



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

TESIS

**EVALUACIÓN DE TRASPLANTE DE GÉRMENES
DENTALES PARA LA REGENERACIÓN DE
INCISIVOS Y MOLARES EN RATONES CD1**

**Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**

PRESENTA

C.D. Marisol Álvarez Sánchez

Director (a)

Dr. Marco Antonio Becerril Flores

Codirector (a)

Mtra. Carmen Balderas Delgadillo

Comité tutorial

Dra. Georgina Almaguer Vargas
Dr. José Ramón Montejano Rodríguez
Dr. Erick Geovanny Montoya Gress

Pachuca de Soto, Hidalgo, agosto, 2024

03/02/2025

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

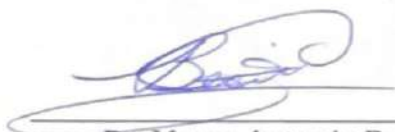
El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulada **"Evaluación de trasplante de gérmenes dentales para la regeneración de incisivos y molares en ratones CD1"**, realizado por la sustentante **Marisol Álvarez Sánchez**, con número de cuenta 139232 perteneciente al programa de **Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"
Pachuca, Hidalgo a 03 de febrero de 2025

El Comité Tutorial



Dr. Marco Antonio Becerril Flores
Director



Mtra. Carmen Balderas Delgadillo
Co-directora



Dra. Georgina Almaguer Vargas
Miembro del comité



Dr. José Ramón Montejano Rodríguez
Miembro del comité



Dr. Erick Geovanny Montoya Gress
Miembro del comité

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n
Carretera Pachuca Actopan, San Agustín
Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 41557 y
41556
medicina@uaeh.edu.mx

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), número de beca 826105 y número de CVU 455996.

Durante el periodo del 30 de octubre al 30 de diciembre de 2023 se realizó una estancia nacional de investigación a cargo del Dr. Rubén Darío Pérez Velázquez y el Biólogo Álvaro Rubén Hernández Cruz en el Área de Anatomía Patológica del Hospital del Niño DIF Hidalgo, en Pachuca de Soto, México, apoyada por Beca Mixta del CONAHCyT.

Agradecimientos Institucionales:

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado a través de la beca otorgada. Su generoso apoyo ha sido crucial para el éxito de esta investigación.

Al Hospital del Niño DIF Hidalgo, en especial al Área de Enseñanza que dirige el Dr. José Roberto Pio quinto Mendoza y al Dr. Rubén Darío Pérez Velázquez por las facilidades otorgadas para realizar la estancia de investigación en el Área de Anatomía Patológica de dicha institución.

Un agradecimiento al personal del Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por su dedicación y cuidado inquebrantables hacia los animales utilizados en esta investigación, así como las facilidades con las que contamos para realizar el trabajo experimental.

Quiero agradecer sinceramente a mi director de tesis el Dr. Marco Antonio Becerril Flores por su guía experta, apoyo constante y dedicación a lo largo de este proceso académico, su mentoría ha sido fundamental para el logro de este trabajo.

Mi gratitud al comité tutorial por su valioso asesoramiento y contribuciones críticas a lo largo de este proyecto de tesis. Su experiencia y orientación han enriquecido significativamente esta investigación.

Deseo por último agradecer al biólogo Álvaro Rubén Hernández Cruz la disposición, el compromiso, pero sobre todo la paciencia que demostró al compartir conmigo sus conocimientos en la estancia realizada para la capacitación de la técnica inmunohistoquímica.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi profunda gratitud a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de esta tesis. Sus aportes, apoyo y orientación fueron fundamentales para el éxito de este proyecto.

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mis padres y hermanas por su constante apoyo emocional y motivación, su aliento incondicional fue mi fuente de fortaleza durante los momentos más desafiantes.

Agradezco a mis amigos Heidy, Arturo, Alonso y Paty el que me alentaran para iniciar este camino en la maestría. Su amistad hizo que este viaje académico fuera más llevadero y memorable gracias por el apoyo moral y por compartirme sus conocimientos.

Pero sobre todo para ti Omar, tu paciencia durante las largas horas de estudio y tu aliento constante fueron una fuerza impulsora fundamental para completar esta tesis. Tu fe en mis capacidades me motivó a superar obstáculos y a perseverar incluso en los momentos más desafiantes. Aprecio profundamente la complicidad que compartimos durante este tiempo y la forma en que siempre encontrabas una manera de hacerme sonreír, incluso en medio de la presión, tu apoyo incondicional ha sido un regalo invaluable que ha iluminado mi camino, este logro no solo es mío, sino también tuyo. Tu presencia y amor han sido la verdadera joya que ha enriquecido este proceso de investigación y escritura. Gracias, Omar, por ser mi mayor motivación y mi mayor tesoro.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	12
I INTRODUCCIÓN.....	13
II ANTECEDENTES.....	13
2.1 Generalidades	13
2.1.1 Odontogénesis en el humano.....	13
2.1.2 Etapas embrionarias	14
2.1.3 Descripción histológica del desarrollo dental.....	16
2.1.4 Anatomía dental humana	18
2.1.5 Odontogénesis en roedores.....	20
2.1.6 Anatomía y fisiología dental	21
2.1.7 Histología dental.....	21
2.1.8 Aspectos moleculares	22
2.2 Inmunohistoquímica	23
2.2.1 Fundamento de las técnicas inmunoenzimáticas	23
2.2.2 Principios de la inmunohistoquímica	24
2.3 Antecedentes del problema.....	25
2.3.1 Incidencia de pérdida dental	25
2.3.2 Agenesia dental	26
2.3.3 Rol de los gérmenes en el crecimiento dental.....	27
2.3.4 Regeneración	27
2.3.5 Mecanismos de regeneración dental en roedores	28
2.3.6 Regeneración natural.....	28
2.3.7 Regeneración inducida.....	29
2.3.8 Terapias de regeneración dental basadas en anticuerpos	29
2.4 Planteamiento del problema.....	30
III JUSTIFICACIÓN	31
IV HIPÓTESIS	32

V OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo General.....	32
5.2 Objetivos Específicos	32
VI MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 Tipo y diseño de estudio	32
6.2 Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión	32
6.3 Diagrama de diseño experimental.....	34
6.4 Metodología.....	35
6.4.1 Obtención de células madre de germen dental (CMGD).....	36
6.4.2 Preparación de muestras para cortes histológicos	37
6.5 Distribución y tratamiento de ratones CD-1.	40
6.6 Análisis Estadístico.....	40
VII RESULTADOS.....	41
7.1 Ensayo preliminar para determinar el desarrollo de incisivos	41
7.2 Determinación del desarrollo de incisivos inferiores y molares en ratones CD-1 hembras.....	42
7.3 Aislamiento de células madre en ratones neonatos	42
7.3.1 Odontogénesis en crías.....	42
7.3.2 Identificación de CMGD mediante inmunohistoquímica	43
7.4 Regeneración en incisivos	47
7.4 Regeneración en molares.....	48
VIII DISCUSIÓN	51
IX CONCLUSIONES.....	54
X RECOMENDACIONES.....	54
REFERENCIAS	54
XI ANEXOS.....	59
1 Preparación de Reactivos.....	59
Solución fisiológica	59
Pepsina	59
PBS.....	59
Formol 10%.....	59
Laminillas electro cargadas.....	59
2 Preparación de tejidos para cortes histológicos.....	59
Deshidratación:.....	59
Clarificación:	59

Tinción H/E:	60
Contraste IHQ	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema del desarrollo dentario	15
Figura 2 Organización de los arcos branquiales en el humano.....	18
Figura 3 Anatomía del órgano dental	20
Figura 4 Esquema de un incisivo de ratón en continuo crecimiento... ..	22
Figura 5 Seguimiento del desarrollo de incisivos fracturados de manera unilateral.....	41
Figura 6 Imágenes del ratón que sufrió la fractura del incisivo inferior izquierdo.....	42
Figura 7 Corte histológico de mandíbula de cría de 5 días de nacidas	43
Figura 8 Imágenes resultantes para la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica	45
Figura 9 Corte transversal de molares en etapa de campana inicial	46
Figura 10 Seguimiento fotográfico del lote 1	47
Figura 11 Desarrollo de incisivos en cada ratón CD-1 del lote 1 48	48
Figura 12 Cortes histológicos de los molares de los ratones del lote 1	49
Figura 13 Corte histológico de un ratón del lote II.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Causas de pérdida dental	26
Tabla 2 Características de los ratones utilizados en cada lote.....	36

ABREVIATURAS

IHM: Inmunohistoquímica

OMS: Organización Mundial de Salud

CM: Células Madre

CMGD: Células Madre de Germen Dental

RPM: Revoluciones por Minuto

SN: Sobrenadante

PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato

RESUMEN

La biología de células madre se ha convertido en un importante campo para comprender la regeneración tisular y su aplicación en la medicina regenerativa. En casi todos los vertebrados se observa un patrón en la formación de órganos en común; esta formación se inicia como resultado de las interacciones a nivel tisular que se produce entre dos tejidos. Hay animales donde se observa esta regeneración y así mismo de un organismo hay regiones anatómicas donde puede haber regeneración, como es el caso de los roedores donde en ciertas zonas, como son los incisivos puede presentarse regeneración dental. En este caso, los incisivos y molares muestran diferentes patrones de erupción: en los molares una vez que concluye el proceso de erupción y la formación total de las raíces estos no presentan regeneración mientras que los incisivos presentan un proceso de regeneración continua a lo largo de toda su vida cuando hay un desgaste de estos dientes. Sin embargo, en el humano no hay ningún tipo de regeneración dental. Si supiéramos cómo se puede regenerar los dientes de los roedores es posible que sepamos cómo regenerarlos en el ser humano. Las investigaciones han demostrado que en cultivos celulares han logrado regenerar dientes de roedores pero no se han hecho ensayos *in vivo*. Por lo que se realizó un proyecto de investigación de tipo experimental cuyo objetivo fue evaluar el trasplante de células madre de gérmenes dentales en fracturas inducidas de molares e incisivos de ratones CD-1. Para ello se obtuvieron células madre de gérmenes dentales de crías de ratón de cinco días de nacidos determinadas mediante la técnica inmunohistoquímica identificando el marcador CD-166 de células madre obtenidas directamente de las mandíbulas y trasplantándolas en molares e incisivos de ratones cepa CD-1 adultos, los cuales fueron monitoreados hasta su completo desarrollo. Se realizaron mediciones de los tamaños, forma, color y bordes de los dientes incisivos y molares a lo largo de 15 días, tanto a los que recibieron el trasplante de células madre como a los que no, que solo actuaron como receptores. Posteriormente, en el primer mes se observó aceptación de estas células en la región de los molares y mejoró la rapidez de crecimiento de los incisivos y a los tres meses se obtuvo como resultado el crecimiento de una masa amorfa, pero si con una similitud histológica. Se encontró presencia de odontoblastos y ameloblastos bien diferenciados significando reproducción activa de los dientes. Con lo que se puede concluir que el trasplante de células madre de germen dental

permite la regeneración de molares e incisivos y da pauta como alternativa de tratamiento para personas que han perdido un órgano dental. Sin embargo, aún falta más por investigar estudiando variables que permiten controlar el desarrollo de estos dientes mejorando su forma. Esto sigue abriendo la puerta para continuar con las investigaciones sobre odontología regenerativa de dientes.

ABSTRACT

Stem cell biology has become an important field for understanding tissue regeneration and its application in regenerative medicine. In almost all vertebrates, a common pattern of organ formation is observed; this formation is initiated as a result of tissue-level interactions that occur between two tissues. There are animals where this regeneration is observed and even within an organism there are anatomical regions where there can be regeneration, as is the case of rodents where in certain areas, such as the incisors, dental regeneration can occur. In this case, incisors and molars show different eruption patterns: in molars, once the eruption process and the total formation of the roots is complete, they do not present regeneration, while incisors present a continuous regeneration process throughout their life when there is wear of these teeth. However, in humans there is no dental regeneration at all. If we knew how rodent teeth can regenerate, it is possible that we would know how to regenerate them in humans. Research has shown that in cell cultures they have been able to regenerate rodent teeth but no in vivo trials have been done. Therefore, an experimental research project was carried out with the objective of evaluating the transplantation of stem cells from dental germs in induced fractures of molars and incisors of CD-1 mice. For this purpose, dental germ stem cells were obtained from five-day-old mouse pups determined by immunohistochemistry technique identifying the CD-166 marker from stem cells obtained directly from the jaws and transplanted into molars and incisors of adult CD-1 strain mice, which were monitored until their complete development. Measurements of the size, shape, color and edges of the incisor and molar teeth were taken over 15 days, both in those that received stem cell transplantation and in those that did not, which only acted as recipients. Subsequently, in the first month, acceptance of these cells was observed in the molar region and the growth rate of the incisors improved and after three months, the result was the growth of an amorphous mass, but with histological similarity. The presence of well differentiated odontoblasts and ameloblasts was found, meaning active reproduction of the teeth. Thus, it can be concluded that the transplantation of dental germ stem cells allows the regeneration of molars and incisors and gives a guideline as a treatment alternative for people who have lost a dental organ. However, there is still more research to be done by studying variables that allow controlling the development of these teeth by improving their shape. This continues to open the door for further research on regenerative dentistry of teeth.

I INTRODUCCIÓN

La pérdida de estructuras dentales es uno de los problemas de salud más importantes que afecta aspectos fisiológicos, morfológicos, fonéticos, así como sociales. Se tienen datos que aproximadamente 158 millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por este padecimiento. Los dientes son estructuras anatómicas calcificadas que se localizan en la cavidad oral de múltiples especies de vertebrados; forman parte de la cavidad bucal la cual integra una parte fundamental del sistema digestivo. Cumplen una vital función: la masticación de los alimentos ingeridos. Algunos estudios realizados recientemente han proporcionado información fundamental sobre la biología de las células madre en la regeneración dental. Sin embargo, aún no es claro si funciona esta alternativa. Esto puede ser posible gracias a las características tanto físicas como histológicas de las células madre que se encuentran en el denominado ápice dental ya que se ha demostrado que en esta zona se diferencian y se exhiben tasas de proliferación altas *in vitro*. El alto potencial de esta zona hace que las células madre presentes en ella sean adecuadas para la regeneración celular ya que son capaces de producir las raíces.

Por lo que para este proyecto de investigación se propuso estimular la regeneración de dientes mediante el trasplante de células madre presentes en el germen dental de ratones cepa CD-1. Lo anterior con la técnica de inmunohistoquímica para la identificación de estas células y medir la velocidad de crecimiento, la forma y color de las células obtenidas.

II ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Odontogénesis en el humano

Los dientes son estructuras anatómicas calcificadas que se localizan en la cavidad oral de múltiples especies de vertebrados; forman parte de la cavidad bucal la cual integra una parte fundamental del sistema digestivo^{1,2} cumplen una vital función: la masticación de los alimentos ingeridos.

Los dientes se componen de tejidos blandos y mineralizados.¹

- Blandos: pulpa y ligamento periodontal
- Mineralizados: esmalte (producido por células epiteliales llamadas ameloblastos), dentina y cemento (producidas por células mesenquimales llamadas odontoblastos y cementoblastos respectivamente).

2.1.2 Etapas embrionarias

La odontogénesis inicia en la semana sexta de vida intrauterina y se lleva a cabo en dos fases denominadas:³

- **Morfogénesis:** en esta etapa ocurre el proceso de formación del patrón que constituirá la corona y la raíz del diente.
- **Histogénesis:** en esta etapa ocurre el proceso en el cual se formarán los tejidos dentarios como lo son la pulpa, el esmalte y la dentina.

Las interacciones que suceden entre los tejidos epiteliales y mesenquimales juegan un papel fundamental en la morfogénesis de los dientes, la cual inicia en el epitelio dentario (también llamado epitelio competente) que induce la formación dental en cualquier mesénquima con origen de la cresta neural. El epitelio dental se engrosa en la ubicación de la futura dentición, generando una franja uniforme denominada lámina dental. El desarrollo dental individual⁴ inicia con la formación de una placoda que nos dará origen a tres etapas primordiales en la formación de nuestra corona dental¹, conocidas como brote, capuchón y campana³.

Etapas de brote: (también conocida como etapa de yema) es producto de la proliferación de células que se originan en la lámina dental, constituido por células periféricas cuboides y células centrales o internas poligonales.

Etapas de capuchón: (también conocida como etapa de casquete) inicia en la novena semana del desarrollo embrionario, en la que el brote crece en sus caras laterales formando esta estructura, en esta etapa el germen dentario está constituido por:

Órgano del esmalte: de origen ectodérmico, el cual dará origen al esmalte dentario, conformado por epitelio dental externo, epitelio dental interno y retículo estrellado.

Esbozo de la papila dentaria: esta estructura es de origen ectomesenquimático, se ubica debajo del órgano del esmalte y dará origen a un complejo denominado dentino-pulpar.

Folículo dentario: es una estructura de origen ectomesenquimático que cubre a todo el germen dentario y dará origen a todos los tejidos que darán soporte al diente, (conocidos como periodonto).

Etapas de campana inicial: ocurren importantes cambios en la estructura del germen dentario, como la conformación de la morfología coronaria y la aparición del brote del germen dentario del diente permanente, esta etapa inicial alrededor de las semanas 14 y 18 de vida intrauterina. En esta etapa se observan las estructuras en el germen dentario:

- Órgano del esmalte: Epitelio dental externo, retículo estrellado, estrato intermedio, epitelio dental interno, asas cervicales y membrana basal.
- Papila dentaria.
- Saco o folículo dentario

Etapas de campana avanzada: esta es la última etapa de formación coronaria, en la cual se hace evidente el proceso de diferenciación de odontoblastos y ameloblastos, lo que da como consecuencia en el inicio de la formación de los tejidos duros del diente³.

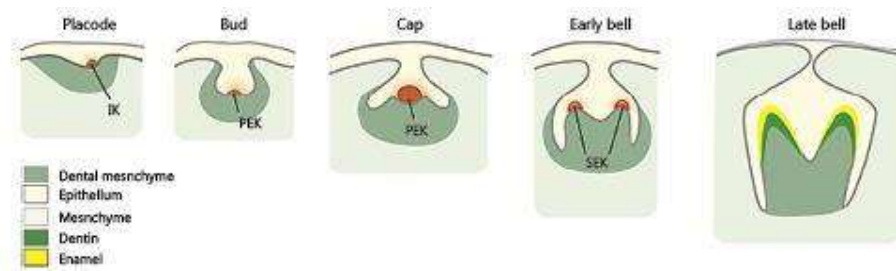


Fig. 1 Esquema del desarrollo dentario¹

Se conoce como amelogénesis al proceso de formación del esmalte dentario, en el cual intervienen los ameloblastos y las células del estrato intermedio que elaboran una matriz orgánica constituida por una proteína fibrosa semejante estructuralmente a la queratina.

La formación de tejidos mineralizados inicia en la zona de cúspides o bordes incisales (según sea el diente) y es la dentina el primer tejido dentario que se forma. En esta etapa se observa que el epitelio adamantino interno presenta una intensa actividad citogenética y se separa de la papila dental por la lámina basal, cuyo límite dará en un futuro la unión amelodentinal.

Las células del epitelio externo del órgano dental se vuelven irregulares y en el lado convexo aparecen pliegues en los cuales penetran capilares del saco dental, que encargaran de asegurar aporte nutricional al órgano dentalio.

Una vez que se forman las primeras capas de la dentina, se inicia la secreción que dará origen a la matriz del esmalte. Los ameloblastomas se concentran en numerosas vesículas cuyo contenido se segrega, lo que da origen a la matriz orgánica del esmalte⁵.

2.1.3 Descripción histológica del desarrollo dental

El desarrollo de la cavidad oral ocurre de manera primitiva en la cuarta y quinta semanas de desarrollo intrauterino con la presencia de una serie de protuberancias en la superficie lateral de la cabeza, los arcos faríngeos; que están formados por un núcleo central de tejido mesenquimático derivado de la cresta neural, cubierto en su lado externo por ectodermo superficial y revestido por epitelio de origen endodérmico en su interior. Cada uno de estos arcos se ve limitado por fuera por las correspondientes hendiduras branquiales y por dentro por bolsas faríngeas, cada una de ellas posee su propio nervio, arteria, elemento muscular y elemento esquelético⁶.

Los arcos branquiales no solo intervienen en la formación del cuello, sino que también juegan un papel fundamental en el desarrollo de la cabeza. Cada arco branquial posee sus propios componentes musculares, su propio nervio y su componente arterial⁷.

Es importante conocer que cada uno de estos arcos dará origen a diferentes estructuras:⁶⁻⁸

- El primer arco o mandibular se encuentra formado en la porción dorsal por el proceso maxilar (está en un futuro dará origen a la premaxila, al maxilar al hueso cigomático y parte del hueso temporal), da origen a los músculos de la masticación, el vientre anterior del digástrico, el milohioideo y la lengua. A las 4 semanas aparece en forma de protuberancias laterales y una media, un tercer abultamiento medial en conjunto con la porción posterior del cuarto arco inician el desarrollo de la epiglotis. La innervación llegará únicamente por la rama maxilar inferior del nervio trigémino.
- El segundo arco o hioideo da origen al estilohioideo, al músculo del estribo, vientre posterior del digástrico, al músculo auricular y a los músculos de la expresión facial. De este arco y del tercero se formará el hueso hioides. Todos estos músculos estarán innervados por el nervio facial.
- Del tercer arco derivan el músculo estilo faríngeo y los constrictores superiores; la porción inferior del cuerpo y la asta mayor del hueso hioides. Son innervados por el glossofaríngeo.
- Los arcos branquiales cuarto y sexto se fusionan para formar los cartílagos tiroideos, cricoides, aritenoides, de Santorini y cuneiforme. Dan origen a los músculos cricotiroideo, periestafilino interno y constrictores de la faringe, su innervación está dada por la rama laríngea superior del vago.

En el embrión también se pueden distinguir cinco pares de bolsas faríngeas:⁸

- La primera bolsa faríngea forma un divertículo pediculado el cual entra en contacto con el revestimiento epitelial de la primera hendidura faríngea, lo que dará origen al conducto auditivo externo.

- En la segunda bolsa faríngea el revestimiento epitelial prolifera brotes que se introducen en la mesénquima adyacente. Posteriormente estos brotes son complementados por tejido mesodérmico, lo que da origen a la amígdala palatina.
- En la tercera y cuarta bolsa se observa en el extremo caudal las alas o prolongaciones dorsal y ventral. En la semana cinco el epitelio del ala dorsal se diferencia en la glándula paratiroides inferior y el de la porción ventral forma el timo. Posteriormente, los primordios de ambas glándulas pierden
- De la cuarta bolsa se forma la glándula paratiroides superior,
- La quinta bolsa faríngea da origen al cuerpo ultimo branquial, el cual quedara incluido en la glándula tiroides.

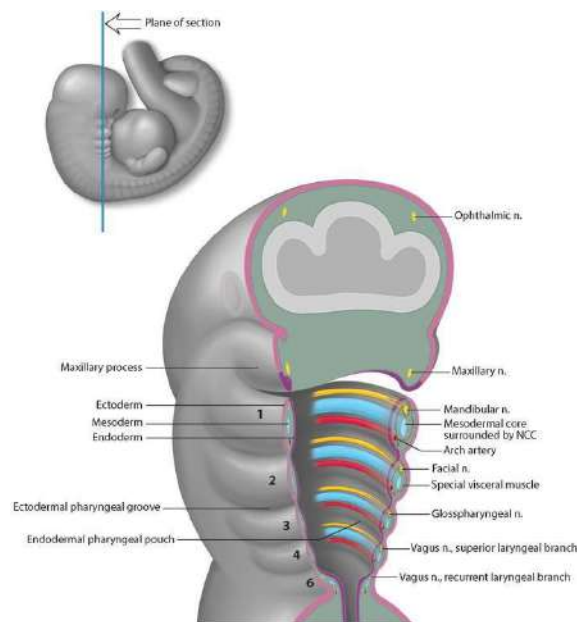


Fig. 2 Organización de los arcos branquiales en el humano⁹

2.1.4 Anatomía dental humana

Los dientes se consideran órganos de origen ectodérmico que se desarrollan a través de interacciones tisulares (descritas anteriormente) en la mayoría de los vertebrados.¹

Los dientes pueden dividirse en dos estructuras: la corona que es la parte que surge del maxilar o mandíbula (según sea el caso), esta se puede observar a simple vista y la raíz la cual sirve como medio de unión y soporte con el hueso alveolar, además de proveer de suministro de sangre y albergar al paquete vasculonervioso que ingresa al diente por el agujero apical.¹⁰

Cada diente está formado por tejidos mineralizados como lo son el esmalte, la dentina y el cemento y por tejidos blandos que son la pulpa y el ligamento periodontal.

- **Esmalte.** Se le considera el material más duro y mineralizado del cuerpo humano,¹¹ es la primera capa de los dientes. Es de color traslucido, no es vital ni sensible lo cual se debe a que está compuesto por 96% de materia inorgánica (apatito carbonatado), 3% de agua y 1% de materia orgánica (queratina).¹² Tiene su origen de células de origen epitelial, llamadas ameloblastos en un proceso llamado amelogénesis. No tiene la capacidad de regeneración.
- **Dentina.** Tiene su origen gracias a las células denominadas odontoblastos, es la segunda capa del diente ubicada debajo del esmalte, tiene una composición del 70% de material inorgánica, 20% de materia orgánica y 10% de agua.¹⁰ En esta estructura el órgano dental extiende procesos celulares que se extienden por los túbulos dentinarios lo que le otorga cierta sensibilidad y por consiguiente en caso de estímulo se produce dolor.
- **Cemento.** Es un tejido similar al hueso ya que posee una matriz inorgánica, tiene su origen en los cementoblastos y se va a encargar de recubrir a la dentina, pero únicamente en su porción radicular. Su importancia radica entre la unión que genera con las fibras del ligamento periodontal para así dar soporte al diente con el alveolo.¹³
- **Pulpa.** Se observa como la parte interna del diente y está compuesta por tejido conectivo laxo (producto de fibroblastos), vasos sanguíneos y nervios.¹⁰ Su composición está formada por un 25% de materia orgánica y 75% de agua. Se encuentra delimitado por la dentina en su entorno exterior. Este tejido en la

actualidad ha sido objeto de diversos estudios ya que se le considera una fuente de células madre, las cuales se han logrado aislar y caracterizar, logrando con ellos regeneración pulpar funcional.¹⁴

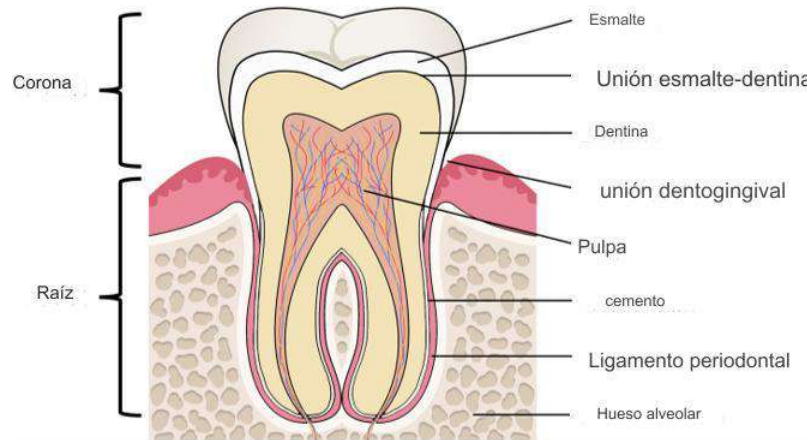


Fig. 3 Anatomía del órgano dental¹⁰

2.1.5 Odontogénesis en roedores

La primera evidencia que se tiene de estructuras dentales oscila aproximadamente hace 420 millones de años en fósiles de placodermos.¹⁵ Los ratones domésticos llegaron a América junto con la colonización (aproximadamente hace 400-600 generaciones), se extendieron y adaptaron muy rápidamente, a las condiciones de esta zona.¹⁶

La formación de los dientes en los mamíferos deriva en el primer arco faríngeo por células del ectodermo, mientras que de la cresta neural deriva el ectomesénquima. En los humanos esto ocurre a partir de la sexta semana de vida intrauterina y termina antes de la etapa adulta. En contraste en los roedores este proceso de crecimiento continua a lo largo de su vida.¹⁷

Los incisivos y molares en los roedores muestran diferentes patrones de erupción, los incisivos presentan un proceso de regeneración continua a lo largo de toda su vida, mientras que en los molares una vez que concluye el proceso de erupción y la formación total de las raíces no presentan regeneración.¹⁸ En los ratones las poblaciones de células madre en

especial en los incisivos se auto renueva continuamente, lo que hace que este modelo sea bastante atractivo.¹⁹

Las células del folículo dental cumplen un papel muy importante en el proceso de erupción dental, en dicho proceso no solo encontraremos cambios histológicos en el germen dental y el hueso alveolar si no también tendremos cambios citológicos en las células del folículo dental, osteoblastos, osteoclastos, etcétera.¹⁸ La interacción entre la mesénquima dental y las células del epitelio nos da como resultado el desarrollo dental²⁰ que concluye hasta que se completa el desarrollo radicular.

2.1.6 Anatomía y fisiología dental

La dentición de los ratones es bastante particular a diferencia del resto de los roedores cuentan con 3 hileras de molares con cúspides longitudinales, la distribución de estos se da de la siguiente manera:

- Incisivos 2 superiores (derecho e izquierdo) y 2 inferiores (derecho e izquierdo)
- Caninos, ausentes.
- Premolares, ausentes.
- Molares 6 superiores (3 derechos 3 izquierdos) y 6 inferiores (3 derechos 3 izquierdos).

Los incisivos son los únicos que poseen la característica de regeneración a diferencia de los molares los cuales una vez que termina su formación carecen de esta cualidad.²¹

2.1.7 Histología dental

Como ya se mencionó los órganos dentales de los mamíferos son formados por el ectodermo y el ectomesénquima que nos dan origen a las diferentes capas de los dientes en los ratones.¹⁹

- **Esmalte.** Los ameloblastos son las células encargadas de generar esmalte, estos en los incisivos no limitan su proliferación (regeneración) como ocurre en los molares.¹⁹
 - Etapa preameloblastos, conocida como la primera diferenciación.
 - Etapa secretora, en la cual se forma la columna vertebral del esmalte.
 - Etapa de maduración, se lleva a cabo la calcificación de la primera columna vertebral del esmalte.
 - Etapa de post maduración, se complementa la producción del esmalte
- **Dentina.** Este es el tipo de matriz más abundante y dura en los dientes, está compuesta por odontoblastos.
- **Pulpa.** Compuesta por fibroblastos.

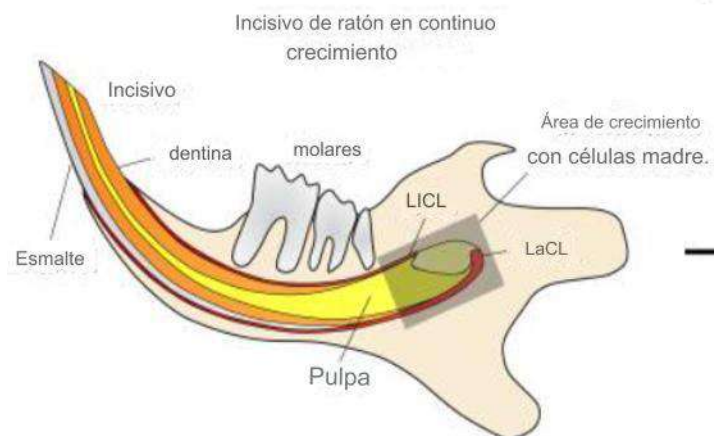


Fig. 4 Esquema de un incisivo de ratón en continuo crecimiento.¹⁹

2.1.8 Aspectos moleculares

Las interacciones epiteliales de origen ectomesenquimal se consideran básicas en el desarrollo de los tejidos dentales pues involucran una serie de fenómenos moleculares y de señalización, en los que las células madre desempeñan un papel fundamental, especialmente las embrionarias.²² Se tienen documentado mediante un enfoque integrador que existen variaciones tanto genéticas como fenotípicas de los ratones domésticos (o salvajes) con los que crecen en un ambiente de laboratorio, esto incluye diferencias en tamaño corporal, en el

metabolismo, en su comportamiento, lo que nos abre un panorama para marcar estas diferencias.¹⁶

Entre las aportaciones a nivel molecular podemos destacar las siguientes:

- La podoplanina es una glicoproteína altamente O-glicosilada, posee una carga muy negativa ya que tiene un elevado contenido en de ácido siálico. Esta glicoproteína se detectó por primera vez en la superficie de las células epiteliales precursoras del germen dental (osteoblastos, odontoblastos y osteocitos) en dientes de roedores.²³

2.2 Inmunohistoquímica

2.2.1 Fundamento de las técnicas inmunoenzimáticas

Las técnicas inmunoenzimáticas, conocidas comúnmente como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), son métodos analíticos fundamentales en la biología molecular y la medicina moderna. Estas técnicas se utilizan para detectar y cuantificar sustancias específicas como proteínas, antígenos, anticuerpos y hormonas en muestras biológicas.²⁴

Las técnicas inmunoenzimáticas se basan en la alta especificidad de los anticuerpos para unirse a sus respectivos antígenos. En una prueba ELISA, un antígeno específico es inmovilizado en una superficie sólida, como una placa de poliestireno. Un anticuerpo primario, que reconoce y se une al antígeno, se añade a la placa. Tras la unión del anticuerpo al antígeno, se introduce un anticuerpo secundario conjugado con una enzima. Esta enzima, comúnmente peroxidasa o fosfatasa alcalina, cataliza una reacción que produce un cambio de color en presencia de un sustrato específico.²⁵

2.2.2 Principios de la inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica avanzada utilizada en el campo de la investigación biomédica para visualizar la presencia, distribución y cantidad de proteínas específicas en tejidos biológicos. Desde su desarrollo inicial en la década de 1940 por Coons y Kaplan, la IHC ha evolucionado continuamente, convirtiéndose en una herramienta esencial en campos como la anatomía patológica, la oncología, la neurociencia y la inmunología. Esta técnica combina los principios de la inmunología y la histología, permitiendo a los científicos detectar antígenos específicos mediante la interacción con anticuerpos marcados y, posteriormente, analizarlos bajo un microscopio. La IHQ ha revolucionado nuestra comprensión de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, y ha contribuido significativamente a los avances en diagnóstico y terapia. Este ensayo explora los principios, aplicaciones y relevancia de la técnica de inmunohistoquímica en la investigación biomédica, respaldado por referencias clave y bibliografía reciente.^{26–28}

La IHC se basa en la detección de antígenos específicos en tejidos utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados con sondas marcadas. Los pasos fundamentales de la técnica son los siguientes:²⁹

1. Fijación del tejido: Los tejidos se fijan en formol para preservar la estructura y los antígenos.
2. Desparafinización y rehidratación: Si se trata de tejidos incluidos en parafina, se debe eliminar la cera y rehidratar los tejidos para facilitar el acceso de los anticuerpos.
3. Recuperación de antígenos: Se pueden aplicar tratamientos de calor o enzimáticos para exponer los antígenos ocultos.
4. Bloqueo de sitios de unión inespecíficos: Para evitar la unión de los anticuerpos a sitios no deseados, se bloquean los sitios de unión inespecíficos con proteínas o sueros.
5. Incubación con anticuerpos primarios: Se aplican anticuerpos específicos para el antígeno de interés.
6. Lavado: Se eliminan los anticuerpos primarios no unidos.
7. Incubación con anticuerpos secundarios: Los anticuerpos secundarios, marcados con enzimas, fluoróforos o partículas coloidales, se unen a los anticuerpos primarios.

8. Revelado: Se revela la señal mediante una reacción que produce un producto detectable, como un colorante, fluorescencia o precipitado.
9. Contratinción: Se utiliza una tinción complementaria para visualizar la morfología de las células.

A pesar de su poder y versatilidad, la IHC presenta desafíos, como la variabilidad en los protocolos y la interpretación subjetiva de los resultados. Sin embargo, los avances tecnológicos, como el desarrollo de anticuerpos más específicos y la automatización de los procedimientos, están abordando estas limitaciones.

El futuro de la IHC se perfila prometedor con el advenimiento de técnicas más sofisticadas, como la espectrometría de masas y la microscopía de súper resolución, que permitirán una caracterización aún más detallada de las proteínas en los tejidos. Además, la integración de la inteligencia artificial y el aprendizaje automático en el análisis de datos de IHC abren nuevas fronteras en la comprensión de la biología y el desarrollo de terapias personalizadas.²⁶

2.3 Antecedentes del problema

Las enfermedades bucales se consideran como uno de los principales problemas de salud pública debido a su alta incidencia y prevalencia en la población mundial. Entre las consecuencias que estas traen consigo podemos mencionar el dolor, el deterioro de la función tanto como el de la calidad de vida.

La Organización Mundial de Salud (OMS) menciona que las enfermedades bucales son las más costosas de atender y en nuestro país se encuentra entre las que demandan mayor atención.³⁰

2.3.1 Incidencia de pérdida dental

Un gran desafío de salud pública son las enfermedades bucodentales en especial la pérdida de dientes ya que esta se da a consecuencia de no tratar las principales enfermedades

(caries dental y periodontitis). La OMS sugiere que la alfabetización juega un papel fundamental en el desarrollo de estos padecimientos, ya que la considera como un factor medible, pero sobre todo modificable.³¹

A nivel mundial entre los principales padecimientos bucodentales podemos mencionar:

Enfermedad bucodental	Número de casos
Caries dental sin tratamiento en dientes permanentes	2 300 millones
Periodontitis severa	796 millones
Caries dental sin tratamiento en dientes temporales	532 millones
Perdida dental	267 millones
Otras afectaciones	139 millones

Tabla 1 Causas de pérdida dental.³²

Entre las principales causas de pérdida dental podemos mencionar las siguientes:

- **Caries dental** se le considera como una destrucción de los tejidos que componen a los dientes causada por la presencia de ácidos producidos por las bacterias propias de la placa depositada en las superficies dentales.³³
- **Enfermedad periodontal** es una patología crónica, que abarca brotes con una sintomatología mínima y puede conducir a la pérdida de soporte de sujeción de los dientes, es decir, a la destrucción de las encías y el hueso que sujeta los dientes.³⁰
- **El edentulismo** (pérdida de dientes) es un indicador de la salud oral de una población y se asocia con una menor calidad de vida.³⁰

2.3.2 Agenesia dental

Según el número de dientes ausentes desde el nacimiento se puede clasificar en anodoncia (patología congénita en la cual se presenta ausencia total de piezas dentales),

oligodoncia (en la cual se presenta ausencia de más de 6 piezas dentales) y la hipodoncia (suele asociarse con proceso de evolución en la que se presenta falta de hasta 6 piezas dentales).³⁴

2.3.3 Rol de los gérmenes en el crecimiento dental

A medida que avanza el tiempo, se realizan cada vez más investigaciones que nos acercan más y más a lograr el objetivo de formar de nuevo un diente por completo y no solo la zona que ha sufrido daños o que se ha perdido.

En los ratones está documentado que los incisivos son dientes que poseen la característica de crecimiento continuo, esto gracias a que todas las células en los diferentes procesos incluida la odontogénesis, la dentinogénesis y la amelogénesis continúan con sus procesos de proliferación. Esto se encuentra reportado en los epitelios apicales de los incisivos que son similares a las etapas de yema, capuchón y campana, característica ya descrita de los gérmenes dentales en etapa prenatal.³⁵

La capacidad de regeneración dental reside principalmente en el denominado epitelio competente¹ que es capaz de inducir la formación de órganos dentarios a partir de cualquier mesénquima de la cresta neural.

2.3.4 Regeneración

La regeneración es la capacidad de un organismo para reconstruir partes dañadas o perdidas de su cuerpo.³⁶ Este fenómeno es especialmente notable en ciertos animales, como las salamandras, que pueden regenerar extremidades completas, y en algunos invertebrados, como las estrellas de mar, que pueden regenerar brazos perdidos.

2.3.5 Mecanismos de regeneración dental en roedores

En casi todos los vertebrados se observa un patrón en la formación de órganos en común, esta formación se inicia como resultado de las interacciones a nivel tisular que se produce entre dos tejidos. Se ha usado el término “células madre” con un grupo de células.

En la mayoría de los vertebrados la formación de órganos tiene un patrón en común, inicia su formación como resultado de las interacciones tisulares inducidas entre dos tejidos.

Se ha aplicado el término células madre (CM) para describir a un grupo de células pluripotentes que poseen la capacidad ilimitada de dividirse. Estas suelen clasificarse en dos categorías distintas: las células embrionarias que se originan en la masa celular interna del blastocisto y son pluripotentes, y células adultas, que se encuentran en diversos tejidos y suelen ser multipotentes (lo que significa que pueden dar lugar únicamente a células de dos capas de gérmenes).³⁷

Existen diversos estudios donde se describe los mecanismos de regeneración como lo son la natural³⁵ y la inducida³⁸ que serán descritos a continuación.

2.3.6 Regeneración natural

Los dientes son órganos ectodérmicos generados por la mayoría de los vertebrados y se producen en varios tamaños, formas y números. Con la excepción de los mamíferos, la mayoría de los vertebrados reemplazan sus dientes continuamente (polifiodontes). Los mamíferos, por otro lado, tienen una capacidad de regeneración de dientes restringida y reemplazan sus dientes sólo una vez (difiodontes) o ninguno (monofiodontes).¹

En ratones y muchas otras especies, los dientes pueden continuar creciendo a lo largo de la vida, proporcionando el principal sistema modelo para estudiar la progresión de varios linajes de células dentales a partir de las poblaciones de células madre dentales ubicadas en el extremo apical del diente. En ratones, la población de células madre de los incisivos se auto renueva continuamente y repone los tejidos que se pierden debido a la mordedura, lo

que hace que este modelo sea atractivo para los estudios de generación de células madre, diferenciación celular, homeostasis y regeneración inducida por lesiones. Además, el incisivo del ratón representa un modelo de órgano que se renueva continuamente con una dinámica celular conceptualmente similar al epitelio intestinal, los folículos pilosos y las uñas.¹⁹

2.3.7 Regeneración inducida

La regeneración de órganos como de tejidos se ha convertido en un campo de investigación con un extenso número de aportaciones, ya que se pretende poder aplicarlo a huesos, músculos, tejidos, órganos, etc.

En la actualidad, la única fuente fácilmente disponible de células madre epiteliales odontogénicas es el nicho apical del incisivo de ratón.³⁵ Las células epiteliales odontogénicas de origen humano pueden obtenerse de células madre de la pulpa, de dientes deciduos exfoliados, de la papila apical, del ligamento periodontal y precursoras del folículo dental.³⁹

Hasta el momento, se han realizado estudios in vitro e in vivo sobre la reparación dental parcial que han generado resultados muy prometedores. Sin embargo, estos estudios se han efectuado principalmente en modelos animales, por lo que queda por ver si estos logros se pueden aplicar directamente a los humanos. Lo anterior demuestra que la mandíbula de un animal adulto puede aceptar un brote dental creado mediante bioingeniería, nutrirlo y cooperar con él de una manera que permita el crecimiento, la morfogénesis y la erupción de los dientes.³⁷

2.3.8 Terapias de regeneración dental basadas en anticuerpos

El tratamiento con anticuerpos anti- USAG-1 en ratones es eficaz en la regeneración dental y puede suponer un gran avance en el tratamiento de anomalías dentales en humanos. Dado que aproximadamente el 0,1% de la población sufre agenesia dental congénita y el 10% de los niños en todo el mundo sufren pérdida parcial de dientes, el diagnóstico temprano mejorará los resultados y la calidad de vida de los pacientes. Comprender el papel de las

variantes patógenas de USAG-1, sus genes asociados que interactúan y sus funciones proteicas ayudará a desarrollar biomarcadores críticos.³⁴

2.4 Planteamiento del problema

Ante la pérdida de dientes de manera total o parcial o el daño de alguna estructura dental es necesario encontrar posibles soluciones para la recuperación de estos órganos en las personas afectadas evitando en lo posible la pérdida de sus dientes. Se tienen varias alternativas como son la aplicación de resinas, sin embargo, son técnicas costosas, dolorosas y tienen un tiempo limitado sin la garantía de que el problema se haya resuelto para toda la vida. Una opción es el trasplante de células madre presentes en el germen dental con la probable posibilidad de que promuevan la regeneración de los dientes que se hayan perdido. A pesar de que se han obtenido a partir de cultivos celulares, no se ha trabajado con modelos *in vivo*.¹⁶

Ante esto nos hacemos la siguiente pregunta: ¿El trasplante de células madre presentes en el germen dental de ratones cepa CD-1 estimulará la regeneración de dientes tanto incisivos como molares como una alternativa para la recuperación de la pérdida dental en ratones?

III JUSTIFICACIÓN

La pérdida de estructuras dentales es uno de los problemas de salud más importantes que afecta aspectos fisiológicos, morfológicos, fonéticos, así como sociales. Se tienen datos que aproximadamente 158 millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por este padecimiento.³¹

En algunos estudios realizados recientemente se ha proporcionado información fundamental sobre la biología de las células madre en la regeneración dental.³² Sin embargo, aún no es claro si funciona esta alternativa.

Actualmente la investigación en el campo de la regeneración de los tejidos dentales tiene dos alternativas de tratamiento: la primera involucra la restauración dental a partir de materiales artificiales y la segunda al uso de células madre o gérmenes dentales, empleando en ocasiones la ingeniería tisular para crear réplicas de los dientes perdidos.

Los roedores como ya se mencionó poseen la característica de regeneración dental, a diferencia de algunos mamíferos. Es por ello que este proyecto se ejecutará de acuerdo a la problemática de la necesidad de obtener una metodología para la regeneración dental.

Es de vital importancia el establecer esta metodología ideal para lograr dicha regeneración ya que una vez que esta se logre se dará apertura para aplicarla a futuras investigaciones que pudieran incluir la regeneración en humanos, cabe destacar esta sería una vital aportación para la raza humana.

IV HIPÓTESIS

El trasplante de células madre de gérmenes dentales obtenidos de las mandíbulas de ratones CD-1 trasplantados molares e incisivos promoverá la regeneración del órgano dental, en un modelo *in vivo*.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el trasplante de células madre de gérmenes dentales en los alvéolos de molares e incisivos de ratones CD-1.

5.2 Objetivos Específicos

1. Identificar células madre de los gérmenes dentales mediante cortes histológicos e inmunohistoquímica.
2. Determinar el establecimiento de las células madre de los gérmenes dentales en molares e incisivos, mediante observaciones en un lapso de 1 mes.
3. Evaluar el trasplante de las células madre de los gérmenes dentales que permite el desarrollo de molares en los ratones receptores, a través de la medición y observación histopatológica, en un lapso de 3 meses.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo y diseño de estudio

Diseño experimental

6.2 Selección de la población, criterios de inclusión y exclusión

Inclusión: ratones cepa CD-1

- Peso 30 a 35 gramos.
- Sanos (sin enfermedades ni alteraciones).
- Viables.
- Resistentes al anestésico.

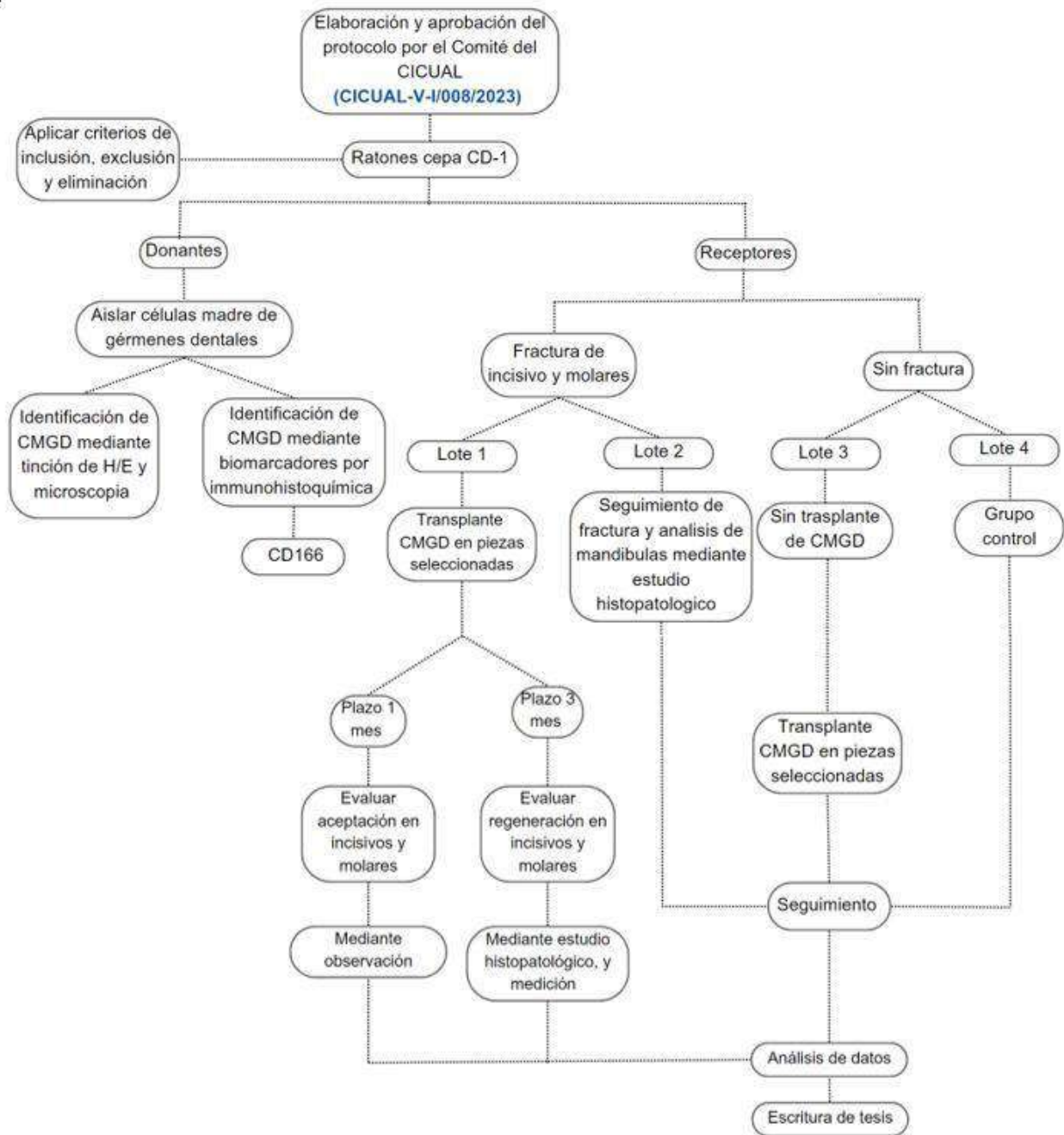
Exclusión: ratones que no sean de la cepa CD-1

- Con afecciones anatómicas visibles.
- Con infecciones.
- De comportamiento anormal.
- Edad mayor a 3 meses.
- Con afecciones dentales.
- Presenten estado gestante.
- No presenten órganos dentales.

Eliminación: ratones cepa CD-1

- Mueran a la mitad del proceso o durante el proceso antes de la obtención de resultados.
- Que durante la separación de la mandíbula se presente un desperfecto o contaminación en el material con el que se esté trabajando.

6.3 Diagrama de diseño experimental



6.4 Metodología

Se trabajó con 30 ratones para la realización de experimentos, 20 adultos hebras y 10 crías, cepa CD-1 con un peso entre 25 y 30 gramos y de 8 a 12 semanas de edad. En cuanto a su alimentación se les suministró croquetas especiales para su mantenimiento alimento balanceado comercial para roedor Harlam 2018S y agua *ad libitum*.

Se realizó la reproducción de ratones para la obtención de sus crías de una semana de nacimiento, de las cuales se obtuvieron sus mandíbulas.

Los ratones que sufrieron fracturas dentales fueron observados diariamente y pesados para observar alguna afectación como resultado de la fractura y se alimentaron proporcionándoles el alimento en polvo, el resto de los cuidados fue igual que los ratones que no recibieron fractura.

Después de la fractura y la implantación de las CMGD se observó en un máximo de 12 semanas si existió regeneración dental.

Es importante señalar que si se notaba en los animales dolor o distrés durante el tiempo de ejecución de este protocolo se procedería a aplicar eutanasia (ya sea por cámara de CO₂ o dislocación cervical) en los animales que lo requirieran, con esto justificamos el uso de cinco animales por lote para cubrir o prever situaciones como la ya mencionada.

El destino final de los animales fue la eutanasia mediante la cámara de CO₂ del bioterio o en su defecto por dislocación cervical, para la obtención de las mandíbulas para su análisis histopatológico.

Los lotes fueron distribuidos como se menciona en la siguiente tabla:

Tabla 2. Características de los lotes de ratones.

LOTE	CARACTERÍSTICAS
1	Ratones con fractura unilateral de molares e incisivo que recibieron trasplante de CMGD.
2	Ratones con fractura unilateral de molares e incisivo sin trasplante de CMGD.
3	Ratones sin fractura de molares e incisivo que recibieron trasplante de CMGD de manera unilateral.
4	Ratones sin tratamiento que sirvió de testigo de aquellos que si recibieron el tratamiento con los otros tres lotes.

6.4.1 Obtención de células madre de germen dental (CMGD)

1. Se realizó eutanasia en diez crías de cinco a siete días de nacidas mediante la técnica de dislocación cervical.

a) Disección

2. Se realizó un corte en la mandíbula a través de la línea desde la comisura de la boca hasta la oreja. Una vez obtenidas las mandíbulas se separaron y se colocaron ocho en un vidrio de reloj con solución fisiológica al 9% a 37 °C. Las dos restantes se colocaron en un frasco con formal al 10% y PBS (pH= 7.2) para su fijación y posterior procesamiento para las técnicas de inmunohistoquímica y H/E.
3. En un microtubo de fondo cónico de poliestireno con 1 mL de pepsina 1:10,000 a 37° C. se colocaron las mandíbulas obtenidas, y se incubaron por 45 min.

b) Manejo de CMGD

4. Una vez que se llevó a cabo la disgregación del tejido de las mandíbulas se centrifugo a 1500 rpm durante 5 min.

5. Con ayuda de una micropipeta se eliminó el sobrenadante (SN) con la solución de enzimas y se rehidrató con 1 mL de solución fisiológica al 0.9% a 37 °C.
6. Nuevamente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.

c) Trasplante de CMGD a ratones receptores

7. Se inocularon los ratones de los lotes 1, 2 y 3 con una solución de pentobarbital a dosis de 50 mg por kg.
8. Una vez sedados se realizaron las fracturas unilaterales en los molares superiores de cada ratón con ayuda de una pinza de mosquito curva y en los incisivos inferiores con la pinza de mosquito recta en los lotes 1 y 2.
9. Se realizó el trasplante de las células en condiciones de asepsia con ayuda de una cucharilla dentinaria.
10. Se regresó a los animales a sus jaulas para su posterior observación.

6.4.2 Preparación de muestras para cortes histológicos

1. **Fijación del tejido:** El primer paso fue fijar el tejido para preservar su estructura y evitar la degradación. Las muestras permanecieron en formol al 10% en PBS por 48 horas como mínimo.
2. **Deshidratación:** Después de la fijación, el tejido se deshidrató mediante una serie de baños de alcohol de concentraciones crecientes. Esto eliminó el agua del tejido, preparándolo para la inclusión en parafina. Cada baño se realizó por lapsos de una hora. (Anexo2)
3. **Clarificación:** Para continuar con la deshidratación y favorecer la inclusión de los tejidos en parafina se procedió en realizar baños en xilol ya que esta es una sustancia miscible en el etanol y la parafina, estos baños se mantuvieron por una hora cada uno y a temperatura ambiente. (Anexo2)
4. **Inclusión en parafina:** Una vez deshidratado, el tejido se sumergió en parafina fundida a 56°C. La parafina impregno el tejido y proporciono soporte estructural para realizar los cortes. Se realizaron 3 baños, cada uno de una hora. Luego colocamos las

muestras en un molde con parafina fundida, cuidando su orientación. Las dejamos solidificar para así obtener el bloque.

5. **Obtención de cortes:** Para este paso los bloques debían estar congelados, se utilizó un microtomo para cortar secciones delgadas de tejido, en este caso fueron de 4 micrómetros de grosor. Estos cortes se colocaron y se extendieron con cuidado en un baño a 50°C, estas secciones se montaron en portaobjetos de vidrio previamente electro cargados para así garantizar una mejor adhesión del tejido. Se llevaron a la estufa y se dejaron 40 minutos ahí.
6. **Desparafinado:** Las secciones montadas en portaobjetos se desparafinaron sumergiéndolas en una serie de baños de xilol. Esto elimino la parafina, dejando solo el tejido montado en el portaobjetos.
7. **Hidratación:** Después del desparafinado, las secciones de tejido se hidrataron pasándolas por una serie de baños de alcohol de concentraciones decrecientes. Esto rehidrato el tejido y lo preparo para la tinción.
8. **Tinción:** Una vez hidratadas, las secciones se tiñeron con los de hematoxilina y eosina.
9. **Preparación final:** Nuevamente las muestras se deshidrataron en alcoholes de diferentes concentraciones y por último con xilol.
10. **Montaje y observación:** Finalmente, las secciones de tejido se montaron con un cubreobjetos y resina. Una vez montadas, las muestras se observaron bajo un microscopio para su análisis y estudio.

d) Técnica inmunohistoquímica

1. Se realizaron los pasos de preparación para cortes histológicos hasta el paso 5, con la diferencia de que las laminillas debían ser electro cargadas. (Anexo 1)
2. Se colocaron las laminillas por 20 min. en la estufa. Después se llevaron a un baño de xilol por 5 min e hidratación en alcoholes.
3. En un vaso de coplin se colocaron las laminillas para llevarlas al baño de recuperación térmica antigénica con solución recuperadora por 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo se sacó el vaso de coplin y se dejó enfriar por 10 min.

4. Una vez que se consideró que la solución recuperadora estaba a temperatura ambiente se eliminó este reactivo y se precedió a realizar 3 enjuagues con agua corriente.
5. Después de realizar el ultimo enjuague se cubrieron las laminillas con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por 5 min. Posteriormente se realizaron 2 enjuagues con agua corriente.
6. Una vez que se realizaron los enjuagues y cuidando que las laminillas estuvieran húmedas se colocaron en los coverplay y en el rack. Se colocó en la hendidura solución PBS por 5 min.
7. Ya que la solución PBS de había eliminado se incubó el anticuerpo por 45 min.
8. Pasados los 45 min. Se realizó un enjuague con PBS (el cual debe estar frío).
9. Como siguiente paso se incubó el sistema de detección de polímeros. Se inició con el primario (2 gotas) por 10 min. Posteriormente se realizó enjuague con PBS por 5 min. Y se continuó con el post – primario (2 gotas) por 10 min y enjuague con PBS por 5 min.
10. Se separaron las laminillas del coverplay cuidando que se mantuviera húmedo.
11. Con una toalla de papel se secaron los bordes de la laminilla para formar una barrera y con ayuda de una pipeta se agregó DAF esperando se produjera la reacción de revelación, se llevó al microscopio y se observó la reacción.
12. Se enjuaga con agua. Se colocaron las muestras en la canastilla y se realizó un contraste con hematoxilina. (Anexo 2)
13. Se fijan las muestras con resina y cubreobjetos.

6.5 Distribución y tratamiento de ratones CD-1.

Se trabajará con 20 ratones, distribuidos en cuatro lotes cada uno con cinco animales como se describió en la tabla 2.

6.6 Análisis Estadístico

Se realizó análisis de ANOVA de una vía.

6.7 Consideraciones éticas

En el desarrollo del protocolo se consideraron los siguientes puntos:

- 1 **Bienestar animal:** Es fundamental minimizar el sufrimiento y asegurar condiciones de vida adecuadas para los animales se tomaron en cuenta los aspectos éticos, la atención veterinaria adecuada y la consideración de métodos humanitarios para el sacrificio de los animales.
- 2 **Reducción, refinamiento y reemplazo (las 3R):** en este caso se minimizó el número de animales utilizados, se redujo el dolor empleado el método menos doloroso y el refinamiento tomando en cuenta la metodología más acertada para tener resultados más confiables y no tener que repetirlos por falta de experiencia en el manejo de los mismos. y considerar métodos no animales siempre que sea posible, aplicando así el principio de las 3R.

VII RESULTADOS

7.1 Ensayo preliminar para determinar el desarrollo de incisivos.

Con la finalidad de conocer el tiempo de regeneración dental de los incisivos que normalmente se presenta en los roedores se realizó fractura unilateral de incisivo en cinco ratones; se registró el tamaño y las características físicas. A lo largo de 14 días y cada tercer día se efectuó el seguimiento midiendo mediciones de cada incisivo y si había cambios físicos adicionales. Los resultados muestran que el incisivo fracturado alcanzó su tamaño normal en 13 días, en este caso fue de 4 mm al igual que el otro incisivo que no se fracturó, e igualmente el estado físico fue similar en ambos incisivos. La gráfica de la figura X muestra los resultados al igual que las imágenes XX.

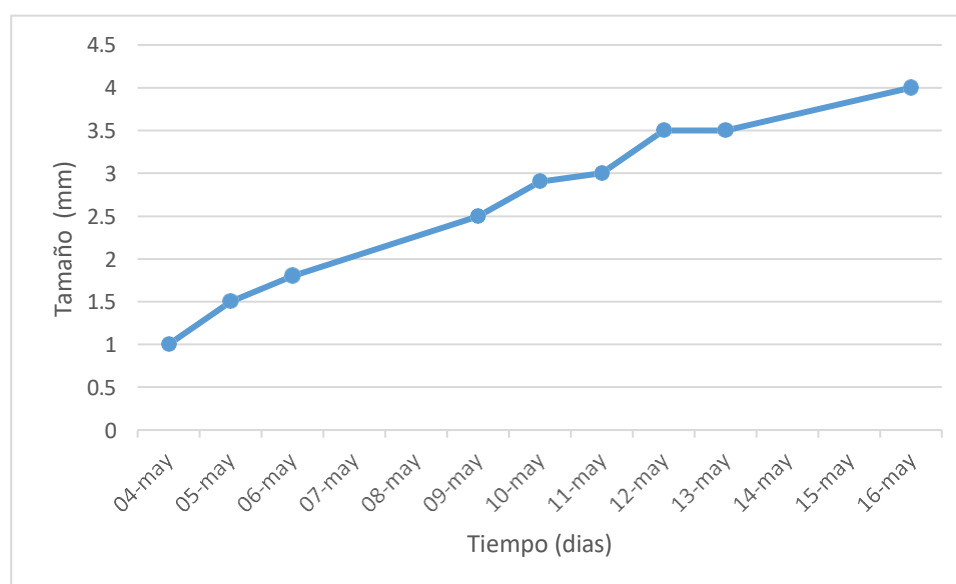


Fig. 5 Seguimiento del desarrollo de incisivos fracturados de manera unilateral.



A) Incisivo inferior izquierdo recién fracturado (tamaño de 1 mm).



B) Incisivo inferior izquierdo desarrollado al día 11 (3.5 mm).

Fig. 6 Imágenes del ratón que sufrió la fractura del incisivo inferior izquierdo.

7.2 Determinación del desarrollo de incisivos inferiores y molares en ratones CD-1 hembras.

Se trabajó con 20 ratones CD-1 hembras distribuidos y tratados tal como se describe en material y métodos, en quienes fue provocada una fractura en molares e incisivos previamente, para posteriormente realizarles un trasplante de CMGD e investigar si se presenta regeneración dental a lo largo de 60 días. En casi todos los grupos de los ratones, su estado general fue favorable, es decir no se presentaron alteraciones físicas ni de conducta, excepto en un solo ratón que presentó un nódulo inguinal con consistencia firme. Transcurrido el periodo se extrajeron las mandíbulas para el estudio histológico y de esta manera evaluar la regeneración dental.

7.3 Aislamiento de células madre en ratones neonatos

7.3.1 Odontogénesis en crías

En figura 5 se muestra un corte histológico de una mandíbula de cría teñida con HE. Se observa el primordio dental en estadio de campana tardía, en el cual se puede diferenciar el epitelio externo del esmalte y el retículo estrellado. Con esto se demuestra que se

encuentran células con capacidad de diferenciación a partir de células madre, lo cual sugiere presencia de las mismas.

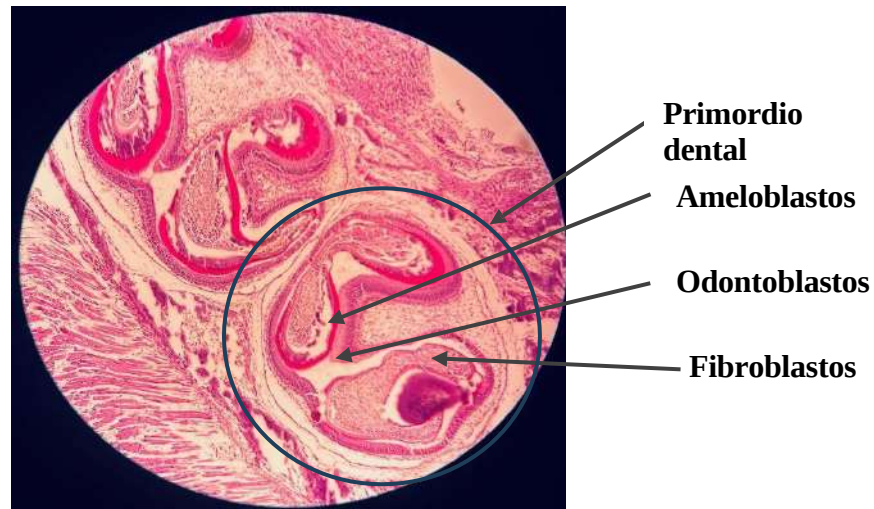


Fig. 7 Corte histológico de mandíbula de cría de 5 días de nacidas en donde se observan 2 molares en etapa de campana tardía, en la que se diferencian los tipos de células que dan origen a cada una de las principales capas del órgano dental, como el esmalte (ameloblastos), la dentina (odontoblastos) y la pulpa (fibroblastos).
Tinción HE 4X

7.3.2 Identificación de CMGD mediante inmunohistoquímica

Para demostrar si en los tejidos de las mandíbulas de los ratones recién nacidos hay presencia de CMGD, fue necesario utilizar la técnica de inmunohistoquímica; para ello se trabajó con anticuerpos anti CD- 166 tal como se describe en material y métodos. Primeramente, se realizó la estandarización de las condiciones que permitieron realizar el ensayo; enseguida la identificación de las mismas.

7.3.2.1 Estandarización de la técnica inmunohistoquímica para la detección de anti-CD166

Para demostrar que con el anticuerpo anti-CD166 se pueden identificar células madre se utilizaron muestras de tejidos humanos facilitados por el Hospital del niño DIF Hidalgo de los siguientes órganos: riñón, piel, musculo liso, cerebro, apéndice, ganglios linfáticos y linfoma ya que algunos de estos como el cerebro no presenta células madre y serviría para observar tejidos negativos al anticuerpo, en cambio tejidos como riñón y piel en donde hay constante regeneración celular se demostraría la presencia de células madre sirviendo como controles positivos; de esta manera servirían de control técnicamente hablando para demostrar si en los tejidos de las mandíbulas hay presencia o ausencia de regeneración y por tanto de células madre. Los resultados darían confianza para que se aplicaran en las mandíbulas de los ratones, para la búsqueda de células madre.

Los resultados obtenidos demuestran que el anti-CD 166 se unió a la superficie de las células de riñón, específicamente en los túbulos renales como se puede observar en la figura 8 en las imágenes B y C, por el contrario fue negativo el resultado en tejido cerebral (imagen D).

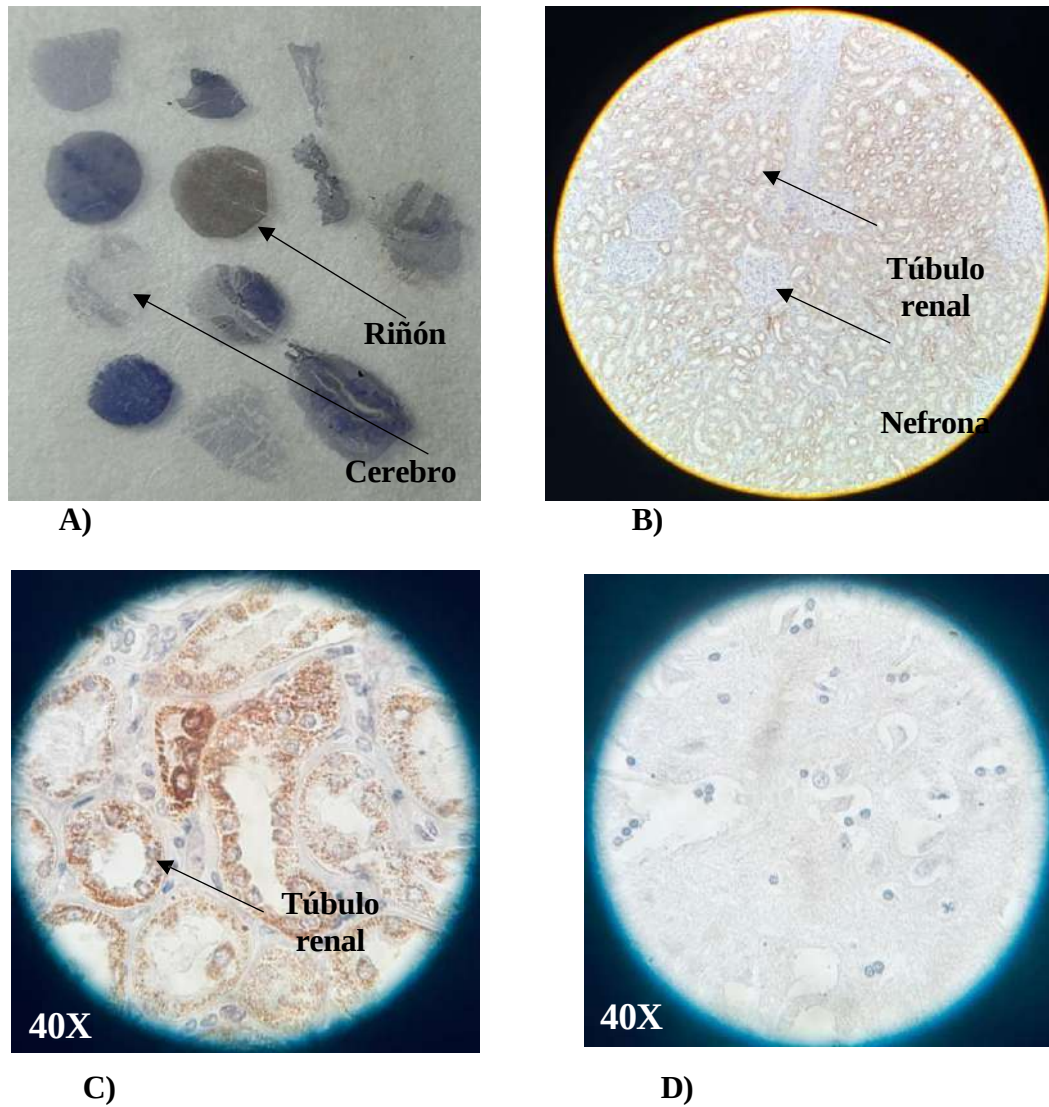
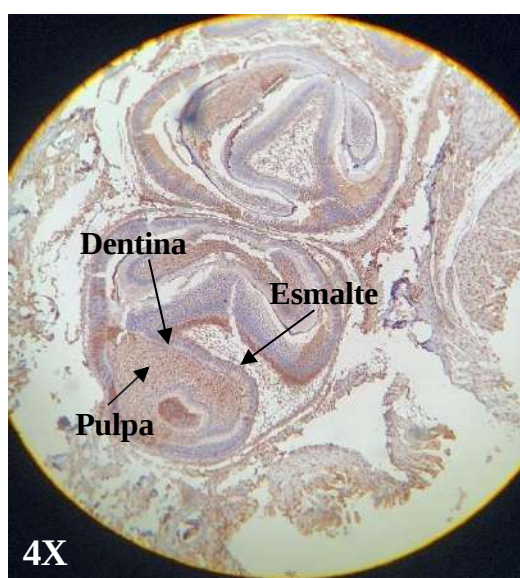


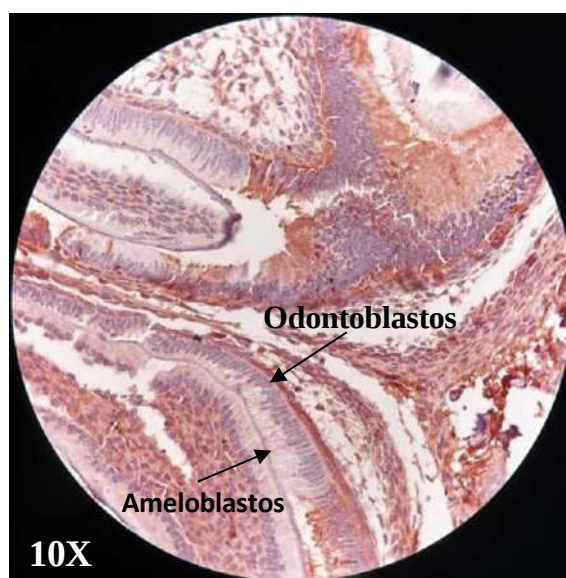
Fig. 8 Imágenes resultantes para la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica de cortes de histológicos de diferentes órganos para marcador CD166. **A)** Arreglo de tejidos para determinar la expresión positiva del anticuerpo CD166. **B)** Corte histológico de riñón con expresión basal positiva del anticuerpo CD166, en zona proximal de túbulo renal (10X). **C)** Expresión basal del anticuerpo CD166 en túbulos renales (40X). **D)** Expresión negativa del anticuerpo CD166, en cerebro (40X).

7.3.2.2 Identificación de CMGD en mandíbulas de crías de ratones

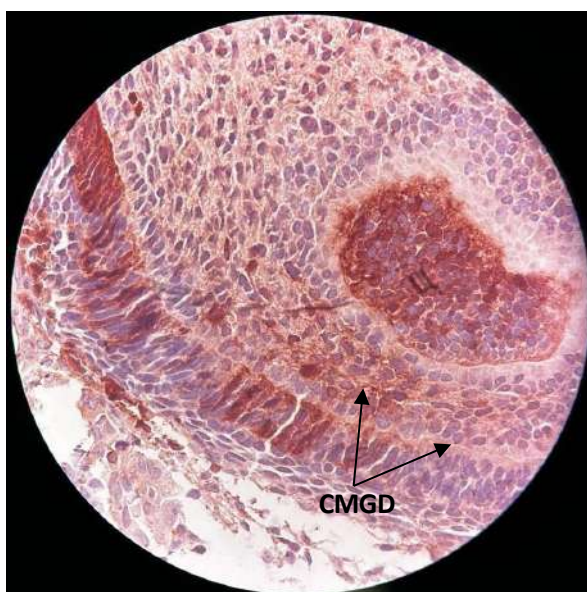
Se obtuvieron mandíbulas de cuatro crías de ratones neonatos como se describió en la sección de material y métodos, en todos ellos se realizaron cortes histológicos, mediante el análisis con la técnica de inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-CD166 los resultados muestran presencia del marcador en las muestras analizadas (flechas en zonas de color marrón)). Como se observa en la figura 6. Los resultados indican presencia de CMGD en los tejidos de las mandíbulas de los ratones, lo cual permitió realizar el trasplante de estos tejidos.



A)



B)



C)

Fig. 9 Corte transversal de molares en etapa de campana inicial con expresión basal del anticuerpo anti-CD166 positiva. **A)** Diferenciación de las tres capas principales del órgano dental, en etapa primitiva (4X). **B)** Complejo amelo-dentinario en donde se observa la diferenciación de odontoblastos y ameloblastos (10X). **C)** Expresión positiva de células madre de germen dental (40X). T/E en contraste con DAB.

7.4 Regeneración en incisivos

Una vez identificadas las CMGD en las mandíbulas se procedió a realizar su trasplante a los ratones que sufrieron fractura de incisivos y de molares para ver si eran capaces de regenerar los dientes perdidos o dañados. Como resultado del trasplante de CMGD en el lote uno observamos una regeneración dental de incisivos en un lapso menor al habitual que ocurre en 15 días. El periodo de observación fue de 7 días en el cual se alcanzó una regeneración del tamaño inicial.

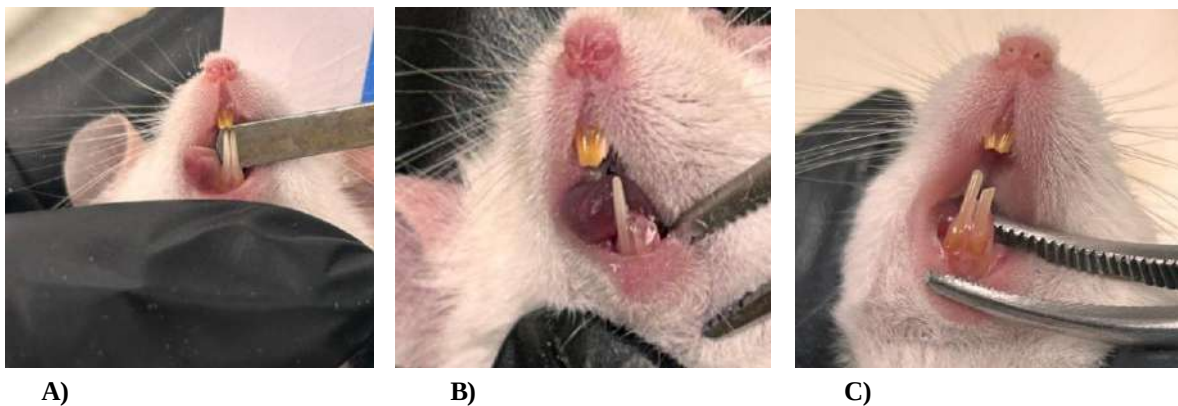


Fig. 10 Seguimiento fotográfico del lote 1 en el desarrollo de incisivos durante siete días tras su fractura y el trasplante. **A)** Antes de la fractura (tamaño 4mm). **B)** Al realizar fractura unilateral (tamaño 1 mm). **C)** Apariencia a los 4 días del trasplante (Tamaño 3 mm).

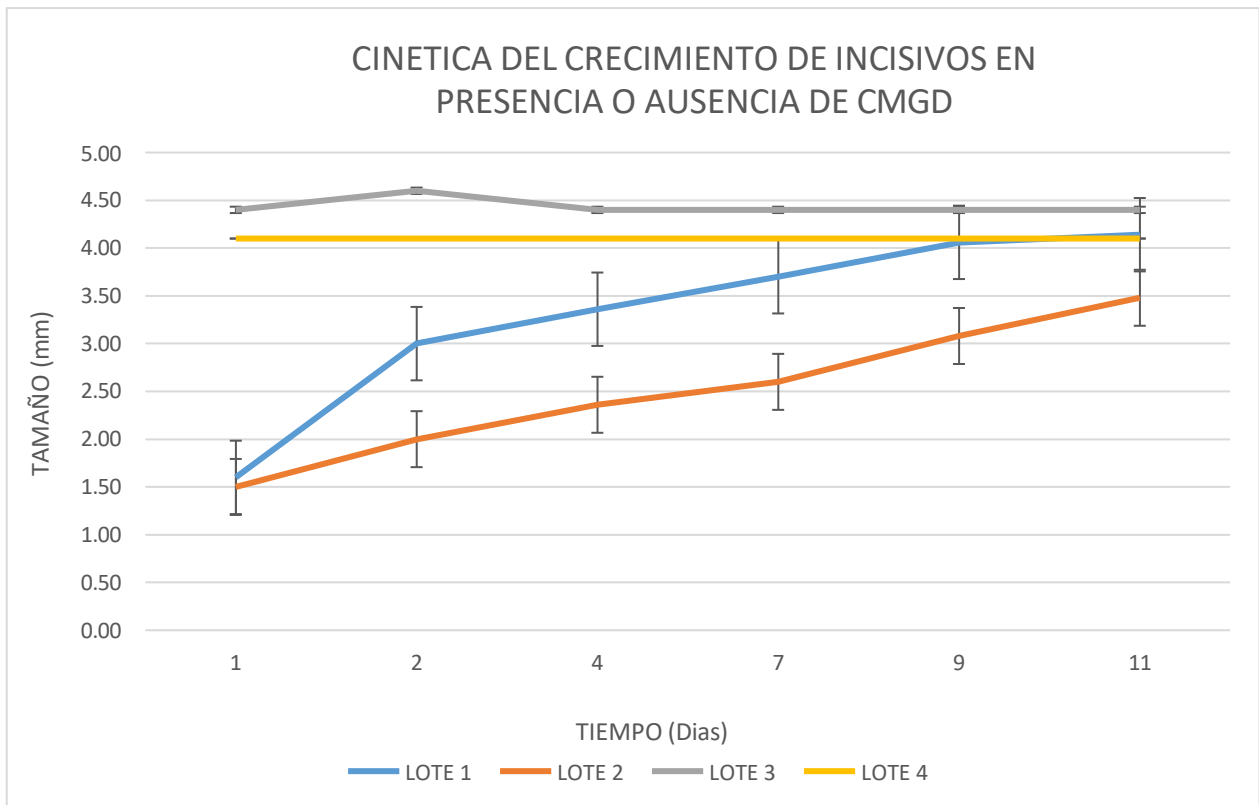
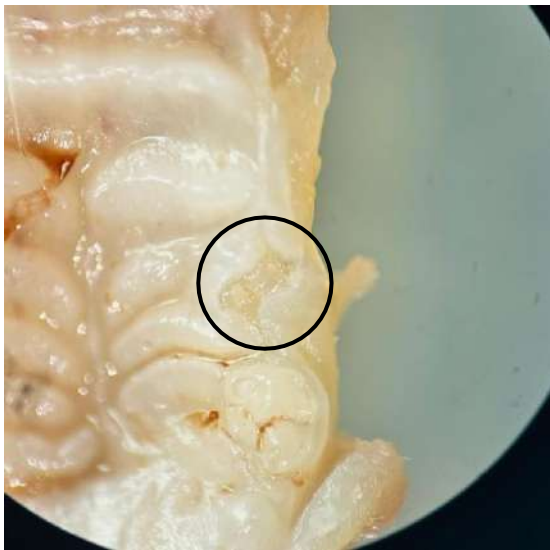


Fig 11 Desarrollo de incisivos en cada ratón CD-1 del lote 1, seguimiento de 10 días tras su fractura y el trasplante de CMGD. (Cada línea corresponde al seguimiento de cada uno de los ratones del lote).

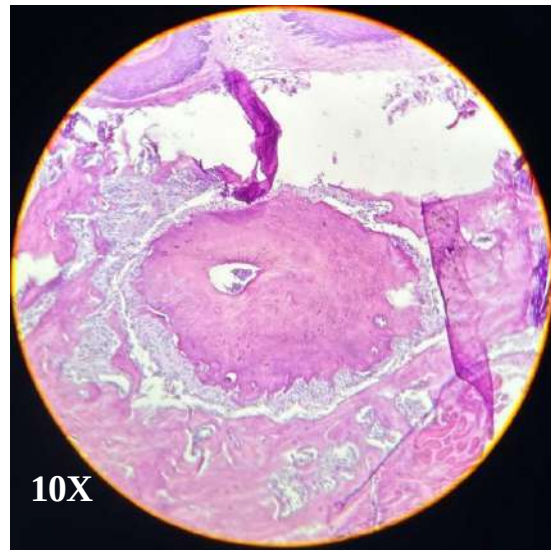
7.4 Regeneración en molares

Se obtuvo regeneración de molares en tres de los cinco ratones que conformaban el lote I, aquel que se le trasplantaron las CMGD, a pesar de que desarrollaron características de masas amorfas de bordes irregulares, sin anatomía bien definida que normalmente se presenta en el desarrollo natural de molares. En los otros tres lotes no hubo desarrollo de molares fracturados por lo que podemos concluir que la regeneración se presentó en el 60% de los ensayos (ver figura 12 A).

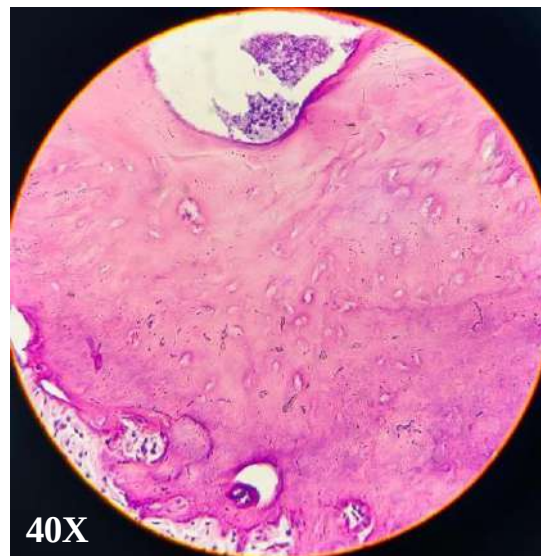
En tinción con hematoxilina y eosina se observó presencia de células dentales propias de desarrollo como son odontoblastos y ameloblastos (figura 12 B y C).



A)



B)



C)

Fig. 12 Cortes histológicos de los molares de los ratones del lote 1, aquellos que recibieron trasplante de células madre. **A)** Regeneración de órgano dental del molar de la fig. 8^a observada con estereomicroscopio (30X) en donde se observa un molar con características de masa amorfa y bordes irregulares. **B) y C)** Corte histológico del molar regenerado del molar observado en Fig. 8^a. Se aprecia el complejo dentino-pulpar con características irregulares y gran presencia de odontoblastos (B a 10X) (C a 40X).

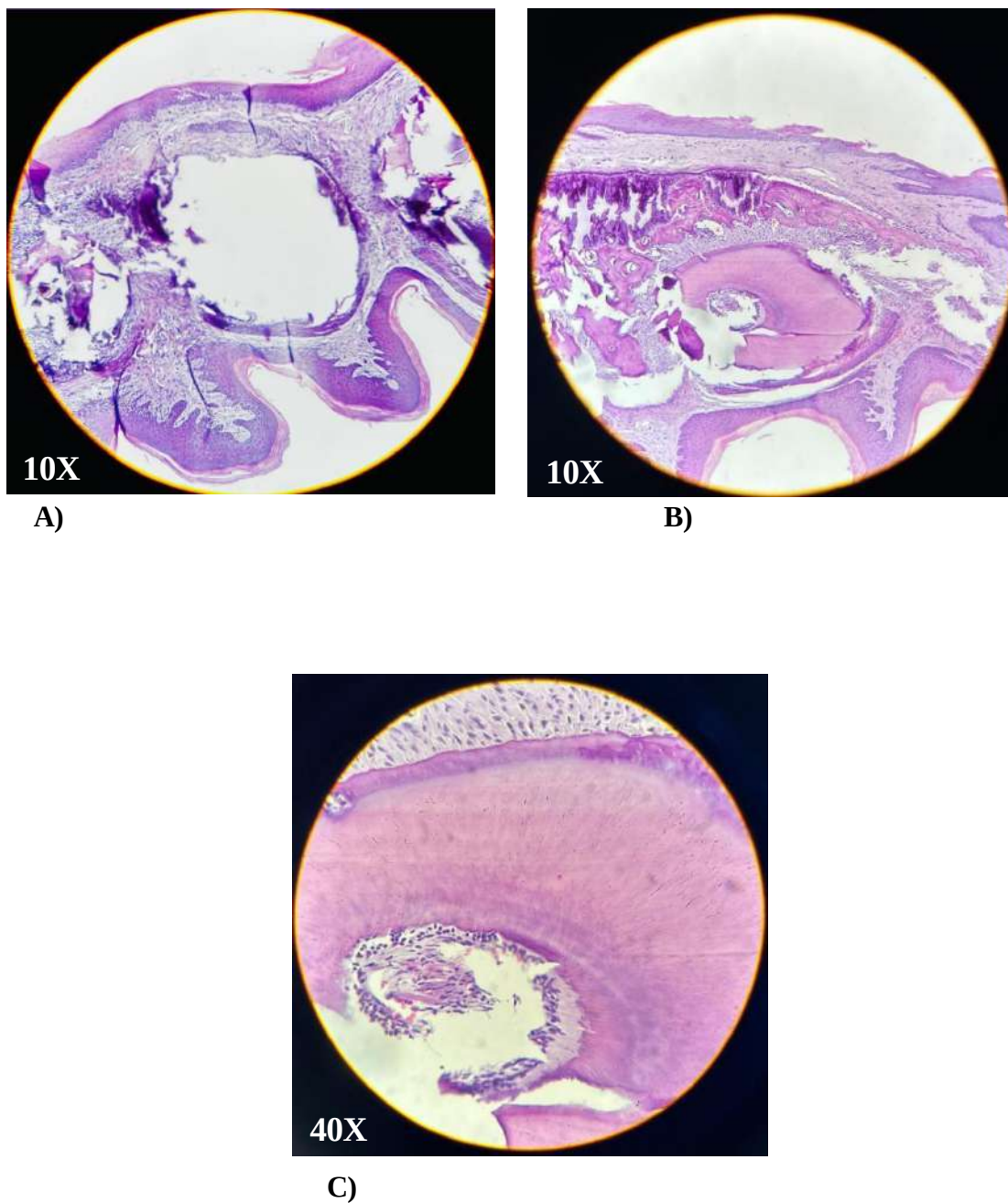


Fig. 13 Corte histológico de un ratón del lote II, donde el molar fue fracturado, pero sin trasplante de CMGD. No se observa regeneración dental. **A)** Cavity alveolar vacía sin presentar regeneración; **B)** Estructura histológica del molar fracturado en donde se aprecia estructuras dentales (Esmalte, dentina y pulpa) atrofiadas sin presentar datos de regeneración.

VIII DISCUSIÓN

La Odontología moderna busca sustituir los materiales dentales que se utilizan actualmente por materiales de origen biológico, basados en células con las mismas características de las naturales (Dulak J et al, 2015). Una de las áreas más prometedoras es la utilización de células madre en la regeneración dental. Esta tendencia busca reemplazar los materiales dentales de restauración tradicionales con terapias que promuevan la regeneración de los tejidos dentales dañados o perdidos (Huang GTJ et al, 2009). En la actualidad, las células madre dentales pueden ser obtenidas de dientes deciduos (de leche), dientes de adultos o incluso del tejido dental remanente después de procedimientos dentales, lo que hace que su obtención sea menos invasiva y más ética en comparación con otras fuentes de células madre, como la médula ósea, el tejido adiposo o del cordón umbilical. La regeneración dental en modelos animales, como los ratones, ha sido un área de investigación de gran interés debido a su relevancia para el desarrollo de terapias regenerativas en humanos. Un estudio publicado en la revista Nature mostró que los ratones pueden regenerar sus incisivos gracias a un tipo de células madre llamadas células mesenquimales estromales. En este estudio, se investigó el potencial de regeneración dental en ratones utilizando células madre de germen dental, ya que estas células tienen la capacidad única de diferenciarse en varios tipos de células dentales, como odontoblastos, cementoblastos y células de la pulpa dental, además tienen la capacidad de autorrenovarse, lo que significa que pueden producir más células madre para mantener su población (Morsczeck C et al, 2005).

Esta investigación se realizó como ya se mencionó en un modelo *in vivo*, ya que este ofrece una plataforma versátil y poderosa para investigar la regeneración dental, su similitud con los humanos, su disponibilidad, costo, la capacidad de manipulación genética, el control experimental y la facilidad de seguimiento (Lai WF et al, 2014)..

El anticuerpo CD166 es utilizado en la investigación de células madre; se utiliza a menudo como una herramienta para identificar y caracterizar estas células en diferentes tejidos. La presencia o ausencia de CD166 en la superficie celular de las células se utiliza como un marcador para distinguir entre células madre y otras células diferenciadas (Van Kempen et al, 2001). El CD166 es una molécula de adhesión de células leucocitarias

activadas que se ha demostrado que se expresa positivamente en células humanas natales. (44) En este estudio para fines de la estandarización de la técnica inmunohistoquímica, se demostró que con el anticuerpo CD166 se expresa de manera positiva en riñón y piel, pero presenta una expresión negativa en cerebro. Si bien el riñón es un órgano que no se regenera, existe evidencia en la cual se han caracterizado un grupo de células tubulares con capacidades regenerativas, los cuales tienen la capacidad de proliferar y transformarse en células epiteliales durante el proceso de regeneración tubular (Flaquer et al. 2010). En contraparte, el cerebro no expresó este marcador, ya que no tenemos evidencia clara de la presencia de células madre en esta región.

Con respecto a los resultados obtenidos planteados en los objetivos de este estudio con la identificación de CD166 en mandíbulas, podemos confirmar con esta técnica que las células trasplantadas en los molares corresponden a células madre. Este hallazgo es importante para validar la investigación, ya que la inmunohistoquímica permite la detección precisa de marcadores específicos que identifican las células madre, proporcionando así una sólida evidencia de la identidad y función de las células trasplantadas. (44)

El diente incisivo del ratón se distingue tanto de sus molares como de cualquier diente humano debido a su constante erupción a lo largo de toda la vida del animal. En el extremo apical del diente, las células se multiplican y transforman en varias células especializadas en la formación dental, incluyendo aquellas originadas del tejido mesenquimal.(45)

En este estudio, observamos que el proceso de regeneración natural en los dientes incisivos de ratones implicó una serie de eventos temporales, incluyendo la migración de células progenitoras hacia el sitio de la lesión, la proliferación celular, y la diferenciación en diversos tipos celulares necesarios para la formación de tejido dental funcional (Ohshima et al. 2005). Este proceso natural, aunque efectivo, requirió un tiempo significativo para completarse, con un promedio de 14 días desde la lesión inicial hasta la restauración completa del tejido dental.

Por el contrario, nuestros hallazgos sugieren que el trasplante de células madre del germen dental aceleró significativamente el proceso de regeneración en comparación con el periodo natural de recuperación. El tiempo de regeneración fue reportado en un lapso de 7

días lo que nos ayuda a concluir que con la intervención con estas células se provocó una notable mejora en la velocidad y la completitud de la recuperación de los tejidos dentales. Los ratones que recibieron el trasplante de células madre exhibieron una recuperación más rápida y completa, lo que se tradujo en una restauración funcional observada. Aunque esta mejora no alcanzó significancia estadística en nuestro estudio, los resultados sugieren un efecto positivo y prometedor del uso de células madre del germen dental en la regeneración de tejidos dentales.

Las células madre de germen dental han surgido como una fuente prometedora en la odontología regenerativa debido a su capacidad única para diferenciarse en varios tipos de células dentales y contribuir a la formación de tejidos dentales funcionales. Varios estudios han destacado la importancia de estas células en la regeneración dental y su potencial para revolucionar los enfoques de tratamiento en odontología (Luo W et al, 2021).

Un estudio realizado por Morsczeck et al, 2005 demostró la presencia de células madre en el germen dental humano, lo que proporcionó una base sólida para investigaciones posteriores sobre su potencial regenerativo. Este estudio identificó células precursoras en el folículo dental de los terceros molares, que tenían la capacidad de diferenciarse en odontoblastos, cementoblastos y células de la pulpa dental, fundamentales para la regeneración de los tejidos dentales.

En este estudio se obtuvieron resultados favorables tras el trasplante de células madre a molares de ratón. Aunque los molares regenerados no reprodujeron una anatomía típica y conocida, la masa amorfa que se presentó mostró en el estudio histológico características propias de células dentales, como la presencia de ameloblastos y odontoblastos. Estos hallazgos indican un potencial prometedor para la regeneración de tejidos dentales utilizando células madre. Aunque la estructura específica del molar no se replicó completamente, la presencia de células especializadas relacionadas con la formación del esmalte y la dentina sugiere un proceso de regeneración direccionado hacia la reconstrucción de tejidos dentales funcionales (Janebodin K et al, 2011)

Estos resultados respaldan la viabilidad del enfoque de trasplante de células madre en el campo de la regeneración dental.

IX CONCLUSIONES

La capacidad de las células madre para diferenciarse en diversos tipos de células especializadas abre nuevas fronteras para terapias personalizadas, que pueden adaptarse a las necesidades específicas de cada paciente, mejorando así la eficacia del tratamiento y reduciendo efectos secundarios. En este estudio se comprobó que las investigaciones en modelos animales han proporcionado pruebas contundentes de la capacidad de las células madre para reparar y regenerar tejidos dañados, lo que se traduce en una mejora de la calidad de vida de los individuos afectados. Estos resultados experimentales favorables justifican plenamente el apoyo y la inversión en la aplicación de células madre para la regeneración dental e incluso para desarrollo de terapias innovadoras que puedan transformar la medicina moderna y proporcionar soluciones curativas para enfermedades actualmente incurables.

X RECOMENDACIONES

Con este estudio se daría apertura para aplicarlo en humanos modificando el nicho en terceros molares y la aplicación en piezas careadas.

REFERENCIAS

1. Balic A. Biology Explaining Tooth Repair and Regeneration: A Mini-Review. *Gerontology*. 2018;64(4):382–8.
2. Guo H, Li B, Wu M, Zhao W, He X, Sui B, et al. Odontogenesis-related developmental microenvironment facilitates deciduous dental pulp stem cell aggregates to revitalize an avulsed tooth. *Biomaterials*. 2021 Dec 1;279:121223.
3. Gomez de Ferraris. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. In Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009.
4. Balic A, Thesleff I. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Curr Top Dev Biol*. 2015;115:157–86.

5. Albertí Vázquez L, Más Sarabia M, Martínez Padilla S, Méndez Martínez MJ. Histogénesis del esmalte dentario. Consideraciones generales. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2007;11(3):0–0.
6. Montes BM. Embriología y anatomía de la cavidad oral y faringe. In: *Libro virtual de formación en otorrino-laringología*. Alcalá de Henares. Madrid : Seorl PCF; 2015.
7. Almeda M. Embriología, anatomía topográfica y anatomía quirúrgica de las regiones cérvico-faciales. In: *Libro virtual de formación en ORL*. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia: Seorl PCF; 2015.
8. Graham A. Development of the pharyngeal arches. *Am J Med Genet A*. 2003 Jun 15;119A(3):251–6.
9. Frisdal A, Trainor PA. Development and Evolution of the Pharyngeal Apparatus. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2014;3(6):403.
10. Farci F, Soni A. Histology, Tooth. *StatPearls*. 2022;
11. Pro JW, Barthelat F. Discrete element models of tooth enamel, a complex three-dimensional biological composite. *Acta Biomater*. 2019;94:536–52.
12. Duverger O, Beniash E, Morasso MI. Keratins as components of the enamel organic matrix. *Matrix Biol*. 2016;52–54:260.
13. Paynter KJ, Pudy G. A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat Rec*. 1958;131(2):233–51.
14. Xie Z, Shen Z, Zhan P, Yang J, Huang Q, Huang S, et al. Functional Dental Pulp Regeneration: Basic Research and Clinical Translation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16).
15. Square TA, Sundaram S, Mackey EJ, Miller CT. Distinct tooth regeneration systems deploy a conserved battery of genes. *Evodevo*. 2021;12(1).
16. Phifer-Rixey M, Bi K, Ferris KG, Sheehan MJ, Lin D, Mack KL, et al. The genomic basis of environmental adaptation in house mice. *PLoS Genet*. 2018;14(9):e1007672.
17. Han X, Yoshizaki K, Tian T, Miyazaki K, Takahashi I, Fukumoto S. Mouse Embryonic Tooth Germ Dissection and Ex vivo Culture Protocol. *Bio Protoc*. 2020;10(3).
18. He M, Wang P, Li B, Wang Y, Wang X, Bai D, et al. Rodent incisor and molar dental follicles show distinct characteristics in tooth eruption. *Arch Oral Biol*. 2021;126.

19. Krivanek J, Soldatov RA, Kastriti ME, Chontorotzea T, Herdina AN, Petersen J, et al. Dental cell type atlas reveals stem and differentiated cell types in mouse and human teeth. *Nat Commun.* 2020;11(1).
20. Bosshardt DD, Stadlinger B, Terheyden H. Cell-to-cell communication--periodontal regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(3):229–39.
21. Vargas Miranda B, Ambriz García D, Navarro Maldonado M del C. Manejo de animales del Bioterio de la UAM-1. México D.F.; 2018. 27 p.
22. Queiroz A, Pelissari C, Arana-Chavez VE, Trierweiler M. Temporo-spatial distribution of stem cell markers CD146 and p75NTR during odontogenesis in mice. *Journal of Applied Oral Science.* 2021;29.
23. Takara K, Maruo N, Oka K, Kaji C, Hatakeyama Y, Sawa N, et al. Morphological study of tooth development in podoplanin-deficient mice. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171912.
24. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971 Sep 1;8(9):871–4.
25. Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC. ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls. *Proteomics Clin Appl [Internet].* 2015 Apr 1 [cited 2024 Aug 4];9(3–4):406–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prca.201400130>
26. Arnold MM, Srivastava S, Fredenburgh J, Stockard CR, Myers RB, Grizzle WE. Effects of Fixation and Tissue Processing on Immunohistochemical Demonstration of Specific Antigens. *Biotechnic & Histochemistry.* 1996;71(5):224–30.
27. Naritoku WY, Taylor CR. A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods: an evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase. <http://dx.doi.org/101177/3037037942>. 1982 Mar 1;30(3):253–60.
28. Singh A, Astekar MS, Sapra G, Agarwal A, Murari A. Immunohistochemical expression of paxillin in ameloblastoma and odontogenic keratocyst: An observational study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2023 Oct 1;27(4):727.
29. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005 Jul 1;42(4):405–26.
30. Mejía González A. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las patologías bucales. Mexico. DF: Impresora y encuadernadora Progreso S.A. de C.V.; 2012.

31. Tenani CF, Silva Junior MF, Lino CM, Sousa M da LR de, Batista MJ. The role of health literacy as a factor associated with tooth loss. *Rev Saude Publica*. 2021;55:116.
32. Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, Alipour V, et al. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J Dent Res*. 2020;99(4):362–73.
33. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020;54(1):7–14.
34. Ravi V, Murashima-Suginami A, Kiso H, Tokita Y, Huang CL, Bessho K, et al. Advances in tooth agenesis and tooth regeneration. *Regen Ther*. 2023 Mar 1;22:160–8.
35. Ohshima H, Nakasone N, Hashimoto E, Sakai H, Nakakura-Ohshima K, Harada H. The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch Oral Biol*. 2005;50(2):153–7.
36. Brockes JP, Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008 Nov 10;24(Volume 24, 2008):525–49.
37. Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci*. 2009;5(3):226–43.
38. Martín Gil Dirigido por M^a Begoña García Cenador L. Evaluación de un modelo experimental en rata dirigido a la regeneración ósea con células madre obtenidas de pulpa dental. [Salamanca]: Universidad de Salamanca; 2020.
39. Estrela C, de Alencar AHG, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*. 2011;22(2):91–8.
40. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):329–37.
41. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009 Sep;88(9):792.
42. Lai WF, Lee JM, Jung HS. Molecular and engineering approaches to regenerate and repair teeth in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014 Nov 24;71(9):1691–701.

43. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement--a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod.* 2004;26(5):483–90.
44. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol.* 2012 Nov 1;57(11):1439–58.
45. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of Putative Stem Cells in Dental Epithelium and Their Association with Notch and Fgf Signaling. *Journal of Cell Biology.* 1999 Oct 4;147(1):105–20.
46. Luo W, Zhang L, Huang B, Zhang H, Zhang Y, Zhang F, et al. BMP9-initiated osteogenic/odontogenic differentiation of mouse tooth germ mesenchymal cells (TGMCS) requires Wnt/ β -catenin signalling activity. *J Cell Mol Med.* 2021 Mar 1;25(5):2666–78.
47. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005 Apr;24(2):155–65.
48. Janebodin K, Horst O V., Ieronimakis N, Balasundaram G, Reesukumal K, Pratumvinit B, et al. Isolation and Characterization of Neural Crest-Derived Stem Cells from Dental Pulp of Neonatal Mice. *PLoS One.* 2011 Nov 8;6(11):e27526.

XI ANEXOS

1 Preparación de Reactivos

Solución fisiológica

9 g. de NaCl

1 litro de H₂O

Pepsina

5 g. de pepsina 1:10,000

7 ml. De HCl

1 litro solución fisiológica

PBS

90 g. de NaCl 13.8 g. de NaH₂PO₄ + H₂O

1 litro de H₂O

Formol 10%

900 ml. Diluyente (PBS)

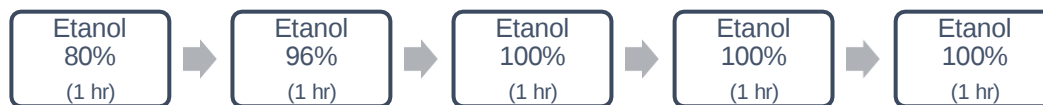
100 ml. Formol absoluto

Laminillas electro cargadas

Poli-L-lisina 10 min.

2 Preparación de tejidos para cortes histológicos

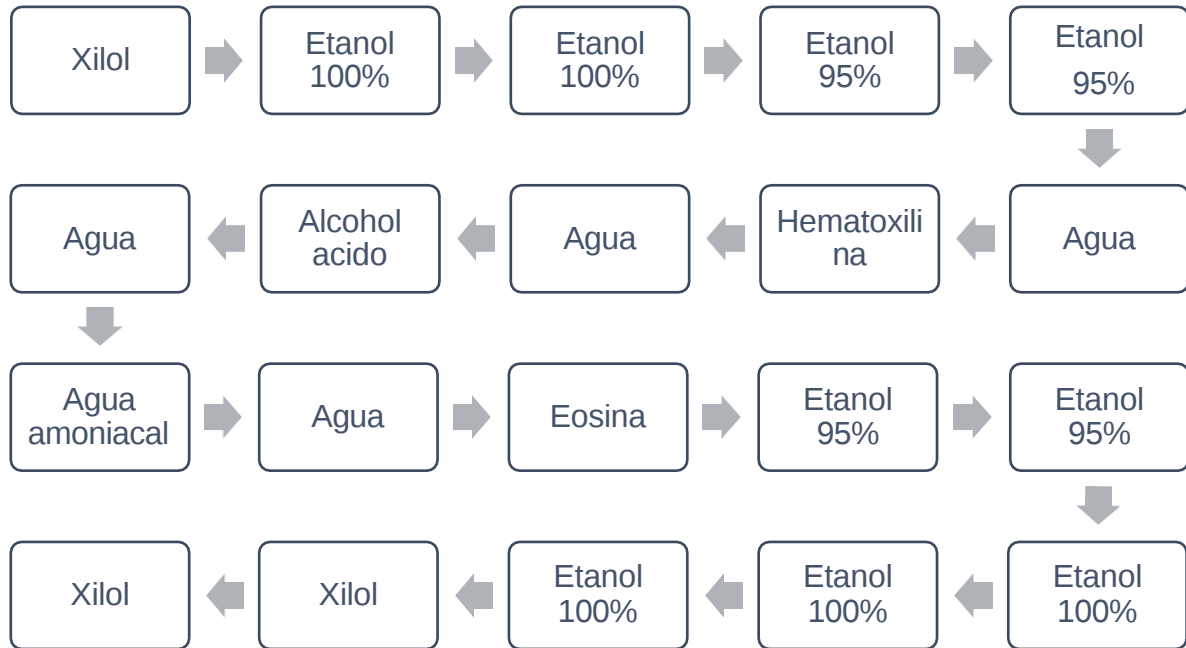
Deshidratación:



Clarificación:



Tinción H/E:



Contraste IHQ

