



# Inmunoexpresión de células dendríticas en pulpas clínicamente sanas e inflamadas en grado irreversible

## *Immunoexpression of dendritic cells in clinically health and irreversible pulps*

Eva Rocío Figueiras Morales,\* Maritza Cardiel Nieves,<sup>§</sup> Luis Fernando Jacinto Alemán,<sup>§</sup> Amalia Ballesteros Vizcarra,<sup>||</sup> Enrique Chávez Bolado,<sup>||</sup> Luis Raúl García Aranda,<sup>||</sup> Juan Carlos Hernández Guerrero<sup>§</sup>

### RESUMEN

Los mecanismos de defensa dentinopulpar involucran una variedad de sistemas biológicos, en donde el sistema inmunológico juega un papel principal. La identificación de células dendríticas (CD) ha generado un sinnúmero de investigaciones para comprender cómo un antígeno puede activar una respuesta inmunológica en la pulpa. El propósito de este estudio fue el realizar la cuantificación y observación de la distribución de CD HLA-DR<sup>+</sup> en el tejido pulpar clínicamente sano e inflamado en grado irreversible. Las observaciones inmunohistoquímicas en pulpas clínicamente sanas mostraron una distribución muy marcada en la zona odontoblástica. Por otra parte, las observaciones en pulpas clínicamente inflamadas en grado irreversible mostraron una distribución y número irregular por todo el tejido, sugiriendo su actividad en la pulpa dental.

**Palabras clave:** Células dendríticas, HLA-DR<sup>+</sup>, pulpa dental, respuesta inmune.

**Key words:** Dendritic cells, HLA-DR<sup>+</sup>, dental pulp, immune response.

### ABSTRACT

Defense reactions of the dentin/pulp complex involve a variety of biological systems; in which the immune system plays a main role. The identification of pulpal dendritic cells (DC) has generated research activities to know how an antigen can evoke a pulpal immune response. The purpose of this work was to make a quantification and observation of DC in healthy and irreversible clinical diagnosed pulp using HLA-DR marker. Immunohistochemical observations of healthy clinical pulps revealed a prominent paraodontoblastic distribution of CD. On the other hand on irreversible clinical pulps the number and distribution of CD was irregular in all the pulp tissue. That makes us suggest that the CD in dental pulp continue activating immunologic responses even on irreversible pulp process.

### INTRODUCCIÓN

El tejido conectivo de la pulpa dental está protegido de estímulos exógenos por tejidos dentales duros. Una vez que la integridad de esta barrera ha sido rota, los elementos nocivos exógenos pueden ganar la entrada hacia el tejido.<sup>1</sup>

Esto dará como resultado una amplia gama de respuestas biológicas, de entre las cuales, se encuentran aquellas que están dirigidas a eliminar a los elementos bacterianos que actúan como antígenos, los cuales activan diversas formas de reacciones inmunológicas.<sup>2</sup>

Jontell et al.<sup>3</sup> demostraron mediante inmunohistoquímica la presencia de células dendríticas (CD) en pulpa, a través de su morfología dendrítica y expresión de sus moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II. Estas células son denominadas células presentadoras de antígeno (CPA) y son las encargadas de permitir el reconocimiento por parte de los linfocitos T de una multitud de diferentes partículas y/o antígenos.<sup>4</sup>

Las CPA capturan antígenos, los internaliza por fagocitosis para ser procesados por enzimas lisosómicas que las convierten en péptidos. Las CD están asociadas a moléculas del CMH clase II, por lo tanto, los fagolisosomas de las CD que contienen los péptidos antigénicos se fusionan con las vesículas del CMH clase II, cargando el péptido en la molécula del CMH y ser llevados a la membrana para ser presentados al receptor de la célula T (RCT) o linfocito T. Esta asociación entre péptido-CMH-RCT permitirá la activación de la respuesta inmune específica, activando linfocitos y la producción de citocinas, que dirigirán los mecanismos efectores de la respuesta inmune, ya sea celular o humoral.<sup>5</sup>

\* Residente de la Especialidad de Endodoncia.

§ Profesor del Laboratorio de Inmunología.

|| Profesor de la Especialidad de Endodoncia.

## METODOLOGÍA

Para este estudio se examinaron un total de 30 muestras de pulpas (10 pulpas clínica e histológicamente sanas y 20 pulpas clínicamente inflamadas en grado irreversible) de pacientes con un promedio de edad de 25 años e igual distribución de género, obtenidas de los Departamentos de Endodoncia y Cirugía Maxilofacial de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. Todo paciente firmó un consentimiento informado.

Las pulpas fueron clínicamente diagnosticadas, bajo los siguientes parámetros: las sanas respondieron dentro de los límites normales a las pruebas de sensibilidad pulpar, y las clínicamente inflamadas en grado irreversible, presentaron historial de dolor espontáneo y dieron positividad y persistencia a las pruebas de sensibilidad pulpar.

### OBTENCIÓN DE PULPAS

Sanas: fueron de dientes extraídos por fines de ortodoncia. Una vez obtenido el diente se fijó en solución de zambony (ac. pícrico con 40% de formaldehído), se les realizó un corte longitudinal de cervical a apical (fresa de diamante punta de lápiz *S.S.White<sup>MR</sup>*) y pieza de alta velocidad con suficiente irrigación (*Midwest, Dentsplay<sup>MR</sup>*) y se extirpó la pulpa.

Irreversibles: se obtuvieron directamente del conducto radicular con una lima número 25 (*Mailefer<sup>MR</sup>*) introduciéndola y realizando un giro antihorario. Ambos grupos de pulpas fueron fijados en solución zambony y procesados en parafina, realizando cortes seriados de 5 micras (*Microtómo, American Optical<sup>MR</sup>*).

Se realizó tinción con H&E para establecer su análisis y diagnóstico histológico. La distribución de las CD fue determinada por la técnica inmunoperoxidasa.

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados convencionalmente en baños de xilol-alcohol. La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con  $H_2O_2$  al 3% por 20 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron anti-HLA-DR antimouse (ZYMED) y el anti-Factor XIIIa antirabbit (Biogenex). Se incubaron las pulpas con HLA-DR en una concentración de 1:100 diluidos en PBS y albúmina al 2% toda la noche a 4 °C, seguido de una segunda incubación de 1 h con anticuerpo secundario y streptavidin–HRP biotinylated link universal a 37 °C. (Dako-Cytomation). Finalmente se revelaron con diaminobencidina (Dako) y contrateñidas con hematoxilina.

De cada muestra se seleccionaron 5 campos ópticos (40x) de manera aleatoria para la cuantificación

de CD HLA-DR<sup>+</sup>. Se calcularon las medidas de tendencia central y de dispersión. Se aplicó la prueba ANOVA y análisis de regresión lineal usando el programa SPSS 12.0 (Chicago, IL).

## RESULTADO

### PULPAS SANAS

#### Examinación microscópica

El análisis histológico mostró la presencia de un tejido conectivo laxo, con gran cantidad de odontoblastos en empalizada y fibras colágenas, no se observaron células características de un infiltrado inflamatorio ni focos de calcificación.

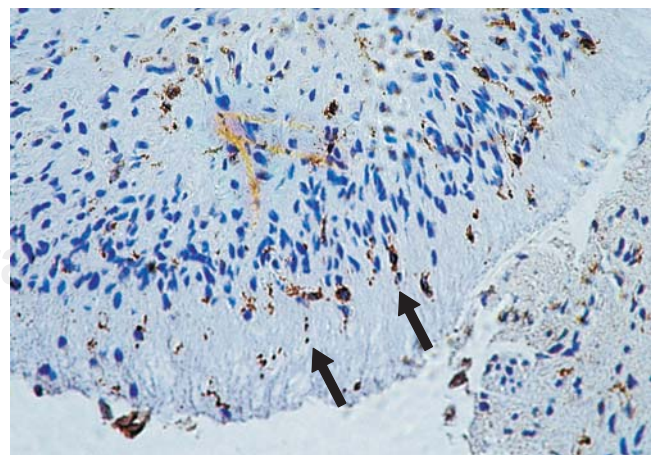
#### Inmunohistoquímica

Se observaron e identificaron CD positivas a HLA-DR (3.9 DE  $\pm$  1.1) estas células estaban en su mayoría agrupadas en la capa odontoblástica, mostrando sus prolongaciones dendríticas (*Figura 1*). En la zona central de la pulpa las células HLA-DR estaban distribuidas por todo el tejido y en mayor número alrededor de los vasos sanguíneos (*Figuras 2 y 3*).

### PULPAS IRREVERSIBLES

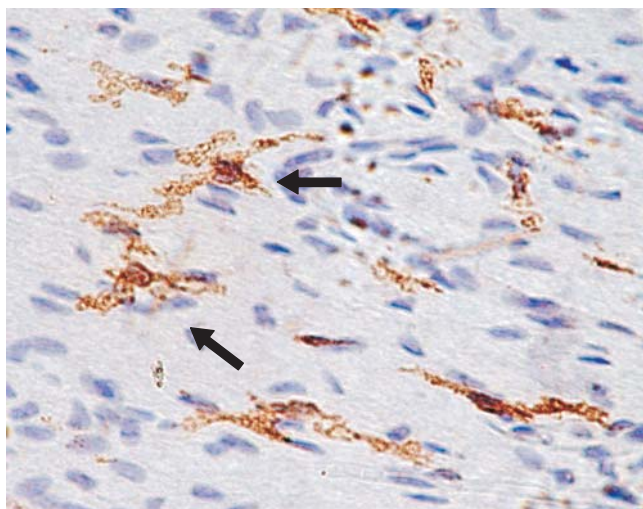
#### Examinación microscópica

El análisis histológico con H&E mostró presencia de un tejido conectivo fibroso denso con presencia de células características de un infiltrado inflamatorio

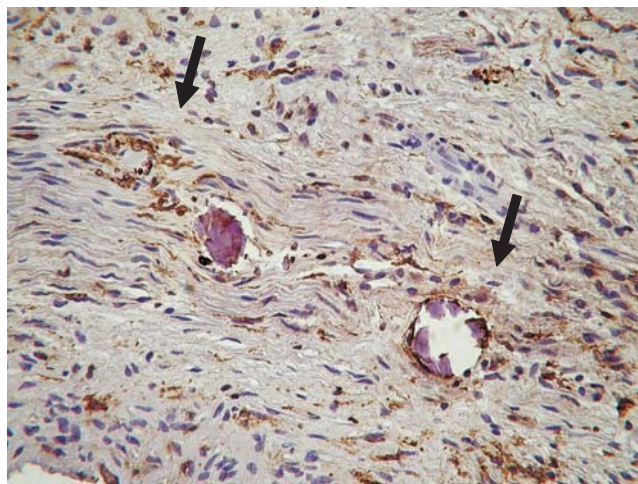


**Figura 1.** Inmunohistoquímica pulpa sana. Localización de CD en la periferia de la capa odontoblástica (flechas) (10x).

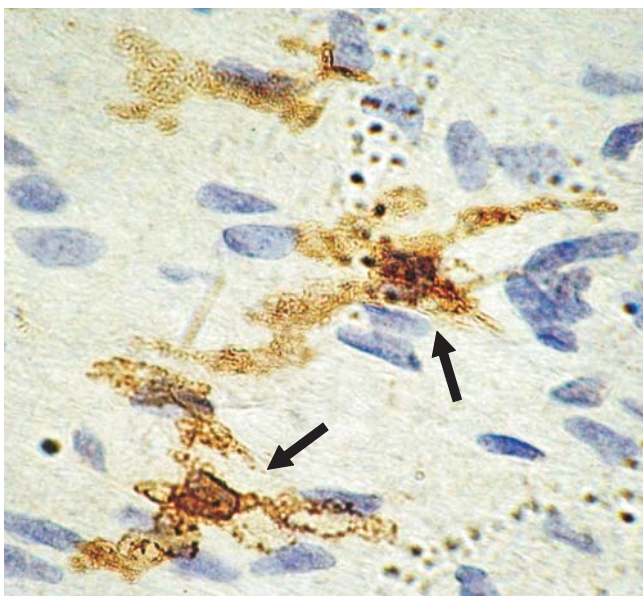




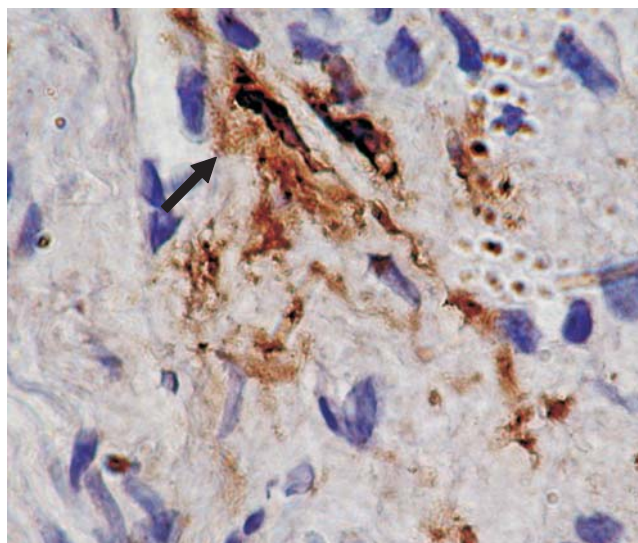
**Figura 2.** Morfología de CD a mayor aumento (40x).



**Figura 4.** Fotomicrografía que muestra (flechas) positividad de CD en el tejido alrededor de las calcificaciones (40x).



**Figura 3.** Estructura dendrítica de células HLA-DR+ (100x).



**Figura 5.** Fotomicrografía de células positivas HLA-DR (100x).

crónico y gran cantidad de tejido calcificado de tipo difuso y otras en forma de denticulos.

### Inmunohistoquímica

Se observaron e identificaron células positivas con HLA-DR ( $3.8 \text{ DE} \pm 2.0$ ) estas células estaban presentes en todo el tejido, en mayor número dentro de un infiltrado inflamatorio, presentando sus prolongaciones dendríticas. En zonas donde había aumen-

to en la densidad de las fibras se observó poco infiltrado inflamatorio al igual que poca reactividad de células HLA-DR +. Se observaron algunas células positivas HLA-DR en los tejidos alrededor de los focos de calcificación (Figuras 4, 5 y 6).

Al realizar el análisis de varianza no se encontraron resultados estadísticamente significativos ( $P = .285$ ). De igual forma el análisis de regresión lineal no mostró significancia entre el número de células dendríticas y el grado de inflamación pulpar (Figura 7).

Asociación entre el número de CD y el grado de inflamación pulpar

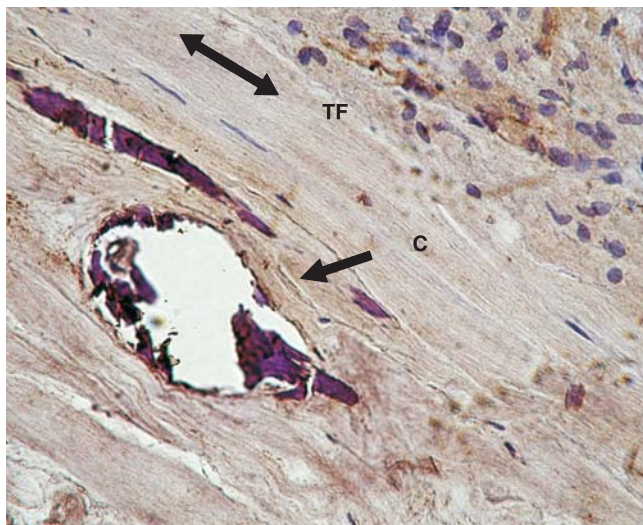
## DISCUSIÓN

A lo largo de varias décadas se ha realizado un sinnúmero de investigaciones para tratar de relacionar las condiciones del tejido pulpar ante diferentes grados de caries, así como cuál es la respuesta que se lleva a cabo a través de las células del sistema inmune.<sup>6-10</sup>

Este estudio mostró que en el tejido pulpar clínicamente sano dentro de la variedad de células asociadas con el sistema inmunitario, la presencia de células dendríticas fue evidenciado, esto concuerda con lo reportado por Jontell,<sup>7</sup> Jontell & Bergenholtz<sup>8</sup> y Ohsima<sup>9,10</sup> Además de refutar previas aseveraciones sobre la inexistencia de células inmunocompetentes en las pulpas sanas propuesta por Seltzer & Bender.<sup>11</sup>

En este estudio detectamos que las CD positivas a HLA-DR en pulpas clínicamente sanas e irreversibles, presentaron características morfológicas en común con las células de Langherhans de la epidermis y de las membranas mucosas como lo mencionado por Czernielewski.<sup>12</sup>

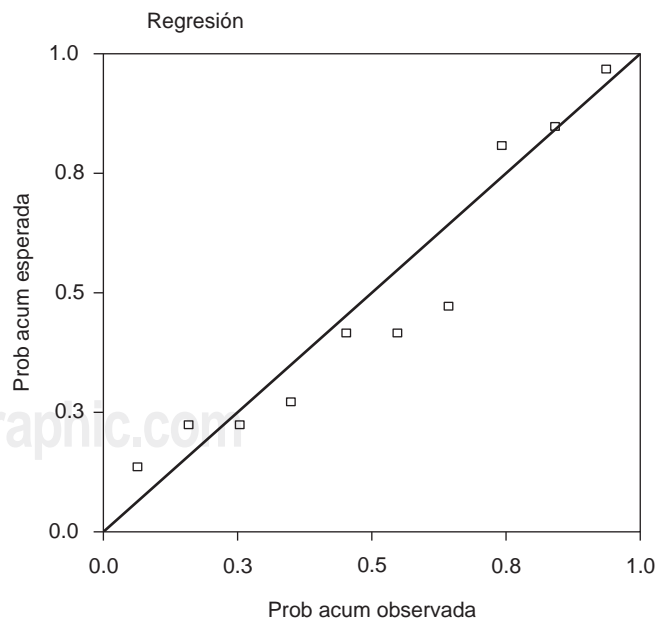
También se observó la presencia de células dendríticas en la periferia de las pulpas clínicamente sanas en la zona odontoblástica como lo mencionan otros autores.<sup>13-15</sup> Esta localización es ideal, ya que se encuentra próxima a los túbulos dentinarios y permite poder captar de esa manera el mayor número de antígenos.<sup>16</sup>



**Figura 6.** Fotomicrografía donde se observa la presencia de una calcificación (C) y de tejido fibroso (TF) con pocas células inflamatorias, no se aprecian células positivas HLA-DR (40x).

De igual forma en esta investigación se pudieron observar cambios amplios en la distribución de las células positivas a HLA-DR en las pulpas con diagnóstico de irreversibilidad. Un fenómeno similar ha sido reportado por Jontell<sup>8</sup> y Massler<sup>17</sup> donde la mayor concentración de células dendríticas se observó en zona acelular o de Weil en dientes con caries avanzada. Esta variabilidad en la distribución mostrada por nuestras muestras podría ser debido al mayor grado de inflamación y/o diseminación de los antígenos responsables.

En nuestras observaciones se identificaron células positivas a HLA-DR en todo el tejido, en mayor número cerca de las células inflamatorias, mostrando sus prolongaciones dendríticas. En las zonas donde había aumento en la densidad de las fibras se observó disminución de células inflamatorias y poca presencia de células positivas a HLA-DR, así como presencia de procesos de calcificación. Esta disminución del número puede ser debida a cambios en el tejido conectivo pulpar hacia un tejido fibroso denso, disminuyendo el número de células.<sup>18,19</sup> El papel de las células dendríticas dentro de las diferentes fases de la inmunodefensa es muy importante. Esta línea de investigación ha sido abordada por diferentes autores, concordando que el conocimiento de estas células podría otorgar nuevas terapias ante la patología pulpar.



**Figura 7.** Gráfica de regresión lineal. No se presentó significancia estadística ( $p < 0.05$ ).



## CONCLUSIONES

En base a todas las observaciones podemos concluir que:

La inmunoexpresión de células dendríticas está presente en el tejido conectivo pulpar sano, localizándose en zonas estratégicas como la zona odontoblástica y la zona central de la pulpa. La localización específica en una zona determinada de la pulpa por parte de las CD puede ser debida al estado de inflamación. Los procesos de inflamación clínica de grado irreversible dan lugar a un aumento en el grosor de las fibras colágenas convirtiendo a la pulpa en un tejido fibroso denso, disminuyendo el número de elementos celulares y dando lugar a la presencia de calcificaciones. Lo cual pudo conducir a la disminución de CD en el tejido pulpar.

La realización de más estudios sobre esta línea de investigación en diferentes estados clínicos, histológicos pulpares, no sólo incrementará el acervo y conocimiento de la función biológica e inmunológica, sino que además podría abrir la posibilidad de crear estrategias terapéuticas para modular la biología pulpar.

## AGRADECIMIENTOS

Lic. Aurora del C. Sánchez García, Departamento de Patología del Instituto Nacional de Neurología, Dr. Andrés Castell Rodríguez, Coordinador del Departamento de Biología Celular y Tisular de Medicina de la UNAM, CDEP Daniel Quezada Rivera. Laboratorio de Patología Bucal de la DePel de la Facultad de Odontología UNAM.

## REFERENCIAS

1. Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. *J Endod* 1990; 16: 98-101.
2. Pashley DH. Dynamics of the pulp-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7(2): 104-33.
3. Jontell M, Okiji T. Bergenholtz, immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 1149-1153.
4. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu et al. Immunology of dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
5. Gerald B, Pier. Jeffrey B, Lyczak. *Immunology, infection and immunity*, edit. ASM press, Washington. CD. Chapter 1, 2 and 3.
6. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in normal dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998: 179-200.
7. Jontell M, Eklöf C, Dahlgren U, Bergenholtz G. Difference in capacity between macrophages and dendritic cells from rat incisor pulp to provide signals to concanavalin-A-Stimulated T-lymphocytes. *J Dent Res* 1994; 72: 1056-1060.
8. Jontell M, Bergenholtz G, Scheynius A, Ambrose W. Dendritic cells and macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp. *J Dent Res* 1998; 67: 1263-1266.

9. Ohshima H, Kawahara I, Maeda T, Takano Y. The relationship between odontoblast and immunocompetent cells during dentinogenesis in rat incisors: an immunohistochemical study using OX-6 monoclonal antibody. *Arch Histo Cytol* 1994; 57: 435-447.
10. Ohshima H, Sato O, Kawahara I, Maeda T, Takano Y. Responses of immunocompetent cells to cavity preparation in rat molars: an immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. *Connect Tissue Res* 1995; 32: 303-311.
11. Seltzer S, Bender IB. The pulp as connective tissue Lippincott Philadelphia. 1984: 78-104.
12. Czernielewski J, Vaigot P, Prunieras M. Epidermal Langerhans cells. A cycling cell population. *J Invest Dermatol* 1985; 84: 424-6.
13. Bergenholtz G, Knutsson G, Jontell M, Okiji T. Albumin flux across dentin of young human premolars following temporary exposure to the oral environment. In: *Proceedings of the International Conference on dentin/pulp complex 1995 and the international meeting on clinical topics of dentin/pulp*.
14. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Cell cooperation in the antibody response*. Immunology, Fourth Edition. London: Mosby, 1996; 15: 464-8.
15. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in normal dental pulp. *J Dent Res* 1987; 66: 1149-1153.
16. Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse traffic from the blood, and the T-cell dependent and independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med* 1988; 167: 632-45.
17. Massler M. Pulpal reactions to dental caries. *Int Dent* 1967; 17: 441-460.
18. Heyerass KL, Kvinnsland L. Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88(Suppl 1): 393-401.
19. Heyerass KI, Jacobsen EB, Fristad I, Raab WH-M. Vascular and immunoreactive nerve fibre reactions in the pulp after stimulation and denervation In: *Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995 and the International meeting on clinical Topics of dentin/pulp complex: Quintessence*. 1996: 162-168.

## LECTURAS RECOMENDADAS

1. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard W, Betjes M, Bhardwaj N et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82: 487-93.
2. Hauss P, Setz F, Cavazzana CM, Fischer A. Characteristics of antigen-independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells with CD4+ cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2285-94.
3. Johnson JS, Jenkins MK. Co-stimulatory functions of antigen-presenting cells. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 625-58.
4. Zhou L, Tedder TF. Human Blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the Immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995; 154: 3821-35.
5. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and the Thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375: 6527: 151-5.
6. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Cell cooperation in the antibody response*. Immunology, Fourth Edition. London: Mosby, 1996; 15: 464-8.
7. Nockoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 1995; 15: 464-8.
8. Baatthen LR, Thorsby E. Human epidermal Langerhans cells are more potent than blood monocyte in inducing some antigen-specific T-cell responses. *Br J Dermatol* 1983; 108: 139-46.

9. Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Van Veen CJ, Van-Hellemond JJ, Neeffjes JJ, Kast WM et al. Mhc class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* 1995; 154: 5715-24.
10. Bucana CD, Munn CG, Song MJ, Dunner K, Kripke ML. Internalization of the molecules into Birbeck granule-loke structures in murine dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1992; 99(4): 365-73.
11. Steinman R, Hoffman L, Pope M, Maturation and migration of contaneous dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1995; 105 (Suppl 1): 2s-7s.
12. Szakal AK, Kapasi ZF, Masuda A, Tew JG. Follicular dendritic cells in the alternative antigen transport pathway: microenvironment, cellular events, age, and retrovirus related alterations. *Semin Immunol* 1992; 4: 257-65.
13. Szakal AK, Kosco MH, Tew JG. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses. *Ann Rev Immunol* 1989; 7(91): 109.
14. Helm SL, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cells and the maintenance of IgE responses. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2362-9.
15. Clark EA, Grabstein KH, Grown AM, Skelly M, Kaisto T, Hirano T et al. Activation of lymphocyte maturation by human follicular dendritic cell line. *J Immunol* 1995; 155: 545-55.
16. Jontel M, Gunraj MN, Bergenholtz G, Immunocompetent cells in normal dental pulp. *Criv Rev Oral Biol Med* 1998: 179-200.
17. Seltzer S, Bender IB. The pulp as connective tissue Lippincott Philadelphia. 1984: 78-104.
18. Hahn CL, Falkler WA Jr, Siegel MA, A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod* 1989; 15: 20-26.
19. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Matsumoto A, Kobayasi C, Suda H. An immunohistochemical study of distrinution of immunocompetent cells, specially macrophages and la antigen – expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. *I Dent Res* 92; 71: 1196-1202.
20. Mangkornkarn C, Steiner JC, Bohman R, Lindemann RA, Flow cytometric analysis of human dental pulp tissue. *J Endodon* 1991; 17: 49-53.
21. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non- carious and carious teeth. *Arch Oral Biol* 1995; 40: 609-614.
22. Pulver WH, Taubman MA, Smith DJ, Immune components in normal and inflamed human dental pulp. *Arch Oral Biol* 97; 22: 102.
23. Pekovic DD, Fillery ED. Identification of bacteria in immunopathologic mechanisms of human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 57: 652-661.
24. Sakamoto M, Sanjo D. An immunohistochemical study on human dental pulp in different depth of carious lesion. *Jpn J Conserv Dent* 1992; 35: 828-835.
25. Okiji T, Kosaka T, Kamal AMM, Kawashima N, Suda H. Age-related changes in the immunoreactivity of the monocyte/macrophage system in rat molar pulp. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 453-460.
26. Holzer P. Local effector function of capsaicin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1998; 24: 739-768.
27. Knight SC, Stagg A, Hill S, Fryer P, Griffiths S. Development and function of dendritic cells in health and disease. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 33s-8s.

Dirección para correspondencia:

**Hernández-Guerrero JC**

Laboratorio de Inmunología. DEPel,

Facultad de Odontología,

Universidad Nacional Autónoma de México,

Circuito Institutos s/n Ciudad Universitaria,

04510, México, D.F., México.

Teléfono: (52) 55 5622 5558

Fax: (52) 55 5622 5558.

E-mail: jcarlosh@servidor.unam.mx