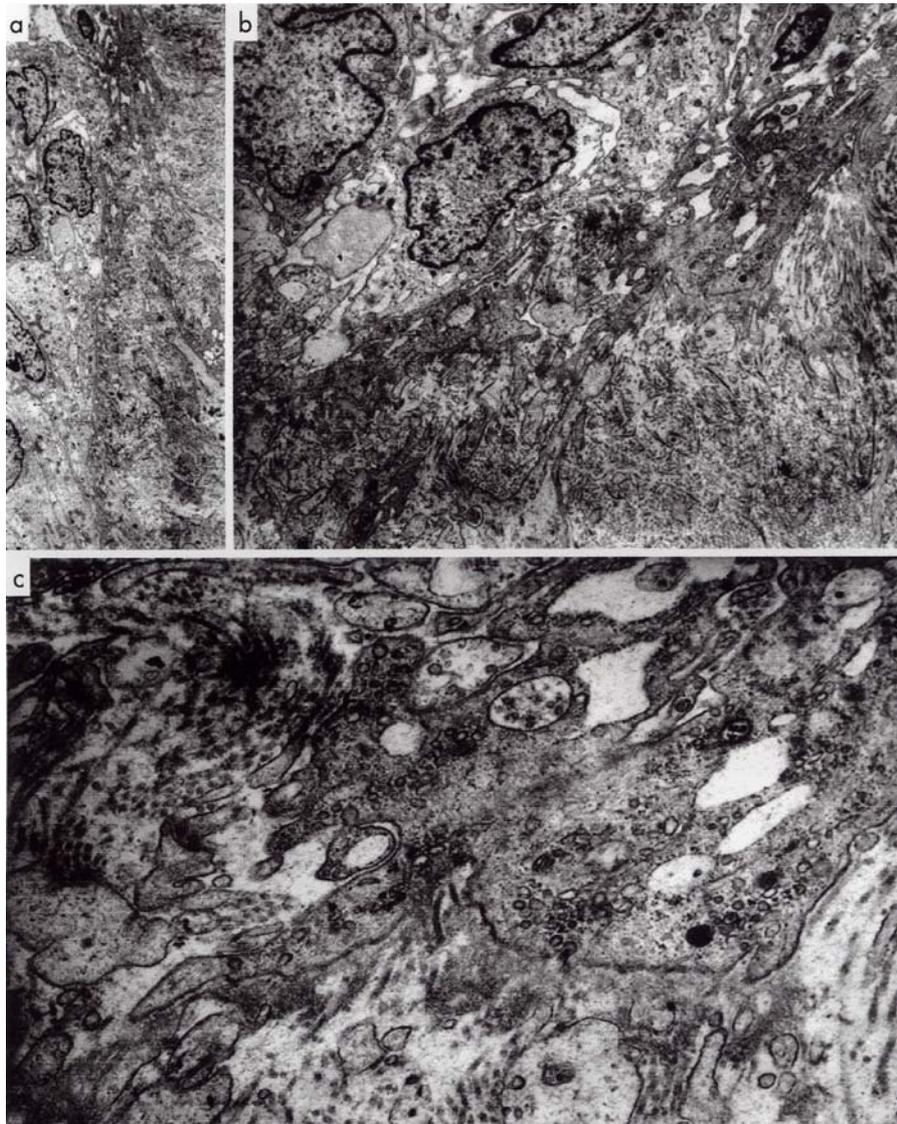


Figura 12

En la imagen A vemos sobre la matriz dentinaria el epitelio interno y su transformación. En la imagen B y C vemos dos detalles de la polarización de las organelas de secreción propias ya de las células transformadas y aun persisten contactos intercelulares, pero progresivamente se amplían los espacios intercelulares con las fibras y la sustancia fundamental que aparecen entre las células (A 800x, B 75000 x y C 75000x)

Esta región es donde la porción apical de las células internas epiteliales de la vaina radicular están en íntima relación con el borde externo de la matriz dentinaria no mineralizada (teóricamente formada por la matriz de la dentina del manto, internamente soportada por la matriz circumpulpar), persistiendo entre ambos, epitelio y dentina, la membrana basal interna.

Las células epiteliales progresivamente se aplanan y se disponen de forma paralela y estratificada en relación a la superficie de la membrana basal. Simultáneamente la superficie de apical de las mismas adquiere un carácter irregular y muestra frecuentes evaginaciones citoplásmicas dirigidas hacia la matriz no mineralizada (Figura 13 A).

La membrana basal, que al principio conserva su organización fibrilar aperiódica superficial y laminar (densa y lucida) en relación con las membranas celulares apicales, a nivel de las evaginaciones y/o extensiones celulares, pierde su continuidad mostrando pequeñas rupturas (Figura 13 B y C).

Progresivamente las células epiteliales, sin perder sus relaciones de contacto mutuo, transforman sus caracteres citológicos en sentido fibroblástico, concretamente por su diferenciación secretora y establecen contacto directo con la matriz colagénica de la dentina externa (Figura 13 D).

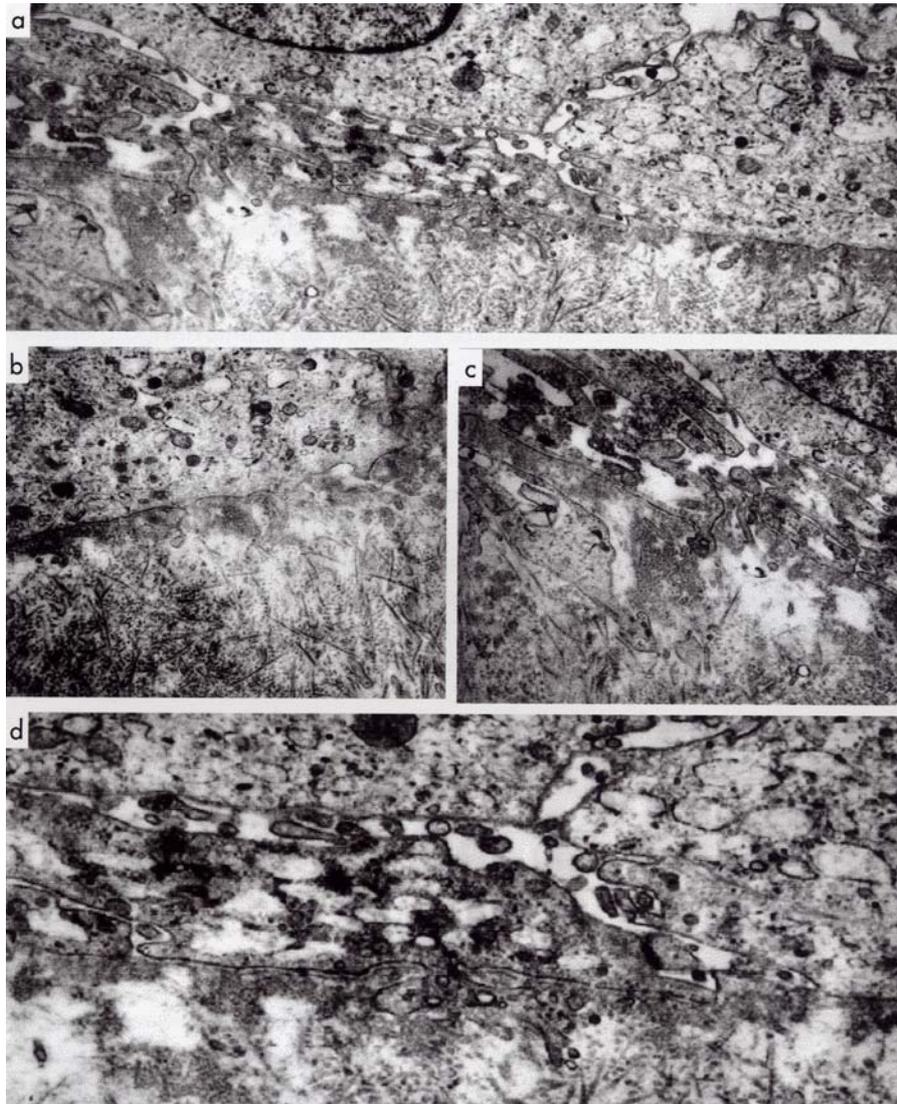


Figura 13

Ultraestructura del epitelio interno en su relación con la membrana basal y la matriz dentinaria recién formada. A: si en la zona inductora habían expansiones celulares filiformes a escasa micras adquiere un carácter irregular con evaginaciones citoplásmicas y pequeñas rupturas de la basal. B-D: se conservan las uniones mutuas, se incrementan las organelas de síntesis, y numerosas cisternas de RER (A 25000x, B y C 45000x y D 60000x)

La presencia de fibras de colágeno entre las células que aun mantienen el carácter epitelial predominante así como también su relación con la membrana basal interna, son dos signos característicos de la transdiferenciación epitelio-cementoblástica (Figuras 14 y 15).

Una cuestión difícil de delimitar es en que medida las células cementoblásticas contribuyen en el incremento de la matriz a nivel de la superficie externa de la raíz en crecimiento. En el extremo del apical de la predentina, la membrana basal interna, cuyo componente más desarrollado es el material fibrilar aperiodico de disposición perpendicular a lámina densa, marca el límite de la superficie de dentina.

Esta situación sólo perdura en la zona inicial de la superficie externa, ya que pronto comienza su desintegración, iniciándose la transformación del epitelio en cementoblastos, fundiéndose la matriz de colágena neoformada por las células transdiferenciadas con la de la dentina externa, sin signos ultraestructurales que permitan establecer su antigua posición, de forma que morfológicamente desaparece por completo el límite y por consiguiente no es posible demostrar que parte de la matriz no mineralizada es dentinaria y en que medida el incremento de grosor externo depende de la matriz de cemento elaborado por los cementoblastos.

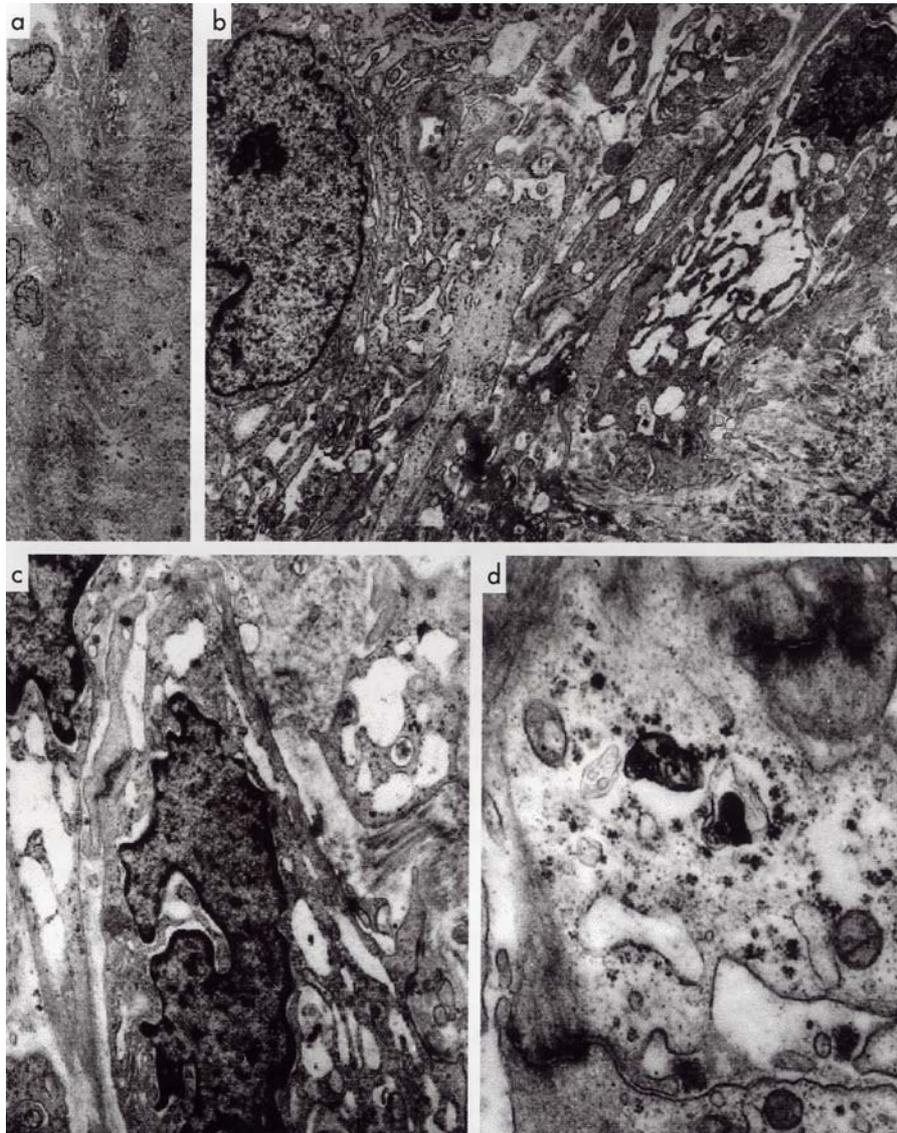


Figura 14

En A: transición epitelio mesenquimal en inmediata continuidad con los primeros odontoblastos. En B: interrelación de la matriz dentinaria externa con la membrana basal y las irregularidades de la relación que establecen entre ella y las células epiteliales en proceso de transdiferenciación, detalle en la imagen C y las uniones que persisten en D (A 800x, B 50000x, C 100000x).

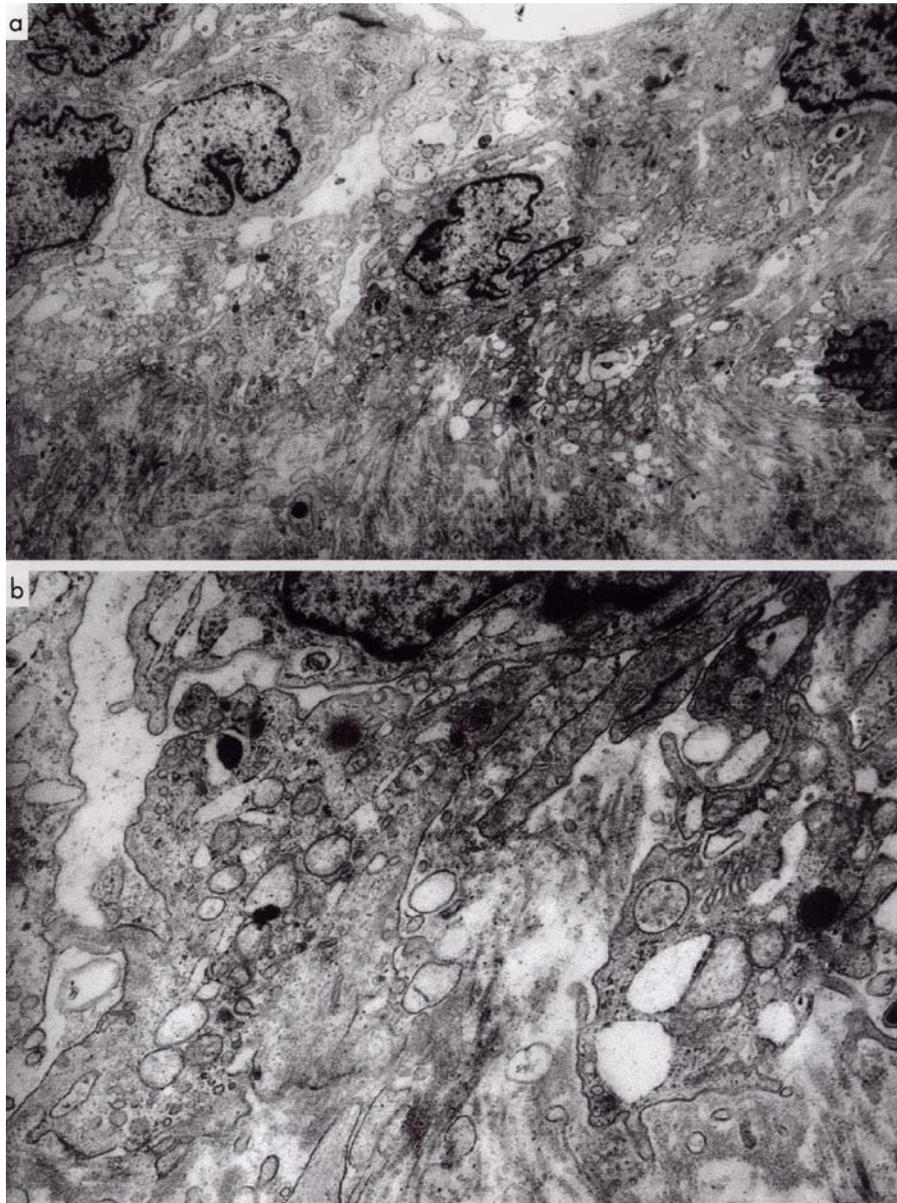


Figura 15

Corte seriado del anterior con evidencias de transformación en la citología con formación de un epitelio multicapa, así como en su relación con la basal y con la génesis de material orgánico, tipo colágena que aparece entre las células (A 50000x y B 100000x)

Las células con características epiteliales (prismáticas, cuboidales o planas) se transforman en células de aspecto mesenquimal (fusiformes o estrelladas), simultáneamente a la elaboración y secreción de la matriz intercelular colagénica. Además con la mencionada transformación las nuevas células cementoblásticas adquieren la capacidad de invadir la matriz dentinaria externa no mineralizada (Figura 16).

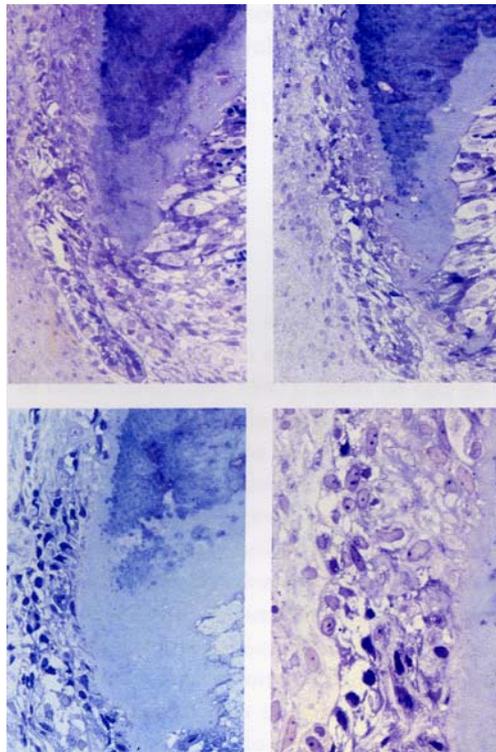
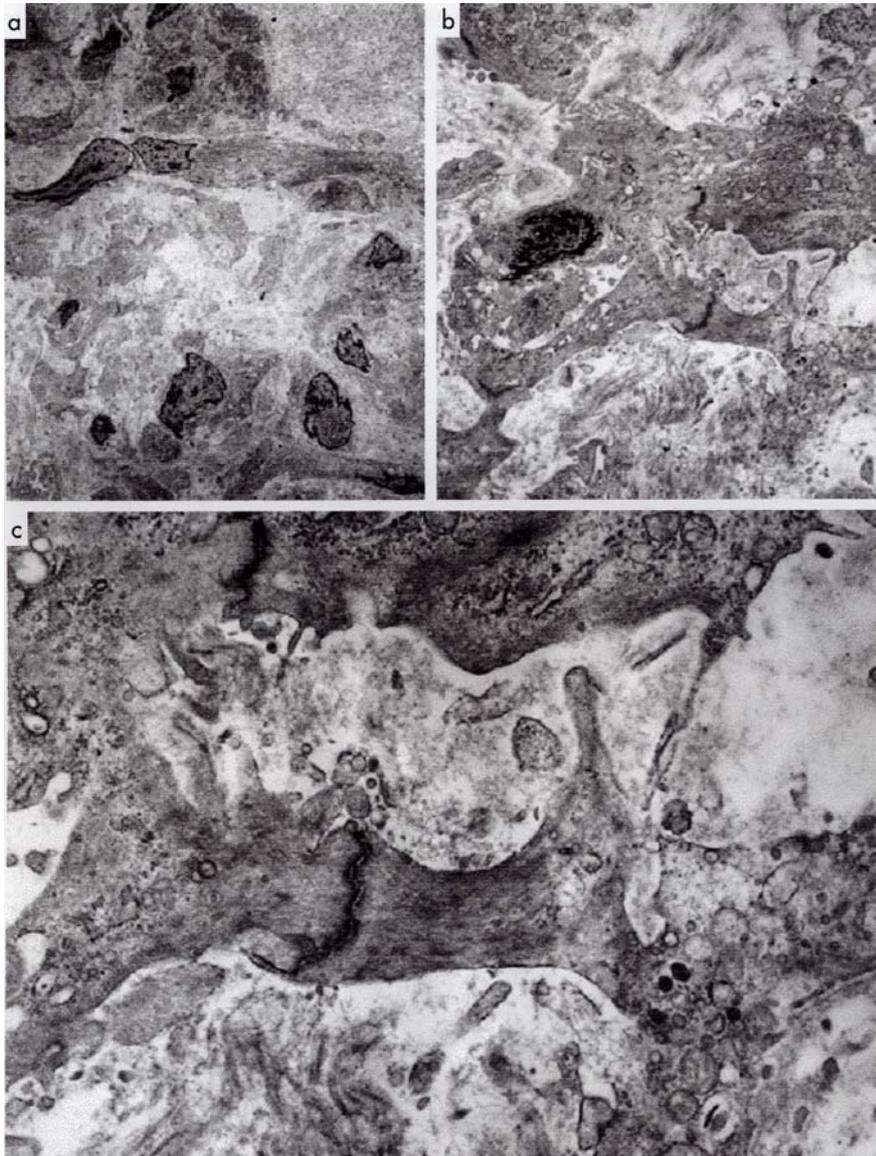


Figura 16

Observamos a microscopia de luz dos cortes semifinos, dos casos distintos, en donde se observa que junto con la transformación las nuevas células cementoblásticas adquieren la capacidad de invadir la matriz dentinaria externa no mineralizada. No hay interrupciones de la basal externa ni invasión del conjuntivo folicular (azul de toluidina, 16x, 40x y 63x)

**Figura 17**

En A: grupo de cementoblastos recién diferenciados, que van separando sus cuerpos (en B), rodeados por colágena, y con uniones. En C: detalle de uniones intercelulares y adhesión a la matriz tipo miofibroblástica. Persisten zonas de membrana basal, vestigio de su origen epitelial (A 5000x, B 10000 y C 50000x)

La morfología transicional cementoblástica se asemeja a la transformación miofibroblástica. Frecuentemente estas células son estrelladas con amplios procesos citoplásmicos, están en conexión con otras células de similares características con las que establecen complejas relaciones, con filamentos intermedios y uniones tipo adherens. Estas células presentan bucles de filamentos, un buen desarrollo del RER y frecuentemente vesículas de pinocitosis. También se conectan a las matrices intercelulares por anclajes tipo fibronexus (Figura 17).

4.4. La capa cementoide celular en relación con la dentina externa no mineralizada

La capa inicial de cementoide celular en relación con la dentina externa no mineralizada rápidamente se transforma en una gruesa capa densamente poblada por cementoblastos.

Este incremento se produce a lo largo de las primeras 100-200 micrometros coronales del eje radicular. Este rápido engrosamiento disminuye a nivel del borde de mineralización de la raíz en crecimiento. Sin embargo la cementogénesis continua pero mas lentamente.

La superficie del cementoide esta cubierta por las células epiteliales internas modificadas, siendo una prueba de su carácter epitelial la persistencia parcial de la membrana basal en su relación con la recién formada matriz cementoide y la existencia de uniones (Figura 18). Estas células pueden estar relacionadas con la capa epitelial externa de la vaina radicular o presentar una cantidad variable de células y material intercelular interpuesto. En nuestros casos esta situación es variable desde el contacto directo entre epitelio interno y externo, a situaciones de estratificación entre ellos (Figura 18).

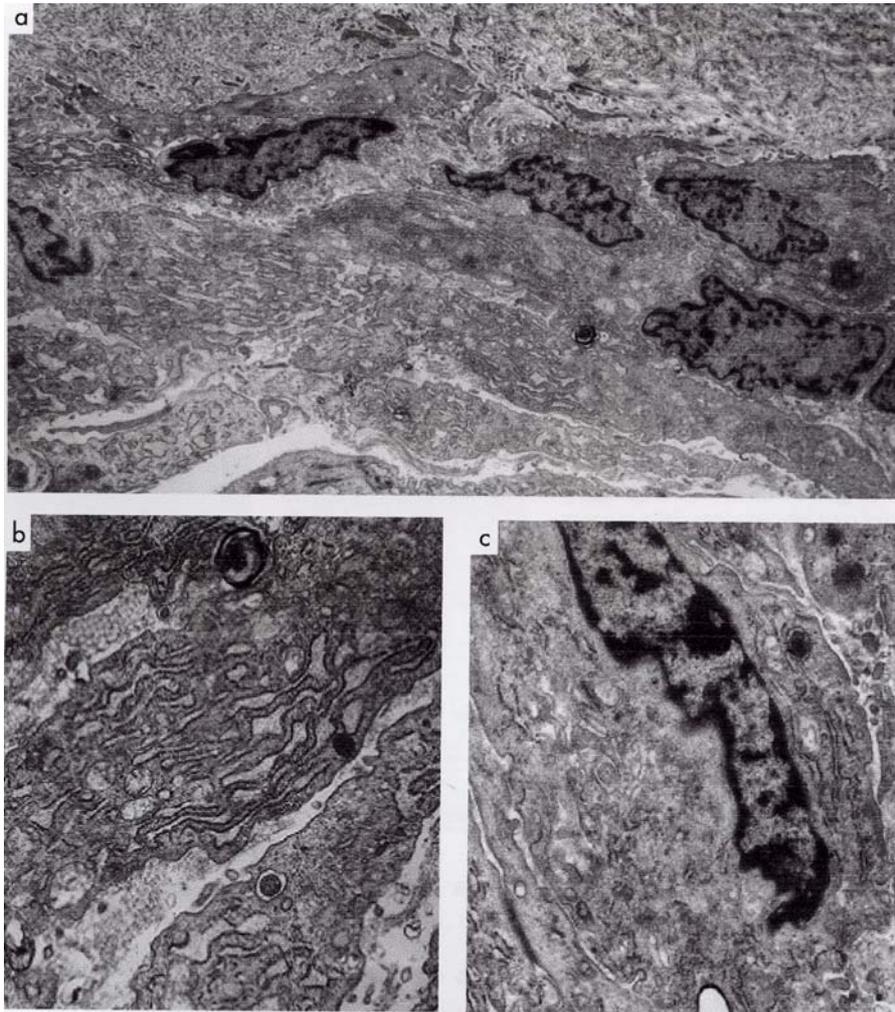


Figura 18

Zona de elementos activos cementoblásticos a nivel ultraestructural, aun en proximidad y con contactos intercelulares como se ve en el detalle de la figura C, pero con el material cementoide recién sintetizado entre ellos y en contacto con la dentina externa (A 15000x, B 25000x y C 30000x)

La superficie externa de la capa cementoide celular la constituye la capa epitelial externa de la vaina radicular.

En nuestros casos la cementogenesis inicial se produce bajo el control total del epitelio de la vaina radicular, y puede ser considerada en varias etapas:

- a) la capa interna de la vaina radicular prolifera y se transforma en precementoblastos y cementoblastos;
- b) simultáneamente a esta transformación, las células invaden la dentina externa produciendo la matriz colagénica del cemento en íntima conexión con la matriz dentinaria externa;
- c) la fusión de la dentina periférica y la inicial matriz orgánica de cemento produce la desaparición del componente aperiodico de la membrana basal interna y en consecuencia se hace imposible precisar el limite entre ambas matrices, dentinaria y cementaria;
- d) entre la capa epitelial externa, y la dentina externa existe una cantidad variable de células y material intercelular;
- e) y todo ello se produce aislado del conjuntivo folicular periférico, persistiendo la capa epitelial externa, incluyendo su membrana basal.

4.5. Restos de Malassez

Los restos de Malassez son una red de células epiteliales incluidos en el conjuntivo del periodonto de inserción (Figura 19).

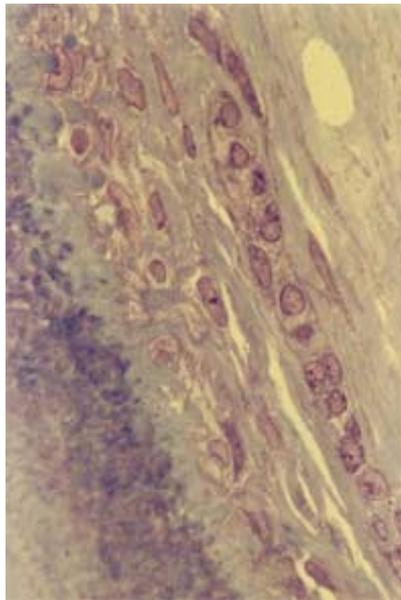


Figura 19

Corte semifino, teñido con azul de toluidina, de la superficie dentaria en la que observamos el cemento y los restos de Malassez, en forma de cordón epitelial. En este caso se extiende a lo largo de la práctica totalidad de la superficie (40x)

A nivel ultraestructural este cordón epitelial muestra una membrana basal que separa a sus células del conjuntivo circundante, en donde aparecen típicos elementos celulares del conjuntivo y matriz fibrosa rica, fundamentalmente, en colágena (Figura 20 A).

Y observamos también amplias perforaciones que podrían poner de manifiesto una interrelación con el conjuntivo periodontal similar al que observamos a nivel de la vaina (Figura 20 B).

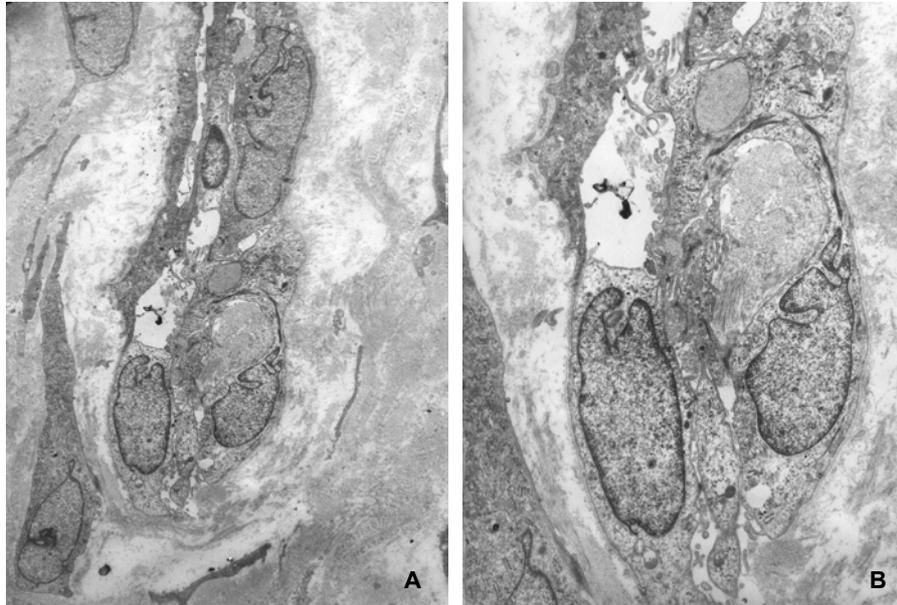


Figura 20

Zona de Malassez de HERS vista a microscopia electrónica de transmisión. En A se observa el área cordonal rodeada de matriz fibrosa del ligamento periodontal y células fibroblásticas. y en B, un detalle de la imagen anterior en donde podemos evidenciar, a mayor aumento como la basal que rodea a las células se interrumpe puntualmente (A 5000x y B 15000x)

HERS mostró una intensa positividad para la A1/A3, no observándose diferencias de inmunotinción en función de la localización del epitelio del diafragma, de la vaina o de los restos de Malassez (Figura 21); y los resultados para el Ki67 pusieron de manifiesto que la proliferación de las células epiteliales se produce preferentemente a nivel de HERS y del diafragma, mientras que es escasa a nivel de la red de Malassez (Figura 21).

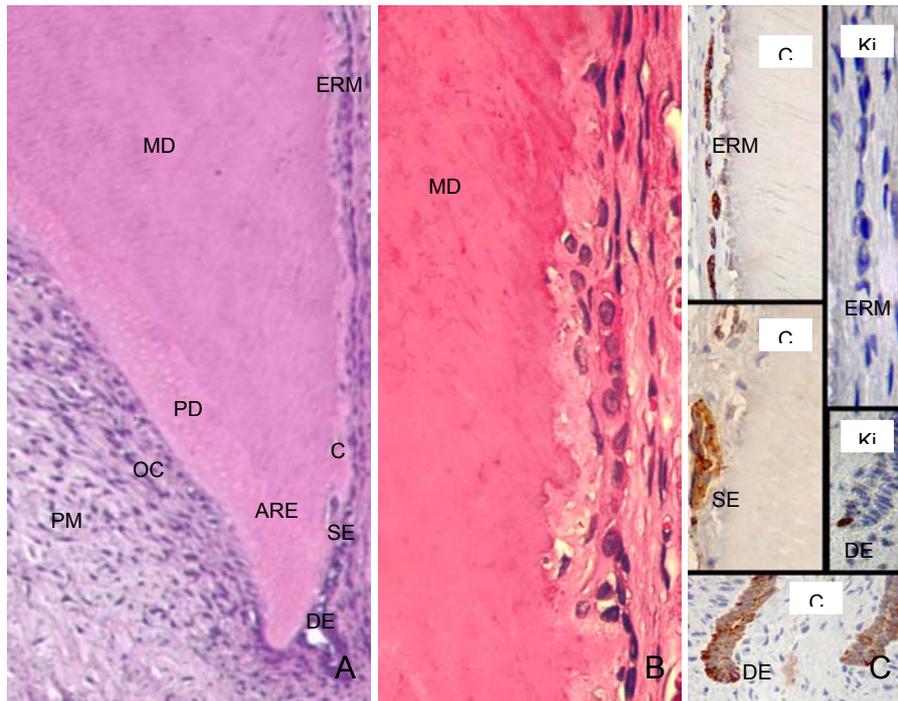


Figura 21

A- Visión a microscopía óptica del extremo de avance radicular (20x, hematoxilina eosina)

B- Aspecto cordonal de los restos epiteliales de Malassez (100x, hematoxilina eosina)

C- Inmunomarcajes para C- queratinas y Ki- Ki 67. Las queratinas marcan específicamente las células de HERS, pero a todos los niveles del mismo, mientras que el Ki67 solo marca aisladas células del diafragma y esta ausente en la red de Malassez (40x, 60x)

Abreviaturas: extremo de avance radicular (ARE), la papilla mesenquimática (PM), los odontoblastos (OC), la predentina (PD), la dentina mineralizada (M D), el cemento en formación (C), los restos epiteliales de Malassez (ERM), la vaina (SE), el diafragma epitelial (DE)

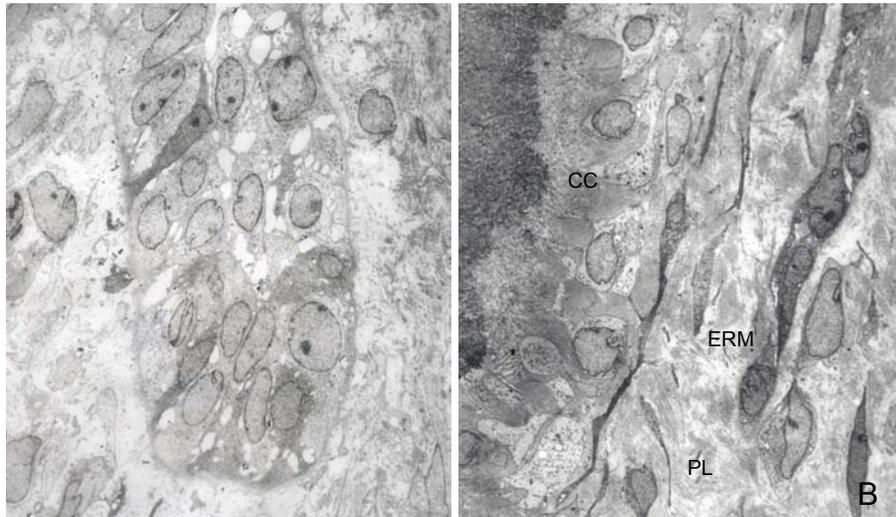


Figura 22

Estudio comparativo de la diversa disposición de las células epiteliales en dos niveles de HERS a nivel de microscopía electrónica

A- Área del diafragma (DE) con aspecto biestratificado y en relación con las células del folículo (FC) y con el tejido pulpar (800x)

B- Área de Malassez con una formación cordonal en relación con el cemento celular (CC) y las estructuras del ligamento periodontal (1000x)

Existen por tanto notables diferencias entre la celularidad de HERS en sus diferentes regiones que se muestran en los dos extremos diafragma y red de Malassez en la figura 23. Estas diferencias son de tipo organizativo, topográficas y citológicas. Y probablemente son la expresión del papel que cada una de las regiones tiene en la rizogénesis. La similitud estructural y la continuidad puntual de algunas de las células de los restos de Malassez con el conjuntivo circundante podrían justificar un papel en continuado de estas células en el mantenimiento del periodonto.

Morfométricamente hemos comprobado una distribución regular de los mismos que en continuidad con HERS se transforma en una malla densa en los niveles radiculares intermedios y se va haciendo más laxa hacia coronal, alejándose al mismo tiempo de la superficie radicular.

Los resultados, que están expresados en micras, tienen significación estadística para la longitud, la superficie que cubren y la distancia a dicha superficie. Y esta asociación significativa es mayor cuando se compara las dos regiones más alejadas la A y la C. El área que ocupan no tiene significación estadística en ninguna de las comparaciones realizadas.

Las abreviaturas utilizadas son: longitud radicular (LR), número de restos epiteliales de malassez (NERM), área (AERM), longitud (LERM), distancia a la superficie radicular (DRE) y superficie radicular cubierta por restos de Malassez (LERM/LR).

En la tabla siguiente se expresa la significación estadística.

ZONA	L R	LERM	LERM/L R	DRE	AERM
A	304,2±6,5	217,9±16,4	71,5±5,4	63,5±23,4	785,4±398,1
B	301,3±2,8	137,8±34,7	45,8±2,0	97,1±29,7	489,7±203,5
C	317,5±5,0	128,8±33,0	40,5±9,6	156,2±10,3	588,4±255,1
ANOVA (p)*	0,01	0,002	0,002	0,006	NS
A vs B (p)*	NS	<0,05	<0,05	NS	NS
A vs C (p)*	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	NS
B vs C (p)*	<0,05	NS	NS	<0,05	NS

(M±DS)* Test de comparación múltiple de Tuckey, con ANOVA

Y a continuación se incluye la tabla con todos los datos recogidos para cada caso. Las mediciones se han realizado en micras.

Caso 1	L R	NERM	AERM	LERM	DRE	LERM/LR
ZONA A-1	301,79	4,00	989,64	218,37	55,66	72,36
ZONA A-2	293,26	3,00	841,50	190,42	64,95	64,93
ZONA B-3	294,92	4,00	345,60	181,99	71,95	61,71
ZONA B-4	299,48	4,00	1133,46	203,78	91,68	68,04
Caso 2						
ZONA A-1	308,87	1,00	1364,76	235,47	43,35	76,23
ZONA A-2	309,79	4,00	1256,94	248,48	42,64	80,21
ZONA B-3	307,21	4,00	532,62	136,03	48,33	44,28
ZONA B-4	302,62	4,00	272,70	68,50	90,07	22,63
ZONA C-5	310,51	3,00	642,06	104,36	83,13	33,61
ZONA C-6	311,37	2,00	421,74	155,16	249,99	49,83
ZONA C-7	320,21	2,00	160,20	56,98	157,66	17,79
Caso 3						
ZONA A-1	315,51	2,00	612,00	255,49	84,97	80,98
ZONA A-2	309,89	4,00	439,02	149,79	77,63	48,34
ZONA B-3	297,19	4,00	343,80	116,16	137,14	39,09
ZONA B-4	304,39	4,00	328,32	142,58	126,72	46,84
Caso 4						
ZONA A-1	305,08	2,00	1024,56	258,09	109,70	84,60
ZONA A-2	300,07	4,00	720,54	170,63	77,04	56,86
ZONA B-3	298,73	3,00	802,62	160,49	92,92	53,72
ZONA B-4	303,61	4,00	547,74	132,65	160,64	43,69
ZONA C-5	318,86	3,00	861,48	152,56	143,51	47,85
ZONA C-6	323,41	5,00	676,26	151,77	154,30	46,93
Caso 5						
ZONA A-1	298,96	1,00	511,92	256,27	32,06	85,72
ZONA A-2	298,85	4,00	354,24	196,22	47,50	65,66
ZONA B-3	448,33	6,00	405,36	134,53	93,19	44,73
ZONA B-4	448,36	3,00	185,58	101,74	58,98	33,43

Consideraciones finales:

- 1- Nuestras observaciones se limitan a la inicial aparición de cementoide sobre la recién formada dentina radicular en los terceros molares con incompleta formación de la raíz.
- 2- Significan la primera evidencia ultraestructural en dientes humanos de una posible transformación epitelio-cementoblástica en estas fases del iniciales del desarrollo radicular.
- 3- Son la primera demostración de mecanismos de muerte celular programada, apoptosis, en el destino evolutivo de HERS para dar lugar a sus porciones de vaina y REM.

El cemento es el tejido mineralizado que cubre la superficie de la raíz del diente. Al esquematizar su caracterización histológica, se le ha definido simplemente como hueso (Levi, 1941), como un tipo de hueso modificado (Orban-Sicher, 1969), o como un tejido singular semejante al hueso (Schroeder, 1991).

El cemento es parecido al hueso por los caracteres de los componentes: fibrosos orgánicos, de la sustancia fundamental, del tipo de sus cristales, de su proceso de desarrollo, de su capacidad reorganizativa, de sus espacios celulares internos y de su composición química (Provenza y Seibel, 1986); sin embargo el cemento destaca por su carácter heterogéneo, su estructura diferente de la ósea, sobre todo en relación con las especializaciones de soporte dentario (cemento acelular), o su singularidad por el hecho ser un tejido duro que siempre se deposita sobre otro tipo de tejido duro, generalmente dentina, y también por tratarse de una estructura avascular (Schroeder, 1991). Nosotros también consideramos que el cemento es un tejido mineralizado singular, cuya semejanza con el hueso es mas aparente que real, el cual en un próximo futuro deberá redefinirse una vez conocidos detalladamente sus caracteres y sobre todo aclarada su histogenie.

El cemento se relaciona externamente con la membrana peridentaria, donde presenta una capa no mineralizada de cementoide o precemento, e internamente con la dentina radicular formando con ella la interfase denominada unión cemento-dentinaria. En base a la ausencia o presencia de células incluidas en la matriz mineralizada, se reconocen dos tipos de cemento: acelular y celular, pero también se clasifica como de fibras intrínsecas o extrínsecas, dependiendo de que posea fibras colágenas formadas respectivamente por cementoblastos o

fibroblastos, a la manera de fibras de Sharpey (Jones, 1981; Schroeder, 1986). La formación y el crecimiento del cemento es la cementogénesis. Semejante a la osteogénesis, el cemento es formado aposicionalmente por células especializadas, los cementoblastos, que fabrican una matriz rica en colágeno, el citado cementoide o precemento, que posteriormente se mineraliza. Pero a diferencia del hueso, el cemento normalmente no se remodela.

En el cemento las fases de crecimiento aposicional alternan con las de reposo, pero no con las de resorción, pudiendo considerarse que el cemento es un tejido de crecimiento continuo (Davis, 1986).

En la odontogénesis, la cementogénesis esta ligada con el desarrollo de la raíz la cual comienza inmediatamente después de haberse formado todo el esmalte y con el la dentina coronaria. Los epitelios dentarios interno y externo del asa cervical, proliferan y crecen para formar una especie de manguito epitelial cuyo extremo apical cierra parcialmente al tejido de la papila dentaria. Esta vaina diafragmada, es conocida globalmente como epitelio radicular de Hertwig y su crecimiento determina la forma, el tamaño y también el número de las raíces (Osborn y Ten Cate, 1976; Schroeder, 1986; Provenza y Seibel, 1986).

En cuanto a los **procesos de inducción** que por parte del epitelio radicular se produce sobre la papila, nuestros resultados, acordes con la literatura, lo evidencian. Las células epiteliales internas del diafragma inducen cambios en las células periféricas de la papila dentaria, conducentes a su diferenciación odontoblástica, adquiriendo la capacidad de elaborar y secretar matriz de dentina. La formación de la predentina radicular por los odontoblastos y también su mineralización se produce de forma

semejante a como ya ocurrió en los niveles coronarios (Avery, 1994 y 2002). Con el crecimiento de la matriz dentinaria radicular, se produce una nueva situación en la odontogénesis. El epitelio dentario interno, determinante para el desarrollo de la primera preentina radicular, al producirse esta, no se diferencia en sentido ameloblástico, como ocurría en la corona. En consecuencia, sobre la dentina radicular recién formada no se produce esmalte, pero se origina un nuevo tejido: el cemento.

Así pues la cementogénesis temprana o cementogénesis inicial, es la formación del primer cemento sobre la superficie externa de la dentina en relación con el extremo de avance apical de las raíces en desarrollo. La mayor parte de los conocimientos ultraestructurales sobre la cementogénesis inicial, han sido obtenidos por investigaciones en dientes de animales de experimentación con raíces en fase de formación.

Principalmente son estudios realizados en roedores, particularmente en molares de ratón (Selvig, 1963,1964 y 1967; Tomas y Collar, 1988; Somerman, 1990; MacNeil, 1993 y 1994), de rata (Bosshardt, 1997; Cho y Garant, 1988; Lester, 1969; Owens, 1979; Painter y Pudy, 1958; Stern, 1964; Yamamoto, 1986 y 1991) aunque también se han realizado estudios de esta naturaleza en perros (Owens, 1978,) cerdos (Bosshardt, 1995 y 2004; Suzuki, 2003) y en el hombre (Selvig, 1965; Furseth, 1967,1969 y 1974; Bosshardt y Schroeder 1991 a, b y 1992; Yamamoto, 1998).

Los resultados obtenidos y las interpretaciones de los mismos, no son totalmente concordantes. Así el análisis global comparativo, puede ser interpretado en el sentido de que la cementogénesis en la rata difiere de la que se produce en el

hombre y también en el perro (Cho y Garant, 1996). Sin embargo, es probable que las diferencias estén principalmente basadas en la velocidad de crecimiento y en el tamaño dentario. El primer molar de la rata, está en funcionamiento a las 3 semanas de haber iniciado su formación. La cementogénesis inicial y la formación de las fibras del ligamento peridentario ocurre simultáneamente. Consecuentemente la determinación del origen de los cementoblastos puede ser complicado (Bosshardt y Schroeder, 1996; Diekwisch, 2001). Mientras que en los premolares humanos, cuyo desarrollo radicular y la cementogénesis inicial dura un promedio de 5-7 años, la formación del cemento esta caracterizada por una larga fase prefuncional (Bosshardt y Schroeder, 1996).

Algo similar cabía esperar en nuestros casos. Efectivamente la velocidad de crecimiento radicular de los terceros molares una vez alcanzada mas de la mitad de su longitud total, es de 0,94 milímetros al año, y la desviación estándar de 0,51. Por ello estas piezas alcanzan su desarrollo radicular completo alrededor de los 20-21 años, siendo su longitud radicular entre 11-14 milímetros y tras unos 10 años de conformación, crecimiento y maduración. Las diferencias encontradas en cuanto a la velocidad se justifica por el hecho de que la longitud radicular de los especimenes estudiados variaba entre el 60-80% respecto a la longitud esperada y la velocidad de incremento que se enlentecía cuanto mayor era la longitud inicial.

Nosotros, basándonos en que el lento crecimiento radicular, puede ser un factor de simplificación, y al plantearnos estudiar la cementogénesis inicial humana, elegimos como modelo analizar el problema en los terceros molares con incompleta formación de la

raíz. Además, estas piezas son dientes accesionales, diferentes de los dientes de reemplazo premolares, en ellos no se ha estudiado la cementogénesis, y son la oportunidad de analizar un proceso embrionario en adultos jóvenes.

La histogénesis del cemento radicular ha sido motivo de opiniones diversas desde su descubrimiento inicial. Purkinje, que en gran medida contribuyó a su demostración y caracterización microscópica (Denton, 1939), supuso para el cemento un origen por osificación del folículo dentario (Henle, 1843), es decir un naturaleza conectiva; sin embargo Raschkow, cuya tesis doctoral sobre el desarrollo de los dientes en los mamíferos dirigió Purkinje, consideró que el cemento se producía a partir de los restos de la pulpa del esmalte (Raschkow, 1835; Treviño, 1873), asignándole por tanto un origen epitelial.

La existencia de opiniones enfrentadas sobre la cementogénesis, particularmente en relación con la influencia o participación del epitelio dentario en el origen del cemento, ha sido por tanto una constante histórica mantenida hasta el presente. Sin embargo, desde el principio, los mas relevantes autores de la ciencia histológica, coinciden en considerar al cemento como un especial tejido conjuntivo mineralizado, semejante al hueso, asignando para el un proceso histogenético semejante (Henle, 1843; Mandl, 1843; Kölliker, 1868).

Huxley estableció en 1853 una descripción exacta de la vaina formadora del diente; Oscar Hertwig en 1874, en un estudio anatómico comparativo realizado en anfibios, reconoció el carácter epitelial de la vaina (citado por Hoffmann-Axthelm, 1981); y von Brunn en 1887, 1891 que la estudio y determinó su significado en los mamíferos, fue el primero en indicar, relacionado con la cementogenesis, la previa resorción de la vaina epitelial (citado por Recadot y Weill, 1966).

En la actualidad la opinión ampliamente predominante es considerar al cemento un derivado del saco dentario como inicialmente indicara Purkinje ("Purkinje presume que la capa cortical de la raíz debe su origen a la osificación del folículo" Henle, 1843), no por transformación directa como supusiera este autor, sino a la manera de los depósitos periósticos del hueso (Kölliker, 1868). La contemporización de estas ideas es considerarlo de origen mesenquimático (Provenza y Seibel, 1986), o matizar su probable naturaleza ectomesenquimática (Ten Cate, 1996; Davis, 1986; Heritier, 1989).

Así pues según la teoría clásica, los cementoblastos son considerados células diferenciadas formadas a partir de células mesenquimáticas, o ectomesenquimáticas, indiferenciadas del saco o folículo dentario. Estas células carecen de marcadores específicos, por lo que solo se las puede evidenciar en zonas activas de cementogénesis, por su ubicación en relación con la superficie cementoidea. Estrictamente solo se esta seguro de su naturaleza cementaria cuando quedan englobados en la matriz en forma de cementocitos, pues a nivel de la superficie cementoidea puede tratarse de cementoblastos o de fibroblastos, y si son indiferenciadas puede tratarse de antecesores comunes o específicos. Así es frecuente que se considere que los fibroblastos de la membrana peridentaria poseen la capacidad de formar cemento (Beertsen y Everts, 1990; Schroeder, 1986).

La microscopia electrónica al respecto solo puede evidenciar si las células presentan o no, en su citoplasma, el aparataje organular propio de las células elaboradoras de matriz colagénica, y en este sentido las células cementoblásticas son "fibroblast-like" (Cho y Garant, 1996)

La cementogénesis inicial según la teoría clásica, actualizada, se produce siguiendo la siguiente secuencia (Gottlieb, 1942; Orban, 1944; Diekwisch, 2001; Garant, 2003):

- (1) proliferación de vaina radicular;
- (2) diferenciación de los odontoblastos a partir de las células periféricas de la pulpa primitiva;
- (3) deposición de la matriz dentinaria;
- (4) disrupción o desintegración de la vaina epitelial radicular (anterior a la deposición de cemento);
- (5) diferenciación de los cementoblastos por interacción entre matriz y células (matriz dentinaria – células mesenquimales del folículo dentario);
- (6) deposición inicial de cemento por los cementoblastos.

Así, el dogma clásico de la cementogénesis establece que la matriz cementaria se deposita sobre la superficie externa solo cuando las células mesenquimáticas del saco dentario acceden a dicha superficie, es decir, cuando desaparece la barrera de la vaina epitelial por degeneración, desintegración o disrupción.

En nuestra opinión, fundamentada en nuestra experiencia sobre cementogénesis humana, las tres primeras afirmaciones reflejan datos objetivos, que parecen ser incuestionables aplicados a la cementogénesis humana. Pero el resto de las afirmaciones son cuando menos observaciones sujetas a variaciones, dependiendo del animal y de la interpretación del observador.

Comencemos por la disrupción o desintegración de HERS (Vaina radicular epitelial de Hertwig). Nosotros no estamos en condiciones de analizarlo en todas las especies. Pero si creemos poder indicar lo que ocurre en los terceros molares humanos. En

nuestros casos, la diferenciación odontoblástica esta relacionada con el epitelio interno del diafragma y en esto coincidimos con lo indicado en la literatura (Garant, 2003), Pero a partir de la deposición inicial de la matriz dentinaria en relación con el epitelio interno, nuestros datos son distintos de lo indicado hasta el presente. Cuando se inicia la formación de la dentina radicular, se producen cambios en la vaina radicular relacionada. Estos cambios han sido poco estudiados en los dientes humanos (Furseth y Mjör, 1979).

La cementogénesis en el hombre ha sido minuciosamente estudiada en lo que respecta a la formación del cemento acelular de fibras extrínsecas y células de fibras extrínsecas (Bosshardt y Schroeder 1991 a, b, 1992), pero la relación entre HERS y la cementogénesis inicial ha sido poco analizada. En los dientes bicúspides en formación se indica que no existen signos de migración de células a través de la vaina radicular, ni tampoco signos de desintegración o resorción de la vaina de Hertwig (Bosshardt y Schroeder 1991 a,b, 1992), Sin embargo se indica que la vaina radicular de Hertwig no cubre la dentina recién formada sino que se desvía inmediatamente del extremo de avance de la raíz en formación (Schroeder 19XXX, Bosshardt y Schroeder 1991 a, b, 1992). Consecuentemente esta separación significa para ellos que las células del tejido conjuntivo pueden acceder a la superficie externa de ARE (Bosshardt y Schroeder, 1992).

Nosotros tampoco hemos encontrado signos de migración de células conjuntivas foliculares a través de HERS, ni tampoco signos de desintegración de HERS. Por el contrario, en nuestros casos el epitelio interno de HERS, inmediato a ARE, como indican Furseth y Mjör (1979), sufre cambios, pero estos cambios son los

conducentes a la **transdiferenciación** o transformación de las células epiteliales en células con morfología propia de la secreción de matriz colagénica. Hay por tanto una transición epitelio-cementoide, que además se produce de una manera rápida, en escasas micras. Nosotros creemos que nuestros preparados, tanto los correspondientes a secciones semifinas de control, observadas con microscopia de luz como las secciones ultrafinas, observadas en microscopia electrónica son ilustrativas de lo indicado. No se trata de una observación aislada o un hallazgo afortunado. Es una observación repetitiva que hemos encontrado en todos los casos.

Nuestras observaciones dan la respuesta a las opiniones manifestadas repetidamente por numerosos autores. Quien mas certeramente intuyó los resultados de nuestros casos ha sido Thomas, que señalo, estudiando la cementogénesis murina, la posibilidad de una transición epitelio mesenquimal (Thomas, 1995). Schroeder considera que los precementoblastos pueden constituir un pool de células en división que quedan localizadas en la vaina epitelial de Hertwig desviada y que ganan la superficie de la raíz en desarrollo cuando los cementoblastos son necesarios para formar el cemento (Schroeder, 1992). ¿Y que mejor "pool" que el propio epitelio, ni mejor efectividad que no exista desviación de la vaina radicular y esta realice directamente sobre la superficie de la dentina radicular recién formada su transformación?. Su morfología estrellada, semejante a fibroblastos activos ha sido acertadamente descrita (Beertsen y Everts, 1990; Bosshardt, 1990, 1991, 2005), pero probablemente no sea un único tipo celular.

Según los estudios de McCulloch se tratan de varias subpoblaciones que participan activamente en el correcto funcionamiento del periodoncio de inserción, cemento y ligamento

peridentario (McCulloch, 1991). No es por tanto de extrañar que incluso en el desarrollo del cemento y el ligamento esta diversidad celular este ya presente; varios tipos celulares y cuyo origen puede ser por tanto diferente.

En los seres vivos, desde el inicio de su existencia, existe un equilibrio entre reproducción celular o mitosis y apoptosis. Durante el desarrollo embriológico la mitosis predomina sobre la apoptosis. Alcanzada la madurez orgánica, mitosis y apoptosis se equilibran manteniendo la homeostasis tisular. Las peculiaridades celulares de cada órgano o tejido, hacen que existan grandes diferencias dentro del propio organismo y que además están relacionadas con la edad.

Por lo que se refiere a la existencia de fenómenos de muerte celular programada o **apoptosis** en el epitelio radicular durante la rizogénesis, nuestras aportaciones son las primeras de las que tenemos conocimiento.

La capacitación de las células del epitelio hacia elementos secretores colagénicos no es homogénea. Se da en la región de la vaina y fundamentalmente en algunas de las células del epitelio interno; mientras que las del externo fundamentalmente se mantienen íntegras y marcando el límite del compartimento cementogénico, sin interrupciones. Las internas que no se capacitan así como las intermedias sufren evidentes signos de apoptosis en los casos por nosotros estudiados.

En relación a la zona de Malassez se ha descrito que durante el desarrollo dentario algunas células de HERS podrían quedar incorporadas en el cemento, mientras que la mayoría

quedan en el ligamento a modo de islotes formando los grupos o restos de Malassez (Hamamoto et al., 1989; Ten Cate, 1996).

La morfogénesis y distribución de estos restos epiteliales han sido bien estudiados en los molares de rata (Hamamoto et al., 1989; Kat et al., 2003) y se conoce que tras la erupción su número disminuye (Wesselink y Beersten, 1993; Sterrett et al., 1993).

Respecto a su distribución, nuestros resultados no están de acuerdo con los mencionados trabajos de Wesselink que afirma que la distribución es homogénea a lo largo de la raíz dentaria. En nuestro estudio la distribución a modo de red densa en la región más apical se vuelve más laxa y alejada de la superficie hacia coronal.

Morfológicamente ni en nuestros estudios ni en la revisión bibliográfica, hay diferencias entre los ERM recién formados y por tanto próximos a HERS y los del área supracrestal. Sin embargo se evidencian diferencias biológicas en relación con la expresión de calbindina (Onishi, 2003).

Los restos de Malassez responden al los estímulos mecánicos y así durante los movimientos dentarios experimentales se observa un aumento de la división celular (Talic et al., 2003). También secretan proteínas como la osteopontina y la ameloblastina; lo que sugeriría un interesante papel relacionado con fases embriológicas de las células de la vaina (Hasegawa et al., 2003). Probablemente dicha actividad este mediada por integrinas (Talic et al., 2004).

Y si bien su papel en el periodonto adulto sigue siendo discutido (Gotz et al., 2003; Shimono et al., 2003; Tadokoro et al., 2002), cabe destacar que en ratas Yamashiro afirma que tendrían

una cierta actividad relacionada con la inervación sensorial del ligamento.

Otras funciones fisiológicas de los mismos apuntan hacia el mantenimiento del periodonto de inserción y la prevención de la anquilosis (Wallace y Vergona, 1990; Wesselink y Beersten, 1993) y en particular la reparación del cemento (Mouri et al., 2003). Importantes a nuestro entender son los trabajos de Fujiyama, publicados en 2004, que sugieren un papel de estas células en los mecanismos de resorción radicular y la inducción de la formación de cemento acelular.

De entre su papel en la patología se han relacionado con la formación de quistes (Philipsen et al., 2004) y tumores odontogénicos.

Tras la revisión de la literatura que hemos realizado concluimos que el nuestro es un trabajo de gran interés en relación a la morfogénesis y la distribución de los restos de Malassez humanos y su relación con HERS. Fundamentalmente apoyarían un papel activo de dicha red epitelial, y que estaría más cerca del que HERS tiene en la rizogénesis y muy lejos del que le otorgaría ser un simple resto vestigial.

Posiblemente nuevas investigaciones en esta línea van a permitir ahondar en un uso potencial de estas células epiteliales del periodonto de inserción en las terapias regenerativas en la patología del periodonto de inserción como se apunta ya en recientes trabajos (Thesleff y Tummers, 2004; Chai y Slavkin, 2003).

De nuestros resultados se puede concluir que:

- (1) En los niveles del diafragma el papel del epitelio radicular es fundamentalmente inductor de la papila mesenquimática para la formación de la dentina.
- (2) La dentina radicular recién formada esta cubierta por la vaina radicular de Hertwig, cuyas células epiteliales internas sufren una transformación epitelio-mesenquimal.
- (3) La transdiferenciación de estas células hacia una variante secretora comporta la inicial formación de cementoide sobre la matriz de dentina aun no mineralizada. Esta temprana formación de cementoide se inicia sobre el eje de avance radicular e implica un rápido engrosamiento a lo largo de los primeros 100-200 micrómetros hacia coronal del mismo.
- (4) Ponemos de manifiesto la continuidad del epitelio radicular en sus tres diferentes regiones: el diafragma, la vaina y el área de Malassez. Evidenciamos que la estructura y ultraestructura epitelial, así como el inmunofenotipo se mantiene en todas las regiones. Mientras que en la zona del diafragma se demuestra que se produce la renovación epitelial en la región de la vaina radicular se describen cambios apoptóticos.
- (5) Y demostramos que la zona de REM, se trata de un epitelio en forma de red fenestrada muy densa en las regiones próximas a la vaina y más laxa y alejada de la superficie dentaria en su trayecto hacia coronal.

- Aristoteles: Partes de los Animales. Traducción: E. Jiménez y A Alonso. Editorial Gredos, Madrid, 2000.
- Aukhil F. The potencial contribution of cell and molecular biology to periodontal tissue regeneration. *Periodontology and restaurative dentistry*, 5: 91-96, 1992.
- Avery J. *Oral Development and Histology* (2 edición). Thieme Medical Publishers, New York, 1994.
- Avery JK. Development of the Teeth: Root and Supporting Structures. In: Avery JK (Ed) *Oral Development and Histology* (3 edición). Thieme, New York, 2002.
- Baskar SN. *Orban's Oral Histology and Embriology* (11 edición). Mosby, St. Louis, 1991.
- Beertsen W y Everts V. Formation of acellular root cementum in relation to dental and non-dental hard tissues in the rat. *J Dental Res*, 69:1669-1673, 1990.
- Bosshardt DD y Schroeder HE. Evidence for rapid multipolar and slow unipolar production of human cellular and acellular cementum matrix with intrinsic fibers. *J Clin Periodontol*, 17:663-668, 1990.
- Bosshardt DD y Schroeder HE. Initiation of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light and electron microscopic study. *Cell Tissue Res*, 263:311-324, 1991.
- Bosshardt DD y Schroeder HE. Establishment of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light and electron microscopic study. *Cell Tissue Res*, 263:325-336, 1991.
- Bosshardt DD y Schroeder HE. Initial formation of cellular intrinsic fiber cementum in developing on human teeth: a light and electron microscopic study. *Cell Tissue Res*, 267:321-335, 1992.
- Bosshardt DD y Schroeder HE. Attempts to label matrix synthesis of human root cementum in vitro. *Cell Tissue Res*, 274:343-352, 1993.
- Bosshardt DD, Zalzal S, Mckee MD y Nanci A. Immunocytochemical and lectin gold characterization of human and porcine cementum. *J Dental Res*, 74:24, 1995.

- Bosshardt DD y Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec*, 245:267-292, 1996.
- Bosshardt DD y Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000, 13:41-75, 1997.
- Bosshardt DD y Nanci A. Immunodetection of enamel and cementumrelated (bone) proteins at the enamelfree area and cervical portion of the tooth in rat molars. *J Bone Miner Res*, 12:367-379, 1997.
- Bosshardt DD y Nanci A. Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem*, 46:135-142, 1998.
- Bosshardt DD y Nanci A. Immunocytochemical characterization of ectopic enamel deposits and cementicles in human teeth. *Eur J Oral Sci*, 111:51-59, 2003.
- Bosshardt DD y Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol*, 31:184-192, 2004.
- Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res*,84:390-406, 2005.
- Bosshardt DD, Degen T y Lang NP. Sequence of protein expression of bone sialoprotein and osteopontin at the developing interface between repair cementum and dentin in human deciduous teeth. *Cell Tissue Res*,320: 399-407, 2005.
- Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*, 35:87-105, 2008.
- Brice GL, Sampson WJ y Sims MR. An ultrastructural evaluation of the relationship between epithelial rests of Malassez and orthodontic root resorption and repair in man. *Aust Orthod J*, 12:90-94, 1991.
- Brunn A von. Ueber die Ausdehnung des Schmelzorganes und seine Bedeutung für die Zahnbildung (The Extension of the Enamel Organ and Its Significance in Tooth Development). *Arch. F. mikr. Anat.* 29:367-383 and plates XXI and XXII, 1887.

- Brunn A von. Beiträge zur Kenntniss der Zahnentwicklung. Arch Mikrosk Anat, 38:142-156, 1891.
- Butler PM. Ontogenetic aspects of dental evolution. Int J Dev Biol, 39:5-34, 1995.
- Chai Y y Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. Microscopy Research & Technique 60:469-479, 2003.
- Cho MI y Garant PR. Ultrastructural evidence of direct cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. J Periodontal Res, 23: 268-276, 1988.
- Cho MI y Garant PR. Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat. Anat Rec, 245:342-360, 1996.
- Davis WL. Histología y Embriología Bucal. Editorial Interamericana. Mexico, 1986.
- Denton GH. The discovery of the cementum. J Dent Res, 18: 239, 1939.
- Diamond M y Appelbaum E. The epithelial sheath: its functional cycle. J Dent Res, 23: 45-50, 1944.
- Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. Int J Dev Biol; 45: 695-706, 2001.
- Ebner von. Histologie der Zahnë mit einschluss der histogenese. En : Handbuch der Zahnheilkunde, J Scheff (ed). Hölder, Wien (3 edición), 240-309, 1909.
- Ebner von. Histologie der Zahnë mit einschluss der histogenese. En : Handbuch der Zahnheilkunde, J Scheff (ed). Hölder, Wien (Cuarta edición), 325-399, 1922.
- Eustachi B. Libellus de dentibus. Venetiis 1563. A little treatise on the teeth. English latin eds. Thomas JH. Watson Publishing International, Ney work, 1999.
- Fujiyama K, Yamashiro T, Fukunaga T, Balam TA, Zheng L, y Takano-Yamamoto T. Denervation resulting in dento-alveolar

ankylosis associated with decreased Malassez epithelium. *J Dent Res*, 83: 625-629, 2004.

Furseth R. A microradiographic and electron microscopic study of the cementum of human deciduous teeth. *Acta Odontol Scand*, 25:613-645, 1967.

Furseth R. The fine structure of the cellular cementum of young human teeth. *Arch Oral Biol*, 14:1147-1158, 1969.

Furseth R. The fine structure of the acellular cementum in young human teeth. *Scand J Dent Res*, 82:437-441, 1974.

Furseth R y Mjör IA. Cementum. En: Mjör IA and Fejerskov O (Eds). *Histology of the Human Tooth*. Muksgaard, Copenhagen, 1979.

Garant PR. Root formation and cementogenesis. En: *Oral cells tissues*. Quintessence Publishing Co, Chicago, 2003.

Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A. *Histología, Embriología Bucodental e Ingeniería tisular* (3 edición). Editorial Panamericana. Madrid, 2009.

Gottlieb B. Biology of the cementum. *J Periodontol*, 13:13-19, 1942.

Götz W, Lossdörfer S, Krüger U, Braumann B y Jäger A. Immuno histochemical localization of insuline-like growth factor-II and its binding protein-6 in human epithelial cells of Malassez. *Eur J Oral Sci*, 111: 26-33, 2003.

Guerini V. *A History of Dentistry From the Most Ancient Times Until the end of the Eighteenth Century*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1909.

Hamamoto Y, Nakajima T y Ozawa H. Ultrastructural and histochemical study on the morphogenesis of epithelial rests of Malassez. *Arch Histol Cytol*, 52:61-70, 1989.

Hammarstrom L, Alatli I y Fong CD. Origins of cementum. *Oral Dis*, 2:63-69, 1996.

Hasegawa N, Kawaguchi H, Ogawa T, Uchida T y Kurihara H. Immunohistochemical characteristics of epithelial cell of rests of

- Malassez during cement repair. *J Periodontal Res*, 38:51-56, 2003.
- Hay ED. Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. En: *Cell biology of extracellular matrix*. ED Hay Ed. Plenum Press, New York, 1991.
- Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*, 154: 8-20,1995.
- Henle J. *Tratado Completo de Anatomía General o Historia de los Tejidos y de la Composición Química del Cuerpo Humano*. Viuda de Jordán e Hijos, Madrid, 1843.
- Heritier M, Dangleterre M y Bailliez Y. Ultrastructure of a new generation of odontoblasts in grafted coronal tissues of mouse molar tooth germs. *Arch Oral Biol*, 34:875-883, 1989.
- Hertwig O. Über Bau und Entwicklung der Placoidschuppen und Zähne der Selachier. *Jena Zschr Natirw*, 8:330-402, 1874.
- Hoffmann RL. Formation of periodontal tissues around subcutaneously transplanted hamsters molars. *J Dental Res*, 39:781-798, 1960.
- Hoffmann-Axthelm W. *History of Dentistry*. Quintessence Publishing Co, Chicago, 1981.
- Hopewell-Smith A. *The histology and pathohistology of the teeth and associated parts*. Dental manufacturing Co, London, 1903.
- Huxley Th H. On the development of the teeth, and on the nature and import of Nassmyth's "Persisten Capsule". *Kart J microsc Sc*, 1:149-164, 1853.
- Jones SJ. Cementum. En: *Dental Anatomy and Embriology*. JW Osborn Ed. Blackwell Scientific, Boston, 1981.
- Kagayama M, Sasano Y, Zhu UJ, Hirata M, Mizoguchi I y Kamaku Y. Epithelial rests colocalize with cementoblast forming acellular cementum but not with cementoblast forming cellular cementum. *Acta Anat (Basel)*, 163:1-9, 1998.

- Kaneko H, Hshimoto S, Enokiya Y, Ogiuchi H y Shimono M. Cell proliferation and death of Herwig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res*, 298: 95-103, 1999.
- Kat PS, Sampson WJ, Wilson DF y Wiebkin OW. Distribution of the epithelial rest of Malassez and their relationship to blood vessels of the periodontal ligament during rat tooth development. *Aust Orthod J*, 19: 77-86, 2003.
- Kölliker A. *Elements d'Histologie Humaine*. Masson, Paris, 1868.
- Kotanyi. Cementum. In: *Oral Histology and Embryology*, Orban B (Ed). The CV Mosby Company, ST Louis, 1944.
- Kronfeld R. The biology of cementum. *J Am Dent Ass*, 25:1451-1461, 1938.
- Lester KS. The unusual nature of root formation in molar teeth of the laboratory rat. *J Ultrastruct Res*, 28:481-506, 1969.
- Lester KS. The incorporation of epithelial cells by cementum. *J Ultrastruct Res*, 27:63-87, 1969.
- Lester KS y Boyde A. Scanning electron microscopy of developing roots of molar teeth of the laboratory rat. *J Ultrastruct Res*, 33:80-94, 1970.
- Levi G. *Tratado de Histología*. Labor, Barcelona, 1941.
- McCulloch CAG y Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in the periodontal physiology and pathology. *J Periodontol Res*, 26:144-154, 1991.
- MacNeil RL y Thomas HF. Development of the murine periodontium. I. Role of basement membrane in formation of a mineralized tissue on the developing root dentin surface. *J Periodontol*, 64:95-102, 1993.
- MacNeil RL y Thomas HF. Development of the murine periodontium. II. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. *J Periodontol*, 64:285-291, 1993.

- MacNeil RL y Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontal Res*, 28:550-559, 1993.
- MacNeil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW y Somerman MJ. Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J Bone Miner Res*, 9:1597-1606, 1994.
- Mandl L. *Manuel d'Anatomie Générale appliquée a la Physiologie et a la Pathologie*. JB Bailliere, Paris, 1843.
- Mouri Y, Shiba H, Mizuno N, Noguchi T, Ogawa T y Kurihara H. Differential gene expression of bone-related proteins in epithelial and fibroblastic cells derived from human periodontal ligament. *Cell Biol Int*, 27:510-524, 2003.
- Mummery JH. *The Microscopic & General Anatomy of the Teeth Human and Comparative* (2 edición). Oxford University Press, London, 1924.
- Nasmyth A. *Researches of the development, structure and diseases of the teeth*. Jhon Churchill, London, 1839.
- Nanci A y Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000, 40:11-28, 2006.
- Onishi T, Okaya R, Murakami H, Ogawa T, Ooshima T y Wakisaka S. Immunolocalization of calbindin D28K and vitamin D receptor during root formation of murine molar teeth. *Anat Rec*, 273:700-704, 2003.
- Orban BJ. Cementum. En: *Oral Histology and Embriology*. Ed. By Orban. CV Mosby. St Louis, 1944.
- Orban BJ. The epithelial network in the periodontal membrane. *J Am Dent Ass*, 44:632-635, 1952.
- Orban BJ y Sicher H. *Histología y embriología bucales de Orban*. H Sicher Ed. La Prensa Medica Mexicana, México, 1969.
- Osborn JW y Ten Cate AR. *Advanced Dental Histology*. John Wright & Sons ED, Bristol, 1976.
- Owens PDA. Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol*, 23:91-104, 1978.

- Owens PDA. A light and electron microscopic study of the early stages of root surface formation in molar teeth in the rat. *Arch Oral Biol*, 24:901-907, 1979.
- Paynter KJ y Pudy G. A study of structure, chemical nature and development of cementum in rat. *Anat Rec*, 131:233-251, 1958.
- Philipsen HP, Reichart PA, Ogawa I, Swei Y y Takata T. The inflammatory paradental cyst: a critical review of 342 cases from a literature survey, including 17 new cases from the author's files. *J Oral Pathol Med*, 33:147-155, 2004.
- Pitaru S, McCulloch CAG y Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res*, 29:81-94, 1994.
- Portal A. *Curso de Anatomía Medica o Elementos de la Anatomía del Hombre*. Real Arbitrio, Madrid, 1806.
- Provenza DV y Seibel W: *Oral Histology* (2 edición). Lea & Febiger, Philadelphia, 1986.
- Raschkow I. *Meletemata circa mammalium dentium evolutionem*. Med Diss, Breslau, 1835.
- Recadot J y Weil R. *Histologie dentaire. Estructure et development de l'organe dentaire*. Masson, Paris, 1966.
- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, 17:208-212, 1963.
- Schroeder HE. The periodontium. En: *Handbook of Microscopic Anatomy*. Ed. Oksche and Vollrath. Springer Verlag, Berlin, 1986.
- Schroeder HE. Development and structure of the tissues of the tooth. En: *Oral Structural Biology*. HE Schroeder. Ed. Thieme, New York, 1991.
- Schroeder HE. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol*, 142:1-59, 1992.

- Selvig KA. Electron microscopy of Hertwig's epithelial sheath and of early dentine and cementum formation in the mouse incisor. *Acta Odontol Scand*, 21:175-186, 1963.
- Selvig KA. An ultrastructural study of cementum formation. *Acta Odontol Scand*, 22:105-120, 1964.
- Selvig KA. The fine structure of human cementum. *Acta Odontol Scand*, 23: 423-441, 1965.
- Selvig KA. Studies on the genesis, composition and fine structure of Cementum. Universitetsforlaget, Bergen, 1967.
- Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaky H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K y Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech*, 60:491-502, 2003.
- Slavkin HC. Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. *Cementogenesis. J Periodontol*; 47:249-255, 1976.
- Somerman MJ, Shroff B, Agraves WS, Morrison G, Craig AM, Denhardt DT, Foster RA y Sauk JJ. Expression of attachment proteins during cementogenesis. *J Biol Buccale*; 18:207-214, 1990.
- Stahl SS y Slavkin HC. Developmental aspects of oral biology. Slavkin HC y Bavetta L Eds, New York, 1972.
- Stern IB. An electron microscopic study of the cementum, sharpey's fibers and periodontal ligament in the rat incisor. *Am J Anat*, 115:377-409,1964.
- Sterrett JD, Lindhe J y Berglundh T. Epithelial remnants in the crestal periodontium of the dog. *J Clin Periodontol*, 20:109-116, 1993.
- Suzuki M, Inoue T Simono M y Yamada S. Behaviour of epithelial tooth root formation in porcine molars: Tunel, TEM and immuno histochemical studies. *Anat Embryol*, 206:13-20, 2002.
- Tadakoro O, Maeda T, Heyerans K, Vandevska-Radunovic V, Kozawa Y y Hals Kvinnsland I. Merkel-like cells in Malassez epithelium in the periodontal ligament of cats: an immunohistochemical, confocal laser scanning and

immunolectron-microscopic investigation. *J Periodontal Res*, 37:456-463, 2002.

Talic NF, Evans CA, Daniel JC y Zaki AE. Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 123:527-533, 2003.

Talic N, Evans C, Daniel J, George A y Zaki AM. Immunohistochemical localization of $\alpha\beta 3$ integrin receptor during experimental rooth movement. Proliferation of epithelial rest of Malassez during experiemental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Ortop*, 125:178-184, 2004.

Thesleff I y Tummers M. Stem cells and tissue engineering: prospects for regenerating tissues in dental practice. *Medical Principles & Practice*, 12 Suppl 1:43-50, 2004.

Ten Cate AR. The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support. *Oral Dis*, 2:55-62, 1996.

Tenorio D. Cruchley A y Hughes FJ. Immunocytochemical investigation of the rat cementoblast phenotipe. *J Periodontal Res*, 28:411-419, 1993.

Thomas HF y Kollar EJ. Tissue interactions in normal murine root development. En: *The biological mechanisms of the root eruption and root resorption*. Z. Davidovitch. Ed. EBSCO Media, Birmingham, 1988.

Thomas HF y Kollar EJ. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol*, 34:27-35, 1989.

Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol*, 39:231-237, 1995.

Tomes Ch. S. *A Manual of Dental Anatomy Human and Comparative*. Churchill, London, 1898.

Triviño C. *El Cirujano Dentista*. Imprenta de Diego Valero, Madrid, 1873.

Trubiani O, Isgro A, Zini N, Antonucci I, Aiuti F, Di Primio R, Nanci A, Caputi S y Paganelli R. Functional interleukin-7/interleukin-7 Ralpha, and SDF-1alpha/CXCR4 are expressed by human

periodontal ligament derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 214:706-713, 2008.

Ustrell JM. *Història de l'Odontologia*. Ed. UB, Barcelona, 2000.

Yamamoto T. The innermost layer of cementum in rat molars: its ultrastructure, development, and calcification. *Arch Histol Jpn*, 49:459-481, 1986.

Yamamoto T y Wakita M. The development and structure of principal fibers and cellular cementum in rat molars. *J Periodont Res*, 26:129-137, 1991.

Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Islam NM, Suzuki R y Wakita M. The regulation of fiber arrangement in advanced cellular cementogenesis of human teeth. *J Periodontal Res*, 33:83-90, 1998.

Yamashiro T, Fujiyama K, Fukunaga T, Wang Y y Yamamoto T. Epithelial rest of Malassez express immunoreactivity of TrkA and its distribution is regulated by sensory nerve innervation. *J Histochem Cytochem*, 48:979-984, 2000.

Wallace JA y Vergona K. Epithelial rest function in replantation: is splinting necessary in replantation? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 70:644-649, 1990.

Wesselink PR y Beersten W. The prevalence and distribution of rests of Malassez in the mouse molar and their possible role in repair and maintenance of the periodontal ligament. *Arch Oral Biol*, 38:399-403, 1993.

Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arch H y Bringas P. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in root development. *Dev Dyn*, 228:651-663, 2003.