

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



**CUANTIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LINFOCITOS EN PULPA  
DENTAL HUMANA SANA Y CON PULPITIS REVERSIBLE**

No. de registro 2019-2

**TESIS QUE PRESENTA:**

HUGO ALEJANDRO BOJÓRQUEZ ARMENTA

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

**DIRECTORES DE TESIS**

DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA

DRA ERIKA DE LOURDES SILVA BENÍTEZ

**CULIACÁN ROSALES, SINALOA, DICIEMBRE 2019**

## **DEDICATORIA**

Dedicado a mis padres Arnoldo Bojórquez y Nery Armenta porque todo lo que soy ha sido gracias a su amor, dedicación, paciencia y educación, gracias por apoyarme en cada una de mis metas, por ayudarme y no dejarme solo en ningún momento.

A mi hermana Liliana Bojórquez Armenta quien hizo posible cumplir este sueño, si a alguien tengo que agradecerle mi título es a ella, gracias por ser mi amiga, mi compañera y mi maestra. No me alcanzara la vida para devolverte todo lo que has hecho por mí.

A mi hermanita que siempre será la pequeña Karen Bojórquez, gracias por estar a mi lado siempre, por ser el brillo en mi vida, por inspirarme y contagiarme de tu felicidad.

A mi amigo, colega y hermano Jorge Armentía, gracias por creer en mí, por ayudarme a cumplir mis sueños, por estar ahí en cada uno de los momentos complicados y ayudarme a salir adelante.

A mi familia y amigos por darme aliento y apoyo, por hacer mi sueño su sueño y mis metas sus metas.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer a la Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar por permitirme ser parte de esta gran familia que se ha vuelto la especialidad en Endodoncia, gracias por ayudarme a ser un mejor ser humano.

Al plantel docente tanto teórico como clínico, gracias por compartir sus conocimientos, por exigirme tanto, por no permitirme quedarme atrás, por darme su regaño cuando fue necesario y sus manos cuando más lo necesité.

Gracias a la Dra. Erika de Lourdes Silva Benítez, Dr. Rosalío Ramos Payán, Dr. José Geovanni Romero Quintana, Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina y la maestra Mariana Avendaño por hacer que me enamorara de la investigación, gracias a su amor por la docencia lograron inspirarme y abrir en mí una nueva pasión por los estudios.

Gracias al Dr. Julio Basurto por su ayuda en la interpretación de mis muestras, a Jorge López, German Jiménez y Erik Lizárraga por su apoyo y paciencia durante mis estadías en el laboratorio. A todos los alumnos y personas que comprenden el grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Molecular e Inmunología.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
INDICE DE GRÁFICAS .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
1 MARCO TEÓRICO .....	2
1.1 PULPA DENTAL .....	2
1.1.1 ZONAS TOPOGRÁFICAS DE LA PULPA DENTAL .....	3
1.2 CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL.....	7
1.2.1 FIBROBLASTOS .....	7
1.2.2 ODONTOBLASTOS .....	7
1.2.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....	8
1.2.4 CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO .....	9
1.2.4.1 NEUTRÓFILOS.....	10
1.2.4.2 MASTOCITOS .....	10
1.2.4.3 MACRÓFAGOS .....	11

1.2.4.4	CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	12
1.2.5	LINFOCITOS .....	13
1.2.5.1	LINFOCITOS B .....	14
1.2.5.2	LINFOCITOS T .....	15
1.3	RESPUESTA INMUNOLÓGICA ANTE LAS AGRESIONES PULPARES .	17
1.4	METODOLOGÍAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS EN PULPA DENTAL.....	19
1.4.1	FROTIS CELULAR.....	19
1.4.2	HISTOLOGÍA.....	20
1.4.2.1	TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA.....	20
1.5	ANTECEDENTES .....	21
2	JUSTIFICACIÓN.....	23
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	OBJETIVO GENERAL .....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1	LUGAR DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	25
4.2	TIPO DE ESTUDIO .....	25
4.3	MUESTRA.....	25

4.3.1	TAMAÑO DE LA MUESTRA .....	25
4.3.2	TIPO DE MUESTREO .....	25
4.3.3	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	25
4.3.4	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	26
4.3.5	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	26
4.4	METODOLOGÍA.....	27
4.4.1	OBTENCIÓN DEL TEJIDO PULPAR .....	27
4.4.2	PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DE LA MUESTRA.....	29
4.4.2.1	INCLUSIÓN DEL TEJIDO EN POLYFREEZE® .....	29
4.4.2.2	CORTES HISTOLÓGICOS Y TINCIÓN.....	30
4.4.3	DISGREGACIÓN MECÁNICO-ENZIMÁTICA DEL TEJIDO.....	31
4.4.3.1	FROTIS CELULAR .....	33
4.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	34
4.6	LUGAR DE REALIZACIÓN .....	34
4.7	FINANCIAMIENTO.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	HISTOLOGÍA DE PULPA DENTAL SANA.....	35
5.2	HISTOLOGÍA DE PULPITIS REVERSIBLE.....	42
5.3	ANÁLISIS COMPARATIVO.....	51

5.4	FROTIS PULPAR.....	54
6	DISCUSIÓN.....	58
7	CONCLUSIÓN.....	60
8	PERSPECTIVAS.....	61
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
10	ANEXOS.....	71
10.1	CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	71
10.2	TÉCNICA DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resumen total de datos en dental sana .....	42
Tabla 2 Resumen total de datos en pulpitis reversible .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas de la pulpa.....	6
Figura 2. Procedimiento para la obtención del tejido pulpar. ....	28
Figura 3. Preparación del tejido pulpar para análisis histológico. ....	29
Figura 4. Cortes histológicos y tinción.....	31
Figura 5. Proceso de Disgregación enzimo-mecánica.....	33
Figura 6. Corte histológico de pulpa dental sana. Porción radicular .....	36
Figura 7. Fibras de colágeno.....	37
Figura 8. Fibroblastos.....	38
Figura 9. Presencia de vasos sanguíneos en un tejido conjuntivo fibroso denso ..	39
Figura 10. Plexo nervioso de Rashkow .....	40
Figura 11. Linfocitos. ....	41
Figura 12. Pulpa dental con diagnóstico de pulpitis reversible.....	43
Figura 13. Fibras de colágeno .....	45
Figura 14. Fibroblastos .....	46
Figura 15. Presencia de espacios vasculares .....	47
Figura 16. Plexo nervioso de Rashkow .....	48
Figura 17. Linfocitos. ....	49

Figura 18. Linfocitos a 4X.....	55
Figura 19. Linfocitos a 10x. ....	56
Figura 20. Linfocito a 40x. ....	57

## **INDICE DE GRÁFICAS**

Gráfica 1. Campos analizados .....	51
Gráfica 2 Linfocitos por campo.....	52
Gráfica 3 Promedio de Linfocitos totales.....	53

## RESUMEN

La pulpa dental es un tejido conectivo de origen ectomesenquimatoso comprendido dentro de las estructuras mineralizadas de los dientes. Está compuesto por diferentes tipos de células, entre las que encontramos odontoblastos, fibroblastos y células mesenquimales diferenciadas, también contiene células del sistema inmunológico como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos y mastocitos, compuestos en su estructura por tejido conectivo laxo, fibras de colágeno, reticular y elásticas, sustancia fundamental, además de estar altamente vascularizada e innervada. La pulpa dental humana está equipada con un complejo sistema de células y moléculas inmunocompetentes residentes, que permiten mantener y regular la homeostasis de los tejidos. La pulpa dental es capaz de desencadenar respuestas inmunológicas innatas destinadas a contener, combatir y eliminar la infección. Si el tejido no puede prevenir el avance de la infección, tiene células específicas contra antígenos (linfocitos T y B así como sus citocinas y anticuerpos). **Objetivos:** Cuantificar la presencia de linfocitos en pulpa sana y pulpitis reversible para conocer la cantidad de células infiltradas en esta etapa de la patología pulpar y su importancia en su desarrollo. **Materiales y métodos:** Se obtuvieron 6 muestras de tejido pulpar de 3ros molares (3 sanas, 3 pulpitis reversible) se colocaron en poly-freeze y se llevaron a crióstato. Se tiñeron con H&E y se analizaron bajo microscopio. **Resultados.** Se obtuvieron un promedio de  $1.151 \pm 0.33$  linfocitos por campo para el grupo de pulpitis reversible y un promedio de  $0.835 \pm 0.22$

linfocitos por campo para el grupo de pulpa sana en los cortes histológicos, lo cual fue estadísticamente significativo ( $p = 0.039$ ). **Conclusión.** Existe un mayor infiltrado linfocitario en el grupo de pulpitis reversible comparado con el grupo sano, lo que indica que estas células pueden jugar un papel crucial en evitar el avance de la patología pulpar.

**Palabras clave:** Histología, Linfocitos, Pulpa dental humana, Células inmunológicas, H&E.

## ABSTRACT

The dental pulp is a connective tissue of ectomesenchymal origin comprised within mineralized tooth structures. It is composed of different types of cells, among which we find, odontoblasts, fibroblasts and differentiated mesenchymal cells, also has cells of the immune system such as neutrophils, dendritic cells, macrophages, lymphocytes and mast cells, composed in its structure by loose connective tissue, fibers collagen, reticular and elastic, fundamental substance, besides being highly vascularized and innervated. The human dental pulp is equipped with a complex system of resident immunocompetent cells and molecules, which allow to maintain and regulate tissue homeostasis. The dental pulp is capable of triggering innate immune responses aimed at containing, combating and eliminating the infection. If the tissue is not able to prevent the advance of infection, it has specific cells against antigens (T and B cells) and its products (inflammatory chemokines, cytokines and antibodies). **Objectives:** This study proposes to quantify the presence of lymphocytes in healthy pulp, reversible pulpitis in order to know the amount of infiltrated cells in each stage of the pulp pathology and its importance in its development. **Materials and methods:** 6 samples of pulp tissue of 3rd molars (3 healthy, 3 reversible pulpitis) were obtained in poly-freeze and taken to cryostat. They were stained with H&E and analyzed under a microscope. **Results:** An average of 1,151 lymphocytes per field were obtained for the reversible pulpitis group and an average of 0.835 lymphocytes per field for the healthy pulp group, which was statistically significant ( $p = 0.039$ ). **Conclusion:** There is a greater

lymphocytic infiltrate in the reversible pulpitis group compared to the healthy group, which indicates that lymphocytes can play a crucial role in preventing the progression of pulp pathology.

**Keywords:** Histology, Lymphocytes, Human dental pulp, Immune cells, H&E.

# INTRODUCCIÓN

La pulpa dental es un tejido conectivo de origen ectomesenquimal comprendido dentro de estructuras dentarias mineralizadas. Está compuesta de diversos tipos de células, entre las que encontramos odontoblastos, fibroblastos y células mesenquimales diferenciadas, células del sistema inmunológico como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos y mastocitos, compuesta en su estructura por tejido conectivo laxo, fibras colágenas, reticulares y elásticas, sustancia fundamental, además de estar altamente vascularizada e innervada.

La pulpa dental humana está equipada con un sistema complejo de células inmunocompetentes residentes y moléculas, que permiten mantener y regular la homeostasis tisular. La pulpa dental es capaz de desencadenar respuestas inmunológicas innatas destinadas a contener, combatir y eliminar la infección. Ante la imposibilidad del tejido de evitar el avance de la infección, éste dispone de células específicas contra antígenos, linfocitos T y B y sus productos.

Diversos estudios han dado a conocer la presencia de linfocitos en la patología pulpar, esto conlleva a un interés en determinar si la infiltración de linfocitos es distinta en cada uno de los estadios patológicos y si existe una relación entre la cantidad de células presentes y la gravedad de la lesión.

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 PULPA DENTAL

El tejido conectivo pulpar tiene origen ectomesenquimal, es de aspecto gelatinoso inmaduro y está rodeado de paredes rígidas que corresponden a las estructuras dentales mineralizadas (1), su célula diferenciada más característica es el odontoblasto; los fibroblastos son las células más abundantes del tejido conectivo pulpar, ellas se encargan de originar las fibras colágenas. Además se encuentran otros tipos celulares como histiocitos, linfocitos, células mesenquimales diferenciadas, macrófagos y eosinófilos (2). Estructuralmente el tejido conectivo pulpar está compuesto por tejido conectivo laxo, fibras reticulares, fibras colágenas, fibras elásticas y sustancia fundamental (3). Además está altamente vascularizado debido a la abundante presencia de pequeñas vénulas, arteriolas y capilares, las fibras sensoriales y las fibras autonómicas se extienden a través de todo el tejido (1). La pulpa dental tiene la capacidad de generar dentina de manera fisiológica y también como respuesta a un estímulo externo, incluso puede desencadenar una respuesta ante agresiones que no la afectan directamente (3).

Desde un punto de vista anatómico, la pulpa dental está dividida en dos partes: la pulpa que se encuentra en la corona y la pulpa de los conductos radiculares la cual permite la conexión con el tejido periapical a través de los múltiples forámenes y foraminas encontradas en el tercio apical de la raíz (3).

### **1.1.1 ZONAS TOPOGRÁFICAS DE LA PULPA DENTAL**

La pulpa coronal se puede dividir en cuatro zonas microscópicas que desde la dentina al centro del órgano dental corresponden a la capa de odontoblastos o zona subodontoblástica, zona pobre en células o zona oligocelular de Weils, zona rica en células y pulpa propiamente dicha (Figura 1) (1).

La zona odontoblástica es el estrato exterior de células de la pulpa sana es la capa de odontoblastos. Dicha capa se encuentra inmediatamente por debajo de la predentina. No obstante, sus prolongaciones odontoblásticas pasan a través de la predentina hasta el interior de la dentina. En consecuencia, la capa de odontoblastos se encuentra en realidad integrada por sus cuerpos celulares. Además entre los odontoblastos se pueden encontrar capilares fibras nerviosas y células dendríticas. La longitud de los odontoblastos es variable; por tanto, sus núcleos no se encuentran todos al mismo nivel, sino que muestran una disposición escalonada, descrita a menudo como “en empalizada”. La capa de odontoblastos de la pulpa coronal contiene más células por unidad de área que la pulpa radicular. Existen una serie de uniones intercelulares especializadas (es decir, complejos de unión), de conexión entre odontoblastos adyacente, que se denomina desmosomas (zona adherente), uniones comunicantes (nexos) y uniones herméticas (zonas ocluyentes). Las numerosas uniones comunicantes proporcionan vías permeables a través de las cuales las moléculas señal pasan de unas células a otras (4).

La zona pobre en células es la capa situada por debajo de la zona odontoblástica y presenta aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de ancho. En general, se encuentra bien definida en la región coronaria de los dientes recién erupcionados, pero, en cambio suele estar ausente en la región radicular. Tampoco se distingue en pulpas embrionarias ya que, al igual que la zona rica en células, se forma tardíamente durante el proceso de histogénesis pulpar. En pulpas maduras la capa oligocelular alcanza un espesor de 60  $\mu\text{m}$  y en la misma se identifican el plexo nervioso de Raschkow (mediante impregnación argéntica), el plexo capilar subodontoblástico y los denominados fibroblastos subodontoblásticos, que están en contacto con los odontoblastos y las células de Höhl por medio de uniones comunicantes tipo gap. Asimismo a este nivel se encuentran las células dendríticas de la pulpa (5).

En el área subodontoblástica 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 mesenquimales 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. Aunque la división celular dentro de la

zona rica en células es una ocurrencia rara en pulpas normales, la muerte de los odontoblastos causa un gran aumento en la tasa de mitosis, ya que los odontoblastos con lesiones irreversibles se sustituyen por células que emigran desde la zona rica en células hasta la superficie interna de la dentina. Se considera probable que esta actividad mitótica represente el primer paso en la formación de una nueva capa odontoblástica. Algunos estudios han implicado a las células primitivas como fuente de estos odontoblastos de reemplazo (4).

La zona central de tejido conjuntivo conocida como pulpa propiamente dicha o núcleo pulpar contiene fibroblastos, el tipo de célula más abundante; vasos sanguíneos más grandes y nervios, las células mesenquimales indiferenciadas y las células de defensa como los macrófagos se localizan con frecuencia en el área perivascular. Los haces de fibra de colágeno son mucho más numerosos en la pulpa de la raíz que en la pulpa coronal (6).

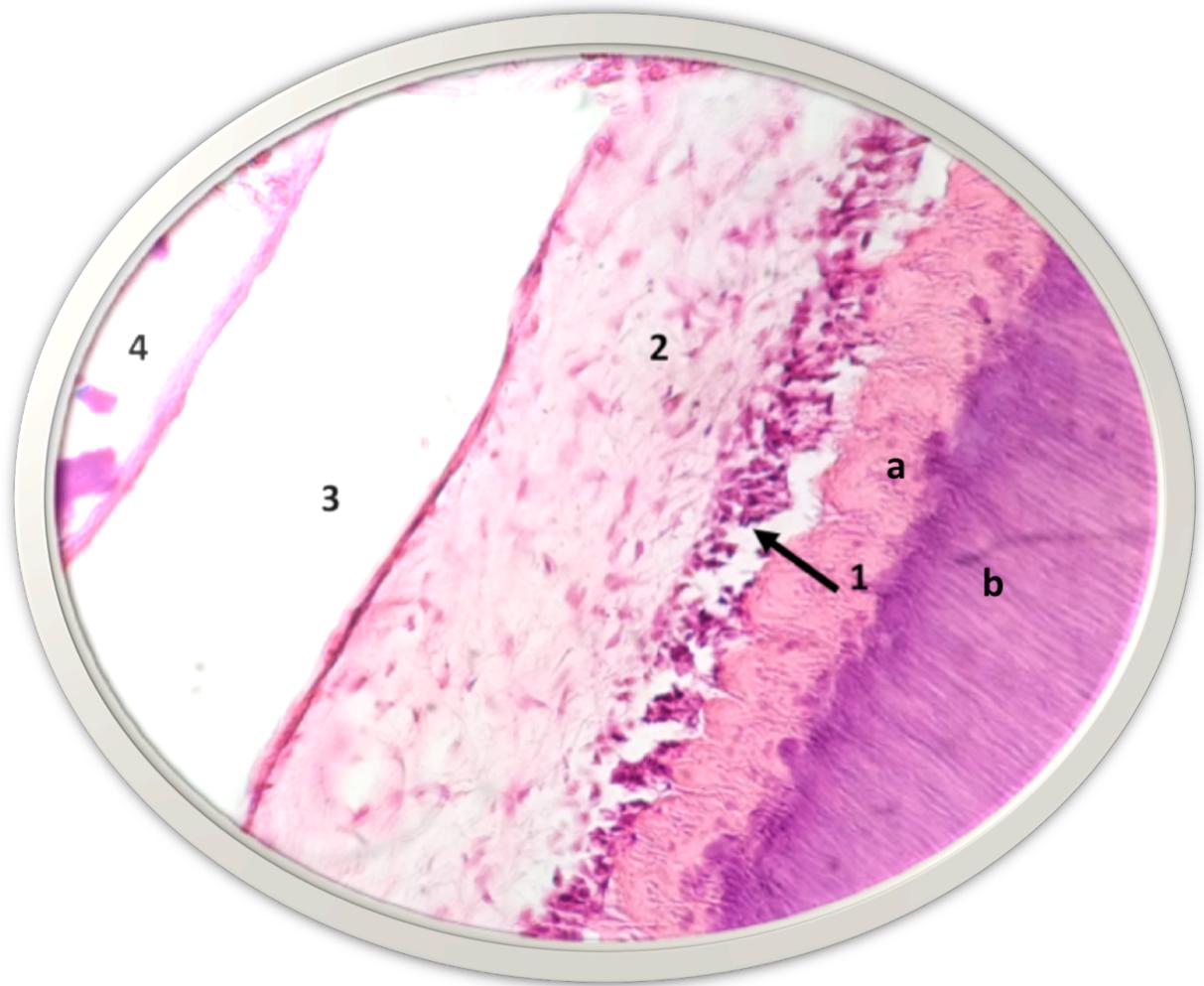


Figura 1. Zonas de la pulpa. 1) Zona subodontoblastica, 2) Zona rica en células, 3) Vaso sanguíneo perteneciente a la zona pobre en células, 4) zona central. a) Predentina, b) dentina.

## **1.2 CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL**

### **1.2.1 FIBROBLASTOS**

El fibroblasto es la célula predominante de los tejidos conectivos del cuerpo. Es una célula dinámica, la cual ejerce funciones tisulares a nivel local y del sistema inmunológico y al evaluarlo en cultivo se ha encontrado de manera interesante que los fibroblastos no son homogéneos entre sí, sino que presentan diferencias en morfología y función de acuerdo con la ubicación en la que se encuentren.

Dentro de sus principales funciones se encuentra la formación de fibras del tejido conectivo denominadas colágeno y elastina; sin embargo, cabe notar que el fibroblasto desempeña otros papeles igualmente importantes tales como: a) producción y mantenimiento de la sustancia fundamental en la cual de productos fibrosos son embebidos, b) capacidad de sintetizar y fagocitar el colágeno y los componentes de la matriz extracelular en procesos de remodelación del tejido conectivo, c) exhiben contractilidad y motilidad utilizadas en la determinación de la organización estructural del tejido conectivo, especialmente durante la embriogénesis (7).

### **1.2.2 ODONTOBLASTOS**

Los odontoblastos son células post-mitóticas (8), producen dentina y exhiben características morfológicas únicas; es decir, extienden los procesos citoplasmáticos en los túbulos dentinarios, la inducción de éstos solo se produce

una vez durante el desarrollo del diente y sobreviven durante toda la vida de los dientes sanos. Durante la diferenciación de los odontoblastos, las moléculas de señalización del epitelio del esmalte interno se consideran necesarias para la diferenciación de sus precursores, es decir, células de papila dental periférica. Si los odontoblastos son destruidos por estímulos externos severos, como la caries profunda, se induce la diferenciación de las células madre de la pulpa dental en células de tipo odontoblastos. Los odontoblastos pueden actuar como receptores nociceptivos (emisión de señales de dolor) y células de vigilancia que detectan la invasión de patógenos exógenos debido a que sus prolongaciones citoplasmáticas son las primeras que responden a la invasión bacteriana que afectan a los túbulos dentinales, expresando receptores tipo toll (TLR) como son TLR-2, TLR-3, TLR-5 y TLR9 en respuesta a los péptidos microbianos asociados a patógenos (PAMP) (9, 10).

### **1.2.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

Las células madre se definen como células no diferenciadas que exhiben auto-renovación y capacidad de diferenciación de múltiples linajes. Las células madre se pueden clasificar en células madre pluripotentes (embrionarias) o pluripotentes inducidas y en células madre adultas (también conocidas como específicas de los tejidos). Las células progenitoras de la pulpa dental se derivan de los tejidos mesodérmicos. Están estrechamente relacionadas con las células madre mesenquimales (estroma) que están presentes en el compartimento estromal de

diferentes tejidos, incluida la médula ósea. Se ha informado que un perfil de expresión génica de DPSC es similar al de MSC de médula ósea. Pueden diferenciarse en varias células de tejido mesodérmicas y no mesodérmicas que incluyen osteoblastos, adipocitos, condrocitos y miocitos, así como neuronales y células endoteliales, hepatocitos, melanocitos, además de los odontoblastos que forman dentina (11).

#### **1.2.4 CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO**

Los recientes avances en inmunología han revelado la enorme complejidad del sistema de regulación inmunitaria (12, 13). La pulpa dental está equipada para montar respuestas inmunológicas adaptativas a la caries (14). La caries dental es la principal causa de la patología pulpar, los microorganismos y sus toxinas causan daño tisular, causando inflamación, un mecanismo de defensa inmediato que conduce a la vasodilatación y al aumento de la permeabilidad vascular, permitiendo la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) (15). La respuesta inmunológica del hospedero que tiene lugar en esta área es muy compleja e implica el reclutamiento de células presentadoras de antígeno, linfocitos, mastocitos y sus citocinas (12, 16), así como proteínas de superficie que ayudan a reconocer fragmentos de microorganismos comunes para llevar a cabo la fagocitosis (17).

#### **1.2.4.1 NEUTRÓFILOS**

Los neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares (PMN), son la población más abundante de leucocitos circulantes y median las primeras fases de las reacciones inflamatorias. Se producen en la médula ósea y surgen de una línea común con los linfocitos mononucleares. Los neutrófilos circulan como células esféricas de unas 12 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro con numerosas proyecciones citoplasmáticas. El núcleo de un neutrófilo está segmentado en tres a cinco lóbulos conectados. El citoplasma contiene gránulos específicos que están llenos de enzimas como la lisozima, la colagenasa y la elastasa. La producción de neutrófilos se activa con el factor estimulador de colonias de granulocitos (18). Son las principales células efectoras innatas en la mayoría de los tejidos, fagocitan microorganismos y producen especies reactivas de oxígeno (ROS) para matar dentro de las células; los microorganismo extracelulares son eliminados por trampas extracelulares de neutrófilos formación NET (neutropjil extracelular traps) que se forman cuando los PMN se lisan y liberan péptidos y ADN antimicrobianos (19). Se han observado solo algunos neutrófilos en tejidos pulpares con caries poco profundas, por lo que se cree que no son muy importantes en la pulpitis reversible (17).

#### **1.2.4.2 MASTOCITOS**

Los mastocitos fueron descubiertos por primera vez en 1877, por Paul Ehrlich, se encuentran principalmente en el tejido conectivo laxo, los mastocitos contienen

núcleos prominentes que tienen forma redonda u ovalada y generalmente no están lobulados. El citoplasma contiene una gran cantidad de gránulos esferofílicos esferoidales, que a menudo son tan numerosos que pueden oscurecer otras estructuras citoplasmáticas, especialmente el núcleo (20).

En los mastocitos, el ligando celular CD117 regula el crecimiento, la migración y las funciones efectoras específicas en respuesta al entorno microbiano y puede modular las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (21), expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) entre los que se encuentran TLR-2 y TLR-4, en respuesta a los PAMP, los mastocitos sintetizan IL-8, TNF- $\alpha$ , ligando de quimiocina CXC 8 (CXCL8), ligando de quimiocina CC 20 (CCL20) y liberación de histamina, la cual liberan de sus gránulos intracelulares (22, 23).

### **1.2.4.3 MACRÓFAGOS**

Los macrófagos se originan a partir de monocitos derivados de médula ósea. Ahora se acepta que los macrófagos residentes de tejidos se originan a partir de precursores embrionarios durante el desarrollo fetal. En algunas circunstancias, los macrófagos residentes de tejido se reponen postnatalmente por monocitos circulantes con la excepción de la microglia, células de Langerhans y macrófagos alveolares que no dependen de un flujo de monocitos en estado estacionario. Los macrófagos residentes muestran firmas transcripcionales y epigenéticas específicas de tejido. La evidencia emergente sugiere que los microambientes

tisulares desempeñan un papel más influyente en la configuración de paisajes potenciadores en los macrófagos tisulares que en el origen del desarrollo.

Los factores de transcripción específicos subyacen a la heterogeneidad de los macrófagos residentes de tejido. La diferenciación de los macrófagos está regulada por el factor de transcripción maestro, que desempeña un papel central en el desarrollo del linaje mieloide (24).

Los macrófagos intervienen en la endocitosis y fagocitosis. Debido a su movilidad y actividad fagocíticas, los macrófagos son capaces de actuar como células depuradoras, eliminando del tejido eritrocitos extravasados, células muertas y cuerpos extraños. El material englobado es destruido por la acción de enzimas lisosómicas (4). Los macrófagos promueven la inflamación a través de la generación de oxidantes y la liberación de citocinas inflamatorias (25), TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-10, citocinas y mediadores lipídicos de vida corta, como el factor activador de plaquetas (FAP), prostaglandinas y leucotrienos para orquestar una inflamación local (12).

#### **1.2.4.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Las células dendríticas (CD) son esenciales en la activación de los linfocitos T y en el desarrollo de la respuesta inmunológica adaptativa frente a los patógenos invasores. Tras el reconocimiento del antígeno (Ag) de los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) por sus receptores (PRR), las CD se activan y adquieren un perfil inflamatorio. Las CD tienen la capacidad de dirigir el perfil de

los linfocitos T (Th) cooperadores hacia Th1, Th2, Th17, Th9 y reguladoras (Treg). Cada subconjunto de linfocitos Th presenta una forma única de expresión génica y está dotado de la capacidad de conducir o suprimir células efectoras en la inflamación. Los patógenos se dirigen a los CD durante la infección. Muchos estudios demostraron que los antígenos y las moléculas derivadas de los patógenos tienen la capacidad de amortiguar la maduración y activación de CD. (26). La respuesta específica se presenta después de la fase inflamatoria y ayuda a potenciar la inmunidad no específica. Para que esto se desarrolle, los antígenos deben ser procesados, presentados y reconocidos por los linfocitos (27, 28).

### **1.2.5 LINFOCITOS**

Los linfocitos, las células más características de la inmunidad adaptativa, son las únicas células del cuerpo que expresan receptores para el antígeno distribuidos de forma clonal, cada uno con una especificidad exquisita frente a un determinante antigénico diferente. Representan del 20 al 25% de la población de leucocitos; miden 7 micras de diámetro, tienen un núcleo redondo que ocupa casi la totalidad de la célula (29). Cada clon de linfocitos constituye la progenie de una célula y expresa receptores para el antígeno con una sola especificidad. Por esto se dice que la población total de receptores para el antígeno en el sistema inmunitario adaptativo tiene una distribución clonal. Los linfocitos constan de subgrupos distintos que difieren en sus funciones y productos proteínicos (18). Varios

estudios sugieren que las respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares juegan un papel en la patogénesis de las lesiones (30).

### **1.2.5.1 LINFOCITOS B**

Los linfocitos B, las células que producen los anticuerpos, se llamaron así porque se ha visto que en las aves maduran en un órgano llamado bolsa de Fabricio. En los mamíferos no existe ningún equivalente anatómico de la bolsa y los primeros estadios de maduración del linfocito B se producen en la médula ósea. De este modo, linfocitos B se refiere a linfocitos derivados de la bolsa o de la médula ósea (18).

Los linfocitos B son activados de manera directa por productos microbianos, (ácido teicoico, peptidoglicano y lipopolisacárido (LPS). El LPS contienen varios componentes que provocan la proliferación y diferenciación de los linfocitos B no específica (31).

Los linfocitos B, a diferencia de los linfocitos T, se encuentran inusualmente en la pulpa dental normal, en los estudios realizados no se observaron células que produzcan inmunoglobulinas en especímenes de pulpa dental sana. Esta observación nos sugiere que los linfocitos B pueden no presentarse en la fase inicial de la respuesta inmunitaria pulpar. El análisis sugiere que los linfocitos B no son residentes permanentes del tejido conectivo de la pulpa dental sana (32, 33).

Algunos linfocitos B aparecen en la pulpitis temprana, pero su número aumenta significativamente junto con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cuando la caries se acerca a la

pulpa. Además de su función principal de producir anticuerpos, los linfocitos B también pueden funcionar como CPA, modular las funciones de CD y producir citocinas como IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$  en respuesta a patógenos (12).

Las pulpas inflamadas contienen niveles más altos de IgG e IgA que las pulpas no inflamadas, utilizando tejidos combinados (34).

### **1.2.5.2 LINFOCITOS T**

Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> (células inmaduras) desempeñan un papel central en la inmunidad adaptativa se nombraron así porque sus precursores, que surgen de la médula ósea, migran al timo y maduran allí (18, 35).

La estabilidad y la plasticidad de varios subgrupos de linfocitos T son paralelas a sus diversas funciones fisiológicas y sugieren mecanismos de selección en el contexto de la maduración de linfocitos T (36). Los linfocitos CD3<sup>+</sup> se diferencian en dos subconjuntos según su marcador molecular: CD4<sup>+</sup> (cooperadores) que promueven la proliferación y diferenciación de las células del sistema inmunológico, mientras que los que portan al marcador CD8<sup>+</sup> (linfocitos citotóxicos/supresores), los cuales destruyen las células portadoras de antígenos, las funciones de los linfocitos pueden ser estimadas por sus perfiles de citocinas (37-40). Algunas citocinas se secretan para regular el tráfico de linfocitos, otras se producen a consecuencia de la infección proinflamatoria, dirigiendo la migración de CD inmaduras y leucocitos al sitio de la lesión (41). Los genes expresados de

la región variable de la cadena alfa y beta pueden estudiarse para comprobar la participación de los linfocitos T en los tejidos patológicos (42, 43).

Los linfocitos son células importantes de la pulpa dental normal, aun en pequeñas cantidades; se encuentran localizadas especialmente en el área central de la pulpa, a lo largo de los vasos sanguíneos (44).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados desempeñan un papel crucial en la orquestación de la respuesta inmunológica, tras la presentación del antígeno por medio de las CD éstas se activan y secretan varias citocinas, un grupo de moléculas biológicamente activas que regulan la intensidad y / o duración de la respuesta inmunológica mediante la estimulación o inhibición de la acción de varios objetivos (28).

Según el perfil de producción de citocinas, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se clasifican además en linfocitos Th1 y Th2 (45). Al igual que los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> efectores se pueden clasificar en T citotóxico-1 (Tc1), Tc2 y CD8 Treg subconjuntos de acuerdo con su patrón de citocinas. Las células Tc1 secretan IFN- $\gamma$  y los linfocitos Tc2 que secretan IL-4 e IL-5. Tanto los linfocitos Tc1 como los Tc2 matan principalmente por la vía de perforina (37, 46-49). Debido a estas características, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son encontrados más frecuentemente en la estructura del tejido pulpar en comparación con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (14, 44, 50).

## **1.3 RESPUESTA INMUNOLÓGICA ANTE LAS AGRESIONES PULPARES**

La caries dental es un proceso biológico y patológico que ocurre esencialmente en una superficie inerte (órgano dental) durante semanas o incluso años. La acumulación de placa dentobacteriana (PDB) es la primera manifestación de esta patología. La producción de ácido por los microorganismos es la causa inmediata y proximal de la desmineralización de los dientes, cuando no es eliminada, el esmalte dental puede degradarse por completo, ocasionando que los microorganismos invadan la dentina (51, 52), además la composición proteica de la película salival, puede afectar la resistencia del esmalte a la unión bacteriana, la erosión y la acidogénesis (53). La superficie del esmalte y el cemento, así como la dentina, forman la primera barrera innata contra los microorganismos que atacan el órgano dental protegiendo así el complejo dentino-pulpar (19). Los odontoblastos pueden actuar como receptores nociceptivos y células de vigilancia que detectan la invasión de patógenos exógenos debido a que sus prolongaciones citoplasmáticas son las primeras que responden a la invasión bacteriana que afectan a los túbulos dentinales, expresando receptores tipo toll (TLR) como son TLR-2, TLR-3, TLR-5 y TLR9 en respuesta a los péptidos microbianos asociados a patógenos (PAMP) (9, 10). Cuando los microorganismos han penetrado los túbulos dentinarios activan también las prolongaciones nerviosas presentes, provocando una inflamación neurogénica (54, 55), estos estímulos desencadenan

la producción de neuropéptidos como el péptido vasoactivo intestinal (VIP), la sustancia P (SP), neuroquinina A (NKA), el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP). El VIP se libera a partir de las fibras parasimpáticas que son estimuladas por LPS, citocinas y óxido nítrico, provocando vasodilatación y efectos inmunomoduladores en las células debido a que se une a receptores. La SP y NKA son liberadas por las fibras A y C estimuladas por irritantes mecánicos, térmicos o químicos, además de que mediadores como las prostaglandinas (PG) y la bradiquinina (BK) también producen su liberación provocando vasodilatación y activación células inmunitarias, el CGRP participa en la reparación al inducir la formación de dentina y modular la acción del sistema inmunológico (56, 57). Otros mediadores quimiotácticos como la IL-1, o IL-8 o péptidos bacterianos atraen a los neutrófilos para eliminar microorganismos mediante fagocitosis además de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando la muerte dentro de las células (19, 58). Cuando el proceso de caries progresa, el número de macrófagos aumenta en la pulpa dental debido al aumento de la permeabilidad vascular y favoreciendo la eliminación de antígenos bacterianos, también son importantes en la homeostasis del tejido, remodelación y reparación después de la inflamación (18, 59). Los macrófagos son capaces de activar a los linfocitos T, desencadenando una respuesta adaptativa que se produce en asociación con las CD, estas células se encuentran inmaduras en la pulpa dental, pero gracias a las citocinas producidas, capturan al antígeno, contribuyendo así a su activación y maduración. Migran posteriormente a los ganglios linfáticos para presentar y activar a los linfocitos T (10, 18, 60). Las células efectoras Th1 producen

interleucina (IL) 2 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y participan principalmente en la activación de macrófagos y linfocitos B, mientras que los linfocitos Th2 producen citocinas tales como IL-4, IL-5 y IL-6 y estimulan la proliferación y la diferenciación de linfocitos B (28, 30, 61-63). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen los péptidos antigénicos presentados en MHC clase I (presente en todas las células nucleadas) y destruyen las células portadoras de antígenos. Como las moléculas MHC de clase I contienen principalmente péptidos derivados del citosol, éste es un mecanismo eficaz para matar células infectadas con virus u otros patógenos intracelulares (37, 46-49).

## **1.4 METODOLOGÍAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS EN PULPA DENTAL**

### **1.4.1 FROTIS CELULAR**

Se define como frote, frotis o extendido, a la preparación microscópica delgada y translúcida, extendida entre dos cristales (porta o cubreobjetos), obtenida de un líquido orgánico espeso o tejido semilíquido o pastoso (sangre, aspirados, secreciones, exudados, etc.) (64).

Para las preparaciones que usan portaobjetos, se coloca una muestra cerca del final de portaobjetos, y un segundo portaobjetos (el esparcidor) se coloca en un ángulo de 45 grados medial a la muestra. El esparcidor se retira a la muestra, lo que permite que se extienda a lo largo del borde del portaobjetos. El esparcidor se

empuja rápidamente hacia adelante para producir el frotis. Las máquinas también pueden preparar películas de muestras, ya sea mediante un procedimiento de extensión similar o girando para deslizarse con una muestra sobre él, utilizando la fuerza centrífuga para extender la muestra a través del vidrio (65).

## **1.4.2 HISTOLOGÍA**

Histología [Gr., *ἵστός*, *histos* = tejidos; *λογία*, *logía* = ciencia], también llamada anatomía microscópica, es el estudio científico de las estructuras microscópicas de los tejidos y órganos del cuerpo. El conocimiento de los tejidos se debe a la existencia por una parte de instrumentos amplificantes (los microscopios) y, por otra, al desarrollo de las técnicas histológicas, histoquímicas o de cultivos celulares y tisulares que hacen posible la observación a través de los mismos (5).

### **1.4.2.1 TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA**

La hematoxilina y la eosina son los colorantes de uso más frecuente en la histología. Un colorante ácido como la eosina, tiene una carga neta negativa en su parte coloreada. Un colorante básico como la hematoxilina tiene una carga neta positiva en su parte coloreada. Los colorantes básicos reaccionan con los componentes aniónicos de las células y los tejidos (componentes que tienen una carga neta negativa). La capacidad de estos grupos aniónicos de reaccionar con una anilina o colorante básico se denomina basofilia. Los colorantes ácidos

reaccionan con los grupos catiónicos de las células y tejidos, en particular con los grupos amino ionizados de las proteínas. La reacción de los grupos catiónicos con un colorante ácido recibe el nombre de acidofilia. La hematoxilina y la eosina se utilizan principalmente para poner en evidencia las características estructurales. Sin embargo, el procedimiento no permite ver de forma adecuada ciertos componentes estructurales de los cortes histológicos tales como elastina, fibras reticulares, membranas basales y lípidos. Cuando se desea estudiar estos componentes, se pueden utilizar otros procedimientos de tinción, en su mayoría selectivos (66, 67).

## **1.5 ANTECEDENTES**

Chin-Lo Hahn, William A. Falkler (14), realizaron un estudio con pulpas en dientes clínicamente diagnosticados como normales, inflamados reversiblemente o irreversiblemente inflamados. Las muestras obtenidas se seccionaron en un criostato a 4  $\mu\text{m}$ . Con el fin de identificar áreas de inflamación (focos de inflamación) a lo largo de cada espécimen pulpar, cada décimo portaobjetos se tiñó con H&E y se observó por microscopía óptica. Se observó mineralización y fibrosis en la porción de pulpa apical en todas las muestras. En comparación con las secciones de pulpas normales y una pulpa reversible, donde no se observó foco de inflamación, los grupos de pulpitis reversible e irreversible tenían al menos un foco de células inflamatorias por muestra pulpar. Se observaron muy pocos neutrófilos y solo ocasionalmente células plasmáticas.

En un estudio realizado por G. Gregoire and Terrie (50), con treinta pulpas dentales, 18 sanas y 12 inflamadas como resultado de la caries dental, en sujetos sanos de ambos sexos con edades entre 12 y 50 años sin antecedentes patológicos. Las muestras de pulpa se originaron a partir de terceros molares extraídos. Se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron mediante microscopía óptica estándar. Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente. Dos puntos importantes se destacan de este estudio: 1) en las muestras sanas hay una localización preferencial de linfocitos en la periferia de la pulpa y 2) hay un predominio de la subpoblación supresora citotóxica tanto en pulpas sanas como inflamadas.

Bruno, Silva (15), evaluó la intensidad del infiltrado inflamatorio y la deposición de colágeno mediante microscopio de luz usando tinción con hematoxilina y eosina en cortes de 5  $\mu$ m. Se encontraron dos patrones microscópicos de pulpitis: el grupo 1 (G1) (n = 15) tenía un infiltrado inflamatorio intenso y deposición de colágeno leve; por el contrario, el grupo 2 (G2) (n = 23) tenía un escaso infiltrado inflamatorio y una intensa deposición de colágeno.

La importancia de los linfocitos en la respuesta inmunológica adquirida requiere el establecimiento de un modelo para la cuantificación de estas células en pulpa dental humana, ya que los estudios que se han realizado proporcionan información insuficiente del sobre su función e importancia en la defensa contra patógenos.

## 2 JUSTIFICACIÓN

La pulpa dental, al igual que otros tejidos del organismo esta propensa a recibir daños provocados por irritantes físicos, químicos y mecánicos, así como lesiones infecciosas ocasionadas por microorganismos. Ante estas agresiones el tejido pulpar está equipado con un sistema de defensa conformado principalmente por células y moléculas que tienen la función de contener la agresión y eliminar el antígeno, con la finalidad de evitar la muerte pulpar y de ser posible reparar o regenerar el tejido.

Diversos investigadores se han dado a la tarea de comprender y explicar la patología pulpar desde su estado normal hasta su etapa patológica, se han utilizado diferentes metodologías para el análisis de los distintos tipos de células inmunocompetentes con las que cuenta el tejido pulpar, sin embargo, no existen suficientes estudios que cuantifiquen la cantidad de linfocitos en pulpa sana contra pulpitis reversible. Este estudio propone la utilización cortes histológicos para cuantificar la presencia de linfocitos en pulpa sana y pulpitis reversible con la finalidad de conocer la cantidad de células infiltradas en esta etapa de la patología pulpar y su importancia en el desarrollo de ésta.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar los linfocitos presentes en pulpa dental sana y con pulpitis reversible.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Cuantificar los linfocitos en pulpa dental sana.
- 2.- Cuantificar los linfocitos en pulpitis reversible.
- 3.- Comparar la población linfocitaria en pulpa sana y con pulpitis reversible.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 LUGAR DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Las muestras se obtendrán bajo consentimiento informado en la Clínica de Enseñanza de la Facultad de Odontología UAS, Culiacán Sinaloa.

### **4.2 TIPO DE ESTUDIO**

*Ex vivo*, transversal, observacional, prospectivo y comparativo

### **4.3 MUESTRA**

#### **4.3.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Las muestras para histología, 3 órganos dentales de pulpa sana, 3 órganos dentales con pulpitis reversible. Se obtuvo además una muestra de pulpitis reversible para realizar frotis pulpar.

#### **4.3.2 TIPO DE MUESTREO**

Consecutivo no probabilístico

#### **4.3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Generales

1. Pacientes mayores de 18 años

2. Sin enfermedades sistémicas
3. Que firmen el consentimiento informado

#### Pulpa dental humana sana

1. Órganos dentales maxilares o mandibulares, incluidos o erupcionados con ápices maduros
2. Diagnóstico pulpar sano comprobado clínica y radiográficamente.

#### Pulpitis reversible

1. Órganos dentales maxilares o mandibulares con ápices maduros
2. Diagnóstico de pulpitis reversible en base a resultados clínicos y radiográficos.

### **4.3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

1. Individuos con tratamiento con antibiótico 2 semanas antes de la toma de la muestra.
2. Mujeres en periodo menstrual o embarazadas.

### **4.3.5 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

1. Imposibilidad de medición de la muestra.
2. Órganos dentales que sufrieron fractura durante la extracción.
3. Cuando existan errores en el procesamiento.
4. Participante manifieste su deseo abandonar del estudio.

## **4.4 METODOLOGÍA**

### **4.4.1 OBTENCIÓN DEL TEJIDO PULPAR**

Después de obtenido el consentimiento informado por parte del paciente (Anexo 1), 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 órganos dentales fueron extraídos en el campo operatorio, inmediatamente después de su extracción se colocaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (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 encía 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 1,500 rpm con ayuda de un disco de diamante adaptado a un Dremel para descubrir la cámara pulpar. El tejido pulpar se adquirió de la cámara utilizando cucharilla de dentina y pinzas de curación. Para obtener el tejido pulpar en los conductos radiculares se utilizaron limas tipo K, Hedstrom y tiranervios estériles, intentando extraer la mayor cantidad de tejido posible (Figura 2).

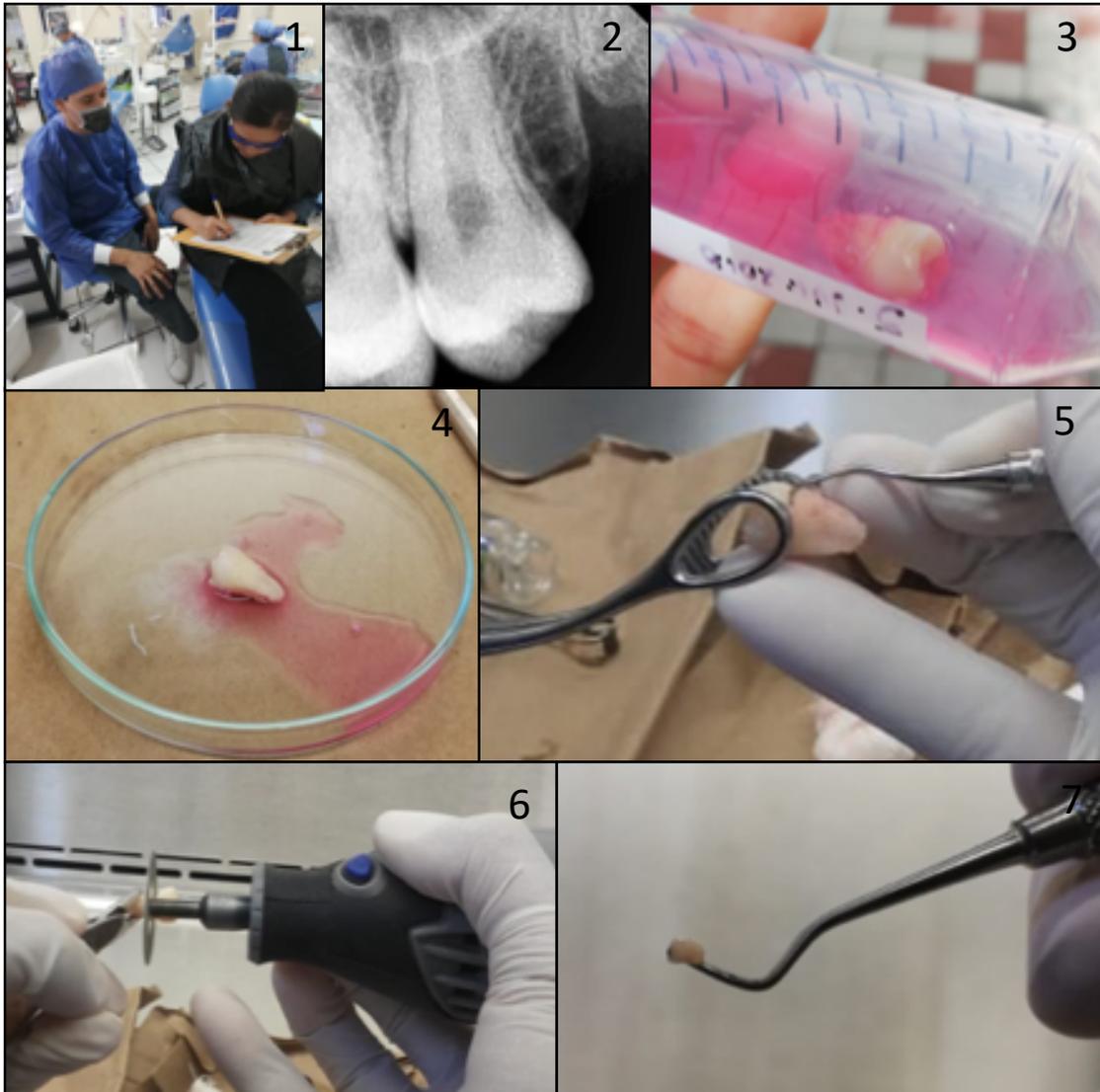


Figura 2. Procedimiento para la obtención del tejido pulpar. a) Obtención del consentimiento informado, 2) Diagnóstico clínico y radiográfico del órgano dental, 3) Extracción del órgano dental, 4) Colocación en campana de flujo laminar, 5) Eliminación del tejido periodontal, 6) Corte en la unión amelo-cementaria, 7) Obtención de la pulpa dental.

## 4.4.2 PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DE LA MUESTRA

### 4.4.2.1 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  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figura 3).

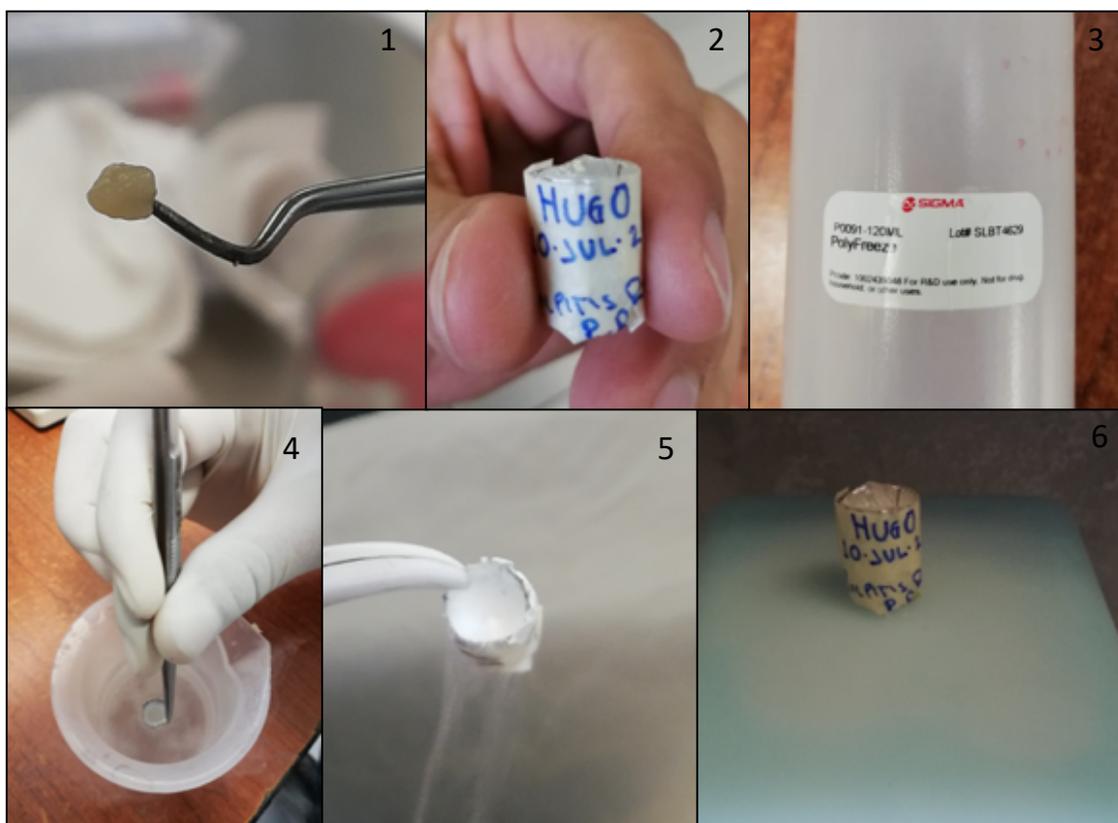


Figura 3. Preparación del tejido pulpar para análisis histológico. 1) Obtención de tejido pulpar, 2) Colocación del tejido pulpar, 3) Poly freeze, 4) Inmersión en nitrógeno líquido, 5) Tejido congelado, 6) Conservación a menos  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.2.2 CORTES HISTOLÓGICOS Y TINCIÓN**

Las muestras fueron cortadas en un crióstato (Leica CM 1860 UV) realizando cortes de 5  $\mu\text{m}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez fijados se dejaron secar a temperatura ambiente y las laminillas fueron guardadas a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Se realizó tinción con Hematoxilina y Eosina (Anexo 2) 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 (Figura 4).

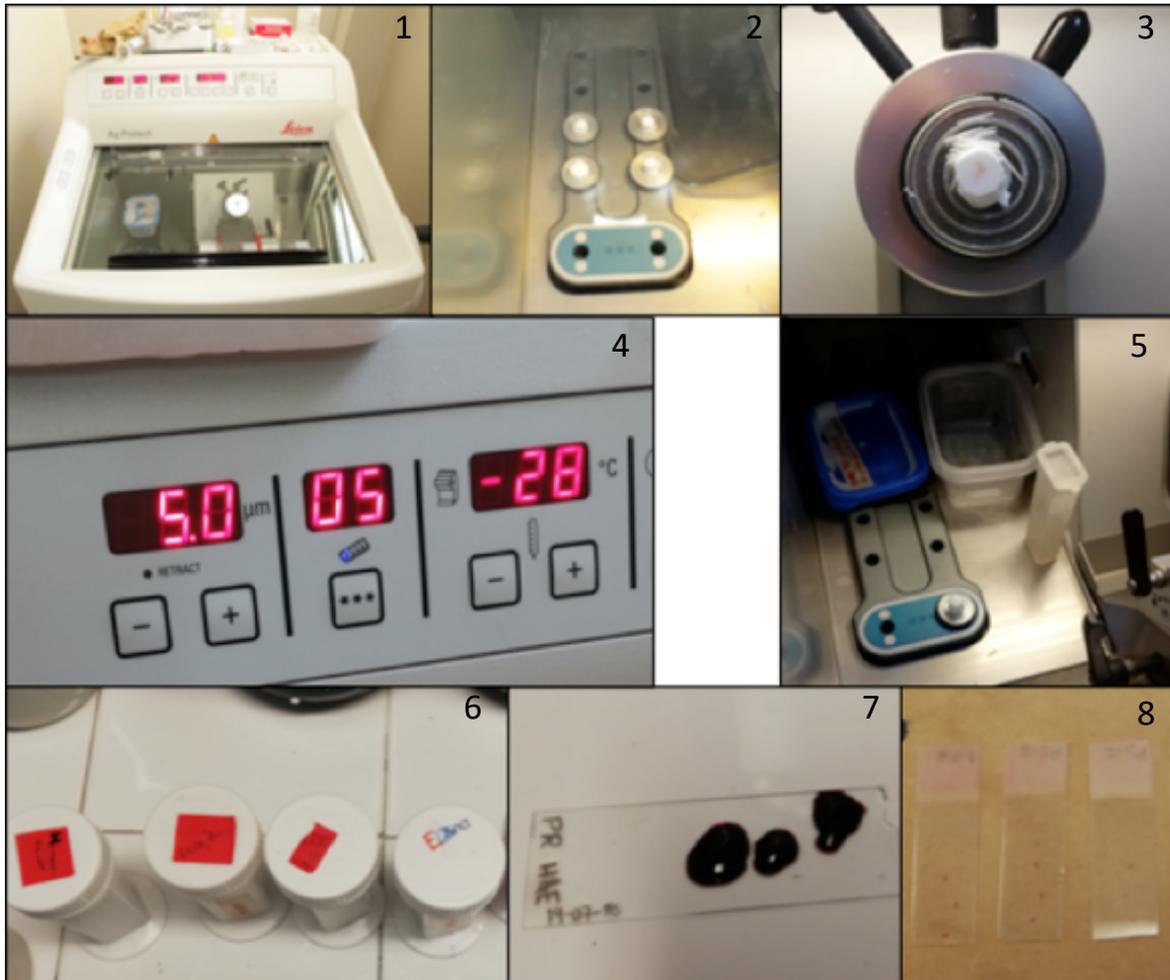


Figura 4. Cortes histológicos y tinción. 1) Crióstato, 2) Muestras en poly-freeze, 3) Colocación del tejido para su corte, 4) Temperatura y grosor del corte, 5) Inmersión en acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 6) Tinción con h&E, 7) Muestra teñida con hematoxilina, 8) Laminillas teñidas.

#### 4.4.3 DISGREGACIÓN MECÁNICO-ENZIMÁTICA DEL TEJIDO

Se obtuvo una muestra de un tercer molar con diagnóstico de pulpitis reversible para la realización del frotis celular. El tejido pulpar se obtuvo con la misma metodología que describimos 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 (1 ml 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 2 mM 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 300 g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante por decantación y se resuspendió en 15 µl de PBS 1x (Figura 5).



Figura 5. Proceso de Disgregación enzimo-mecánica. 1) Obtención de tejido pulpar, 2) Dispasa, colagenasa y solución de ringer, 3) Solución enzimática, 4) Incubadora con agitación, 5) Centrifuga, 6) Resuspensión del pellet celular en DMEM.

#### 4.4.3.1 FROTIS CELULAR

Para la muestra evaluada por esta técnica fue necesario depositar 5  $\mu$ l de la suspensión celular obtenida a partir de la disgregación enzimática del tejido pulpar adicionada con 5  $\mu$ 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, el cual consta de una solución fijadora y dos soluciones colorantes amortiguadas, cuyos componentes dan por resultado una tinción clásica del tipo Romanowsky que permite diferenciar las células, que por su morfología y composición fisicoquímica, requieren 2 colorantes de contraste para poder identificar las diferentes estructuras celulares y así reconocer procesos patológicos.

#### **4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se empleó el software Microsoft Excel 2010 e IBM SPSS v. 20 para realizar estadística descriptiva y comparativa con una prueba de t-student de las variables cuantitativas.

#### **4.6 LUGAR DE REALIZACIÓN**

Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas, UAS.

#### **4.7 FINANCIAMIENTO**

Beca para estudios de posgrados CONACYT.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 HISTOLOGÍA DE PULPA DENTAL SANA**

Se obtuvieron cortes histológicos a partir de 3 terceros molares sanos, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se analizaron bajo microscopio óptico con la ayuda de un patólogo bucal a 40 X.

El tejido pulpar analizado es laxo y con abundantes células propias de la pulpa, así como fibras estructurales y espacios extracelulares. Fue posible identificar la zona odontoblástica, rica en células y central de la pulpa (Figura 6).



Figura 6. Corte histológico de pulpa dental sana. Porción radicular 1) zona odontoblástica; 2) zona rica en células; 3) zona central.

Fue fácilmente identificable la presencia de fibras de colágeno (Figura 7) que se extendían por todos los cortes y sobre cada una de las fibras una cantidad extensa de fibroblastos (Figura 8), lo cual era de esperarse ya que es la célula más abundante del tejido pulpar. Se encontraron espacios vasculares, así como pericitos, comprobándose la amplia vascularidad en el tejido pulpar (Figura 9) y se

visualizaron plexos nerviosos (Figura 10) demostrándose una vez más, la capacidad que tiene el tejido pulpar para reaccionar a efectos tanto nocivos como fisiológicos.

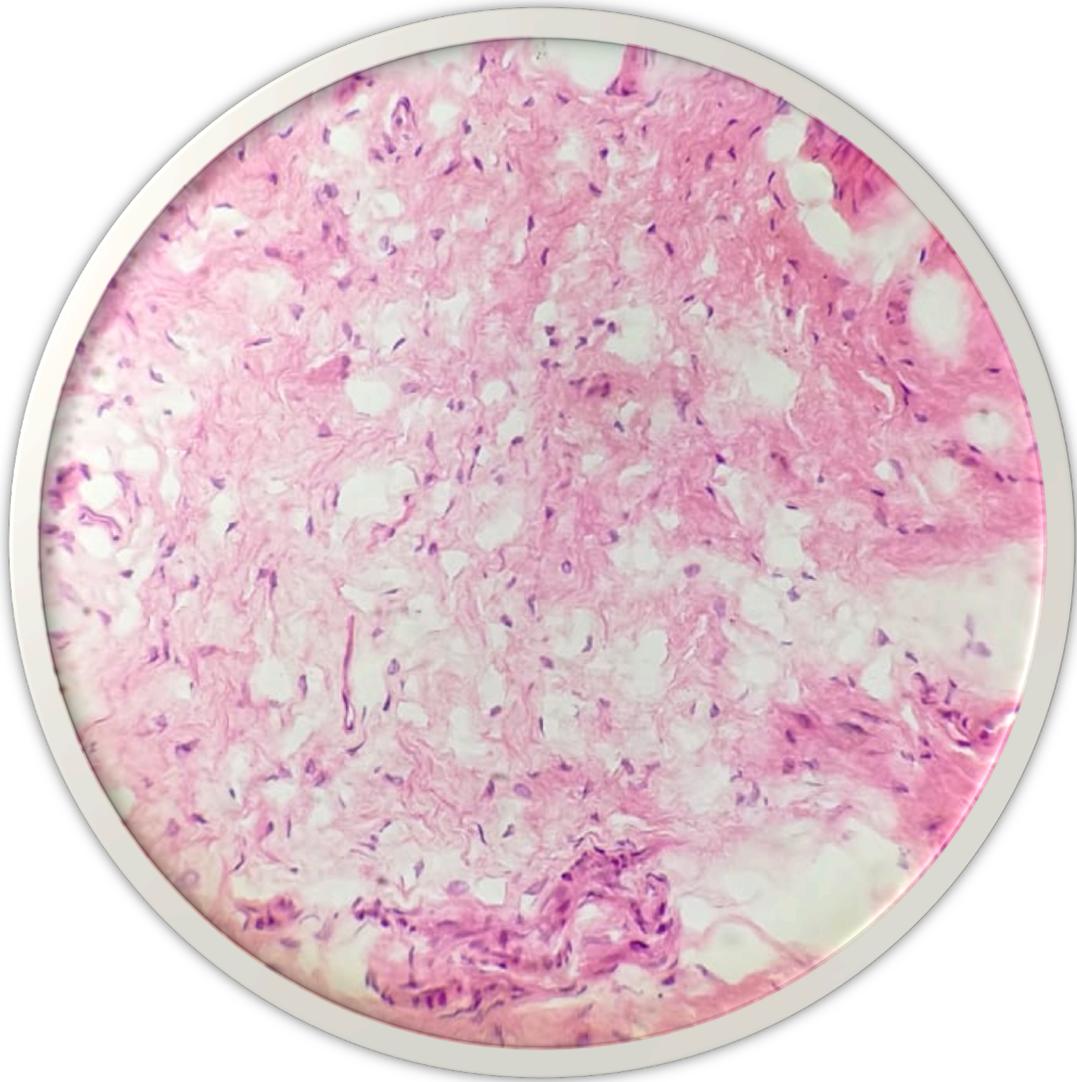


Figura 7. Fibras de colágeno. Se pueden observar fibras de colágeno con algunos fibroblastos y abundante vascularización

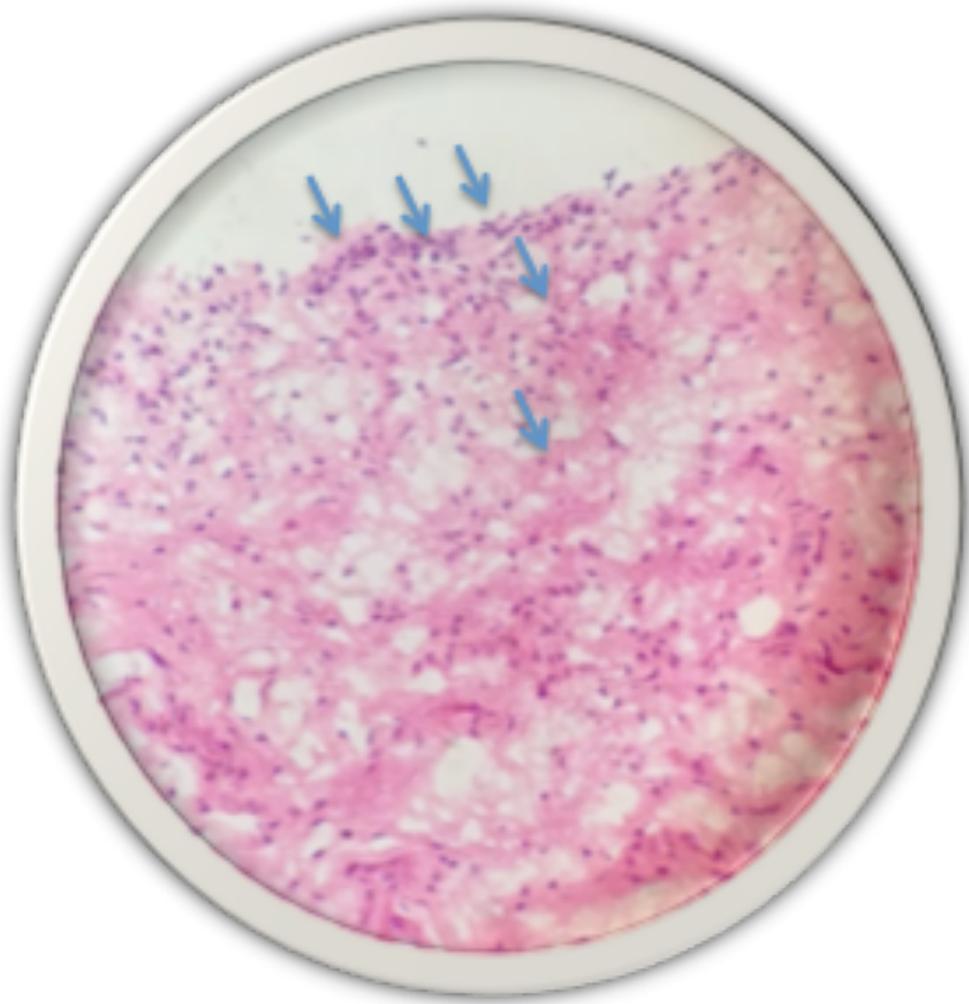


Figura 8. Fibroblastos. Se observan células con morfología ahusada característica de fibroblastos.

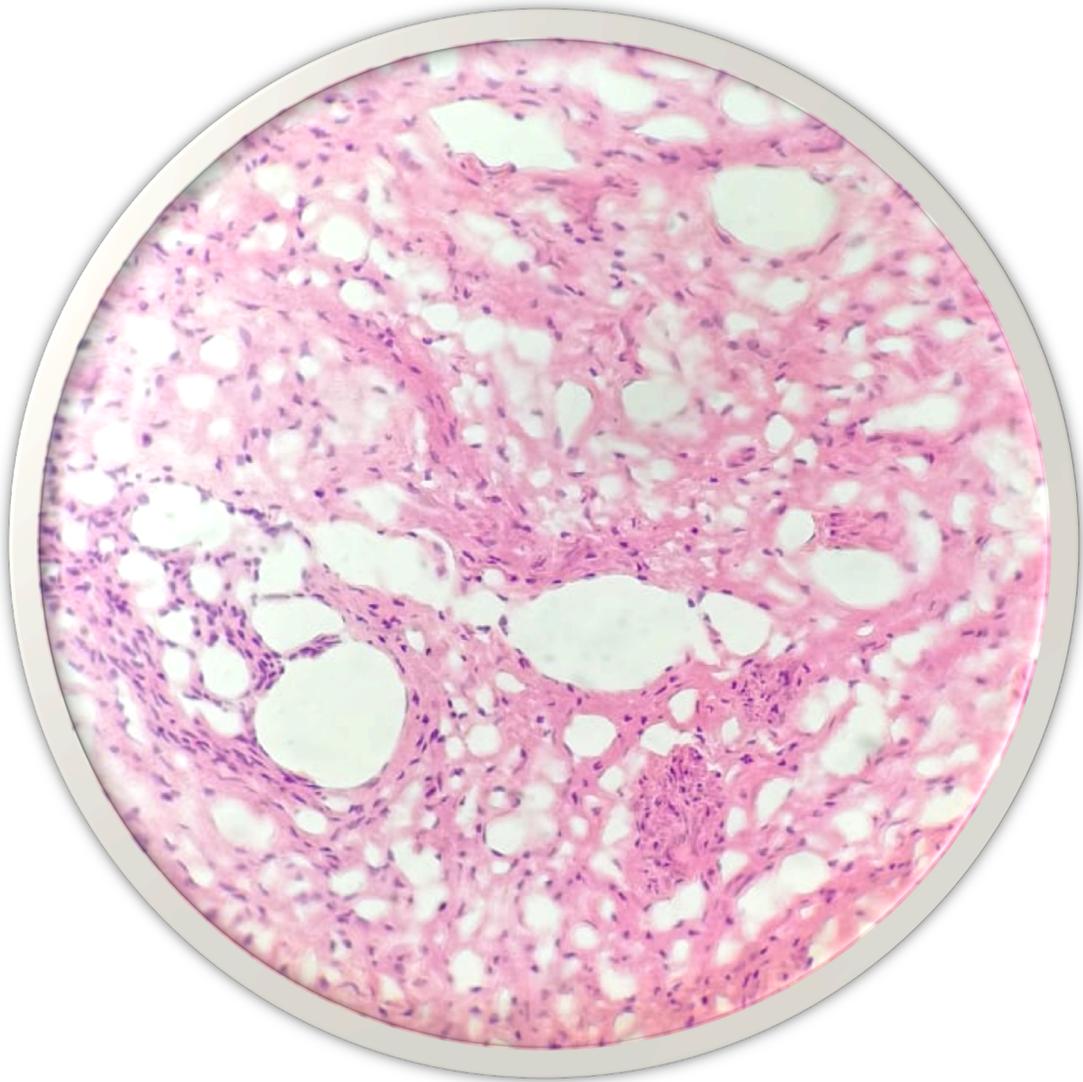


Figura 9. Presencia de vasos sanguíneos en un tejido conjuntivo fibroso denso

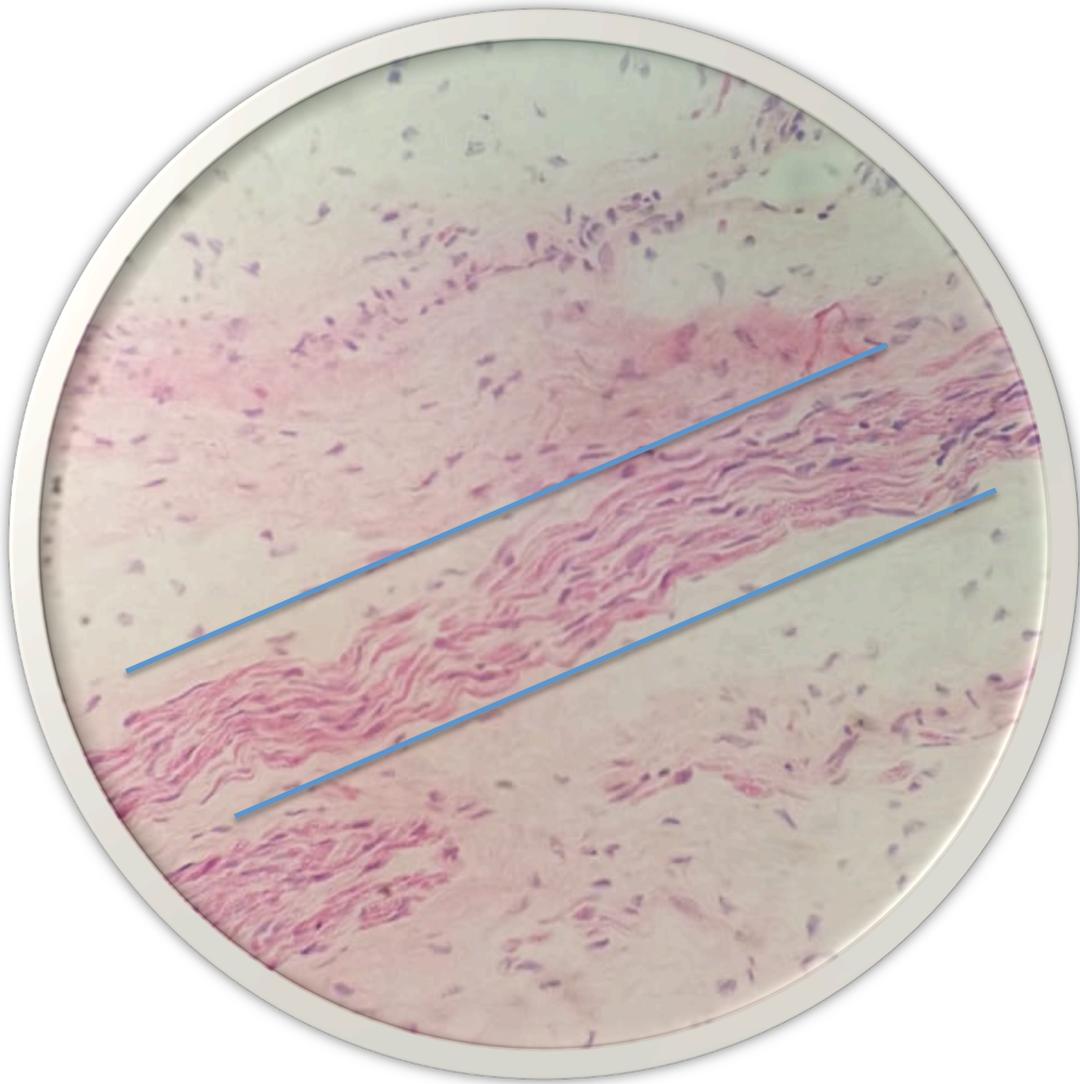


Figura 10. Plexo nervioso de Rashkow donde se observan los núcleos ondulados de las células de Schwann

La presencia de células inmunitarias fue demostrada, ya que en cada una de las muestras se observaron linfocitos (Figura 11), esto en la mayoría de los campos estudiados, lo que nos demuestra que estas células están dispersas por todo el tejido pulpar, además fueron identificables muy pocas células polimorfonucleares.

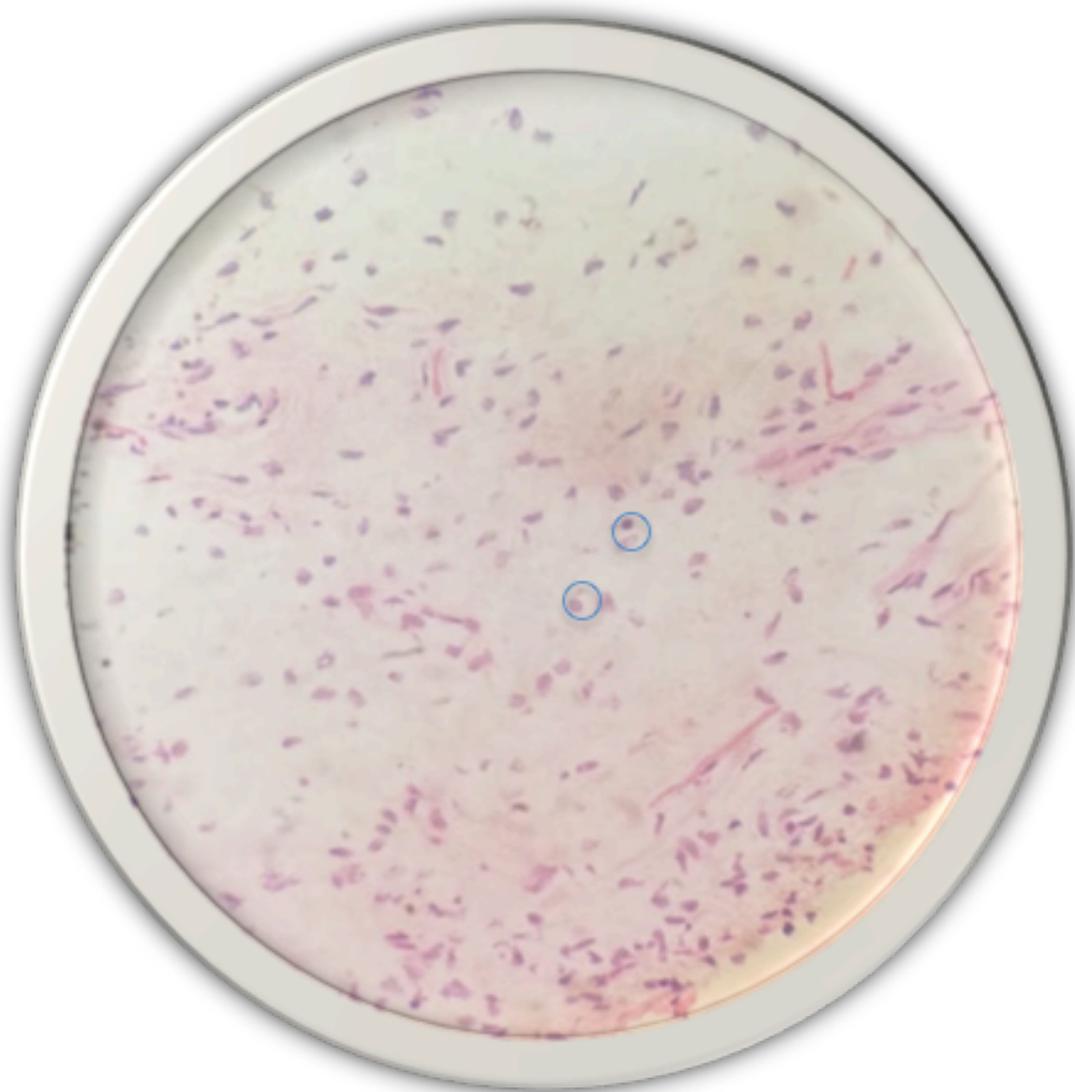


Figura 11. Linfocitos. Se encuentran señaladas por círculos la presencia de 2 linfocitos, se aprecia la morfología redonda y de un tamaño menor al de las demás células, así como un núcleo grande y escaso citoplasma.

Con la ayuda del microscopio óptico se analizaron cada uno de los cortes obtenidos de las muestras de pulpa sana a 40X con la ayuda de un patólogo bucal. Se contabilizaron los linfocitos y neutrófilos encontrados en cada uno de los

campos analizados. Los resultados de cada uno de los cortes analizados, el total y el promedio de linfocitos por campo se resume en la tabla 1.

Tabla 1 Resumen total de datos en dental sana

<b>Parámetro</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>
Campos	8	15	25	22.12	3.48
Neutrófilos	8	0	3	0.5	1.06
Linfocitos	8	13	24	18.12	4.45
Linfocitos por Campo	8	0.52	1.26	0.83	0.22
Neutrófilos por Campo	8	0	0.2	0.03	0.07

## **5.2 HISTOLOGÍA DE PULPITIS REVERSIBLE**

El tejido pulpar analizado se observó laxo y con abundantes células propias de la pulpa, así como fibras estructurales y espacios extracelulares. Fue posible identificar las zonas morfológicas de la pulpa, zona odontoblástica, zona rica en células, zona pobre en células y zona central (Figura 12).



Figura 12. Corte histológico de pulpa dental con diagnóstico de pulpitis reversible. Se observa la cámara pulpar completamente rodeada de predentina y dentina.

Fue identificable una extensa red de fibras de colágeno ( Figura 13) en distribuidas por toda la pulpa dental, así como la presencia de fibroblastos (Figura 14), correspondiente con lo encontrado en la literatura. En todas las muestras se

podieron visualizar plexos nerviosos demostrándose una vez más, la capacidad que tiene el tejido pulpar para reaccionar a efectos tanto nocivos como fisiológicos (figuras 15, 16). Encontramos una ligera reducción en la zona odontoblástica, debido posiblemente a la irritación contante, así como una ligera zona de calcificación pulpar. Fue identificable una zona de inflamación moderada en una de las muestras con células con morfología característica de linfocitos (Figura 17).

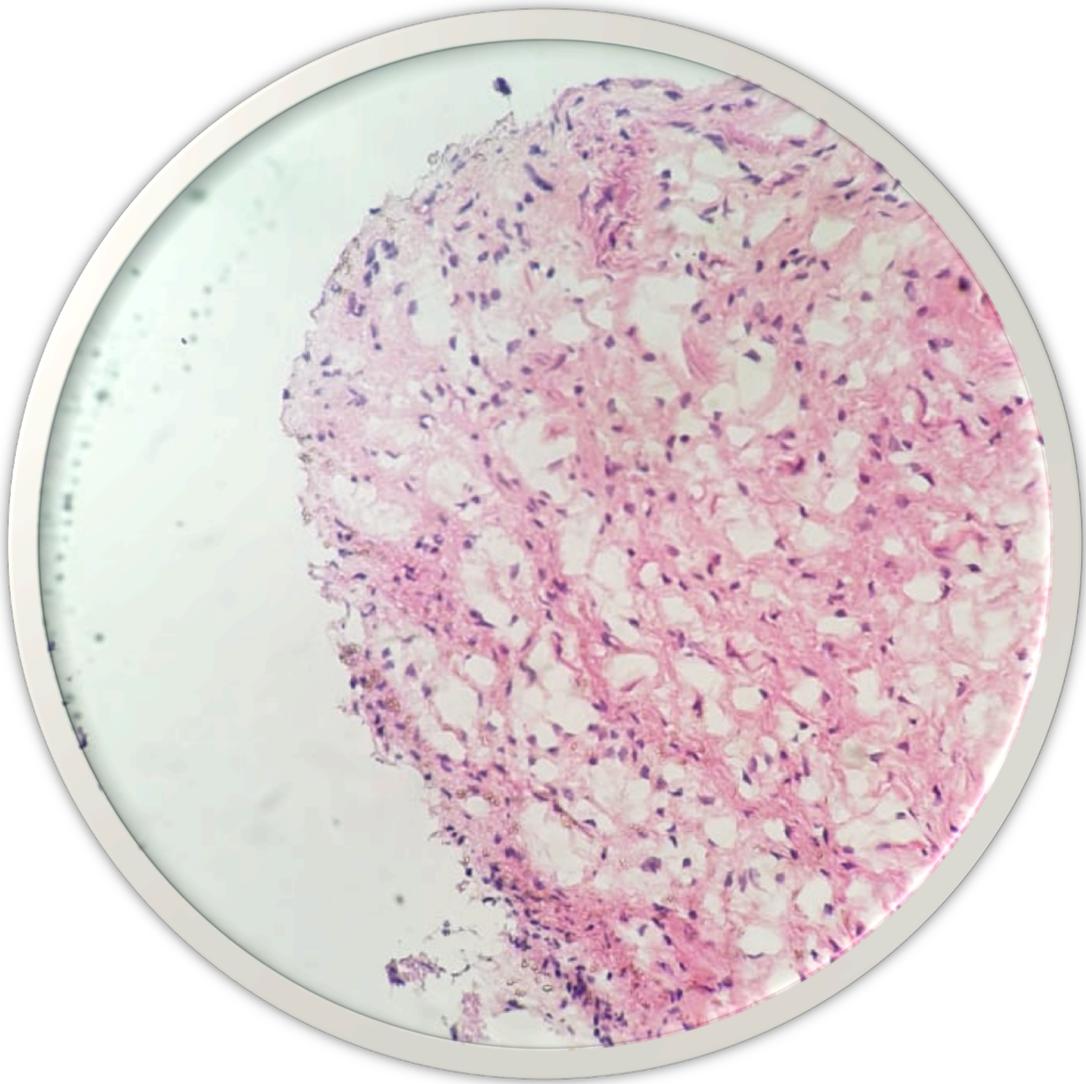


Figura 13. Fibras de colágeno teñidas en rosa, se encuentran en todo el tejido pulpar dando estabilidad y sostén a las células que componen la pulpa dental.

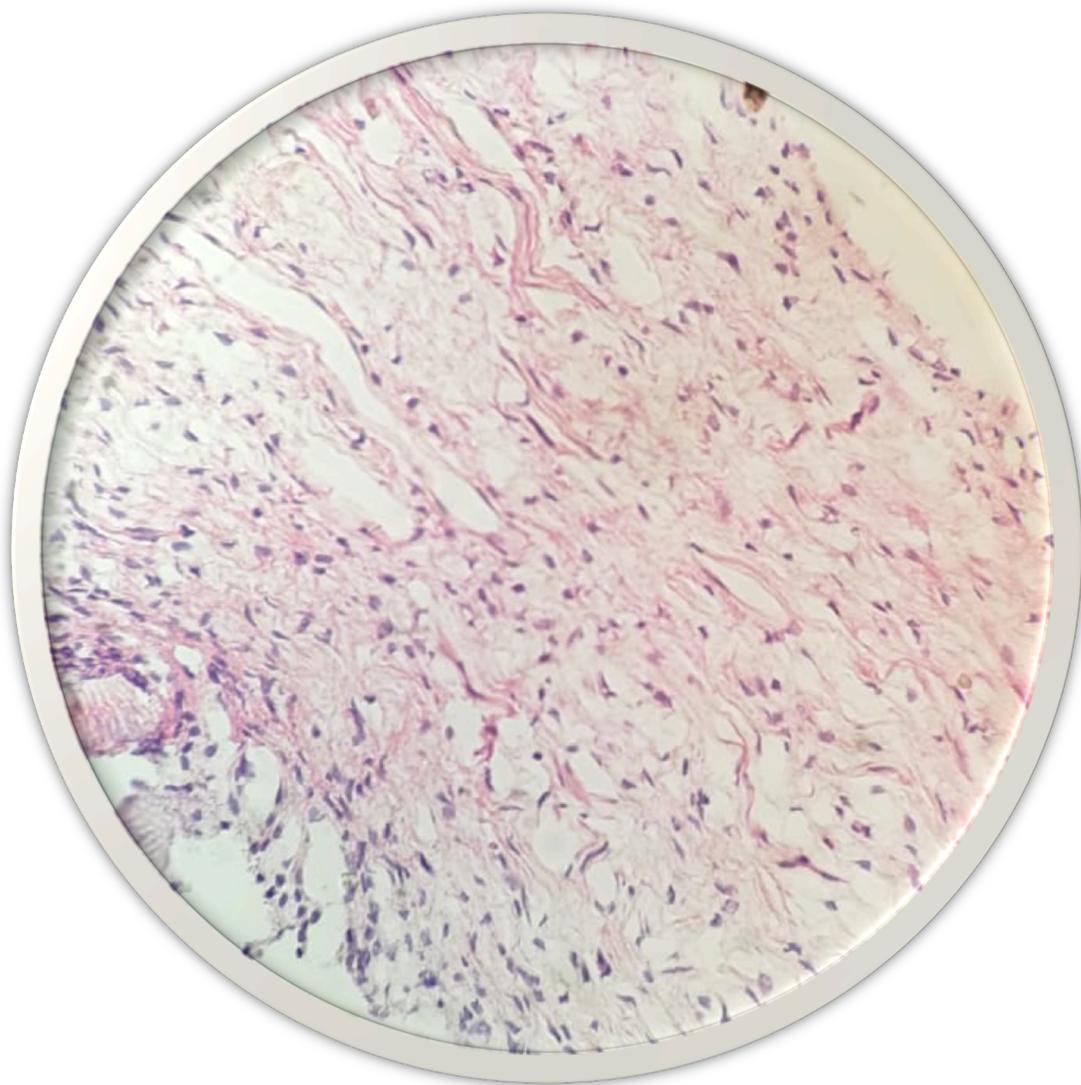


Figura 14. Fibroblastos relacionados a los haces de colágeno, debido a que estas células se encuentran constantemente produciendo y degradando la matriz extracelular, es posible observarlos de manera ordenada.

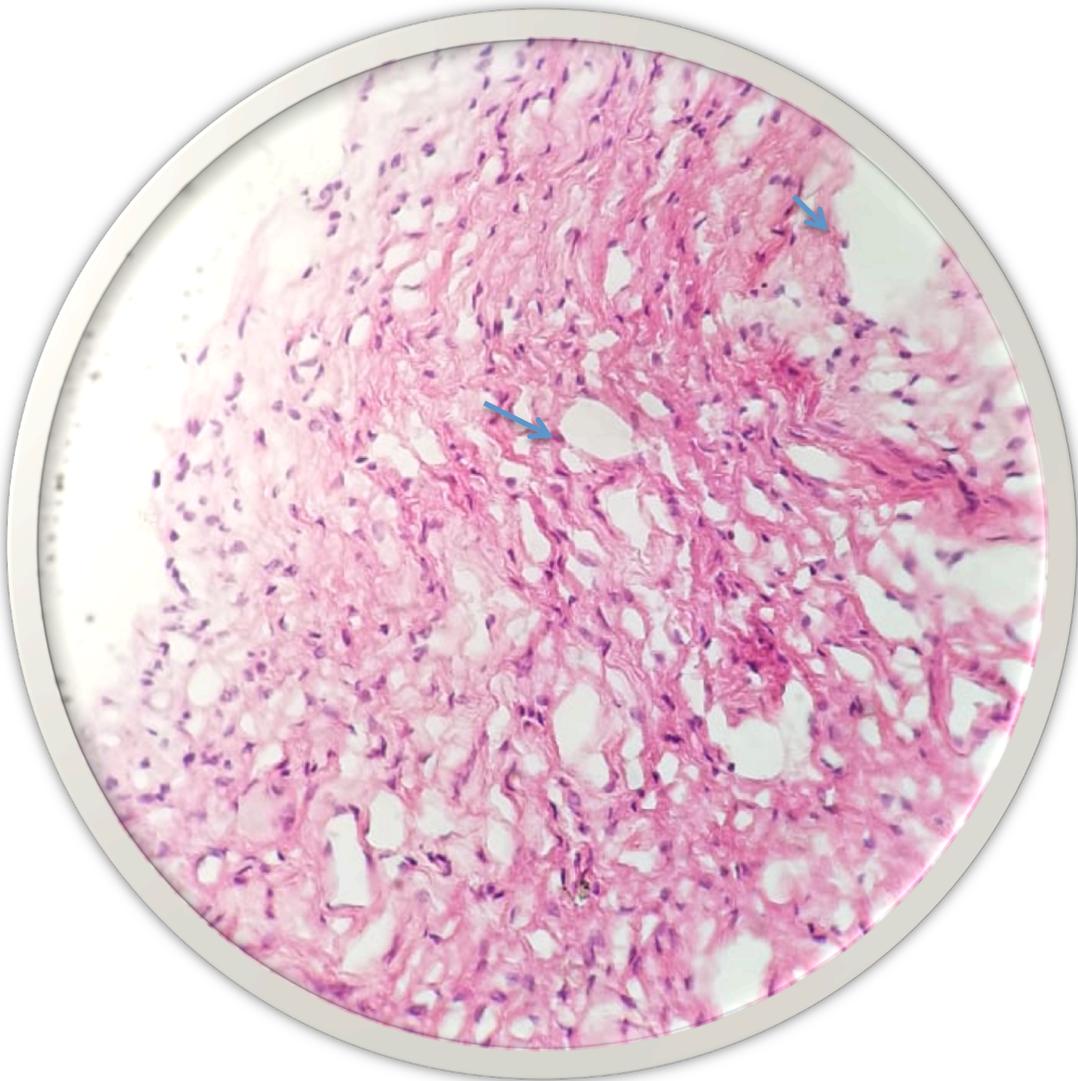


Figura 15. Presencia de espacios vasculares que atraviesan todo el tejido pulpar, lo que permite una constante irrigación, así como permitir una atracción rápida de células inmunológicas.

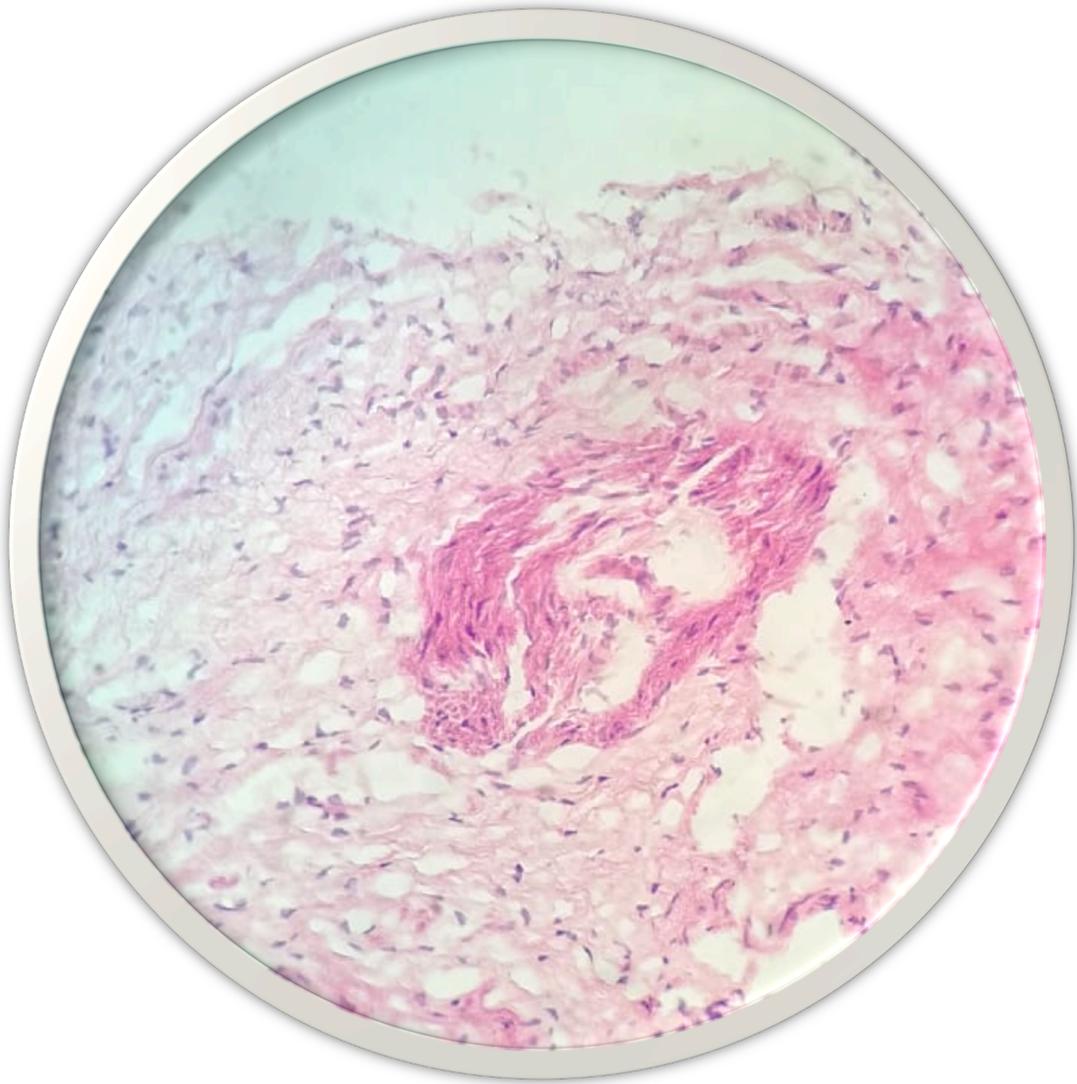


Figura 16. Plexo nervioso de Rashkow donde se observan los núcleos ondulados de las células de Schwann

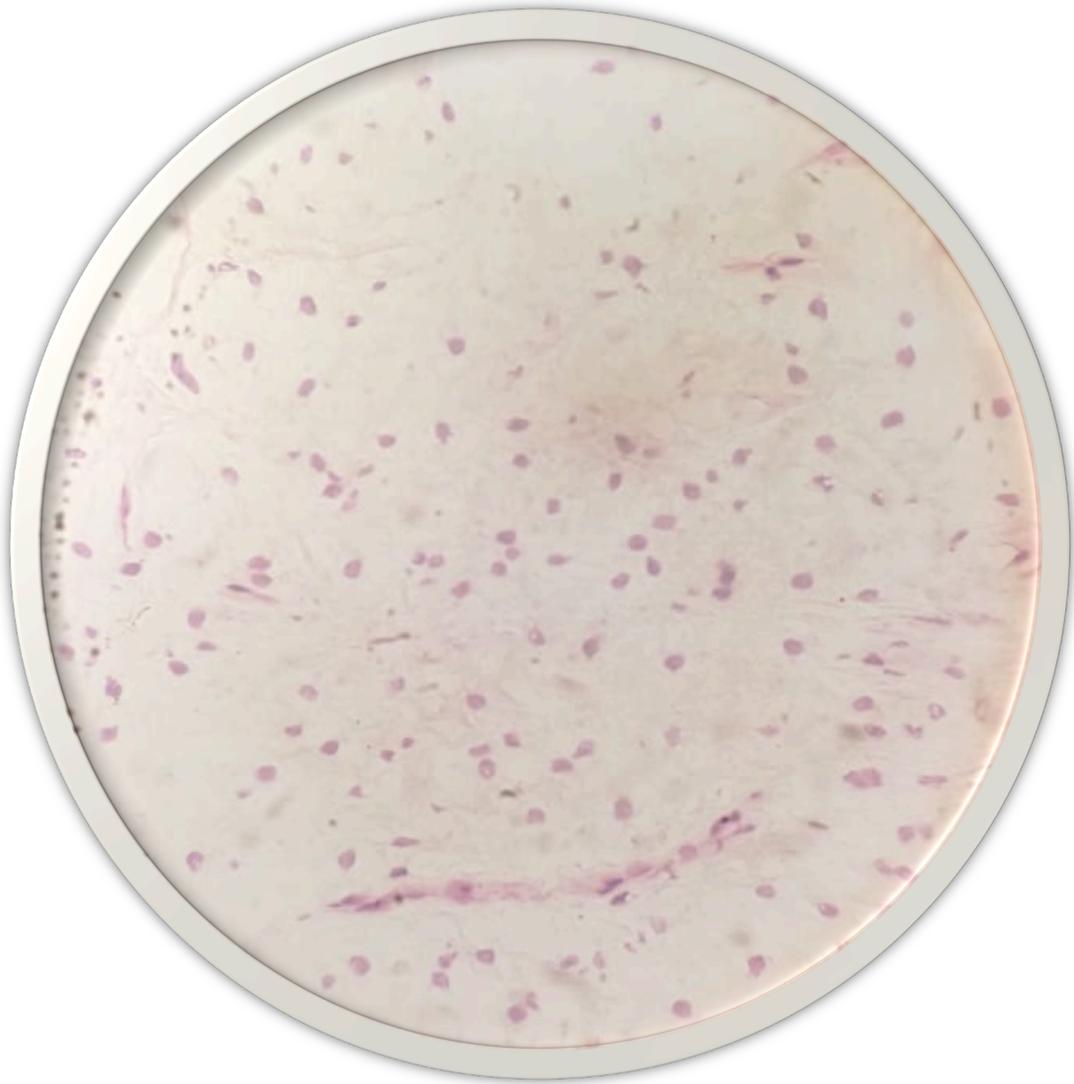


Figura 17. Linfocitos. Observamos un foco inflamatorio con abundantes linfocitos.

Con la ayuda del microscopio óptico se analizaron cada uno de los cortes obtenidos de las muestras de pulpitis reversible, el análisis se hizo bajo 40x con la ayuda de un patólogo bucal, se contabilizaron los linfocitos y neutrófilos encontrados en cada uno de los campos analizados. Los resultados de cada uno

de los cortes analizados, el total y el promedio de linfocitos por campo se resume en la tabla 2.

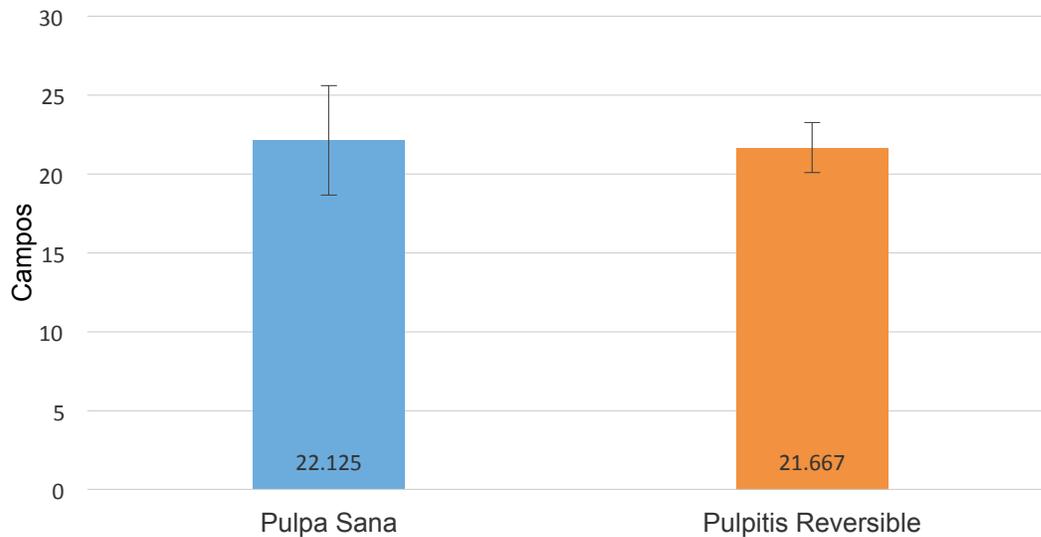
Tabla 2 Resumen total de datos en pulpitis reversible

<b>Parámetro</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>
Campos	9	20	24	21.66	1.58
Neutrófilos	9	0	3	0.77	1.09
Linfocitos	9	15	37	25.11	7.81
Linfocitos por Campo	9	0.71	1.68	1.15	0.33
Neutrófilos por Campo	9	0	0.13	0.03	0.05

Se empleó el software Microsoft Excel 2010 e IBM SPSS V. 20 para realizar estadística descriptiva y comparativa con una prueba de t-student de las variables cuantitativas de la tabla 1 y tabla 2, los datos obtenidos fueron graficados y descritos (Gráficas 1-3).

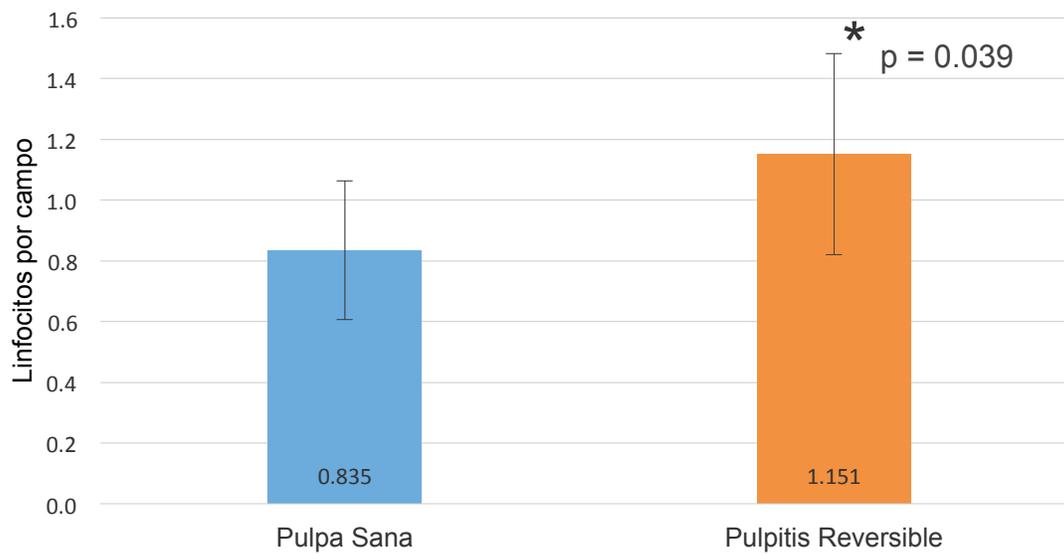
### 5.3 ANÁLISIS COMPARATIVO

El promedio de campos analizados para los dos grupos fue similar,  $22.12 \pm 3.48$  campos para el grupo de pulpa sana y  $21.66 \pm 1.58$  campos para el grupo de pulpitis reversible ( $p = 0.726$ ).



Gráfica 1. Campos analizados

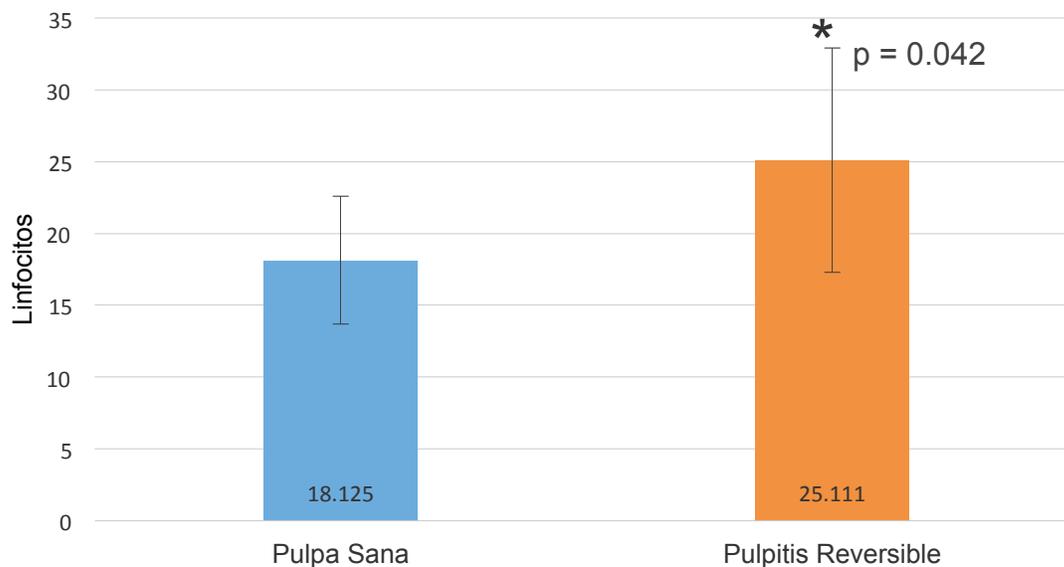
Se obtuvieron un promedio de  $1.151 \pm 0.33$  linfocitos por campo para el grupo de pulpitis reversible y un promedio de  $0.835 \pm 0.22$  linfocitos por campo para el grupo de pulpa sana, lo cual fue estadísticamente significativo ( $p = 0.039$ )



\*  $p = 0.05$ . Prueba t-student

Gráfica 2 Linfocitos por campo.

En el análisis de las muestras obtenidas encontramos una diferencia en el infiltrado linfocitario presente en ambos grupos, para el grupo de pulpitis reversible tuvimos un promedio de  $25.111 \pm 7.81$  linfocitos comparado con  $18.125 \pm 4.45$  del grupo de pulpa sana, lo que fue estadísticamente significativo ( $p = 0.042$ ). Los linfocitos juegan un papel importante no solo en la inmunidad adquirida, sino que también ayudan a potencializar los efectos de la inmunidad innata, con base a los resultados obtenidos consideramos que estas células tienen un papel importante como mecanismo de defensa ante las agresiones bacterianas y sus subproductos en los primeros estadios inflamatorios del tejido pulpar.



\*  $p = 0.05$ . Prueba t-student

Gráfica 3 Promedio de Linfocitos totales.

## **5.4 FROTIS PULPAR**

Con la ayuda del microscopio óptico se analizaron cada uno de los frotis pulpaes cortes obtenidos de las muestras, el análisis se realizó bajo 10 y 40 X con la ayuda de un patólogo bucal, fue posible identificar linfocitos en todas las muestras analizadas (figuras 18-20) lo que nos indica que el proceso de disgregación enzimática permite conservar viables a las células pulpaes.

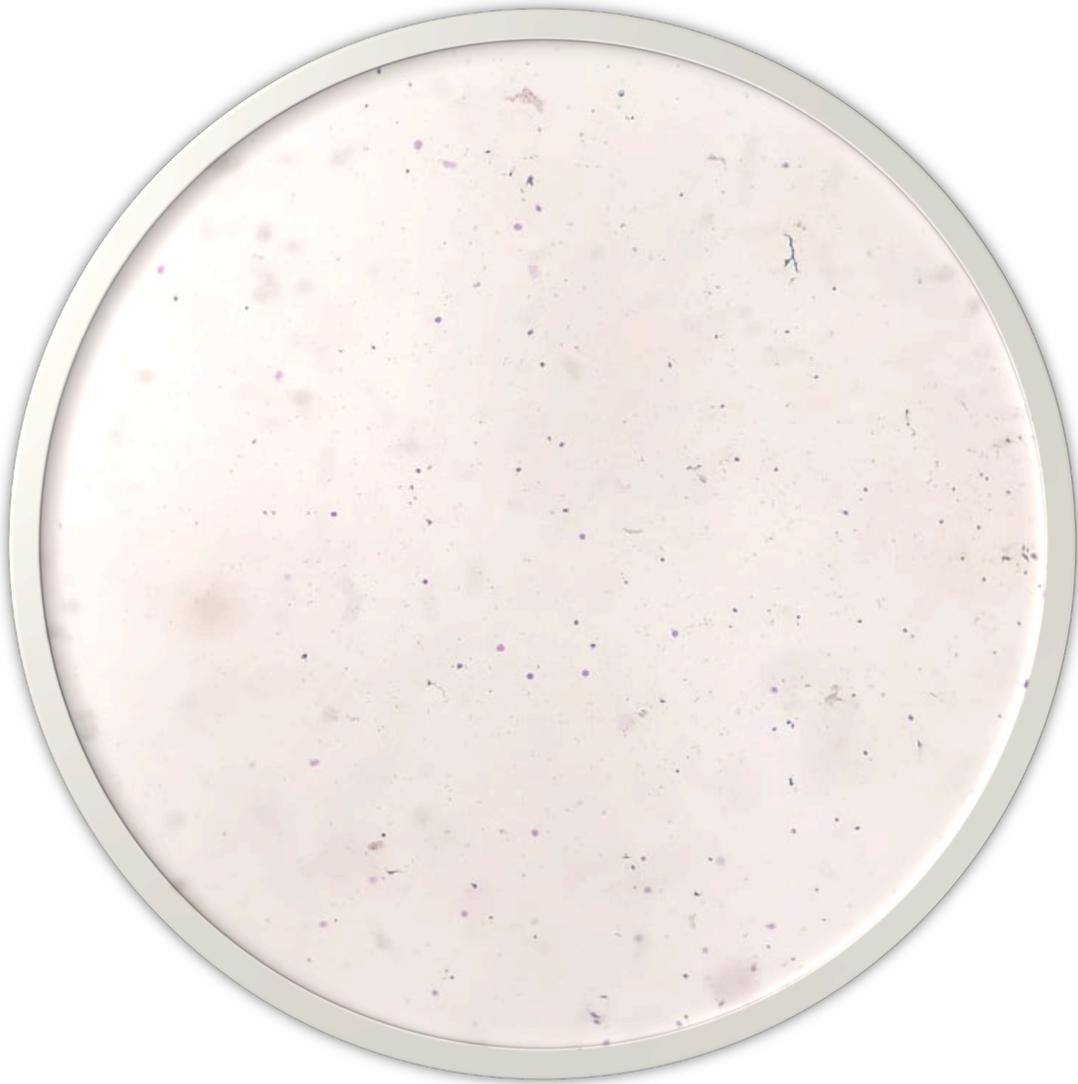


Figura 18. Linfocitos a 4X. Extendido celular donde se puede observar la presencia de abundantes núcleos correspondientes a distintos tipos celulares.

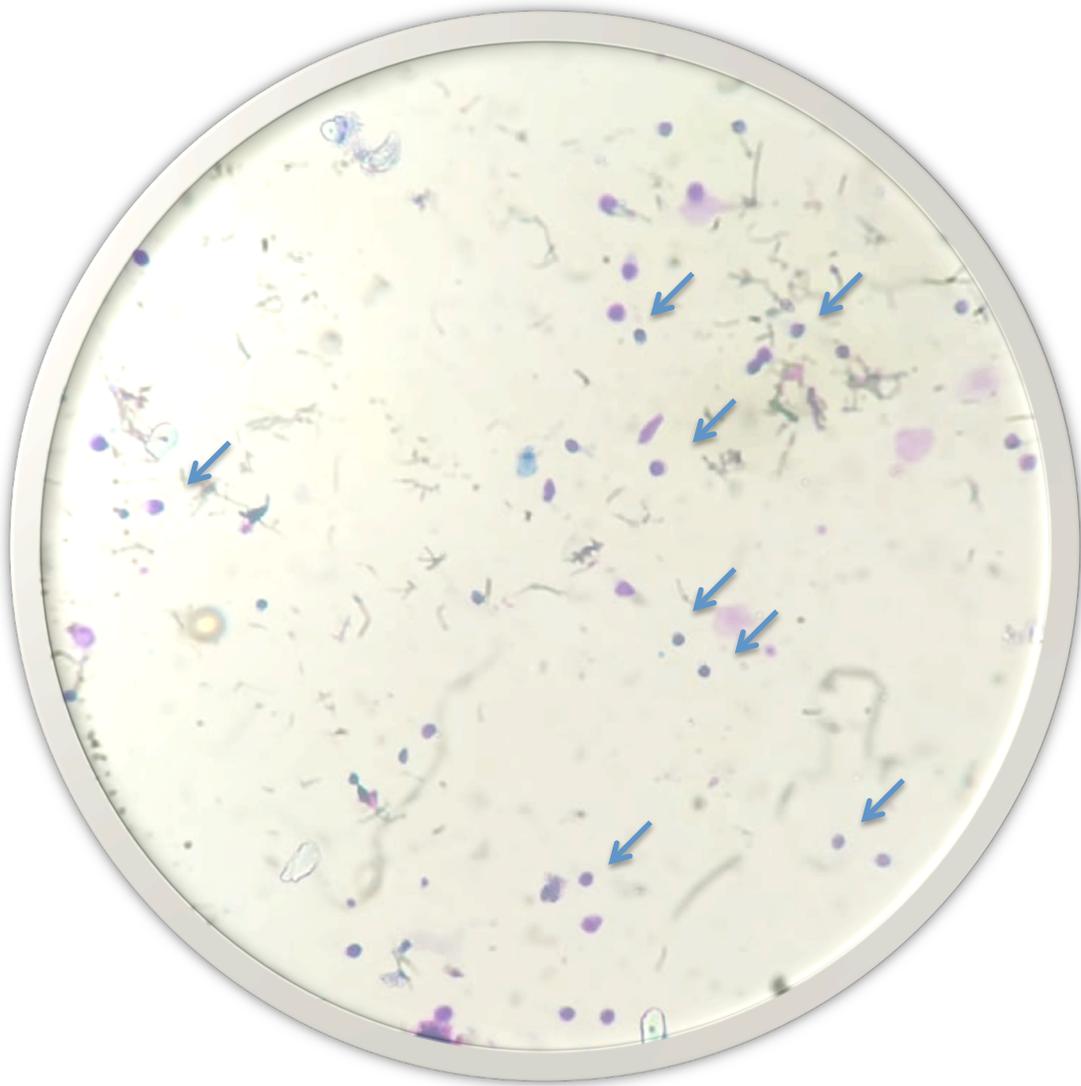


Figura 19. Linfocitos a 10x. Las flechas señalan células con morfología compatible a la descrita en la literatura que pertenece a linfocitos.

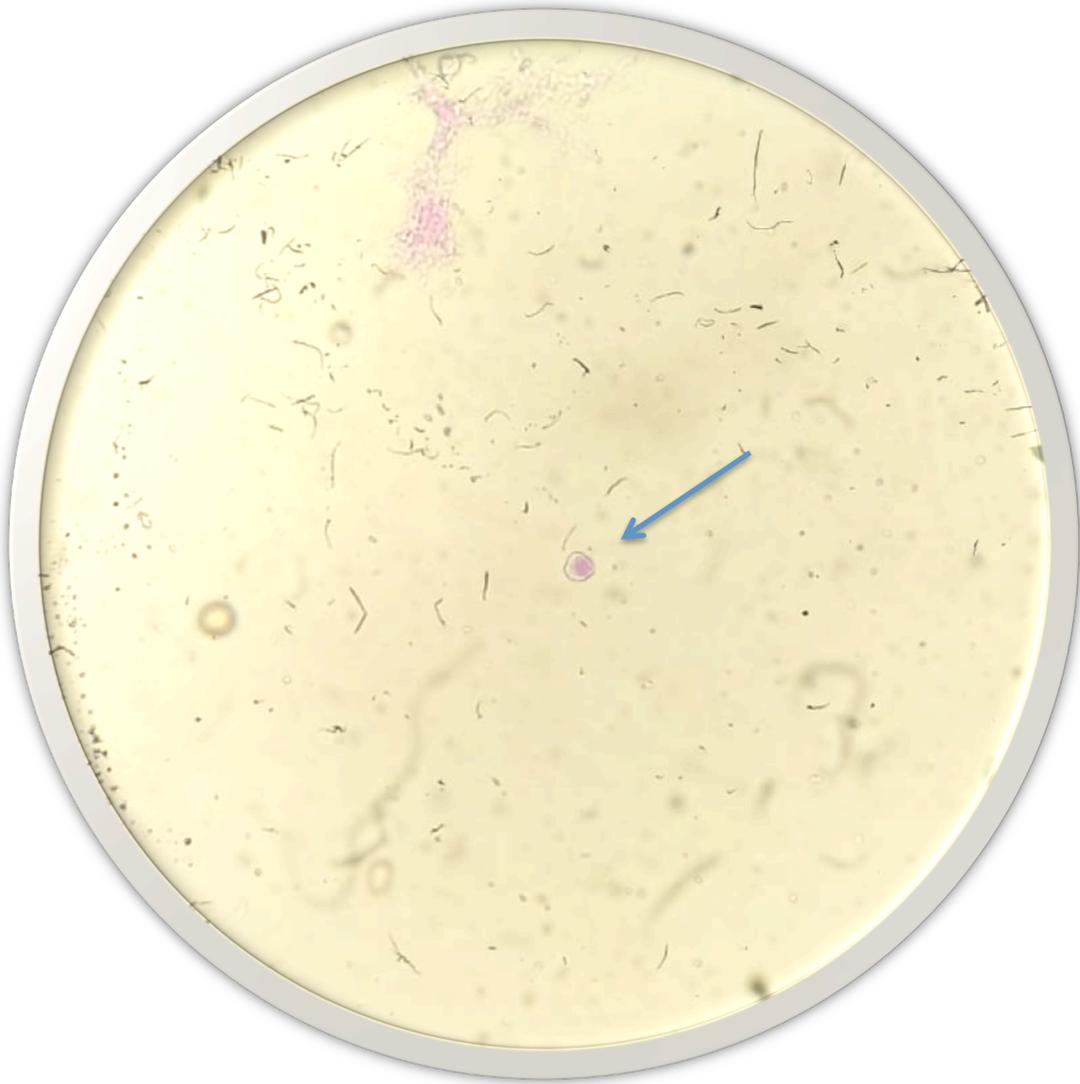


Figura 20. Linfocito a 40x. Se pueden observar la presencia de una célula con un gran núcleo esférico teñido de violeta-azul con escaso citoplasma periférico.

## 6 DISCUSIÓN

El análisis de la pulpa dental mediante técnicas histológicas ha sido ampliamente utilizada debido a su facilidad en la obtención del tejido, así como su procesamiento, debido a esto se han logrado avances en la comprensión de este tejido tanto en salud, como durante los procesos patológicos. La descripción anatómica y la identificación de los tipos celulares que la conforman han sido cruciales (5, 27, 66).

Ricucci D y Siqueira JF en (2014 y 2017) Kenneth M. Hargreaves y Berman LH (2016 y 2012), realizaron estudios en pulpas sanas mediante la técnica de H&E e identificaron cada una de las zonas de la pulpa, no hubo reducción en la longitud de la capa odontoblástica así como presencia de predentina ligada a los odontoblastos, ausencia de dentina terciaria, focos inflamatorios y áreas de necrosis. En nuestro estudio encontramos las mismas características histológicas y morfológicas de las células, por lo que podemos decir que realizamos un buen diagnóstico clínico, el cual fue comprobable mediante el análisis histológico (4, 6, 68, 69).

Nuestros resultados concuerdan con los de Chin-Lo Hahn, William A. Falkler (14), quienes mediante H&E y microscopio óptico no observaron focos inflamatorios en muestras de pulpa sana. Sin embargo, en su grupo de pulpitis no se observaron focos de inflamación, a diferencia de nuestros resultados, en los cuales fue posible encontrar un foco inflamatorio en una muestra con diagnóstico de pulpitis

reversible con predominio de células redondas con núcleo grande y escaso citoplasma, compatible con lo descrito histológicamente para linfocitos.

Ricucci, Loghin (68) reportaron que la pulpitis reversible puede tener una capa odontoblástica reducida o aplanada, islas de calcificación en todo el tejido pulpar, con capas gruesas de dentina terciaria que reducen el volumen del espacio pulpar, linfocitos y las células plasmáticas se ven reunidos en concentraciones moderadas debajo de las áreas más profundas de penetración de caries. Nuestros resultados concuerdan con estos autores debido a que encontramos zonas con presencia de calcificación pulpar y un área con presencia de infiltrado linfocitario, así como disminución ligera en la capa de odontoblastos.

Nuestros resultados no mostraron evidencia de áreas de necrosis ni zonas de colonización bacteriana en ninguno de los 2 grupos, lo cual concuerda con lo reportado por Ricucci, Siqueira (69) quienes en su estudio utilizando pulpas sanas y con pulpitis reversible no identificaron zonas de necrosis, dando como resultado una similitud entre el diagnóstico clínico e histopatológico.

## 7 CONCLUSIÓN

Se cuantificó en cortes histológicos la presencia de linfocitos en pulpa sana y pulpitis reversible, se identificó una mayor cantidad en pulpitis reversible (1.15 por campo) comparado con los encontrados en pulpa sana (0.8 por campo), presentando una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.039$ ).

La disgregación enzimática de la pulpa preserva la viabilidad celular, permitiendo la identificación de linfocitos por frotis celular.

La presencia de linfocitos en pulpitis reversible revela su participación en los mecanismo de defensa frente a infecciones bacterianas y sus subproductos en los tejidos dentales.

## **8 PERSPECTIVAS**

Se sugiere continuar con la línea de investigación enfocándose en la distribución de los linfocitos en todas las áreas de la pulpa dental, con la finalidad de comprobar si éstos son residentes de la pulpa dental o están de paso con el tejido sanguíneo.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Joanna Maria Tomaszewska, Bogdan Miskowiak, Teresa Matthews-Brzozowska, Wierzbicki P. Characteristics of dental pulp in human upper first premolar teeth based on immunohistochemical and morphometric examinations. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2013;51(2):6.
2. Pashley DH, EL. P. Dentin permeability and restorative dentistry: status report for The American Journal of Dentistry. *Am J Dent*. 1991;4(2):4.
3. Juana María Abreu Correa, Rosario Marbán González, Isnaida Morffi López, Cruz IOdl. Complejo dentino pulpar. Estructura y diagnóstico. *REMIJ*. 2011;12(1):18.
4. Kenneth M. Hargreaves, Berman LH. *Cohen's Pathways of the Pulp*. España: ELSEVIER; 2016. 3612 p.
5. Ma E. Gómez de Ferraris, Muñoz AC. *Histología y embiología bucodental*. Panamericana EM, editor2002. 482 p.
6. HARGREAVES KENNETH M. , E. GH. *Dental's Pulp*: Quintessence Publishing Co, Inc; 2012.
7. Acosta Gómez A. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas Odontológica*. 2006;25(57).
8. Sasaki T, Garant P. Structure and organization of odontoblast. *The Anatomical Record*. 1996;235(245):235-49.

9. Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenital anomalies*. 2016;56(4):144-53.
10. Durand SH, Flacher V, Romeas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, et al. Lipoteichoic Acid Increases TLR and Functional Chemokine Expression while Reducing Dentin Formation in In Vitro Differentiated Human Odontoblasts. *The Journal of Immunology*. 2006;176(5):2880-7.
11. Ashri NY, Ajlan SA, Aldahmash AM. Dental pulp stem cells. Biology and use for periodontal tissue engineering. *Saudi medical journal*. 2015;36(12):1391-9.
12. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod*. 2007;33(7):773-81.
13. Eleazer Paul D, Farber Paul A, Samuel S. Lack of lymphocyte stimulation by root canal products. *JOURNAL OF ENDODONTICS*. 1975;1(12).
14. Chin-Lo Hahn, William A. Falkler, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *Journal of endodontics*. 1989;15(1):6.
15. Bruno KF, Silva JA, Silva TA, Batista AC, Alencar AH, Estrela C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. *Int Endod J*. 2010;43(11):1013-21.
16. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Sobrinho AP. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod*. 2012;38(4):481-5.

17. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod.* 2007;33(6):643-51.
18. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* Barcelona, España: Elsevier España; 2012. 558 p.
19. Meyle J, Dommisch H, Groeger S, Giacaman RA, Costalonga M, Herzberg M. The innate host response in caries and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2017;44(12):1215-25.
20. Miller G, Sternberg R, Piliero S, P R. Histologic identification of mast cells in human dental pulp. *Oral Surgery.* 1978.
21. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology.* 2011;12(11):1035-44.
22. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews Immunology.* 2007;7(3):179-90.
23. Johnzon CF, Ronnberg E, Pejler G. The Role of Mast Cells in Bacterial Infection. *The American journal of pathology.* 2016;186(1):4-14.
24. Park I, Kassiteridi C, Monaco C. Functional diversity of macrophages in vascular biology and disease. *Vascular pharmacology.* 2017;99:13-22.
25. Prebble H, Cross S, Marks E, Healy J, Searle E, Amir R, et al. Induced macrophage activation in live excised atherosclerotic plaque. *Immunobiology.* 2018.

26. Peron G, Thomaz LL, Rosa LCD, Thome R, Verinaud LMC. Modulation of dendritic cell by pathogen antigens: where do we stand? Immunology letters. 2018.
27. Avery J. Oral Development and Histology. New York: Thieme.2002.
28. M. Jontell, T. Okiji, U. Dahigren, Bergenholtz G. IMMUNE DEFENSE MECHANISMS OF THE DENTAL PULP. Crit Rev Oral Biol Med. 1998;9(2):179-200.
29. Fernandez-Urtasun AML. Manual de histología. Mexico Impresora Marvel, S.A. de C.V.; 2006.
30. TAKAHASHI. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. International Endodontic Journal. 1998;31:311-25.
31. TEW J, ENGEL D, D. M. Polyclonal B-cell activation in periodontitis. Journal of Periodontal Research. 1998;24:255-41.
32. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. J Dent Res. 1987;66(6):1149-53.
33. PEKOVICI D. D., ADAMKIEWICZ V. W., GORNITSKY M. Immunoglobulins in human dental caries. Arch Oral Biol. 1988;33(2):135-41.
34. Speer ML, Madonia JV, MA. H. Quantitative evaluation of the immunocompetence of the dental pulp. J Endod. 1977;3(11):418-23.
35. TROWBRIDGE H. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. Journal of Endodontics. 1990;16:54-61.

36. Shah DK, Zuniga-Pflucker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *Journal of immunology*. 2014;192(9):4017-23.
37. Arneth BM. Activation of CD4 and CD8 T cell receptors and regulatory T cells in response to human proteins. *PeerJ*. 2018;6:e4462.
38. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune Defense Mechanisms of the Dental Pulp. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1998;9(2):179-200.
39. YAMAMURA M, UYEMURA K, RJ D. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1992;255(5040):277-9.
40. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins Jr W, Silva JSD, Cunha FDQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral microbiology and immunology*. 2005;20(5):310-6.
41. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology*. 2000;18(1):217-42.
42. FORMAN JD, KLEIN JT, SILVER RF, LIU MC, GREENLEE BM, DR. M. Selective activation and accumulation of oligoclonal V beta-specific T cells in active pulmonary sarcoidosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;94:1533-42.
43. PANNETIER C, EVEN J, P. K. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunology Today*. 1995;16:176-81.
44. MANOLEA H, MOGOANTĂ L, MĂRGĂRITESCU CL, DEVA V, ȘURLIN P, O C. Immunohistochemical aspects of the evaluation of the inflammatory answer of

the dental pulp. Romanian Journal of Morphology and Embryology. 2009;50(2):207-12.

45. T. R. Mosmann, Coffman RL. TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. Ann Rev Immunol. 1998;7:145-73.

46. Duruturk L, Sari S, Sengul A. Immunocompetent cell level as a diagnostic reference for pulpal pathosis of primary teeth. Arch Oral Biol. 2013;58(10):1517-22.

47. S. M. Wahl, L. M. Wahl, McCarthy JB. Lymphocyte-Mediated Activation of Fibroblast Proliferation and Collagen Production. Journal of immunology. 1978;121(3):942-6.

48. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. Journal of oral microbiology. 2011;3.

49. Tim R. Mosmann, Li Li, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. seminars in IMMUNOLOGY. 1997;9:87-92.

50. G. Gregoire, Terrie B. Identification of lymphocyte antigens in human dental pulps. J Oral Pathol Med. 1990;19:6.

51. Kutsch VK. Dental caries: an updated medical model of risk assessment. J Prosthet Dent. 2014;111(4):280-5.

52. Bowen WH. Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. Molecular oral microbiology. 2015;31(3):228-33.

53. Cheaib Z, Rakmathulina E, Lussi A, Eick S. Impact of acquired pellicle modification on adhesion of early colonizers. *Caries Research*. 2015;46:626-32.
54. Bayliss WM. On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. *Journal of Physiology*. 1901;26:173-209.
55. Richardson JD, MR V. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:839 – 45.
56. Caviedes-Bucheli J, Munoz HR, Azuero-Holguin MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*. 2008;34(7):773-88.
57. Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguin MM, Munoz HR. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J*. 2006;39(5):394-400.
58. Marki A, Esko JD, Pries AR, Ley K. Role of the endothelial surface layer in neutrophil recruitment. *Journal of Leukocyte Biology*. 2015;98:503-15.
59. Toshio Izumi, Ieyoshi Kobayashi, Kazuhiko Okamura, Sakai H. IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON THE IMMUNOCOMPETENT CELLS OF THE PULP IN HUMAN NON-CARIOUS AND CARIOUS TEETH. *Archs oral biology*. 1995;40(7):7.

60. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. Mediators of inflammation. 2015;2015:230251.
61. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, FQ C. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. Oral Microbiol Immunol. 2009;24:25-31.
62. Gaudin A, Renard E, Hill M, Bouchet-Delbos L, Bienvenu-Louvet G, Farges JC, et al. Phenotypic analysis of immunocompetent cells in healthy human dental pulp. J Endod. 2015;41(5):621-7.
63. LUCEY DANIEL R., CLERICI MARIO, M. SG. Type 1 and Type 2 Cytokine Dysregulation in Human Infectious, Neoplastic, and Inflammatory Diseases. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. 1996;9(4):532-62.
64. B R. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004. 884 p.
65. Douglas C. Tkachuk, Hirschmann JV. Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
66. Michael H. Ross, Pawlina W. Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. : Ed. Médica Panamericana; 2007. 974 p.
67. Ross M, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology. Philadelphia, PA 19103: Wolters Kluwer; 2016. 1071 p.

68. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *J Endod.* 2014;40(12):1932-9.
69. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Loghin S, Lin LM. Pulp and apical tissue response to deep caries in immature teeth: A histologic and histobacteriologic study. *Journal of dentistry.* 2017;56:19-32.

## **10 ANEXOS**

### **10.1 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 “CUANTIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LINFOCITOS EN PULPA DENTAL HUMANA SANA Y CON PULPITIS REVERSIBLE”.

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. Aclaramos 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. Si usted desea ampliar la información respecto a esta investigación puede contactar al responsable de esta investigación: Dra. Erika de Lourdes Silva Benítez (Facultad de Odontología) y Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina (Facultad de Química), teléfono 667-7137860 ext. 116; Universidad Autónoma de Sinaloa, Avenida de las Américas y Universitarios, C.P. 80010.

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.

## **10.2 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%, 95% y 100% durante 15 segundos en cada uno respectivamente. Por último, se sumergieron en xileno 1 minuto y se dejaron secar a temperatura ambiente.