

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA CUANTIFICAR
LINFOCITOS T CD4⁺ Y CD8⁺ EN PULPA DENTAL HUMANA**

**TESIS QUE PRESENTA:
CD. MITZELY QUIROA CUADRAS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

**DIRECTORES DE TESIS:
DRA. ELSA MARIBEL MEDINA AGUILAR
DRA. ERIKA DE LOURDES SILVA BENÍTEZ**

DICIEMBRE 2017, CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO.

DEDICATORIA

Dedico este estudio a mis padres **Juan Ariosto Quiroa Ceyca** e **Irma Cuadras Gutiérrez** por haberme apoyado en mi decisión de realizar un posgrado. Por brindarme las herramientas necesarias para hacer mi sueño profesional realidad y por el esfuerzo que día a día hicieron para culminar este anhelo que hoy veo reflejado. Por darme el ejemplo de superación académica y personal, ejemplo, que he intentado seguir para convertirme en la mejor versión de mí misma tanto en lo laboral como personalmente.

A mis hermanos, abuelos, primos, tíos y amigos que en algún momento sacrifique en tiempo y atención por la ilusión de convertirme en una endodoncista. Personas que, a pesar de no estar compartiendo momentos importantes, estuvieron conmigo apoyándome emocionalmente.

A mi esposo **Eduardo Escalante Camacho**, no solo por apoyarme si no por haber tomado mi sueño y hacerlo parte de él, por impulsarme cuando me detuve, por levantarme cuando me caí, por caminar conmigo cuando quise parar y por confiar en mí cuando yo no lo hacía. Por ser mi fan número uno y mi más grande admirador.

A mi nuevo sueño, mi hija **Ximena Escalante Quiroa** por estar conmigo en la culminación de esta etapa, por ser fuerte y apoyarme cuando no pude parar, dormir, comer, descansar o brindarle el tiempo que se merece para decirle que la amo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a la **Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar** por haberme dado la oportunidad de ser parte de la generación 2015-2017 de la Especialidad en Endodoncia. Por brindarme el regalo de cambiar mi vida para crecer profesionalmente y como persona.

Agradezco a todos **mis maestros** por haberme compartido sus conocimientos y por el interés siempre de vernos convertidos en los mejores. Por no sólo apoyarnos académicamente, sino también, por haberse convertido además en personas inolvidables que más que maestros se convirtieron en grandes amigos.

A las personas que me ayudaron a impulsar este proyecto hacia adelante; a mi asesora de tesis **Dra. Erika de Lourdes Silva Benítez** por estar conmigo de principio a fin, al **Dr. José Geovanni Romero Quintana**, **Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina** y **Dr. Rosalío Ramos Payán**, por su asesoría. A mi mentor en área de investigación **Germán Jiménez Gastelum** por su apoyo durante todo el estudio, a mi amiga **Isabel Romero González** por brindarme su apoyo durante este proyecto, al Dr. Julio Basurto Flores, Erik Lizárraga Verdugo y a todas las personas que formar parte del área de investigación en el laboratorio de microbiología e inmunología de la Facultad de Ciencias Químico biológica de la UAS.

Quiero agradecer a **mis amigas del posgrado** por ser parte de mi vida en estos dos años, por su compañía, apoyo, amistad y por haber convertido esta experiencia en una de las mejores de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1 RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2 INTRODUCCIÓN	3
3 MARCO TEÓRICO	4
3.1 Pulpa dental	4
3.1.1 Zonas topográficas de la pulpa dental	4
3.1.1.1 Capa odontoblástica	4
3.1.1.2 Zona pobre en células.....	5
3.1.1.3 Zona rica en células.....	6
3.1.1.4 Pulpa central	6
3.1.2 Población celular de pulpa dental sana	6
3.1.2.1 Odontoblastos	7
3.1.2.2 Fibroblastos.....	8
3.1.2.3 Células madre mesenquimales	9
3.1.2.4 Macrófagos	10
3.1.2.5 Neutrófilos	11
3.1.2.6 Mastocitos	12
3.1.2.7 Células Dendríticas	12
3.1.2.8 Linfocitos	13

3.1.3	Población celular en pulpa dental afectada	15
3.1.4	Vasos linfáticos en la pulpa dental.....	15
3.2	Importancia de la respuesta inmunológica pulpar	17
3.3	Metodologías empleadas para caracterizar la composición celular de la pulpa dental.	18
3.3.1	Métodos histológicos	18
3.3.1.1	Tinción con hematoxilina y eosina	18
3.3.2	Inmunohistoquímica.....	19
3.3.3	Citometría de flujo.....	19
3.3.4	Frotis celular	21
3.4	Antecedentes	21
4	JUSTIFICACIÓN	26
5	OBJETIVOS	27
5.1	OBJETIVO GENERAL	27
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
6	MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1	Lugar de obtención de la muestra.....	28
6.2	Tipo de estudio	28
6.3	Muestra	28
6.3.1	Tamaño de muestra.....	28
6.3.2	Tipo de muestreo.....	28
6.3.3	Criterios de inclusión	29
6.3.3.1	Histología y citometría de pulpa dental humana sana.....	29
6.3.3.2	Frotis de pulpa dental.....	29
6.3.3.2.1	Pulpa sana.....	29

6.3.3.2.2	Pulpitis irreversible.....	29
6.3.4	Criterios de exclusión	30
6.3.4.1	Histología y citometría de pulpa dental humana sana.....	30
6.3.4.2	Frotis de pulpa dental.....	30
6.3.4.2.1	Pulpa sana.....	30
6.3.4.2.2	Pulpitis irreversible.....	30
6.3.5	Criterio de eliminación	31
6.3.5.1	Histología y citometría de pulpa dental humana sana.....	31
6.3.5.2	Frotis de pulpa dental.....	31
6.3.5.2.1	Pulpa sana.....	31
6.3.5.2.2	Pulpitis irreversible.....	31
6.4	Metodología	31
6.4.1	Obtención del tejido pulpar	31
6.4.1.1	Histología, citometría y frotis de pulpa dental sana.....	31
6.4.1.2	Frotis de pulpa dental con pulpitis irreversible	34
6.4.2	Preparación histológica de la muestra.....	35
6.4.2.1	Inclusión del tejido en PolyFreeze®.....	35
6.4.2.2	Realización de cortes histológicos y tinción	35
6.4.3	Disgregación mecánico-enzimática del tejido.....	35
6.4.4	Frotis celular	38
6.4.4.1	Pulpa sana	38
6.4.4.2	Pulpitis irreversible	38
6.4.5	Protocolo para cuantificación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en pulpa dental humana sana y con pulpitis irreversible por citometría de flujo	39
6.4.5.1	Inmunofenotipificación	39

6.4.5.2	Reactivos	40
6.4.5.3	Adquisición y análisis de la muestra	41
6.4.5.4	Análisis del panel de linfocitos T	41
6.4.5.5	Análisis estadístico.....	42
6.5	Lugar de realización.....	42
6.6	Financiamiento.....	42
7	RESULTADOS.....	43
7.1	HISTOLOGÍA DE PULPA DENTAL HUMANA SANA	43
7.1.1	Descripción de la celularidad y composición de la pulpa dental humana sana	43
7.1.2	Determinación del número de linfocitos por campo en pulpa dental humana sana	47
7.2	FROTIS CELULAR	48
7.2.1	Evaluación de la presencia de linfocitos en pulpa dental humana.....	48
7.2.1.1	Tejido pulpar sano.....	49
7.2.1.2	Tejido pulpar con pulpitis irreversible	51
7.3	ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO CON CITOMETRÍA DE FLUJO	51
8	DISCUSIÓN	54
9	CONCLUSIONES	56
10	PERSPECTIVAS	57
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
12	ANEXOS.....	65
12.1	CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	65
12.2	TÉCNICA DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Panel de inmunofenotipificación de leucocitos.	42
Tabla 2. Número de linfocitos en pulpa dental humana sana.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología para la obtención del tejido pulpar.....	33
Figura 2. Obtención del tejido pulpar en pulpitis irreversible	34
Figura 3. Proceso de disgregación.....	37
Figura 4. Proceso de marcaje de los anticuerpos.	40
Figura 5. Corte histológico de pulpa dental humana sana.	43
Figura 6. Fibras de colágena.....	44
Figura 7. Fibroblastos.....	44
Figura 8. Vasos sanguíneos con presencia de pericitos.	45
Figura 9. Plexos nerviosos con presencia de células de Schwann.	45
Figura 10. Túbulos dentinarios	46
Figura 11. Material mineralizado.	46
Figura 12. Linfocitos.	47
Figura 13. Células pulpares en frotis de pulpa sana	50
Figura 14. Células pulpares en frotis de pulpitis irreversible	51
Figura 15. Dot Plots de citometría de flujo inicial.....	52
Figura 16. Dot Plots de citometría de flujo de cuantificación.....	53

1 RESUMEN

Introducción: La pulpa dental es un sistema de tejido conjuntivo irrigado y vascularizado constituido por fibras de colágena, sustancia fundamental y células formativas, constitutivas e inmunológicas. Los linfocitos T son células de defensa que actúan ante un daño o infección pulpar con el objetivo de eliminar el agente causal específico y lograr la reparación o regeneración del tejido pulpar. El conocimiento de la frecuencia de linfocitos T y sus subgrupos en pulpa sana en comparación con pulpitis irreversible, nos permite comprender la patogénesis de la pulpitis dental y el comportamiento inmunológico de este tejido. **Objetivo:** Estandarizar un protocolo para cuantificar linfocitos T CD4+ y CD8+ en pulpa dental humana. **Materiales y Métodos:** Se obtuvieron 9 terceros molares sanos extraídos los cuales se dividieron en 3 grupos para: a) análisis histológico (n=7); b) frotis celular pulpar (n=1), y c) análisis por citometría de flujo(n=1). Además, se obtuvo una muestra de tejido pulpar con pulpitis irreversible para frotis (n=1). **Resultados:** Fue posible la estandarización debido a que en los tres tipos de análisis realizados se observó viabilidad y presencia linfocítica. La muestra de tejido de pulpitis no fue viable como muestra para el estudio. **Conclusiones:** Es posible realizar un estudio de cuantificación de linfocitos T CD4⁺ Y CD8⁺ en pulpa dental humana sana pero no en pulpitis irreversible.

Palabras claves: Pulpa, linfocitos T, histología, frotis, citometría.

ABSTRACT

Introduction: The dental pulp is a system of irrigated and vascularized conjunctive tissue constituted by collagen fibers, fundamental substance and both formative, constitutive and immunological cells. T lymphocytes are defense cells that act against damage or pulpal infection in order to eliminate the specific causative agent and achieve repair or pulp tissue regeneration. The knowledge of the frequency of T lymphocytes and their subgroups in healthy pulp compared with irreversible pulpitis, allows us to understand the pathogenesis of dental pulpitis and the immunological behavior of this tissue. **Objective:** Standardize a protocol to quantify CD4 and CD8 T lymphocytes in human dental pulp. **Materials and Methods:** 9 extracted healthy third molars were obtained, which were divided into 3 groups for: a) histological analysis (n=7); b) pulpal cell smear (n = 1), and c) analysis by flow cytometry (n = 1). In addition, a sample of pulp tissue with irreversible pulpitis was obtained for smears (n = 1). **Results:** Standardization was possible due to the fact that in the three types of analyzes performed, viability and lymphocytic presence were observed. The sample of pulpitis tissue was not viable as a sample for the study. **Conclusions:** It is possible to carry out a quantification study of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in healthy human dental pulp but not in irreversible pulpitis.

Key words: Pulp, T lymphocytes, histology, smear, cytometry.

2 INTRODUCCIÓN

La pulpa dental es un sistema de tejido conjuntivo situado dentro de paredes rígidas de dentina mineralizada, está formado por células, substancia fundamental y fibras. Además, está provisto de un sistema vasculonervioso que permite la irrigación y ofrece sensibilidad al mismo.

La pulpa dental está provista por una gran diversidad de células formativas y constitutivas como odontoblastos, fibroblastos, células madre indiferenciadas, además de células de defensa como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos por mencionar algunos, los cuales se encuentran presentes tanto en pulpa sana como en los casos en que se está presentando un proceso patológico.

El tejido de la pulpa dental como cualquier otro tejido está propenso a daños o lesiones, tanto físicos, químicos y mecánicos. Estas lesiones se pueden presentar debido a procesos cariogénicos siendo ésta la causa más común. Entre otras causas se hace referencia a tratamientos dentales iatrogénicos, traumatismos dentales, enfermedad periodontal y anacoressis, aunque éste último no está bien documentado.

Ante la agresión pulpar causada por algunos de los conceptos antes mencionados existe una respuesta inmunológica inicial que se desencadena en este tejido caracterizada por un proceso inflamatorio donde existe un reclutamiento de células de defensa como neutrófilos y macrófagos, posteriormente si el estímulo persiste se instala una respuesta inmunológica específica caracterizada principalmente por linfocitos T cooperadores CD4+ y linfocitos T citotóxicos CD8+. Además, se encuentran Linfocitos B diferenciados a células plasmáticas secretoras de anticuerpos con el principal objetivo de eliminar al antígeno que produjo su diferenciación y activación. Todo lo anterior demuestra que la pulpa dental está equipada con un arsenal de células de defensa esenciales para el inicio de las respuestas inmunológicas.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Pulpa dental

La pulpa dental es un sistema de tejido conjuntivo formado por células, substancia fundamental y fibras (Seltzer & Bender, 1987) circundado por paredes de dentina que ocupa la cámara pulpar y los conductos radiculares (Estrela, 2009). Las células como los fibroblastos fabrican una matriz fundamental que actúa como base y precursor del complejo fibroso, compuesto por colágena y reticulina (Seltzer & Bender, 1987) que presentan una orientación coronal en el tercio apical y orientadas al azar en la región apical (Fox & Heeley, 1980).

En el tejido pulpar podemos encontrar fibras neurales, vasos sanguíneos y linfáticos cuyas funciones principales son producir dentina, mantener la vitalidad biológica y fisiológica de la dentina (Liu, Gronthos, & Shi, 2006). Los vasos sanguíneos y los haces nerviosos ingresan a la pulpa dental a través del foramen apical y proporcionan nutrición y un sistema nervioso sensorial receptivo (Tatullo, Marrelli, Shakesheff, & White, 2015).

En la pulpa dental es normal encontrar células como odontoblastos, fibroblastos y células madre indiferenciadas, además de células inmunológicas (Fox & Heeley, 1980; Hargreaves, Goodis, & Tay, 2012; Liu et al., 2006; Seltzer & Bender, 1987).

3.1.1 Zonas topográficas de la pulpa dental

3.1.1.1 Capa odontoblástica

El estrato celular más externo de la pulpa sana es la capa de odontoblastos. Esta capa se localiza inmediatamente subyacente a la predentina; las proyecciones odontoblásticas, sin embargo, pasan a través de la predentina para llegar a la dentina. En consecuencia, la capa odontoblástica se compone de los cuerpos

celulares de los odontoblastos. Además, entre estos últimos se pueden encontrar capilares, fibras nerviosas y células dendríticas. La altura de los odontoblastos es variable; en consecuencia, sus núcleos no se encuentran al mismo nivel, sino que están alineados de forma escalonada, descrito a menudo como una empalizada (Hargreaves & Berman, 2016). Los cuerpos celulares de los odontoblastos están conectados por complejos firmes y uniones comunicantes (Bishop & Yoshida, 1992). La capa odontoblástica de la pulpa coronal contiene más células por unidad de área que la de la pulpa radicular (Hargreaves & Berman, 2016). Puesto que el número de túbulos dentinarios por unidad de área es menor en la raíz que en la corona del diente, los cuerpos celulares de los odontoblastos están menos apiñados y se pueden ensanchar en sentido lateral (Stenvik, 1969). Existe una serie de uniones intercelulares especializadas (es decir, complejos de unión), que incluyen desmosomas (zónulas adherentes), uniones en hendidura (nexos) y uniones estrechas (zónulas ocluyentes) que conectan odontoblastos adyacentes (Hargreaves & Berman, 2016). Al parecer, las uniones estrechas determinan la permeabilidad de la capa odontoblástica mediante la restricción del paso de moléculas, iones y fluido (von Fraunhofer, Adachi, Barnes, & Romberg, 2000).

3.1.1.2 Zona pobre en células

Bajo la capa odontoblástica en la pulpa coronal, existe con frecuencia una zona estrecha, de un ancho aproximado de 40 μ m, relativamente libre de células y por ello recibe el nombre de zona pobre en células o capa de Weil. Esa zona está formada por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y las finas prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos (Hargreaves & Berman, 2016). La presencia o ausencia de la zona pobre en células depende del estado funcional de la pulpa (Elliott, Roberts, Burkes, & Phillips, 1999). Esta zona puede no ser aparente en las pulpas jóvenes, donde la dentina se forma con rapidez, o en las pulpas viejas, donde se genera dentina reparadora (Hargreaves & Berman, 2016).

3.1.1.3 Zona rica en células

En el área subendoblástica existe un estrato destacado que contiene una proporción elevada de fibroblastos, en comparación con la región más central de la pulpa. Esta capa es mucho más prominente en la pulpa coronal que en la radicular. Además de fibroblastos, la zona rica en células puede contener un número variable de macrófagos, células dendríticas y células mesenquimatosas indiferenciadas o células madre. De acuerdo con la evidencia obtenida en molares de rata, se ha sugerido que la zona rica en células obedece a la migración periférica de las células que pueblan las regiones centrales de la pulpa, comenzando en la época aproximada de la erupción dental. La migración de células inmunocompetentes dentro y fuera de la zona rica en células es consecuencia de la provocación antigénica (Hargreaves & Berman, 2016). Los odontoblastos con lesiones irreversibles se sustituyen por células que emigran desde la zona rica en células hasta la superficie interna de la dentina (Fitzgerald, Chiego, & Heys, 1990).

3.1.1.4 Pulpa central

La pulpa central es la masa central de la pulpa, contiene los vasos sanguíneos y los nervios de mayor tamaño. La célula más destacada en esta zona es el fibroblasto (Hargreaves & Berman, 2016).

3.1.2 Población celular de pulpa dental sana

La pulpa dental en condiciones normales está equipada con una variedad de células asociadas con el sistema de defensa inmunológica. La gran mayoría de las células identificadas pertenecían a la línea de linfocitos T. Además, se demostró la presencia de las células con la capacidad de presentación de antígeno (M. Jontell, Gunraj, & Bergenholtz, 1987). Los datos refutan las suposiciones previas de que la pulpa dental normal, sin ninguna clase de alteraciones, carece de células inmunocompetentes (Seltzer & Bender, 1987).

Entre las células presentes en la pulpa dental observamos a los fibroblastos que son células fundamentales debido a que sintetizan colágena. Los odontoblastos son células pulpares muy diferenciadas cuya función principal es producción de dentina dispuestos en forma de empalizada en la periferia de la cámara pulpar y conducto radicular cuya prolongación odontoblástica se encuentra en los túbulos dentinarios acompañado de terminaciones nerviosas. Cuando se lesiona la dentina, se altera esta distribución de empalizada desorganizando la continuidad celular y se crea una reacción pulpar. También se encuentran pericitos en las paredes vasculares y células madre indiferenciadas (Seltzer & Bender, 1987).

3.1.2.1 Odontoblastos

Los odontoblastos se localizan en la periferia del tejido pulpar, con extensiones a la parte interna de la dentina. La dentina no existiría de no ser producida por los odontoblastos y la pulpa dental depende de la protección ofrecida por la dentina y el esmalte (Hargreaves & Berman, 2016).

El odontoblasto es una célula cilíndrica alta en la porción coronal, cúbicas en la porción media y aplanadas en cerca del foramen apical (Couve, 1986). Está conformado por un cuerpo y un proceso odontoblástico que ocupa la mayor parte del espacio dentro del túbulo. Esta célula es la causante de la dentinogénesis durante el desarrollo dental y en el envejecimiento, se le considera la célula más característica del complejo pulpo dentinario. Durante la dentinogénesis, los odontoblastos forman los túbulos dentinarios, y su presencia dentro de los túbulos convierte la dentina en un tejido vivo. El odontoblasto sintetiza sobre todo colágeno tipo I y V en la matriz extracelular (Hargreaves & Berman, 2016).

Los odontoblastos se alinean en una sola capa en la interfaz entre la dentina y la pulpa. Una de las características más enigmáticas de estas células es que están estrechamente relacionadas con las terminaciones nerviosas (Magloire et al., 2010).

Previamente sus cuerpos celulares están incrustados en una densa red de axones sensoriales del trigémino íntimamente relacionados con su membrana celular, sin estructuras tipo sinapsis (Ibuki, Kido, Kiyoshima, Terada, & Tanaka, 1996; Thivichon-Prince et al., 2009), demostraron que los odontoblastos muestran propiedades excitables, lo que sugiere que pueden operar como células sensoriales (Allard, Magloire, Couble, Maurin, & Bleicher, 2006). Los odontoblastos están sujetos a estímulos externos que causan deformaciones de dentina; de manera similar, la respuesta celular podría involucrar al cilio primario. La mecanosensibilidad sugiere que el desplazamiento del fluido dentro de los túbulos dentinarios podría traducirse en señales eléctricas que se traduce en dolor dental (Allard, Couble, Magloire, & Bleicher, 2000).

Los odontoblastos son responsables de la formación de dentina. Se sospecha que desempeñan un papel en la transmisión del dolor dental como células sensoriales debido a su estrecha relación con los nervios, pero este papel nunca se ha demostrado. La evidencia de propiedades excitables de los odontoblastos y la agrupación de moléculas clave en el sitio del contacto del nervio odontoblástico sugieren fuertemente que los odontoblastos pueden operar como células sensoriales que inician la transmisión del dolor dental (Allard et al., 2006).

3.1.2.2 Fibroblastos

Los fibroblastos son células fundamentales en todo tejido conjuntivo. Su forma es de huso con núcleos ovales; tienen prolongaciones citoplasmáticas desde el cuerpo celular principal. En cortes con hematoxilina y eosina pueden verse los núcleos pero no las prolongaciones (Seltzer & Bender, 1987). Los fibroblastos son las células más numerosas en la pulpa. Parecen ser células de tejido específico, capaces de dar lugar a células comisionadas para establecer la diferenciación (p. ej., células similares a los odontoblastos). Estas células sintetizan colágeno tipos I y III, así como proteoglucanos y GAG. Producen y mantienen las proteínas de matriz de la MEC (Hargreaves & Berman, 2016). En cultivos tisulares se ha demostrado que los

fibroblastos de pulpa dental también sintetizan glucoproteínas como la fibronectina la cual al unirse con colágena pulpar tipo III puede originar fibras reticulares (Shuttleworth, Berry, & Wilson, 1982). Puesto que también son capaces de fagocitar y digerir el colágeno, los fibroblastos son los encargados de renovar el colágeno en la pulpa. Aunque distribuidos por toda la pulpa, los fibroblastos abundan sobre todo en la zona rica en células. Los fibroblastos en fase de diferenciación precoz son poligonales y aparecen ampliamente separados y uniformemente distribuidos dentro de la sustancia fundamental. Conforme maduran, estas células se convierten en estrelladas. Muchos fibroblastos de la pulpa se caracterizan por ser relativamente indiferenciados. Un término más moderno para las células indiferenciadas es células madre. Muchas células pulpares parecen permanecer relativamente indiferenciadas (en comparación con fibroblastos de otros tejidos conjuntivos) (Hargreaves & Berman, 2016). Un estudio demostró que la actividad mitótica previa a la diferenciación de los odontoblastos de reemplazo parece tener lugar sobre todo entre los fibroblastos perivasculares (Fitzgerald et al., 1990).

3.1.2.3 Células madre mesenquimales

El tejido pulpar se consideran una fuente rica de células madre mesenquimales indiferenciadas (Estrela, Alencar, Kitten, Vencio, & Gava, 2011). Por lo general se encuentran por fuera de las paredes vasculares (Seltzer & Bender, 1987). Notablemente, la pulpa dental es posiblemente la fuente más accesible de células madre postnatales (Casagrande, Cordeiro, Nor, & Nor, 2011). Su función natural es la producción de odontoblastos ya que tienen la capacidad de migrar hacia la superficie de la dentina y diferenciarse en odontoblastos para formar dentina reparadora. A diferencia de la dentina primaria, esta dentina reparadora está mal organizada, con túbulos dentinarios irregulares incrustados en la matriz de dentina, pero proporciona una barrera protectora para la pulpa (Liu et al., 2006) y de soporte a la estructuras dental (Tatullo et al., 2015).

Se sabe que estas células madre tienen el potencial de diferenciarse en varios tipos de células, incluyendo odontoblastos, progenitores neurales, osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Estrela et al., 2011). Además, durante traumatismos son capaces de transformarse en macrófagos. También pueden diferenciarse en fibroblastos u osteoclastos (Seltzer & Bender, 1987).

Las células madre de pulpa dental se pueden aislar y cultivar, y son células potenciales para su uso en la ingeniería y regeneración tisular, que incluyen tejido dental, nervios y óseo (Estrela et al., 2011). Además, estudios han demostrado la capacidad de producir tejidos dentales in vivo incluyendo dentina, pulpa y estructuras similares a coronas (Yan, Yu, Zhang, Tang, & Yu, 2011).

Algunos investigadores aislaron y caracterizaron estas células madre denominándolas células madre de la pulpa dental (DPSC) (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000).

3.1.2.4 Macrófagos

La presencia de macrófagos residentes (histiocitos) en la pulpa dental sana ha sido bien documentado. Estas células pueden aparecer con diferentes morfologías: oval, alargadas, pequeñas y dendríticas. Normalmente aparecen como células alargadas con una localización perivascular lo que lo hace difícil de distinguir de los fibroblastos en el microscopio. Los macrófagos son las células inmunológicas más predominantes en la pulpa dental. Se ha descrito características similares a las células dendríticas debido a que también expresan molécula de clase II. Se encuentran distribuidas en la zona perivascular y en la zona para-odontoblástica dentro de la pulpa (M Jontell, Okiji, Dahlgren, & Bergenholtz, 1998).

Los macrófagos también llamados fagocitos mononucleares debido a su alta capacidad de fagocitar y la presencia de un núcleo en su citoplasma, son monocitos que han abandonado el torrente sanguíneo, han entrado en los tejidos y se han

diferenciado en varias subpoblaciones. Una subpoblación importante de macrófagos desempeña funciones activas de endocitosis y fagocitosis. Debido a su movilidad y actividad fagocítica, estos elementos celulares son capaces de actuar como basureros “scavengers”, que eliminan hematíes extravasados, células muertas y sustancias extrañas presentes en los tejidos. El material ingerido por los macrófagos es destruido mediante la acción de enzimas lisosomales (Hargreaves & Berman, 2016).

Otro subconjunto de macrófagos participa en reacciones inmunológicas mediante el procesamiento del antígeno y su presentación posterior a los linfocitos T de memoria. El antígeno procesado se une a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés Major Histocompatibility Complex) clase II, lo que hace posible que se establezca una interacción con receptores específicos presentes en los linfocitos T de memoria (Hargreaves & Berman, 2016).

Como respuesta el linfocito T libera citocinas (IFN- γ) importante para la eliminación del antígeno por parte del macrófago (M Jontell et al., 1998). Igual que los fibroblastos, los macrófagos toman parte activa en las vías de señalización en la pulpa. Una vez activados por estímulos inflamatorios apropiados, los macrófagos son capaces de producir una gran variedad de factores solubles, entre ellos interleucina 1, factor de necrosis tumoral, factores de crecimiento y otras citocinas (Hargreaves & Berman, 2016).

3.1.2.5 Neutrófilos

Los neutrófilos constituyen un ejército de fagocitos circulantes, listos para responder rápidamente y en gran número, siempre que se produzcan lesiones tisulares. Se caracterizan por un núcleo multilobulado y abundantes gránulos en su citoplasma que almacenan agentes bactericidas y enzimas lisosómicas. Su función es la quimiotaxis, fagocitosis y destrucción bacteriana (Stites, Terr, & Parslow, 1998). Los neutrófilos son células fagocíticas de la respuesta inmune innata. Pocos neutrófilos se han observado en los tejidos pulpares (M. Jontell et al., 1987).

3.1.2.6 Mastocitos

En un principio investigaciones previas que intentaron identificar los mastocitos en la pulpa dental sana no demostraron la presencia de estas células debido a métodos de tinción metacromática (Miller, Sternberg, Piliero, & Rosenberg, 1978). Pero mediante tinciones con hematoxilina y eosina se ha demostrado que los mastocitos están presentes en los tejidos conectivos de todo el cuerpo, incluido el tejido pulpar dental tanto inflamado como sano (Farnoush, 1984). Aunque en pocas ocasiones se hallan en el tejido pulpar normal (Hargreaves & Berman, 2016). Los mastocitos están generalmente presentes cerca de los vasos sanguíneos y presentan forma redondeada u ovalada y se encuentran densamente granulados. Es importante mencionar que el número de mastocitos en la pulpa con inflamación crónica es mayor que en los tejidos no inflamados o pulpas con respuesta inflamatoria aguda. Se ha observado que los mastocitos provenientes de pulpas inflamadas mostraron signos de degranulación por fuera de la membrana celular, contrario en los casos de pulpa sana (Farnoush, 1984).

El papel y la función de los mastocitos en la pulpa dental normal e inflamada aún no están claros. Sin embargo, como los componentes vasoactivos de los mastocitos, como la histamina o las enzimas proteolíticas liberadas por la degranulación, actúan como mediadores durante el proceso inflamatorio, es posible que las sustancias biológicamente activas liberadas de los mastocitos pulpares también puede contribuir a los cambios tisulares en la pulpitis al aumentar la permeabilidad vascular, promover el edema y la fagocitosis e interferir con la coagulación sanguínea (Farnoush, 1984).

3.1.2.7 Células Dendríticas

Las células dendríticas son un conjunto de células de origen hematopoyético que se caracterizan por la presencia de prolongaciones citoplasmáticas que asemejan las dendritas de las células nerviosas (M Jontell et al., 1998). Se consideran elementos

accesorios del sistema inmunológico, se hallan sobre todo en los tejidos linfoides, pero también están ampliamente distribuidas por los tejidos conectivos, entre ellos el pulpar (Sakurai, Okiji, & Suda, 1999). Estas células son células presentadoras de antígeno, y se caracterizan por la presencia de moléculas del MHC de clase II en su superficie celular (Hargreaves & Berman, 2016). En la pulpa normal, se localizan principalmente en la periferia de la pulpa coronal cerca de la predentina y capa odontoblástica donde el tejido pulpar está sujeto a encontrarse con antígenos externos, pero migran centralmente en la pulpa después de un estímulo antigénico (Zhang et al., 2006). Algunas de estas células extienden sus procesos citoplasmáticos dentro de los túbulos dentinarios posibilitando la detección de antígenos a través de los túbulos (M Jontell et al., 1998). También se pueden encontrar en condiciones normales en partes centrales de la pulpa (M. Jontell et al., 1987).

Se sabe que las células dendríticas desempeñan una función central en la inducción de la inmunidad dependiente de linfocitos T. Al igual que los macrófagos engloban antígenos proteínicos y después presentan un conjunto de fragmentos peptídicos de los antígenos asociados a moléculas MHC clase II. Este conjunto es el que pueden reconocer los linfocitos T $CD4^+$ virgen en el ganglio linfático lo que produce la activación de esa célula (Hargreaves & Berman, 2016). En ese momento el Linfocito expanden su clona y entran a la circulación donde migran a los tejidos periféricos como células de memoria $CD45RO^+$. Cuando el antígeno desafía de nuevo los tejidos periféricos las células presentadoras de antígenos lo capturan y lo degradan. Los antígenos son después presentados a los linfocitos T $CD4^+$ de memoria que se encuentran en la zona, son activados a nivel local y desencadenan la fase de efectora (M Jontell et al., 1998).

3.1.2.8 Linfocitos

Los linfocitos son células que tienen especificidad contra antígenos (M Jontell et al., 1998). En pulpa sana generalmente no se encuentran linfocitos en abundancia y se

presentan de forma transitoria en espera de convertirse en linfocitos maduros o se transportan al tejido dañado y sangre como respuesta a una lesión (Seltzer & Bender, 1987).

Los linfocitos T son células residentes normales de la pulpa dental y se encuentran dispersos en los vasos sanguíneos dentro de la pulpa. Los linfocitos T se dividen a su vez en linfocitos cooperadores ($CD4^+$) y citotóxicos ($CD8^+$). La activación de los linfocitos $CD4^+$ juegan un papel muy importante en la respuesta inmunológica seguida del reconocimiento de un antígeno a través del receptor de membrana de los linfocitos T (TCR). Después de la activación los linfocitos T secretan citocinas para estimular o inhibir la acción de células blanco. De acuerdo el tipo de la producción de la citosina los linfocitos $CD4^+$ se clasifican en Th1 o Th2. Los linfocitos Th1 producen interleucina (IL-2) e interferón gama (IFN γ) y están involucrados en la activación de los macrófagos, mientras que los linfocitos Th2 producen citosinas como IL-4 e IL-5 e IL-6 que intervienen en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B (M Jontell et al., 1998). Mientras que los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) ocasionan la lisis de la célula diana por medio de la exocitosis de perforinas o gránulos líticos (Abbas, 2012).

Por medio de análisis de citometría de flujo de pulpa dental humana se ha demostrado que los linfocitos T $CD4^+$ se encuentran en mayor proporción que linfocitos T $CD8^+$ (Mangkornkarn, Steiner, Bohman, & Lindemann, 1991).

Los linfocitos B están ausentes o se encuentran rara vez en la pulpa sana humana (M. Jontell et al., 1987; M Jontell et al., 1998). Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en células plasmáticas al tener contacto con un antígeno y están involucrados en patologías e inflamaciones crónicas pulpares. Los primeros es producirse es la Inmunoglobulina G. La concentración de inmunoglobulinas en la pulpa inflamada humana es mucho mayor que en pulpa sana. Estos hallazgos comprueban los mecanismos de la pulpitis dental (M Jontell et al., 1998).

3.1.3 Población celular en pulpa dental afectada

En presencia de una inflamación pulpar causada por caries dental, se ha encontrado un aumento significativo de células del sistema inmunológico como linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, células plasmáticas y macrófagos cuanto más próxima a la cavidad pulpar se encuentre la caries dental (Izumi T, 1995).

Se ha demostrado que puede existir un aumento significativo de células inflamatorias como macrófagos y linfocitos T en las diferentes etapas de la reabsorción de la raíz en órganos dentales deciduos (Angelova, Takagi, Okiji, Kaneko, & Yamashita, 2004).

3.1.4 Vasos linfáticos en la pulpa dental

Tanto los estudios morfológicos como los funcionales en animales, muestran la existencia de vasos linfáticos en la pulpa (Bishop & Malhotra, 1990). Estos vasos son importantes para ajustar el aumento en las presiones osmóticas coloidales, ejercidas por las proteínas y las macromoléculas que se acumulan de manera extracelular en las zonas inflamadas. Otra de sus funciones importantes es servir como vía de llegada a los ganglios linfáticos regionales para las células presentadoras de antígeno (Bergenholtz, Horsted-Bindslev, & Reit, 2011)

Los vasos linfáticos forman un sistema circulatorio secundario; su función principal es regresar el líquido intersticial al torrente sanguíneo. El sistema linfático funciona también para transportar productos celulares a la circulación sanguínea. En los tejidos, surge de una red delicada de pequeños capilares linfáticos con paredes delgadas. El líquido intersticial difunde por las paredes de dichos capilares, para convertirse en linfa. Los capilares linfáticos convergen para formar vasos. Una extensa red de vasos y conductos linfáticos regresa el líquido tisular al sistema vascular. Antes de llegar al torrente sanguíneo, se filtran en nódulos y ganglios linfáticos distribuidos a lo largo de linfáticos mayores. La filtración nodular protege al cuerpo contra invasión de microorganismos y materiales extraños. Los leucocitos que

están en los nódulos ingieren y destruyen material nocivo. Los nódulos son centros donde proliferan y se acumulan linfocitos y otras células que elaboran anticuerpos. La linfa dental y de tejido subcutáneo drenan por ganglios submaxilares, submentonianos y finalmente nódulos cervicales superficiales y profundos distribuidos a lo largo de venas yugales externa e interna donde posteriormente pasa al torrente sanguíneo en la unión de venas yugales interna, externa y subclavias (Seltzer & Bender, 1987).

La linfa en la región coronal se recoge en las hendiduras de tejidos intersticiales y se drena hacia el ápice, de donde es transportada a través de los capilares linfáticos (Oehmke, Knolle, & Oehmke, 2003).

La presencia de vasos linfáticos pulpares ha sido de controversia por su notable parecido morfológico con venas y capilares, pero con la diferencia en ausencia de membrana basal y defenestración en células endoteliales. Aun así, se ha demostrado claramente la distribución de los vasos linfáticos en pulpa dental humana. Grandes vasos linfáticos se encuentran en la parte central de la pulpa y hay pequeños vasos linfáticos en la periferia. Los vasos linfáticos son más numerosos en la parte central que en la capa de odontoblastos periférica. Esto sugiere que el drenaje linfático de la pulpa dental se inicia desde la periferia de la pulpa y se acumula en la parte central. (Matsumoto, Kato, Miura, Yanagisawa, & Shimizu, 1997; Pimenta F.J, 2003; Sawa et al., 1998; Seltzer & Bender, 1987).

Bernick and Patek (1969), demostraron que capilares linfáticos se originan cerca de la zona de Weil y la capa odontoblástica. Drenan en vasos recolectores, pequeños y de paredes delgadas, que frecuentemente se comunican entre sí. Después los vasos recolectores pasan a la pulpa por la región apical, junto con vasos sanguíneos y nervios. Posteriormente pasan a la pulpa por la región apical junto con vasos sanguíneos y nervios. Los capilares linfáticos laterales también drenan en vasos recolectores que van hacia el ápice (Seltzer & Bender, 1987).

Los capilares linfáticos desempeñan un papel importante en presencia de una inflamación pulpar, debido a que existen cambios en la presión pulpar y permeabilidad capilar debido a un aumento del tejido y de líquido intersticial que, de no drenado por el sistema linfático pulpar, propiciará una la inflamación severa generando necrosis del tejido. En estudios recientes se ha comprobado presencia de linfangiogénesis en pulpa dental durante procesos inflamatorios pulpares (Pimenta F.J, 2003).

3.2 Importancia de la respuesta inmunológica pulpar

La pulpa dental es un tejido muy dinámico que responde a los estímulos externos de diferentes maneras. Sin embargo, ciertas características exclusivas de la respuesta pulpar la distinguen de otros tejidos conectivos del organismo. La exposición pulpar a la caries dental, su imposibilidad de expandirse, y la escasez de circulación colateral determinan su susceptibilidad a la lesión y complican su regeneración. Además, la pulpa está dotada de una rica irrigación neurovascular que favorece los efectos de la inflamación y que puede conducir a una rápida degeneración y necrosis, situación que se considera muy seria en cualquier tejido del organismo (Hargreaves & Berman, 2016).

Cuando la pulpa dental es agredida o ha sufrido una lesión, tiende a desarrollar un proceso de inflamación en primera estancia como respuesta inmunológica a la lesión tisulares locales; es la respuesta de los tejidos a la lesión y su mecanismo de restauración (Seltzer & Bender, 1987). En este momento la pulpa pueden recuperarse si la mayoría de los antígenos se eliminan lo suficientemente temprano (Hahn & Liewehr, 2007).

Si la respuesta innata no puede eliminar al antígeno, la inmunidad adaptativa es estimulada, ya sea con una respuesta de tipo celular (inmunidad mediada por células) o mediante la producción de anticuerpos específicos (inmunidad humoral)

para mejorar los mecanismos de protección que rigen la defensa y reparación de la pulpa (Bergenholtz, 1990)

En por ello la importancia de que la pulpa dental esté equipada con una red de células inmunológicas que juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis, reparación y regeneración de este tejido (Angelova et al., 2004).

3.3 Metodologías empleadas para caracterizar la composición celular de la pulpa dental.

3.3.1 Métodos histológicos

Se denomina técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de los microscopios fotónicos y electrónicos (Montalvo Arenas, 2010).

La técnica histológica convencional es el método más utilizado para el procesamiento de tejidos, la cual consiste en la transformación de una muestra en delgados cortes teñidos capaces de ser observados al microscopio. El objetivo es comprender la microanatomía de las células, los tejidos y los órganos y a correlacionar la estructura con la función (Martínez Rivera, Piña Osuna, Soto Domínguez, & García Garza, 2011).

3.3.1.1 Tinción con hematoxilina y eosina

El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora (Arenas, 2010).

La coloración de hematoxilina - eosina se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos, a través del microscopio fotónico. Consiste en la tinción de los núcleos mediante una hematoxilina, previamente oxidada y transformada en hemateína a la que se le añade una sustancia mordiente para formar una laca (para tal fin se usan sales metálicas de aluminio, plomo o hierro). Los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron. Mientras que el citoplasma y material extracelular utilizando la eosina les confiere diversos grados de color rosado (Arenas, 2010).

3.3.2 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) constituye en la actualidad una herramienta diagnóstica fundamental. Se trata de un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o los tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a los correspondientes antígenos, y la reacción se hace visible solo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración (Fuertes, Santonja, Kutzner, & Requena, 2013).

3.3.3 Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite evaluar células en una suspensión de manera individual arrojando datos como características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en un líquido, emitiendo una señal individualmente al interferir con un haz de luz. Esto se logra a través de anticuerpos acoplados a fluorocromos de diferentes colores. Una de las características analíticas más importantes de los citómetro de flujo es su capacidad de proveer información cualitativa y cuantitativa sobre múltiples parámetros o características celulares, como el tamaño, forma y complejidad de todo un tejido al incidir una fuente de luz, además

de distinguir y caracterizar diferentes tipos celulares incluso en poblaciones extremadamente pequeñas. Las aplicaciones más relevantes de la citometría de flujo en la práctica médica se relacionan con la hematología e inmunología clínicas, midiendo parámetros como número y clasificación de células. Esta técnica es empleada también en el conteo de subpoblaciones de linfocitos. Las aplicaciones de la citometría de flujo son numerosas, lo cual ha permitido el empleo de estos instrumentos de manera amplia en los campos, tanto de la investigación biológica como médica (Barrera Ramírez et al., 2004).

Los conocimientos existentes en relación con los componentes celulares de la pulpa dental se han derivado principalmente de los métodos clásicos de la histología y bioquímica. Dado que las observaciones hechas de secciones de tejido preparados son estáticas, no está claro si esto refleja con precisión la dinámica celular de tejido vivo de la pulpa. Por lo tanto, se ha desarrollado el método por citometría de flujo para analizar el tejido pulpar vital humano. Por medio de este método se han detectado subpoblaciones de linfocitos T ($CD4^+$ y $CD8^+$) en pulpa sana (Mangkornkarn et al., 1991). En dientes deciduos con caries se han observado un notable aumento de linfocitos T $CD8^+$ en la pulpa junto con la profundidad de la lesión cariosa. Se puede concluir que la pulpa mantiene su capacidad de cicatrización y defensa contra el avance de una lesión cariogénica en dientes deciduos (Simsek & Duruturk, 2005).

Se han encontrado porcentajes altos de linfocitos T, tanto cooperadores como reguladores y de linfocitos B en pulpitis irreversible comparado con pulpa normal y pulpitis reversible. Esto demuestra que los porcentajes de población linfocitaria aumentan en presencia de inflamación o patologías pulpares (Kim, 1996). Estos resultados demuestran la viabilidad del uso de análisis de citometría de flujo para examinar, a un nivel cuantitativo, la heterogeneidad celular de la pulpa dental humana (Mangkornkarn et al., 1991).

3.3.4 Frotis celular

Se define como frote, frotis o extendido, a la preparación microscópica delgada y transparente, extendida entre dos cristales (porta o cubreobjetos), obtenida de un líquido orgánico espeso o tejido semilíquido o pastoso (sangre, aspirados, secreciones, exudados, etc.) El frote se utiliza para el estudio de las características citológicas de las células. Permite la evaluación de las líneas eritrocíticas, leucocitaria, entre otras, determinando forma, tamaño, color e inclusiones citoplasmáticas, dando una medida cuantitativa y cualitativa de los elementos que lo conforman (Rodak, 2005).

3.4 Antecedentes

Chutima Mangkornkarn and Robert A. Lindemann (1991), analizaron el tejido pulpar humano vital mediante citometría de flujo. Se utilizaron 5 terceros molares sanos sin caries. Los órganos dentales se seccionaron y se le obtuvo el tejido pulpar y se cortaron en trozos pequeños para ser disgregado enzimáticamente con 2mg por ml de colagenasa. La suspensión celular se lavó y se re suspendió en PBS para ser agregados los anticuerpos monoclonales para detectar subpoblaciones de linfocitos T ($CD4^+$ Y $CD8^+$) y linfocito B. Los resultados demostraron que los linfocitos que portan antígenos CD4 y CD8 se detectaron claramente en el tejido pulpar mediante este método confirmado la presencia de un pequeño porcentaje de linfocitos en el tejido pulpar normal. Se encontró que los linfocitos T representaban aproximadamente del 1 a 2.5% del total de células pulpares. Las subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ se encontraron en una proporción (1,2: 1), con un porcentaje correspondiente de linfocitos T del 16% para $CD4^+$ y 13% para $CD8^+$. No se encontraron células B en ninguna muestra. Estos resultados demuestran la viabilidad de usar análisis de citometría de flujo para examinar, a nivel cuantitativo, la heterogeneidad celular de la pulpa dental humana.

Freitas, Novaretti, Rodini, Batista, and Lara (2007), usando inmunohistoquímica identificaron y cuantificaron linfocitos T CD8⁺, CD4⁺, CD45RO⁺, y mastocitos en cuarenta muestras de tejidos pulpaes de dientes permanentes. Se dividieron en 5 grupos: dientes no erupcionados (grupo I, n=8); dientes parcialmente erupcionados, sin oclusión (grupo II, n=9); dientes erupcionados (en oclusión), ya sea sin caries dentinaria clínica (grupo III, n=12) o con caries dentina superficial poco profunda (grupo IV, n=6); y dientes erupcionados con pulpitis hiperplásica crónica (grupo V, n=5). Inmediatamente después de la extracción, se seccionó el tercio radicular apical, los dientes se sumergieron en 10% de formaldehído, se cortaron longitudinalmente y se les extrajo la pulpa la cual fue fijada nuevamente. Todas las muestras se deshidrataron en etanol, se sumergieron en xileno y se incluyeron en parafina. Las secciones se cortaron con un grosor de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) o con un grosor de 4 µm y se inmunotñieron mediante el método de la inmunoperoxidasa (estreptavidina-biotina-peroxidasa). Todas las muestras teñidas con HE se evaluaron microscópicamente como presencia de infiltrado inflamatorio. Las muestras para inmunohistoquímica fueron teñidos con anticuerpos monoclonales para linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y CD45RO⁺, además de mastocitos. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina. En los resultados de la histología con microscopio óptico se observaron que las pulpas de los grupos I y II presentaron características del tejido conectivo joven, como muchas células, vasos sanguíneos y nervios, así como un número limitado de fibras de colágeno. La capa odontoblástica era muy evidente y bien organizada. Las pulpas del grupo III se caracterizaron por un tejido conjuntivo laxo, con un número considerable de células fusiformes, vasos sanguíneos y nervios, sin foco de inflamación. Además, algunas muestras en este grupo presentaron características de un tejido más antiguo, como fibrosis, menos células y presencia de calcificaciones pulpaes. El grupo IV presentaba un tejido conectivo denso que exhibía fibrosis, menos células y vasos sanguíneos, y un infiltrado inflamatorio discreto a moderado. En pulpas del grupo V, pocos odontoblastos sobrevivieron, y la pulpa fue reemplazada por tejido de granulación, caracterizado por muchos vasos sanguíneos recién formados, células mononucleares, especialmente células plasmáticas, y células polimorfonucleares. Estos pólipos pulpaes estaban cubiertos

por una capa de epitelio escamoso estratificado bien formado. En las muestras de inmunohistoquímica los linfocitos teñidos exhibieron un anillo marrón oscuro alrededor de las células, mientras que los anticuerpos antitriptasa identificaron los gránulos de los mastocitos. Las células CD8⁺ se encontraron mayormente en el grupo IV (30.01 ± 18.05), seguidas por los grupos III (16.24 ± 8.60), I (14.87 ± 11.37), II (7.53 ± 6.80) y V (0.44 ± 1.00). El grupo II presentó el mayor número de células CD45RO⁺ de todos los grupos. Se observaron algunas células en los grupos III (4.78 ± 5.71), IV (2.91 ± 2.42) y I (0.85 ± 1.33). La frecuencia de células CD4⁺ fue mayor en el grupo IV (19.32 ± 16.60), seguido, en orden, por los grupos III (7.54 ± 5.51), II (3.96 ± 3.56), I (3.20 ± 2.67) y V (0.66 ± 1.00).

Comparando el tipo predominante de células T en cada grupo, el grupo I presentó un número significativamente mayor de células CD8⁺ que CD4⁺ ($p = 0.002$) y las células CD45RO⁺ ($p = 0.0001$). Además, en este grupo, las células CD4⁺ fueron significativamente más frecuentes que las células CD45RO⁺ ($p = 0.031$). En el grupo III, el número de células T CD8⁺ fue significativamente mayor que el número de células T CD45RO⁺ ($p = 0.011$). Los mastocitos solo se encontraron en la pulpitis hiperplásica crónica (grupo V).

Bruno et al. (2010) evaluaron las características microscópicas y densidades de mastocitos, linfocitos T cooperadores CD4⁺, linfocitos T de memoria CD45RO⁺, linfocitos T reguladores Foxp3⁺, linfocitos B CD20⁺, macrófagos CD68⁺, y CD31⁺ de los vasos sanguíneos de la pulpitis dental humana ($n = 38$) y el tejido pulpar sano ($n=6$). Se analizaron pulpas de 38 dientes humanos retiradas en pulpectomías con un diagnóstico clínico de pulpitis irreversible. El tejido pulpar se sumergió en formalina al 10% para la evaluación mediante microscopía de luz e inmunohistoquímica. Se utilizaron pruebas de Wilcoxon y Mann-Whitney para el análisis estadístico. Como resultados se encontraron dos patrones microscópicos de pulpitis: grupo 1 ($n = 15$) presentó un infiltrado inflamatorio intenso y deposición de colágeno leve; por el contrario, el grupo 2 ($n = 23$) mostró un infiltrado inflamatorio escaso y la deposición de colágeno intenso. El número de macrófagos CD68⁺ ($p = 0.004$) y los linfocitos B

CD20⁺ ($p = 0.068$) y la densidad de los vasos sanguíneos ($p = 0.002$) fueron mayores en G1 que en G2. Sin embargo, se encontró un número similar de linfocitos T CD4⁺ y T CD45RO⁺ en ambos grupos ($p > 0.05$). Los mastocitos se distribuyeron por igual en G1 y G2, mientras que los linfocitos T reguladores Foxp3⁺ se detectaron en 59% y 14% de las muestras de G1 y G2. Los controles mostraron un menor número de células Foxp3, CD4⁺, CD45RO⁺, CD68⁺ y CD20⁺ que en los grupos G1 y G2. De esta manera concluyeron que la pulpitis irreversible tenía características microscópicas distintas con importantes diferencias cuantitativas y cualitativas en la infiltración de células inflamatorias.

Duruturk, Sari, and Sengul (2013), evaluaron la cantidad de células inmunes en pulpa sana de dientes deciduos con el fin de evaluar la presencia de las células CD4⁺/CD8⁺ y linfocitos B como referencia al diagnóstico para la patología pulpar en dientes primarios. En base a exámenes clínicos y radiográficos los dientes cariados y no cariados se agruparon como dientes sanos, con pulpitis reversible e irreversible. Se utilizaron 81 muestras pulpares de dientes deciduos extraídos para el análisis por citometría de flujo. Los dientes se limpiaron, se les retiró el tejido pulpar y posteriormente se seccionaron y centrifugaron. Los resultados no revelaron aumentos en los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y B en pulpa inflamada en comparación con la pulpa sana. Sin embargo, el número de células CD8⁺ y NK disminuyeron en línea con la inflamación progresiva. Con ello concluyeron que la cuantificación de linfocitos CD4⁺/CD8⁺ y B no se puede usar como referencia de diagnóstico para la patología pulpar en dientes primarios.

Gaudin et al. (2015), caracterizaron y cuantificaron las células inmunológicas en la pulpa dental humana sana de terceros molares extraídos mediante el uso de la clasificación de células activadas por fluorescencia, junto con la identificación de subgrupos de células específicas en los leucocitos (CD45⁺) por citometría de flujo. Durante su investigación se utilizaron 44 terceros molares extraídos por fines ortodónticos, que posteriormente se les removió el tejido pulpar al ser seccionados. El tejido se centrifugó y el sobrenadante se degradó enzimáticamente con

colagenasa. Rutinariamente se obtuvieron de 1 a 7 millones de células por paciente, que posteriormente fueron utilizados para la tinción de anticuerpos. Como resultados obtuvieron que las células CD45⁺ representaron el 0.94% ± 0.65% de las células obtenidas a partir de la digestión enzimática de las pulpas dentales. Los granulocitos/neutrófilos CD16⁺CD14⁺ se encontraron representando la principal subpoblación en CD45⁺ (50.01% ± 9.08%, n=7), seguido de linfocitos T CD3⁺ (32.58%± 11%, n =17), monocitos CD14⁺ (8.93% ± 5.8%, n = 7), y células dendríticas HLA-DR Lin1⁻ (4.51% ± 1.12%, n = 7). Subpoblaciones menores incluyeron células asesinas naturales CD3⁻CD56⁺ (2.63% ± 1.15%, n = 7) y linfocitos B CD19⁺ (1.65% ± 0.89%, n=17). Además, promueven la identificación celular a un fenotipo compatible con Foxp3/CD25⁻ expresado por linfocitos T reguladores (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD127^{low}). La clasificación de células activadas por análisis de fluorescencia y microscopía confocal también revelaron expresión de células HO-1 en HLA-DR⁺.

4 JUSTIFICACIÓN

El tejido pulpar como cualquier otro tejido del cuerpo, esta propenso a daños o lesiones infecciosas, mecánicas, físicas y químicas. Ante ello la pulpa presenta un sistema inmunológico de defensa conformado por células y moléculas que desempeñan la función de eliminación del antígeno o factor etiológico de dicha lesión, todo ello con el objetivo de evitar la degeneración tisular y lograr en el mejor de los casos una regeneración tisular o reparación pulpar.

Hasta el momento existen pocos estudios en los cuales se cuantifique la frecuencia de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en pulpa sana comparada con pulpa que está desarrollando un cuadro inflamatorio irreversible. Las metodologías que se han utilizado hasta el momento para la caracterización de la pulpa dental son la histología, la inmunohistoquímica y recientemente la citometría de flujo. Las primeras dos evalúan únicamente secciones del tejido, por lo que no es posible conocer la cuantificación total de estas poblaciones celulares. En cambio, la citometría de flujo es una técnica por la cual pueden evaluarse tejidos completos y nos ofrece datos cualitativos y cuantitativos más reales y fidedignos. Escasos estudios han utilizado esta metodología para caracterizar poblaciones celulares pulpares, por lo que es importante realizar primeramente la estandarización de la misma para así obtener datos confiables. Por lo que este estudio propone identificar por varias metodologías la presencia de células y su cuantificación estandarizando los procedimientos para futuros análisis más precisos.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un protocolo para cuantificar linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en pulpa dental humana.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de linfocitos en pulpa dental humana sana y con pulpitis irreversible mediante frotis celular.
2. Cuantificar el número de linfocitos en pulpa dental sana mediante histología.
3. Realizar un protocolo para la cuantificación de linfocitos mediante citometría de flujo.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar de obtención de la muestra

Las muestras se obtuvieron bajo consentimiento informado en la Clínica de la Especialidad de Endodoncia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán Sinaloa en colaboración con la Clínica de Enseñanza de la Facultad de Odontología UAS.

6.2 Tipo de estudio

Ex vivo, experimental, transversal, prospectivo. Además de comparativo para frotis y descriptivo en histología.

6.3 Muestra

6.3.1 Tamaño de muestra

Las muestras de tejido pulpar se obtuvieron a partir de 9 terceros molares sanos extraídos por razones ortodónticas. De los cuales se dividieron en 3 grupos: a) 7 terceros molares para análisis histológico; b) 1 tercer molar para frotis celular pulpar y c) 1 tercer molar para análisis por citometría de flujo. Además, se obtuvo una muestra de tejido pulpar con un diagnóstico de pulpitis irreversible para realización de frotis celular (n=1).

6.3.2 Tipo de muestreo

Consecutivo no probabilístico

6.3.3 Criterios de inclusión

6.3.3.1 Histología y citometría de pulpa dental humana sana

1. Terceros molares maxilares o mandibulares
2. Con un diagnóstico pulpar sano comprobado clínica y radiográficamente.
3. Erupcionados o incluidos.
4. Ausencia de caries dental.
5. Sin evidencia radiográfica de patología periapical.
6. Ausencia de dolor dental.

6.3.3.2 Frotis de pulpa dental

6.3.3.2.1 Pulpa sana

Para el frotis con diagnóstico de pulpa sana, presentaron los mismos criterios de inclusión propios de la histología de pulpa dental antes mencionados.

6.3.3.2.2 Pulpitis irreversible

1. Dientes permanentes maxilares o mandibulares.
2. Evidencia clínica y radiográfica de la lesión cariogénica, restauración o curación operatoria.
3. Presencia o no de dolor dental.
4. Respuesta positiva a estímulos fríos mayor a los rangos normales de 3 segundos.
5. Con un diagnóstico de pulpitis irreversible en base a resultados clínicos y radiográficos.

6.3.4 Criterios de exclusión

6.3.4.1 Histología y citometría de pulpa dental humana sana

1. Terceros molares con caries presente.
2. Con un diagnóstico de pulpitis reversible, irreversible o necrosis comprobado clínica y radiográficamente.
3. Evidencia radiográfica de patología periapical.
4. Presencia de dolor dental.
5. Respuesta positiva al aplicaba estímulos fríos que sobrepasen los límites de los rangos normales (mayor a 3 segundos) o respuesta negativa.
6. Individuos con tratamiento con antibiótico 2 semanas antes de la toma de la muestra.
7. Mujeres en periodo menstrual.

6.3.4.2 Frotis de pulpa dental

6.3.4.2.1 Pulpa sana

Para el frotis con diagnóstico de pulpa sana, presentaron los mismos criterios de exclusión propios de la histología de pulpa dental antes mencionados.

6.3.4.2.2 Pulpitis irreversible

1. Dientes temporales.
2. Diagnóstico de pulpa sana, pulpitis reversible o necrosis pulpar en base a la evidencia clínica y radiográfica.
3. Individuos con tratamiento con antibiótico 2 semanas antes de la toma de la muestra.
4. Mujeres en periodo menstrual.

6.3.5 Criterio de eliminación

6.3.5.1 Histología y citometría de pulpa dental humana sana

1. Imposibilidad de medición de la muestra.
2. Terceros molares que sufrieron fractura durante la extracción.
3. Cuando existan errores en los resultados del laboratorio.
4. Participante manifieste su deseo abandonar del estudio.

6.3.5.2 Frotis de pulpa dental

6.3.5.2.1 Pulpa sana

Para el frotis con diagnóstico de pulpa sana, presentaron los mismos criterios de eliminación propios de la histología de pulpa dental antes mencionados.

6.3.5.2.2 Pulpitis irreversible

1. Cuando existan errores en los resultados del laboratorio.
2. Participante manifieste su deseo abandonar del estudio.
3. Adquisición insuficiente de tejido o muestra pulpar.

6.4 Metodología

6.4.1 Obtención del tejido pulpar

6.4.1.1 Histología, citometría y frotis de pulpa dental sana

Después de obtener el consentimiento informado por parte del paciente, se realizó un procedimiento profiláctico en el órgano dental a extraer y posteriormente un colutorio con clorhexidina al 0.12%, para proceder a anestésiar el área a tratar. Los terceros

molares fueron extraídos en el campo operatorio, donde inmediatamente después de su extracción se colocaron en medio de cultivo o DMEM como medio de transporte para ser llevados al laboratorio donde el órgano dental se colocó en una caja Petri desinfectada con etanol al 70%. Los restos de tejido periodontal, sangre y gingival fueron removidos de las muestras utilizando un bisturí estéril. En seguida los terceros molares fueron seccionados transversalmente a nivel de la unión amelo-cementaria a 1500 rpm con ayuda de un disco de diamante adaptado a un Dremel para descubrir la cámara pulpar. El tejido pulpar se adquirió primeramente de la cámara utilizando cucharilla de dentina y pinzas de curación, además de apoyarnos con limas tipo K, Hedstrom y tiranervios estériles para obtener el tejido pulpar en los conductos radiculares, intentando extraer la mayor cantidad de tejido posible. Obtenido el tejido este se suspendió en 1 ml de DMEM contenido en un tubo eppendorf de 1.5 ml, el cual fue anteriormente pesado en mg en una balanza analítica (Ohaus; mod. Adverturer). Una vez contenido el tejido se pesó nuevamente y se obtuvo el peso total de la muestra en mg (Figura 1).

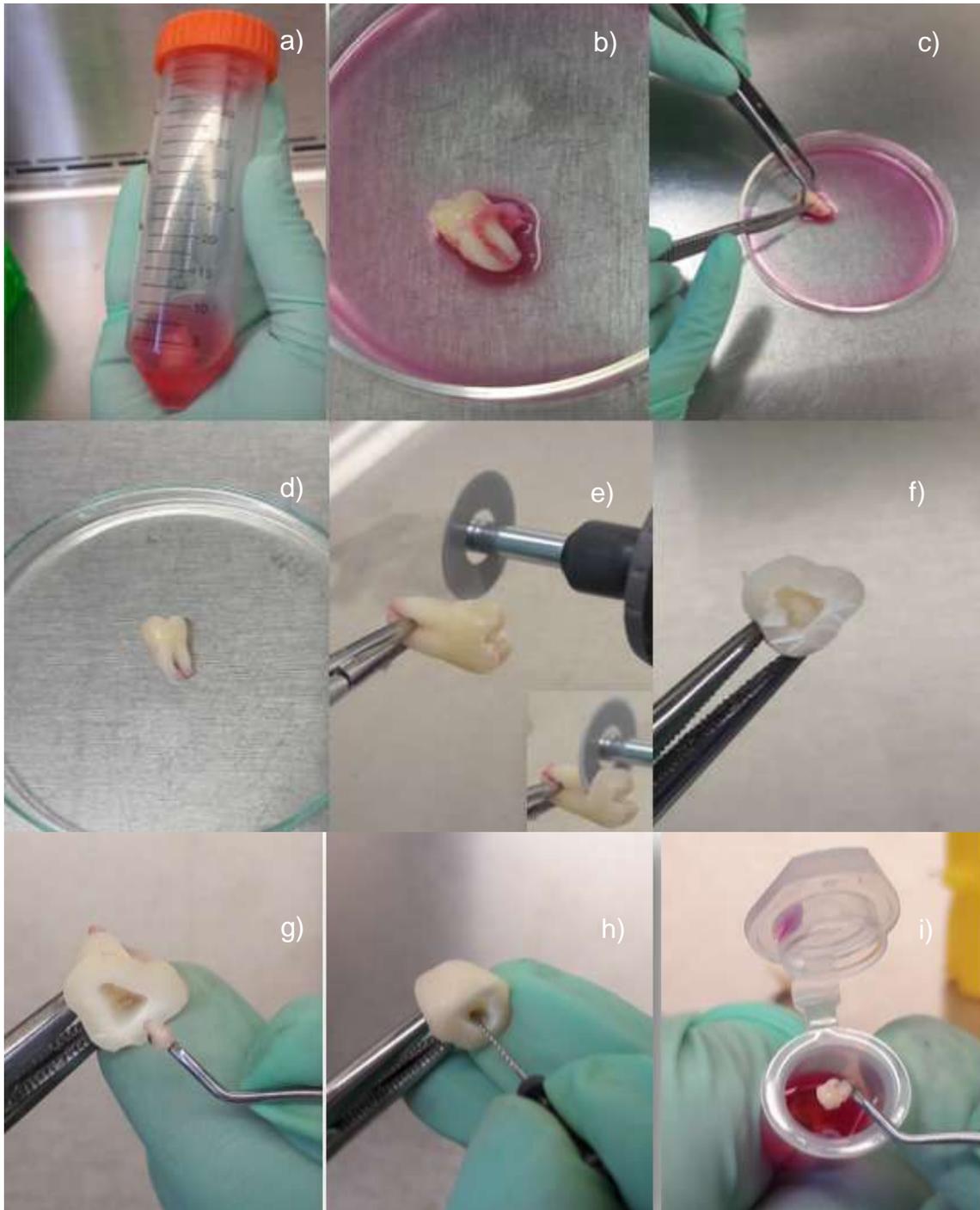


Figura 1. Metodología para la obtención del tejido pulpar: a) Tercer molar suspendido en medio de transporte, b) Molar en caja petri, c) Eliminación del tejido periodontal y gingival, d) Órgano dental limpio, e) Sección transversal del tercer molar, f) Cámara pulpar descubierta, g) Obtención de la pulpa coronal, h) Obtención de la pulpa radicular, i) Colocación de tejido obtenido en medio de cultivo.

6.4.1.2 Frotis de pulpa dental con pulpitis irreversible

El proceso de obtención del tejido pulpar se realizó en el campo quirúrgico dental durante el tratamiento endodóntico del órgano dental de estudio, posterior al acceso coronario. Para extraer el tejido se utilizó cucharilla de dentina en la cámara pulpar, limas, sistemas y puntillas para micropipeta en los conductos radiculares. Una vez recolectado el tejido éste se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con medio transporte para su traslado al laboratorio (Figura 2).

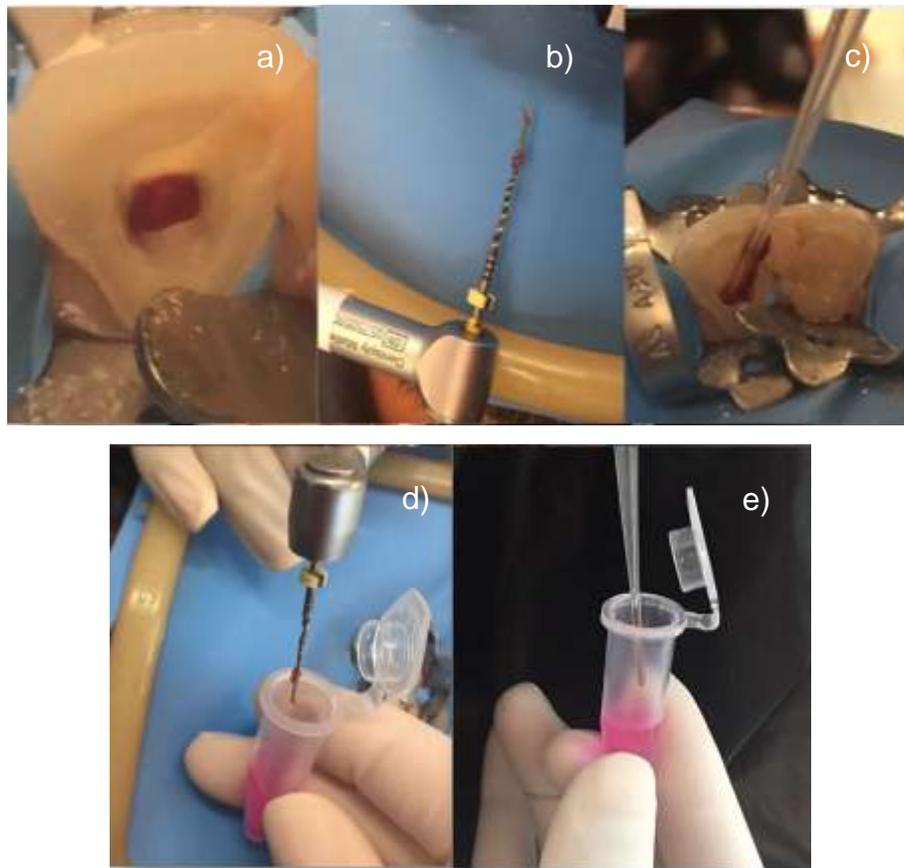


Figura 2. Obtención del tejido pulpar en pulpitis irreversible; a) Acceso coronal, b) Obtención del tejido con sistemas endodónticos, c) Uso de puntillas, d) y e) Colocación de tejido en tubo eppendorf con medio de transporte.

6.4.2 Preparación histológica de la muestra

6.4.2.1 Inclusión del tejido en PolyFreeze®

Las muestras de tejido pulpar que se utilizaron para histología fueron incluidas y orientadas en PolyFreeze® (Sigma- Aldrich) para posteriormente congelarlas en nitrógeno líquido y ser almacenadas hasta el momento de ser procesadas a -20°C hasta el procesamiento.

6.4.2.2 Realización de cortes histológicos y tinción

Las muestras fueron cortadas en un criostato (Leica CM 1860 UV) realizando cortes de $7\ \mu\text{m}$ de grosor, los cortes fueron recuperados en portaobjetos previamente desengrasados y tratados con 10% de Poly-L-Lisina (Sigma-Aldrich) para evitar el desprendimiento del tejido. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente durante 2 horas y fueron fijados con acetona a -20°C . Una vez fijados se dejaron secar a temperatura ambiente y las laminillas fueron guardadas a -4°C hasta su procesamiento.

Se realizó tinción con Hematoxilina y Eosina (Anexo2) sobre las muestras para la interpretación histológica de los tejidos. Posteriormente se montaron con Entellan New (Merck Millipore) para su preservación y evaluación histológica por microscopía óptica.

6.4.3 Disgregación mecánico-enzimática del tejido

Para la realización del frotis celular de pulpa sana y la estandarización de protocolo para la cuantificación de linfocitos T en pulpa dental mediante citometría de flujo, el tejido pulpar ya obtenido anteriormente, se colocó nuevamente en una caja petri y seccionó en pequeños trozos utilizando navajas de corte o hoja de bisturí estéril. Los fragmentos resultantes se incubaron a 37°C en agitación constante durante 35

minutos en un tubo de eppendorf de 1.5 ml con una solución enzimática (1ml de solución Ringer con 3 mg de colagenasa tipo I, y 4 mg de dispasa Sigma Chemical Co.). Enseguida se retiró la solución enzimática mediante centrifugación a 300 g por 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Posteriormente el pellet celular se resuspendió en 1 ml de PBS 1x, EDTA 2mM y 2% suero fetal bovino, se homogenizó y se tomó la totalidad de la suspensión para ser filtrada a través de organza para eliminar los restos de tejido que no pudieron ser disgregados en su totalidad. Se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 300g durante 5 minutos (Figura 3). Se retiró el sobrenadante por decantación y se resuspendió en 30 μ l de PBS 1x. Este último paso concerniente a la resuspensión se realizó sólo para el procedimiento de frotis de pulpa sana.

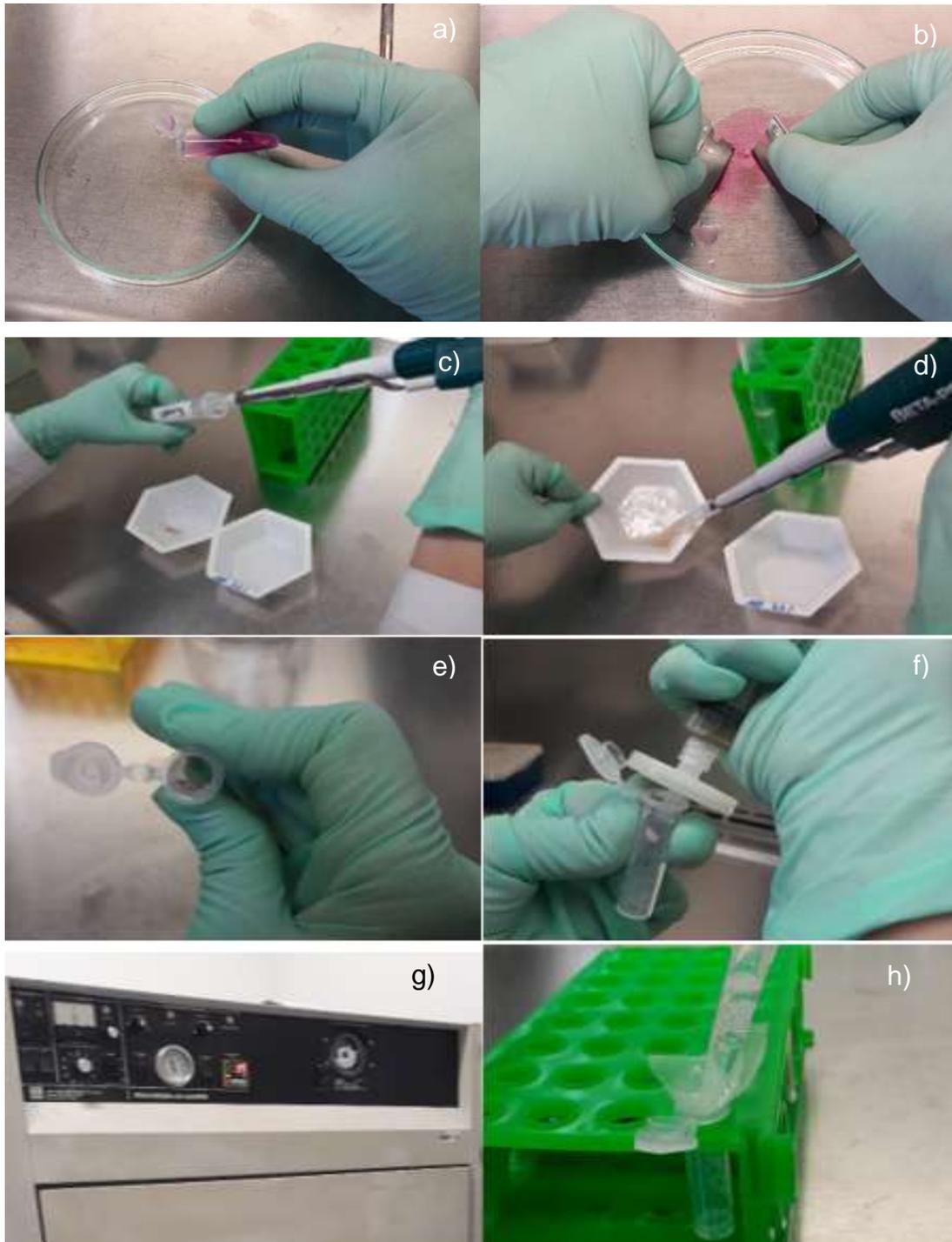


Figura 3. Proceso de disgregación enzimática: a) Colocación del tejido en caja Petri, b) Corte en trozos del tejido, c) Preparación de la solución enzimática, d) Homogenización de la solución, e) Tejido pulpar en tubo Eppendorf, f) Colocación de la solución enzimática en el tejido pulpar, g) Incubación, h) filtración de la suspensión a través de organza.

En los casos en que se requirió la disgregación enzimática para análisis por citometría de flujo, se sigue el mismo protocolo anteriormente descrito hasta el paso de la última decantación. Los pasos siguientes serán explicados más adelante en el apartado de inmunofenotipificación.

La muestra obtenida de la pulpa dental con pulpitis irreversible no requirió el proceso de disgregación enzimática debido a la consistencia acuosa de la muestra y en ausencia de un tejido sólido propiamente.

6.4.4 Frotis celular

6.4.4.1 Pulpa sana

Para las muestras evaluadas por esta técnica fue necesario depositar 5 μ l de la suspensión celular obtenida a partir de la disgregación enzimática del tejido pulpar adicionada con 5 μ l de suero sanguíneo sobre un portaobjetos previamente desinfectado y desengrasado con etanol al 70%. Se realizó el frotis con la técnica dos portaobjetos en ángulo hasta obtener el extendido, el cual se dejó secar. Posteriormente se realizó la tinción de las laminillas obtenidas con hemocolorante rápido Hycel.

6.4.4.2 Pulpitis irreversible

A consecuencia de la muestra semilíquida proveniente del tejido con pulpitis irreversible, se colocó directamente 5 μ l de la muestra con 5 μ l de suero sanguíneo sobre un portaobjetos previamente desinfectado y desengrasado con etanol al 70%. Se realizó el frotis con la técnica dos portaobjetos en ángulo hasta obtener el extendido y se dejó secar. Posteriormente se realizó la tinción de las laminillas obtenidas con hemocolorante rápido Hycel.

6.4.5 Protocolo para cuantificación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en pulpa dental humana sana y con pulpitis irreversible por citometría de flujo

6.4.5.1 Inmunofenotipificación

Para el análisis del tejido pulpar por citometría se requirió la suspensión celular obtenida de la disgregación enzimática, posterior a la decantación de la suspensión, una vez realizada la filtración por organza. Enseguida a ello se le adicionaron 10 µl de bloqueador de FcR. Se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y se adicionaron 3 µl del mix de anticuerpos para incubarlos por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad o 15 minutos a 4°C (Tabla 1). Por último, se realizó un lavado con 1 ml de PBS 1X y se centrifugó a 300 g durante 5 min; el sobrenadante se decantó y se resuspendió con 100 µl de PBS 1X para realizar el análisis mediante citometría de flujo (Figura 4).

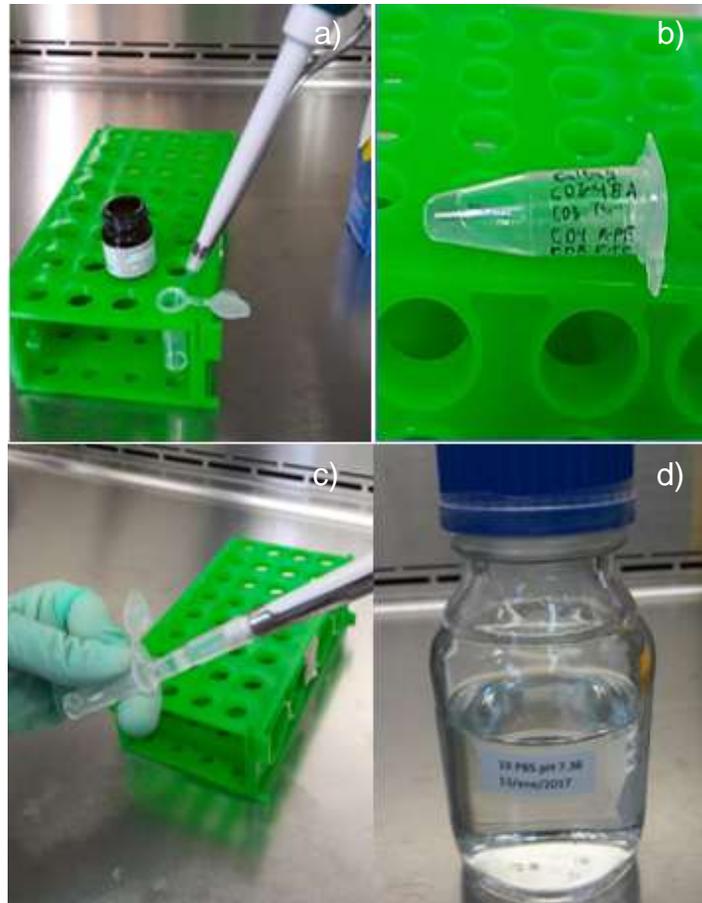


Figura 4. Proceso de marcaje de los anticuerpos: a) Adición del bloqueador de FcR, b) Mix de anticuerpos monoclonales, c) Adición del mix de anticuerpos, d) PBS 1x.

Además de la muestra para citometría descrita anteriormente, se utilizó otra muestra pulpar blanco como control la cual fue tratada bajo las mismas condiciones a excepción del marcaje con los anticuerpos.

6.4.5.2 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron: perlas 8 peak, perlas 6 peak (BD Accuri), para la calibración del equipo y perlas de 3 picos ("BD calibrate", BD Accuri) con los fluorocromos FITC, PE, PerCP, APC y el negativo para su compensación. Además

de un Kit multitest de anticuerpos monoclonales CD3 PerCP/ CD4 PE / CD8 FITC de la casa comercial Miltenyi Biotec, para las tinciones de las poblaciones celulares.

6.4.5.3 Adquisición y análisis de la muestra

En un citómetro de flujo Accuri C6 se adquirió la totalidad de la suspensión celular dentro de un gate poligonal en gráficos de densidad poblacional, empleando umbral de detección en FSC-H de 300,000 para reducir la adquisición de detrito celular en el programa Accuri C6. Posteriormente, los datos obtenidos se analizaron en el programa FlowJo V.10 por medio de gráficos density plot. La muestra se desplegó en 3 tipos de gráficos: FSC-A/FSC-H, donde se seleccionaron células individuales descartando los agregados celulares, el segundo gráfico fue SSC-A/SSC-H, éste gráfico nos permitió descartar las células de complejidad celular anormal y el último gráfico FSC-A/SSC-A, donde se mostraron las células organizadas de acuerdo a su tamaño y complejidad respectivamente.

6.4.5.4 Análisis del panel de linfocitos T

La identificación de los linfocitos T se llevó a cabo a través de su expresión de antígenos de superficie CD3⁺ y las subpoblaciones de cooperadoras y citotóxicas a través de los antígenos CD4⁺ y CD8⁺ respectivamente, mediante la captación de fluorescencia emitida de los anticuerpos utilizados. Para ello, se utilizó el filtro FL1 (533/30 nm) para el reconocimiento de FITC, FL2 (585/40 nm) para el reconocimiento de PE y FL3 (670 nm “long pass” (LP) para PerCP. Los datos se analizaron en el programa FlowJo V.10.

El algoritmo de identificación celular partió de un gráfico con los parámetros de SSC-A y FL3 para separar los linfocitos T, estos se encontraron localizados en la parte inferior del gráfico como una población oval perfectamente definida con características de baja complejidad y siendo célula CD3⁺. A partir de las células CD3⁺ se desplegó un nuevo gráfico con los filtros FL2 y FL1 para distinguir entre las

células CD4⁺ y CD8⁺. Las células antígeno-positivas se contabilizaron y los valores porcentuales se determinaron en relación a la cantidad de células del gate del gráfico SSC-A/SSC-H.

Tabla 1. Panel de inmunofenotipificación de leucocitos.

Anticuerpo	Fluorocromo	Reactividad
CD3	PerCP	LT
CD4	PE	LT cooperadores
CD8	FITC	LT citotóxicos

6.4.5.5 Análisis estadístico

Los datos de las variables cuantitativas serán representados como su media \pm su desviación estándar (DS). Los datos categóricos se expresarán como porcentajes. Para todos los análisis se utilizará el programa IBM SPSS v20.0 (SPSS inc, IL, USA). Las diferencias en las frecuencias de las células de la respuesta inmunológica, se evaluarán con la prueba T student con una significancia del 95%.

6.5 Lugar de realización

Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas.

6.6 Financiamiento

Beca para estudios de posgrados CONACYT.

7 RESULTADOS

7.1 HISTOLOGÍA DE PULPA DENTAL HUMANA SANA

7.1.1 Descripción de la celularidad y composición de la pulpa dental humana sana

A partir de los cortes histológicos de pulpa dental humana sana, se obtuvieron un total de 11 laminillas provenientes de 7 terceros molares sanos. Se les realizó tinción con hematoxilina y eosina para la evaluación en el microscopio confocal (Leica DMI8) a una magnitud de 63X por un patólogo bucal experto (Figura 5).

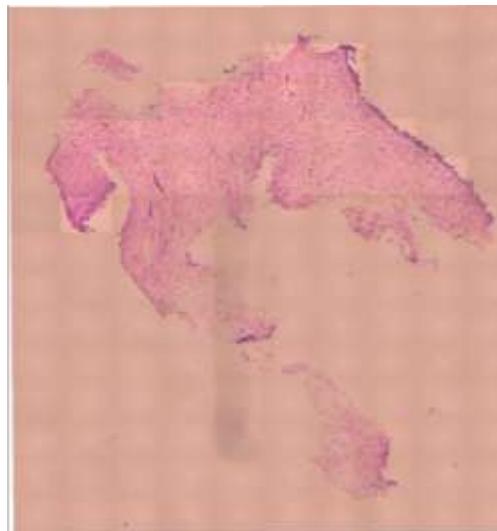


Figura 5. Corte histológico de pulpa dental humana sana. Se observa tejido pulpar completo tanto pulpa coronal como radicular.

Fue posible observar la presencia de fibras de colágena propias de un tejido conjuntivo fibroso laxo celularizado (Figura 6), en presencia abundante de fibroblastos con una morfología estrellada a nivel de la pulpa radicular y ahusada en cámara pulpar (Figura 7). Se demostró la vascularidad del tejido al encontrarse capilares sanguíneos dispersos en presencia de pericitos a su alrededor y en la

mayoría de los casos en ausencia de hematíes o eritrocitos al interior de los vasos sanguíneos (Figura 8).

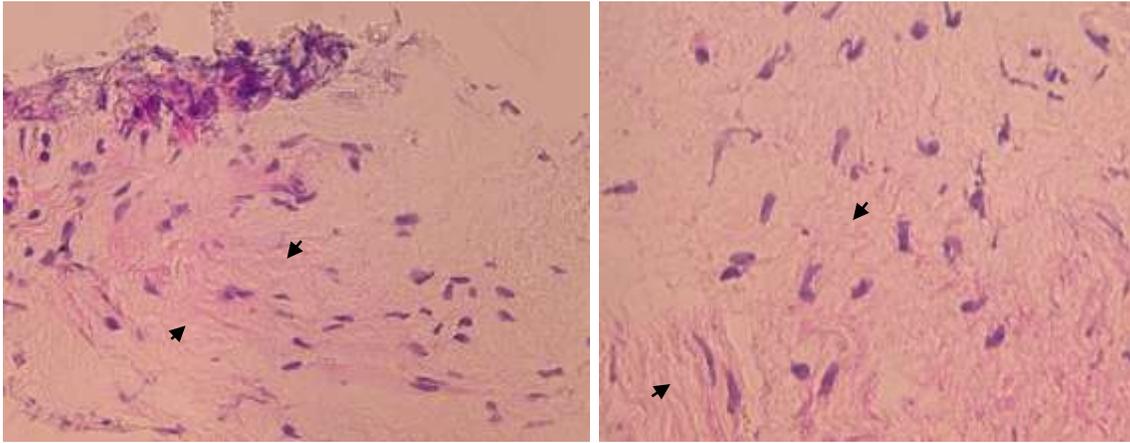


Figura 6. Fibras de colágena

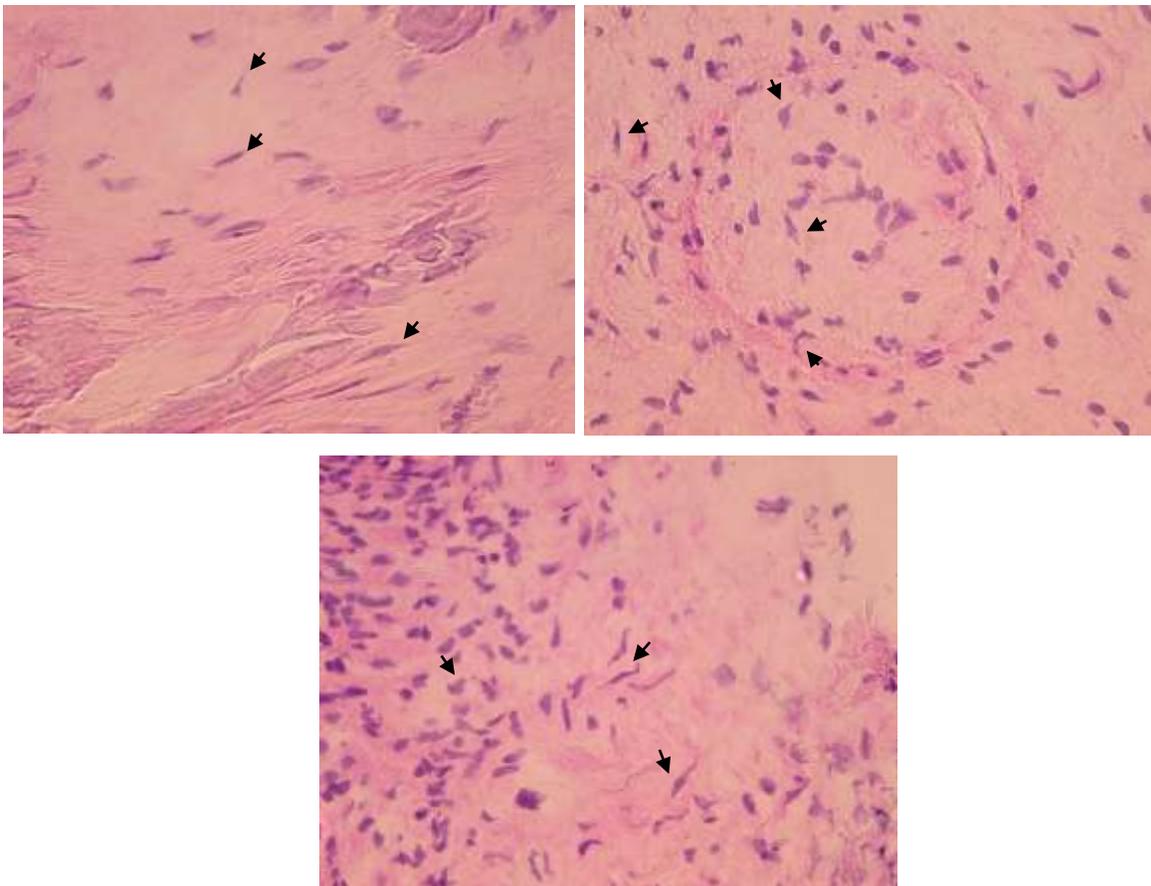


Figura 7. Fibroblastos

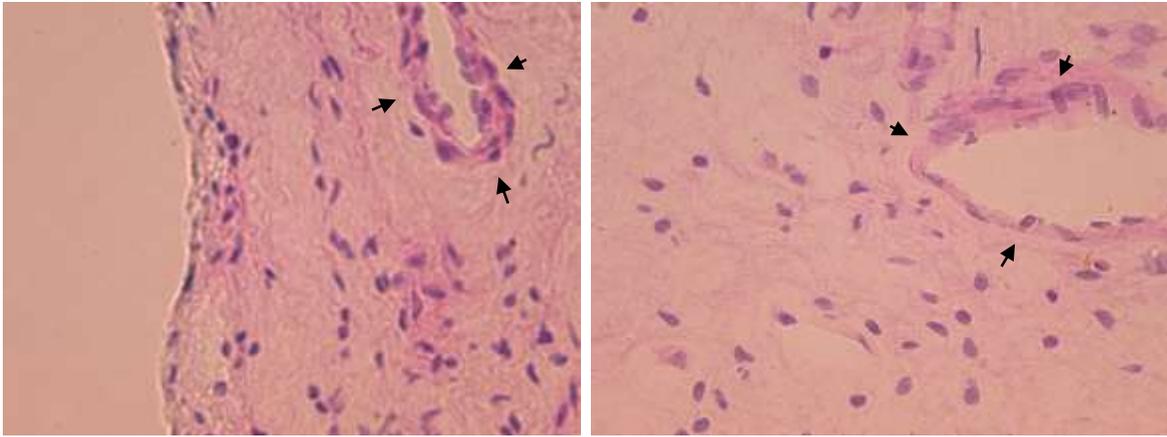


Figura 8. Vasos sanguíneos con presencia de pericitos.

Se visualizaron plexos nerviosos con presencia de células de Schwann (Figura 9). Vasos linfáticos estaban presentes en forma de “hasta de venado” o “y” diferenciándose de los vasos sanguíneos en la ausencia de eritrocitos y pericitos.

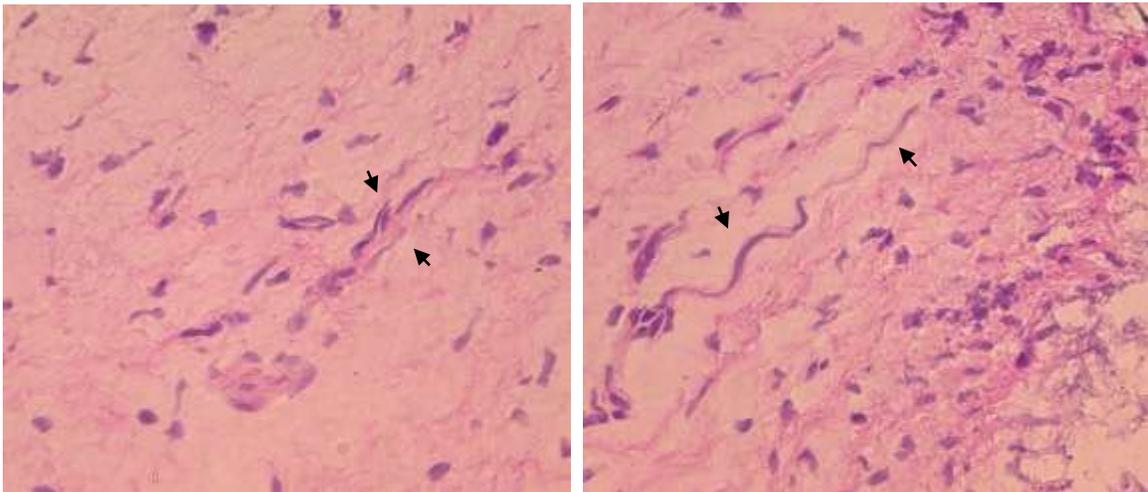


Figura 9. Plexos nerviosos con presencia de células de Schwann.

El tejido conjuntivo a nivel apical se presentaba más laxo y menos fibroso en comparación con el tejido más coronal.

En algunas muestras se pudo observar fragmentos de dentina presentando la composición típica de túbulos dentinarios, los cuales fueron visualizados tanto

longitudinal y transversalmente (Figura 10). Además, se localizaron fragmentos de material mineralizado de color grisáceo sustituyendo el tejido conjuntivo pulpar en dos de las laminillas (Figura 11).

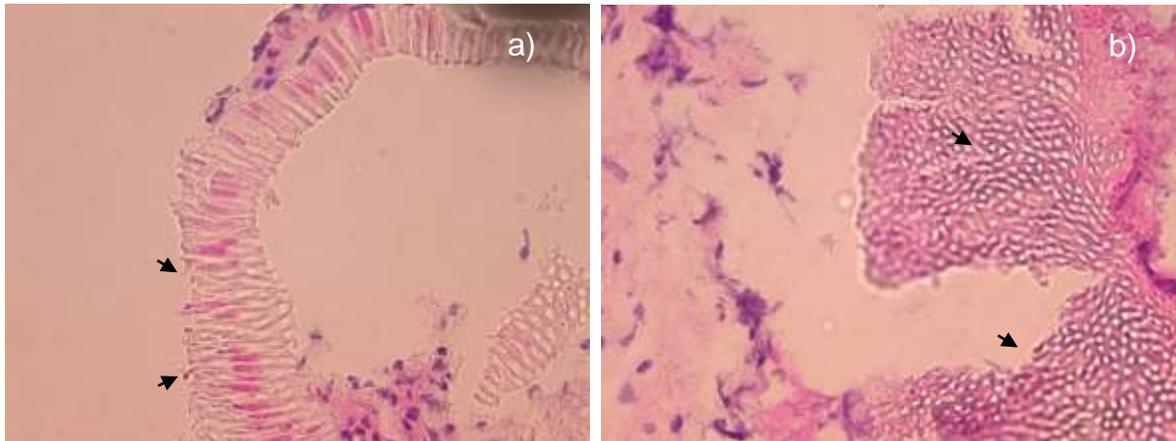


Figura 10. Túbulos dentinarios. a) corte longitudinal; b) corte transversal.

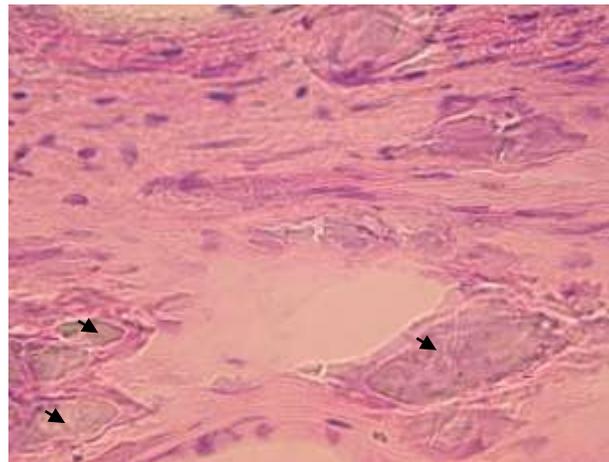


Figura 11. Material mineralizado.

La existencia de linfocitos en la pulpa dental humana fue evidente en todas las muestras. En general en el tejido pulpar se observaron escasos linfocitos dispersos con un mayor número en pulpa radicular en comparación con pulpa coronal, donde la presencia fue escasa o nula (Figura 12). No se identificaron macrófagos y polimorfonucleares ninguna de las muestras analizadas.

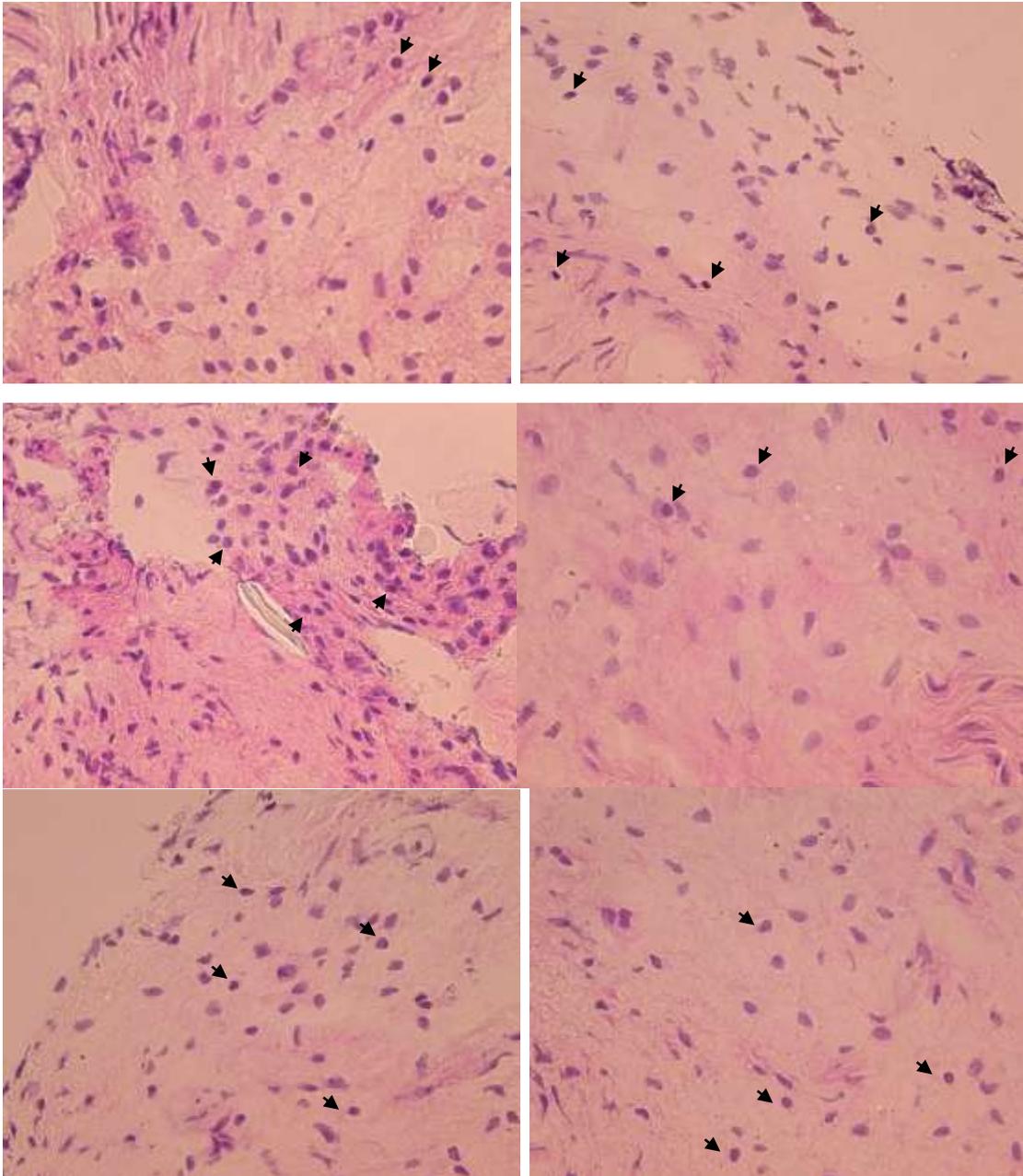


Figura 12. Linfocitos.

7.1.2 Determinación del número de linfocitos por campo en pulpa dental humana sana

Con base en la evidencia clínica microscópica de la presencia de linfocitos en pulpa sana observada en este estudio y con la finalidad de obtener el número de linfocitos por campo aproximado presentes en tejido pulpar normal, se realizó una lectura por

campo de la totalidad del tejido de cada una de las 11 muestras obtenidas. Para obtener dicha cuantificación, se promedió la suma total de linfocitos observados entre el número de campos analizados. Este promedio se calculó en cada laminilla por separado y en base a ello se realizó una tabla representativa que resume los resultados encontrados (Tabla 2). El campo en el que se llevó a cabo el análisis fue a una magnificación de 40x a través del microscopio óptico bajo la responsabilidad de un patólogo bucal experto.

Tabla 2. Número de linfocitos en pulpa dental humana sana

No. de laminilla	No. de linfocitos	No. de campos observados	Numero de linfocitos por campo
1	65	34	1.91
2	14	3	4.67
3	14	7	2.00
4	8	6	1.33
5	9	2	4.50
6	30	6	5.00
7	1	2	0.50
8	1	3	0.33
9	2	5	0.40
10	31	7	4.43
11	42	9	4.67
Total	217	84	2.58

Se obtuvo un promedio general de 2.5 linfocitos por campo de 40x por muestra de tejido pulpar.

7.2 FROTIS CELULAR

7.2.1 Evaluación de la presencia de linfocitos en pulpa dental humana

Se realizaron dos frotis de pulpa dental humana, uno proveniente de un tercer molar con un diagnóstico sano y otro a partir de una muestra de tejido con diagnóstico de pulpitis irreversible obtenido de un órgano dental durante un tratamiento de

conductos. Los frotis obtenidos se observaron a través de microscopía óptica bajo la responsabilidad y criterio de un investigador experto certificado. Las magnificaciones utilizadas fueron 10x, 40x y 100x.

7.2.1.1 Tejido pulpar sano

Con base en el análisis microscópico en el frotis de pulpa sana se pudo identificar la presencia de varias células como neutrófilos, macrófagos, pocos eritrocitos y linfocitos (Figura 13). Con ello se comprueba la viabilidad de la celularidad del tejido pulpar, haciendo énfasis en los linfocitos, posterior al proceso de la disgregación enzimática.

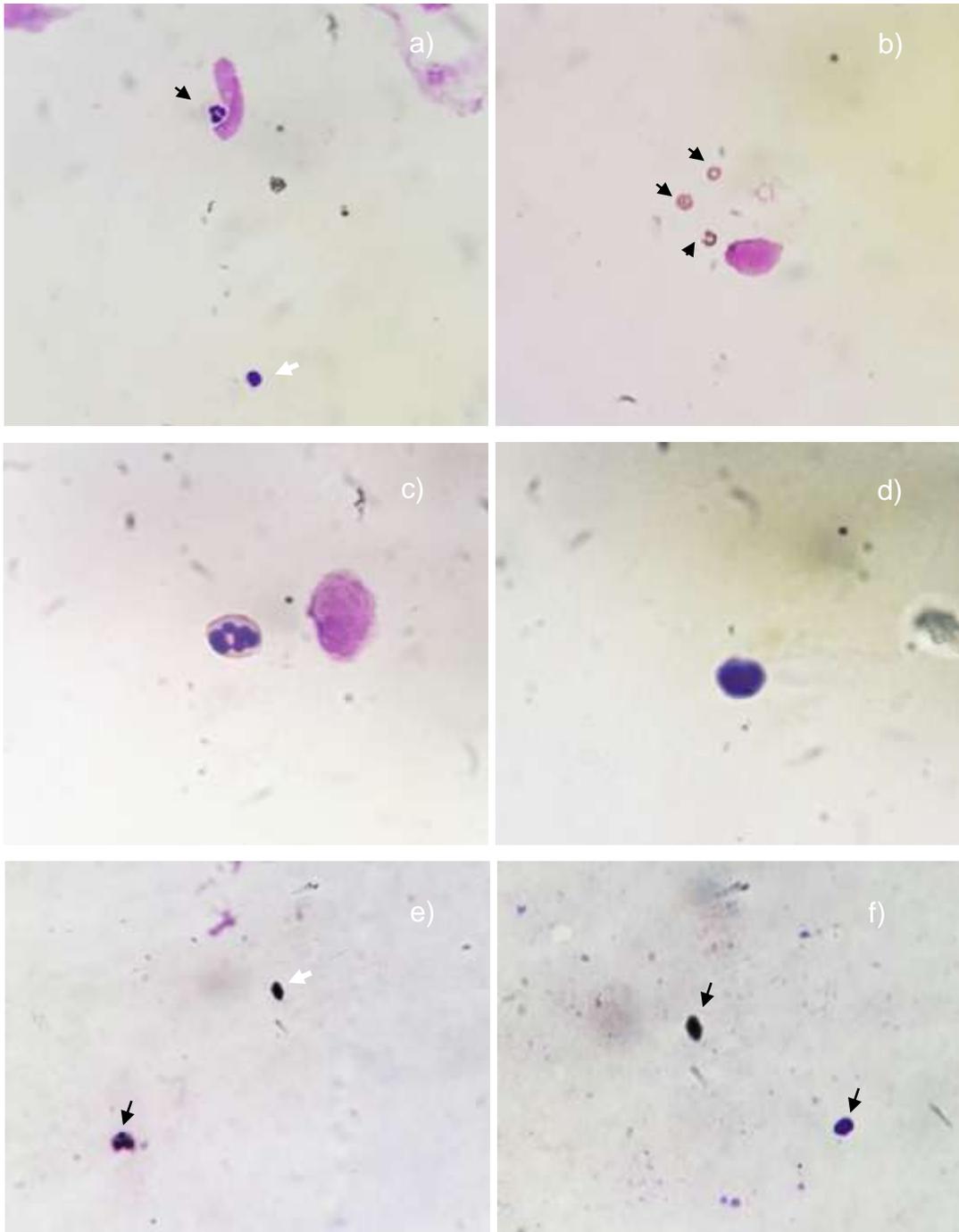


Figura 13. Células pulpares en frotis de pulpa sana. a) Neutrófilo (flecha negra) 40x, linfocito (flecha blanca) 40x; b) Eritrocitos 40x; c) Neutrófilo 100x; d) Linfocito 100x; e) Linfocitos 40x (flecha blanca), neutrófilo 40x (flecha negra); f) Linfocitos 40x.

7.2.1.2 Tejido pulpar con pulpitis irreversible

En el caso del frotis del tejido pulpar con pulpitis irreversible, se observaron abundantes eritrocitos, algunas células polimorfonucleares y detritos estructurales de la pulpa (Figura 14). Lo anterior confirmó un extendido de un tejido desintegrado o en descomposición en ausencia de una estructura propia de un tejido y en semejanza a un frotis sanguíneo.

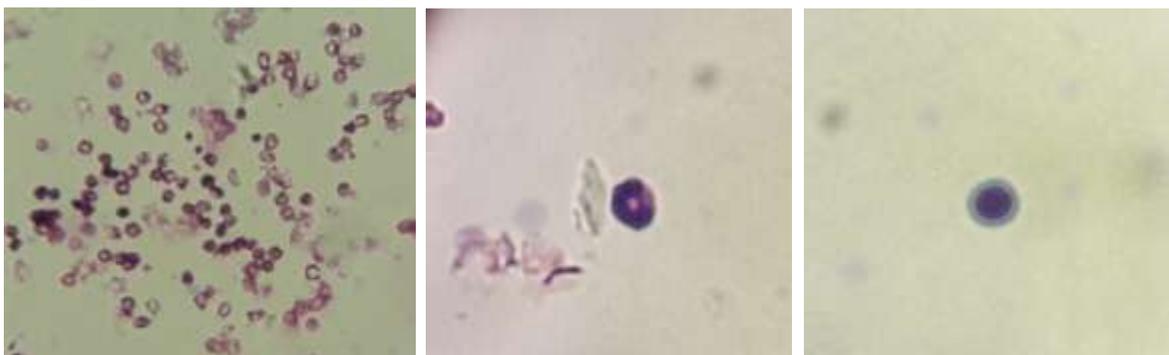


Figura 14. Células pulpares en frotis de pulpitis irreversible. a) Eritrocitos, b) Neutrófilo, c) Linfocito.

7.3 ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO CON CITOMETRÍA DE FLUJO

La muestra se adquirió y analizó en el citómetro Accuri C6, los datos arrojados fueron manipulados por el programa Flowjo V.10 por medio de gráficos density plot. Se reconocieron 20276 células de las cuales, se desplegó en 3 tipos de gráficos: FSC-A/FSC-H, donde se seleccionaron células individuales o únicas descartando los agregados celulares y detritos, obteniendo un total de 1961 células correspondiente al 9.62% de los eventos antes adquiridos. El segundo gráfico fue SSC-A/SSC-H, éste gráfico nos permitió descartar las células de complejidad celular anormal o dañadas denominadas células sencillas obteniendo un total de 1657 células viables correspondiente al 84.5% de las células únicas y el último gráfico FSC-A/SSC-A, donde se mostraron 1436 células totales organizadas de acuerdo a su tamaño y

complejidad respectivamente, correspondiente al 86.7% de las células sencillas (Figura 15).

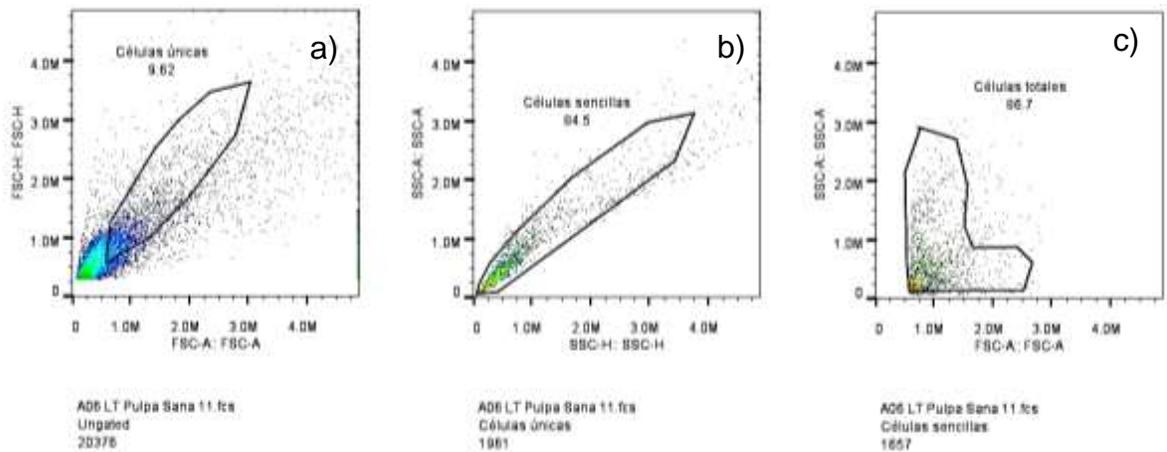


Figura 15. Dot Plots de citometría de flujo inicial. a) Gráfico de células únicas, b) Gráfico células sencillas y c) Gráfico células totales.

El algoritmo de identificación celular partió de un gráfico con los parámetros de SSC-A y FL3 para separar los linfocitos T o $CD3^+$, estos se encontraron localizados en la parte inferior del gráfico como una población oval perfectamente definida con características de baja complejidad y con un total de 419 de linfocitos correspondiente al 29% de las células totales pulpaes. A partir de las células $CD3^+$ se desplegó un nuevo gráfico con el filtro FL2 obteniendo un total de 134 células $CD4^+$ correspondiente al 32% de las $CD3^+$. El gráfico con el filtro FL3 desplegado de las células $CD3^+$ para distinguir células $CD8^+$ obtuvo un total de 215 células correspondiente al 51.8 % de las células $CD3^+$ (Figura 16).

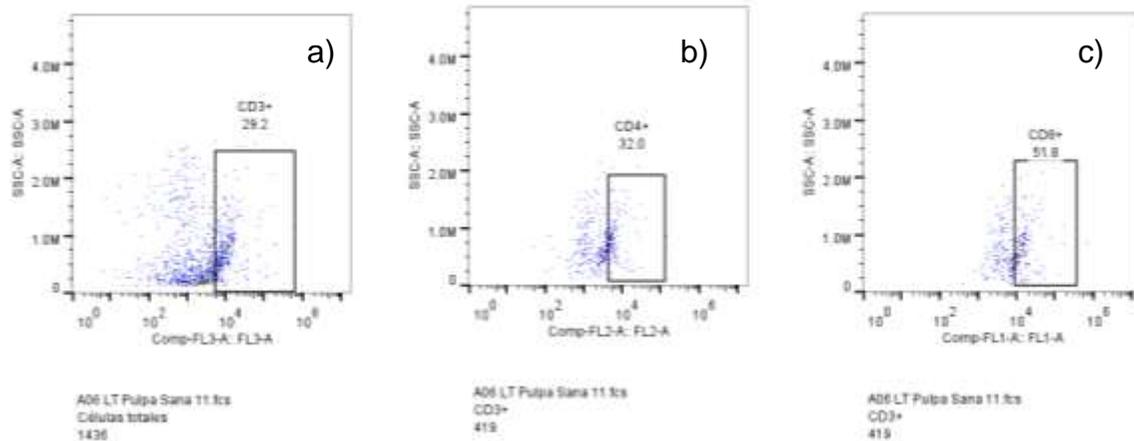


Figura 16. Dot Plots de citometría de flujo de cuantificación. a) El gráfico muestra células CD3⁺, b) El gráfico muestra células CD4⁺ y c) El gráfico muestra células CD8⁺.

8 DISCUSIÓN

Mangkornkarn et al. (1991), Duruturk et al. (2013) y Gaudin et al. (2015) han confirmado la presencia de linfocitos T tanto CD4⁺ y CD8⁺ en pulpa dental humana sana por medio de análisis por citometría de flujo, sin antes comprobar su existencia por medio de otras técnicas. En nuestro caso decidimos estandarizar la técnica para la cuantificación de linfocitos confirmando primeramente la presencia de ellos mediante técnicas histológicas de pulpa dental, además de frotis celular del tejido pulpar sano proveniente de la disgregación enzimática del mismo, comprobando con ello, además, que el protocolo que realizamos para la disgregación del tejido ,es exitosa para conservar la viabilidad celular propias del tejido pulpar sano sin dudar de esta manera que el análisis de citometría posterior, arrojaría datos reales y fidedignos en cuanto a la cuantificación de linfocitos del tejido pulpar.

Duruturk et al. (2013), en su estudio mostraron porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ presentes en pulpa dental con un diagnóstico de pulpitis irreversible por medio de análisis por citometría de flujo. Mientras que en nuestra investigación al intentar obtener el tejido pulpar pudimos percatarnos de que la consistencia acuosa y de apariencia sanguínea del mismo impedía su extracción, siendo difícil o imposible realizarlo usando instrumentos como cucharilla de dentina, limas o tiranervios. Por este motivo en nuestro estudio optamos por emplear puntillas para micropipeta para succionar o adquirir la consistencia líquida de la muestra. Además, al realizar el frotis celular y analizar microscópicamente dicha suspensión fue posible observar que la composición estructural y celular no correspondía al de un tejido, por el contrario, la apariencia del extendido semejava al de un frotis sanguíneo con presencia exorbitante de eritrocitos, escasas células polimorfonucleares y abundancia en detritos tisulares.

Por lo anterior encontramos complicado la obtención de un tejido pulpar consistente cuando presenta un cuadro de pulpitis irreversible, a menos de que este se encuentre en estados iniciales de la patología, lo cual puede ser impredecible al

momento de elegir las muestras que cumplieron con los criterios hasta el momento de la extracción del tejido pulpar, dificultando enormemente el estudio.

Concordamos con M. Jontell et al. (1987) al plantear en su estudio que la pulpa dental en condiciones normales está equipada con una variedad de células asociadas con el sistema de defensa inmune incluido los linfocitos, debido a que en nuestros resultados tanto histológico y de frotis de pulpa dental, así como de citometría de flujo, pudimos confirmar la presencia de neutrófilos, macrófagos y linfocitos.

En nuestro estudio evaluamos histológicamente cortes de tejido pulpar sano, donde pudimos confirmar que la pulpa dental es un tejido conjuntivo laxo con presencia de fibras de colágena y fibroblastos en abundancia. Además, está equipado con una cantidad considerable de vasos sanguíneos y plexos nerviosos que le brinda nutrición y sensibilidad. Por lo anterior coincidimos con los resultados de Liu et al. (2006), Tatullo et al. (2015) y Hargreaves and Berman (2016) quienes mencionaron la presencia de dichas estructuras y células en la pulpa dental humana sana.

En base al resultado que arrojó la muestra única de tejido pulpar analizada mediante citometría de flujo, se obtuvo que, del total de células pulpares presentes, el 29% correspondieron a linfocitos T CD3⁺. Por lo cual, estamos de acuerdo con Gaudin et al. (2015) quien mencionó en su estudio la existencia de un 32 ± 11% de linfocitos T del total de células pulpares en pulpa dental humana sana y estamos en desacuerdo con los datos de Mangkornkarn et al. (1991) quienes refirieron un porcentaje del 1-2.5% de linfocitos T CD3⁺. Aunque es necesario más estudios con un mayor número de muestras para confirmar nuestros resultados debido a que en la investigación que realizamos sólo se analizó una muestra de tejido pulpar.

9 CONCLUSIONES

Es posible realizar un estudio de cuantificación de linfocitos T CD4⁺ Y CD8⁺ en pulpa dental humana sana.

La cuantificación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ no es factible en muestras con de un diagnóstico de pulpitis irreversible.

Se logró la identificación de células pulpares por frotis celular e histología confirmando la presencia de linfocitos en la pulpa dental.

La disgregación enzimática del tejido pulpar sano permite conservar la vitalidad de las células pulpares, principalmente de los linfocitos.

Se estandarizó el protocolo de análisis de citometría de flujo para la identificación de linfocitos T y subtipos.

Se obtuvo un promedio general de 2.5 linfocitos por campo en 40x por muestra de tejido pulpar.

10 PERSPECTIVAS

Se sugiere seguir con la línea de investigación dirigida hacia la cuantificación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en pulpa dental humana sana y con pulpitis reversible, ya que el tejido con un diagnóstico de pulpitis irreversible en la mayoría de los casos imposibilita su obtención y no muestra las condiciones óptimas de un tejido para su estudio.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K. (2012). *Inmunología Celular y Molecular*. ELSEVIER

Allard, B., Couble, M. L., Magloire, H., & Bleicher, F. (2000). Characterization and gene expression of high conductance calcium-activated potassium channels displaying mechanosensitivity in human odontoblasts. *J Biol Chem*, 275(33), 25556-25561. doi: 10.1074/jbc.M002327200

Allard, B., Magloire, H., Couble, M. L., Maurin, J. C., & Bleicher, F. (2006). Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem*, 281(39), 29002-29010. doi: 10.1074/jbc.M601020200

Angelova, A., Takagi, Y., Okiji, T., Kaneko, T., & Yamashita, Y. (2004). Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol*, 49(1), 29-36. doi: 10.1016/s0003-9969(03)00173-0

Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Sainz Espuñes, T. d. R., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17, 42-55.

Bergenholtz, G. (1990). Pathogenic Mechanisms in Pulpal Disease. *Journal of Endodontics*, 16, 98–101.

Bergenholtz, G., Horsted-Bindslev, P., & Reit, C. (2011). *Endodoncia: Editorial El Manual Moderno*.

Bernick, S., & Patek, P. R. (1969). Lymphatic vessels of the dental pulp in dogs. *J Dent Res*, 48(5), 959-964.

- Bishop, M. A., & Malhotra, M. (1990). An investigation of lymphatic vessels in the feline dental pulp. *Am J Anat*, 187(3), 247-253. doi: 10.1002/aja.1001870304
- Bishop, M. A., & Yoshida, S. (1992). A permeability barrier to lanthanum and the presence of collagen between odontoblasts in pig molars. *J Anat*, 181 (Pt 1), 29-38.
- Bruno, K. F., Silva, J. A., Silva, T. A., Batista, A. C., Alencar, A. H., & Estrela, C. (2010). Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. *Int Endod J*, 43(11), 1013-1021. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01757.x
- Casagrande, L., Cordeiro, M. M., Nor, S. A., & Nor, J. E. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 99(1), 1-7. doi: 10.1007/s10266-010-0154-z
- Couve, E. (1986). Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol*, 31(10), 643-651.
- Chutima Mangkornkarn, D., James C. Steiner, DDS, MSD, Roger Bohman, PhD, and, & Robert A. Lindemann, D. (1991). Flow Cytometric Analysis of Human Dental Pulp Tissue. *Journal of Endodontics*, 17, 49-53.
- Duruturk, L., Sari, S., & Sengul, A. (2013). Immunocompetent cell level as a diagnostic reference for pulpal pathosis of primary teeth. *Arch Oral Biol*, 58(10), 1517-1522. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.04.010
- Elliott, R. D., Roberts, M. W., Burkes, J., & Phillips, C. (1999). Evaluation of the carbon dioxide laser on vital human primary pulp tissue. *Pediatr Dent*, 21(6), 327-331.
- Estrela, C. (2009). *Endodontic Science*: Artes Medicas.

- Estrela, C., Alencar, A. H., Kitten, G. T., Vencio, E. F., & Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*, 22(2), 91-98.
- Farnoush, A. (1984). Mast cells in human dental pulp. *J Endod*, 10(6), 250-252. doi: 10.1016/s0099-2399(84)80057-6
- Fitzgerald, M., Chiego, D. J., Jr., & Heys, D. R. (1990). Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*, 35(9), 707-715.
- Fox, A. G., & Heeley, J. D. (1980). Histological Study of Pulp of Human Primary Teeth. *Archs oral Bid.*, 25, 103-110.
- Freitas, P., Novaretti, C. P., Rodini, C. O., Batista, A. C., & Lara, V. S. (2007). Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103(5), e95-102. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.11.031
- Fuertes, L., Santonja, C., Kutzner, H., & Requena, L. (2013). Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte i). *Actas Dermosifilográficas*, 99-27.
- Gaudin, A., Renard, E., Hill, M., Bouchet-Delbos, L., Bienvenu-Louvet, G., Farges, J. C., . . . Alliot-Licht, B. (2015). Phenotypic analysis of immunocompetent cells in healthy human dental pulp. *J Endod*, 41(5), 621-627. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.005
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25), 13625-13630. doi: 10.1073/pnas.240309797

- Hahn, C.-L., & Liewehr, F. R. (2007). Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. *Journal of Endodontics*, 33(3), 213-219. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2006.11.008>
- Hargreaves, K. M., & Berman, L. H. (2016). *Cohen. Vías de la Pulpa*: Elsevier Health Sciences Spain.
- Hargreaves, K. M., Goodis, H. E., & Tay, F. R. (2012). *Seltzer and Bender's Dental Pulp*: Quintessence Pub.
- Ibuki, T., Kido, M. A., Kiyoshima, T., Terada, Y., & Tanaka, T. (1996). An ultrastructural study of the relationship between sensory trigeminal nerves and odontoblasts in rat dentin/pulp as demonstrated by the anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP). *J Dent Res*, 75(12), 1963-1970. doi: 10.1177/00220345960750120801
- Izumi T, K. J., Okamura K, Sakai H. . (1995). IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON THE IMMUNOCOMPETENT CELLS OF THE PULP IN HUMAN NON-CARIOUS AND CARIOUS TEETH. *Arch Oral Biol*, 40, 609–614.
- Jontell, M., Gunraj, M. N., & Bergenholtz, G. (1987). Immunocompetent Cells in the Normal Dental Pulp. *Journal of Dental Research*, 66(6), 1149-1153. doi: 10.1177/00220345870660061101
- Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., & Bergenholtz, G. (1998). Immune Defense Mechanisms of the Dental Pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2, 179-200.
- Kim, M. R. (1996). PR 12 Flow cytometric analysis of lymphocytes in normal and inflamed pulp. *J Endod*, 22(4), 210. doi: 10.1016/S0099-2399(96)80185-3
- Liu, H., Gronthos, S., & Shi, S. (2006). Dental pulp stem cells. *Methods Enzymol*, 419, 99-113. doi: 10.1016/s0076-6879(06)19005-9

- Magloire, H., Maurin, J. C., Couble, M. L., Shibukawa, Y., Tsumura, M., Thivichon-Prince, B., & Bleicher, F. (2010). Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J Orofac Pain*, 24(4), 335-349.
- Mangkornkarn, C., Steiner, J. C., Bohman, R., & Lindemann, R. A. (1991). Flow Cytometric Analysis of Human Dental Pulp Tissue. *J Endod*, 17, 49-53.
- Matsumoto, Y., Kato, S., Miura, M., Yanagisawa, S., & Shimizu, M. (1997). Fine structure and distribution of lymphatic vessels in the human dental pulp: a study using an enzyme-histochemical method. *Cell Tissue Res*, 288(1), 79-85.
- Miller, G. S., Sternberg, R. N., Piliero, S. J., & Rosenberg, P. A. (1978). Histologic identification of mast cells in human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 46(4), 559-566.
- Montalvo Arenas, C. E. (2010). Técnica histológica. 1-12.
- Oehmke, M. J., Knolle, E., & Oehmke, H. J. (2003). Lymph drainage in the human dental pulp. *Microsc Res Tech*, 62(3), 187-191. doi: 10.1002/jemt.10378
- Pimenta F.J, S. A. R., Gomez R.S (2003). Lymphangiogenesis inhuman dental pulp. *Int Endod J*, 12, 853–856.
- Rodak, B. F. (2005). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*: Médica Panamericana.
- Sakurai, K., Okiji, T., & Suda, H. (1999). Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: an immunohistochemical study. *J Dent Res*, 78(10), 1596-1608. doi: 10.1177/00220345990780100401

- Sawa, Y., Yoshida, S., Ashikaga, Y., Kim, T., Yamaoka, Y., & Suzuki, M. (1998). Immunohistochemical demonstration of lymphatic vessels in human dental pulp. *Tissue Cell*, 30(5), 510-516.
- Seltzer, S., & Bender, I. B. (1987). *Pulpa dental*. Mexico: Editorial el Manual Moderno.
- Shuttleworth, C. A., Berry, L., & Wilson, N. H. (1982). Biosynthesis of glycoproteins by rabbit dental pulp fibroblasts in culture. *Arch Oral Biol*, 27(8), 645-650.
- Simsek, S., & Duruturk, L. (2005). A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption. *Arch Oral Biol*, 50(5), 461-468. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.10.009
- Stenvik, A. (1969). Pulp and dentine reactions to experimental tooth intrusion. (A histologic study--long-term effects). *Rep Congr Eur Orthod Soc*, 449-464.
- Stites, D. P., Terr, A. I., & Parslow, T. G. (1998). *Inmunología básica y clínica: El Manual Moderno*.
- Tatullo, M., Marrelli, M., Shakesheff, K. M., & White, L. J. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 9(11), 1205-1216. doi: 10.1002/term.1899
- Thivichon-Prince, B., Couble, M. L., Giamarchi, A., Delmas, P., Franco, B., Romio, L., . . . Bleicher, F. (2009). Primary cilia of odontoblasts: possible role in molar morphogenesis. *J Dent Res*, 88(10), 910-915. doi: 10.1177/0022034509345822
- von Fraunhofer, J. A., Adachi, E. I., Barnes, D. M., & Romberg, E. (2000). The effect of tooth preparation on microleakage behavior. *Oper Dent*, 25(6), 526-533.

Yan, M., Yu, Y., Zhang, G., Tang, C., & Yu, J. (2011). A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Rev*, 7(1), 161-171. doi: 10.1007/s12015-010-9155-0

Zhang, J., Kawashima, N., Suda, H., Nakano, Y., Takano, Y., & Azuma, M. (2006). The existence of CD11c+ sentinel and F4/80+ interstitial dendritic cells in dental pulp and their dynamics and functional properties. *Int Immunol*, 18(9), 1375-1384. doi: 10.1093/intimm/dxl070

12 ANEXOS

12.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO



Especialidad de Endodoncia Facultad de Odontología
Universidad Autónoma de Sinaloa
Consentimiento Informado

Este formulario de consentimiento informado está dirigido a pacientes que son atendidos en la Clínica de la Especialidad de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Campus Ciudad Universitaria para invitarlos a participar en la investigación titulada “ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD4 Y CD8 EN PULPA DENTAL HUMANA”.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no, e independientemente de esto recibirá todos los servicios que solicite en esta clínica. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes. Aclaremos que no habrá beneficio para usted, pero su participación nos ayudará a entender mejor la presencia de células de la respuesta inmune en el tejido pulpar.

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por H. Comité Ética de la Facultad de Odontología, cuya tarea es asegurarse de que se protejan a los participantes en la investigación.

En caso de aceptar, yo (paciente) _____ he decidido participar en esta investigación donde se obtendrá dependiendo del caso un tercer molar o tejido pulpar, lo cual no se afectará mi tratamiento. He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado.

Su firma indica que usted ha decidido tomar parte en este proyecto y que ha leído y entendido la información proporcionada y explicada personalmente.

Firma de/la donador(a)

Firma del testigo

Nombre y firma de la persona que obtuvo el consentimiento informado.

12.2 TÉCNICA DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA

Para la tinción de las secciones de tejido pulpar, los portaobjetos fueron cubiertos con hematoxilina de Harris durante un minuto para la colocación nuclear y se lavaron con agua tridestilada. Posteriormente se pasaron a etanol ácido por 20 segundos para ser lavados y sumergidos en bicarbonato de sodio 0.02% por un minuto como solución mordiente y nuevamente fueron lavados. Finalmente se cubrieron con eosina durante 10 segundos para generar contraste. Al término de la tinción las laminillas se colocaron en etanol al 70% y 100% durante 15 segundos en cada uno respectivamente. Por último, se sumergieron en xileno 1 minuto y se dejaron secar a temperatura ambiente.