

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

CARRERA DE POSGRADO DEL DOCTORADO



TESIS DOCTORAL

"ESTUDIOS DE LA INCIDENCIA DE LOS MECANISMOS DE ADHESION CELULAR EN LOS PROCESOS INFLAMATORIOS DE LA PULPA"

DOCTORANDA: OD. GABRIELA VIVIANA PISTERNA
DIRECTORA: PROF. DRA. MARTHA SIRAGUSA
CO-DIRECTORA: PROF. DRA. MABEL D'ARRIGO
AÑO 2006

Índice

Agradecimientos.....	2
Dedicatoria.....	3
Introducción	4
Desarrollo	7
CD44.....	19
Materiales y métodos:.....	27
Resultados	31
Discusión	37
Conclusiones.....	43
Fotos.....	44
Ficha de Inclusión Exclusión	50
Bibliografía	52

Agradecimientos

A las Autoridades de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Rosario, a la Comisión de Doctorado y en especial al Señor Decano Odontólogo Héctor Darío Masía por haber gestionado la reapertura de la Carrera de Doctorado en Odontología y permitir de este modo la concreción de este proyecto.

A los integrantes de la Sala de Guardia nocturna, compañeros de la Carrera de la Especialidad en Endodoncia, alumnos de la Cátedra de Endodoncia y Cátedra de Cirugía por su valiosa colaboración, ya que aportaron muestras para la realización de la presente investigación.

A las Estadísticas Mercedes Leiva y Bioquímica Hebe Bottai por su orientación en la determinación del método estadístico para la realización de este trabajo.

A la Dra. Juana Valverde y a todos los miembros del Laboratorio de Inmunohematología por su incondicional apoyo.

A la Sra. Regina Barchi, Sra. María Verónica Weskamp y al Sr. Germán Paredes por su colaboración en lo administrativo.

A mi compañero Adrián, que respalda con amor y paciencia todos mis proyectos.

A todos los que de alguna forma brindaron su aporte para el logro de este trabajo.

Dedicatoria

A mis padres, que siempre me alentaron al estudio y la superación personal.

Introducción

La pulpa dentaria presenta características anatómicas y funcionales que la diferencian de otros tejidos conjuntivos del organismo ya que se encuentra en una cavidad rígida e inextensible, carece de circulación colateral y posee un aporte nutritivo reducido a través del foramen apical. La pulpa dentaria madura recuerda al tejido conectivo embrionario y alberga elementos titulares tales como nervios, tejido vascular, fibras del tejido conectivo, sustancia fundamental, fluido intersticial, odontoblastos, fibroblastos, células inmunocompetentes, y otros elementos celulares.

Embriológicamente la pulpa dentaria deriva de la cresta neural cefálica. Las células que experimentan una migración extensa descienden a ambos lados de la cabeza hacia el maxilar y la mandíbula y forman los gérmenes dentales.

Se cree que el control de la cronología del desarrollo y la posición del epitelio y el mesénquima reside en la expresión secuencial de las moléculas de enlace transmembrana celulares como moléculas de adhesión celular (CAM) y moléculas de adhesión al sustrato (SAM).

Las moléculas de adhesión celular median la morfogénesis a través de la proliferación celular controlada, adherencia célula-célula específica y la migración. Las células contienen proteínas de membrana llamadas integrinas que son receptores específicos para las moléculas de adhesión celular. La laminina es la molécula de adhesión celular de las membranas basales.

Las moléculas de adhesión al sustrato median las interacciones célula-matriz extracelular y las que han sido mejor estudiadas son las fibronectinas (familia de glucoproteínas que se unen a la fibrina, colágeno, sulfato de heparina, y superficies celulares)¹.

Durante la formación de la pieza dentaria, los odontoblastos derivados del mesénquima maduran, secretan una matriz extracelular (ECM) compuesta por proteínas colágenas y no colágenas que al principio no son mineralizadas constituyendo la predentina. Durante la formación de dentina primaria esta predentina cambia y comienza el proceso de mineralización para formar dentina².

Durante el desarrollo del diente, numerosas citoquinas contribuyen al crecimiento y a la diferenciación de las células relacionadas con el tejido duro y la formación del tejido blando. Además, varias citoquinas están presentes en la dentina y tienen efectos profundos en la reparación tisular después de una lesión con la interacción de células de la pulpa dental³.

Ante la agresión, producida por una infección por caries, la pulpa reacciona formando dentina o inflamándose. La formación de dentina reaccional o reparativa ocurre después de una lesión sobre el diente, y la intensidad de la respuesta depende de la severidad de lesión.

Las bacterias presentes en un proceso de caries, producen enzimas con efectos perjudiciales para el huésped, por ejemplo, la *Porphyromonas gingivalis* tiene el gen de la colagenasa, demostrado en estudios recientes, que fueron aisladas de infecciones endodónticas⁴. Los productos del metabolismo bacteriano destruyen esmalte y dentina y son capaces de producir una reacción inflamatoria pulpar. Cuando la dentina es invadida extensamente, la infección bacteriana también afecta a la pulpa. La pulpa puede responder: disminuyendo la permeabilidad dentinaria, formando dentina nueva o reaccionar con una respuesta inflamatoria e inmune. En general se acepta que cuando la caries ha invadido la dentina, en la pulpa ya comienzan a producirse algunos cambios, porque hay difusión de irritantes solubles que estimulan a la pulpa. Éstas sustancias que se difunden hacia la pulpa pueden ser toxinas y enzimas bacterianas, antígenos, quimiotoxinas, ácidos orgánicos y productos de la destrucción tisular⁵.

Cuando se desarrolla el proceso inflamatorio, intervienen además de las sustancias descritas anteriormente, moléculas de adhesión, tales como la molécula de CD44. El principal ligando de la molécula de CD44 es el ácido hialurónico un glicosaminoglicano no sulfatado que está distribuido ubicuamente en los espacios extracelulares^{6, 7, 8}.

Se cree que durante el desarrollo dentario esta proteína transmembranal juega un importante rol en los eventos mediados por hialuronato y es probable que como otros receptores transmembranales de la matriz extracelular, (por Ej. Integrinas), CD44 tenga un rol especial en el control de diferenciación celular⁹.

En el tejido pulpar, como respuesta al ataque bacteriano se produce un infiltrado celular inflamatorio que principalmente está formado por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Algunas de estas células son inmunocompetentes y son capaces de responder a las sustancias antigénicas que llegan desde la caries¹⁰. El mecanismo específico por el cual las células inmunocompetentes perpetúan la respuesta inmune es a través de la liberación y la interacción de un grupo de moléculas conocidas como citoquinas. Las citoquinas son factores solubles y son mediadores moleculares que intervienen en las respuestas inmunes celulares. Aunque las citoquinas son un grupo muy diverso de moléculas, la mayoría muestra bastante similitud estructural y funcional. Su tamaño varía entre 15 y 30 kiloDalton de peso molecular¹¹.

El término citoquina no necesariamente se refiere a la totalidad de moléculas mensajeras intercelulares. Una clase específica de citoquinas son las interleuquinas, un grupo de polipéptidos estructurales que han sido investigados intensivamente en la última década^{12,13}.

En la inflamación pulpar hay degeneración de las proteínas de la matriz, y ésta requiere de la actividad de distintas endopeptidasas. Las enzimas proteolíticas son indispensables para la degradación de la matriz extracelular y pueden ser subdivididas en tres clases sobre la base de su acción sobre moléculas blanco:

- serino proteasa
- cisteína proteinasa
- metaloproteinasas de la matriz (MMP)^{14 15}

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) constituyen las principales enzimas que degradan la matriz y han sido identificadas en muchos procesos que involucran la remodelación de los tejidos, la fuente principal de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) en los sitios de inflamación son los leucocitos¹⁶.

Desarrollo

Estado actual del conocimiento

Fisiología pulpar

El tejido de la pulpa dentaria remeda al tejido conectivo embrionario y aloja elementos titulares, células, fibras, nervios, vasos, sustancia fundamental y fibroblastos. Mediante estudios embriológicos se ha demostrado que la pulpa dentaria deriva de la cresta neural cefálica, cuyas células migran hacia la zona de la mandíbula y el maxilar formando los gérmenes dentales. La formación de las piezas dentarias comienza en la sexta semana de vida intrauterina. Se establece una actividad proliferativa y la consecuente formación de las láminas dentales primarias, cada una de las cuales se dispone en una lámina vestibular y otra dental.

Numerosas investigaciones han determinado que el desarrollo embrionario de un tejido se produce por la interacción con un tejido adyacente.

En el desarrollo dental se producen interacciones epiteliales complejas que han sido ampliamente estudiadas. Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular dirigen la diferenciación de los ameloblastos y odontoblastos.

La pulpa dental esta dividida histológicamente en dos zonas bien definidas que han sido denominadas una zona central y otra zona periférica¹⁷.

En general la pulpa presenta homogeneidad en su combinación de células, sustancia intercelular, elementos fibrilares, vasos y nervios.

La zona periférica está rodeada por la dentina calcificada. La célula presente en esta zona es la empalizada de odontoblastos, hacia el centro, una zona subodontoblástica, que está libre de células y es denominada zona basal de Weil. Aquí se ramifican plexos capilares y fibras nerviosas pequeñas. Más hacia el centro se encuentra una zona rica en células que forman parte del estroma pulpar. Esta zona está formada por fibroblastos, células no diferenciadas que pueden reemplazar a los odontoblastos diferenciándose y proliferando^{18,19}.

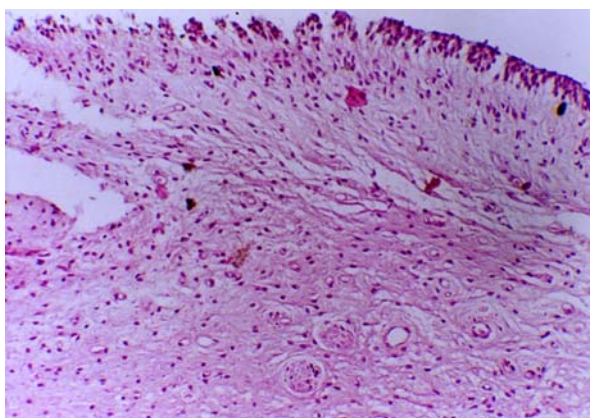


Foto N°1: Tejido pulpar normal.10X. G.Pisterna

La zona pulpar central posee grandes vasos y nervios, fibroblastos, sustancia fundamental y colágeno.

Los fibroblastos presentes varían ampliamente en su grado de diferenciación²⁰, sintetizan y secretan la mayor parte de los componentes extracelulares como el colágeno y la sustancia fundamental o matriz extracelular que fue demostrado por Weinstock y Leblond²¹, y también el fibroblasto no es solo el principal productor de colágeno, sino que también elimina el exceso o participa en su recambio en el tejido pulpar por la resorción de fibras de colágeno²². También se encuentran macrófagos, que pueden eliminar bacterias y cuerpos extraños, células muertas y otros residuos²³. Estas células guardan relación con la vigilancia inmunitaria pulpar.

Los neutrófilos no se hallan en pulpas normales, pero cuando hay lesión o muerte, migran con rapidez hacia la zona afectada desde los vasos cercanos a la injuria²⁴. Son las principales células de los microabscesos y muy eficientes en fagocitar y destruir bacterias o células muertas. Mediante esta participación, se lesionan células sanas vecinas y puede generarse una inflamación más amplia.

La presencia de linfocitos y plasmocitos aparece ante la permanencia de algún irritante ya que estas células se caracterizan por estar presentes en reacciones inmunitarias.

Las células cebadas son muy comunes en pulpas inflamadas^{25, 26}. Estas células liberan los gránulos que contiene repletos de histamina y heparina hacia el tejido adyacente ante un proceso inflamatorio. La histamina liberada en la zona cercana a los vasos produce vasodilatación, lo que aumenta la permeabilidad del vaso y el líquido y así los leucocitos pueden extravasarse.

Los odontoblastos son las principales células formadoras de dentina, cuyo origen está en las células mesenquimatosas periféricas de la papila dental, durante el desarrollo dentario, y los odontoblastos se diferencian adquiriendo su forma y su capacidad de sintetizar y secretar glucoproteínas. Las glucoproteínas forman la matriz de la predentina, primero a nivel de la unión de esmalte y dentina mediante la formación de vesículas de matriz.

La estructura dentinaria puede ser modificada mediante la producción de dentina peritubular. Es un recubrimiento hipermineralizado con poca matriz orgánica en el interior del túbulo que va reduciendo su luz. Cuando el odontoblasto es irritado, éste puede acelerar la formación de dentina peritubular pudiendo llegar a obliterar totalmente el túbulo en el que se encuentra haciendo que disminuya la sensibilidad dentinaria.

En otras situaciones clínicas el odontoblasto irritado puede secretar colágeno, material amorfo o grandes cristales, hacia la luz del canalículo, lo que disminuye la permeabilidad dentinaria a los irritantes²⁷.

Las células dendríticas son células inmunocompetentes de los sistemas y de la piel, linfoides y hemopoyéticas. También se llaman las células interdigitantes, reticulares, y veladas. Funcionan morfológica y fenotípicamente procesando los antígenos o presentándolos a las células T, de tal modo que estimulan la inmunidad celular.

La identificación de las células dendríticas pulpares (DCs) ha generado actividades de investigación que han llevado a un concepto de cómo un desafío antigénico puede evocar una respuesta inflamatoria pulpar. Aunque las células dendríticas pulpares no pueden identificar específicamente a los antígenos extraños, proporcionan señales necesarias para activar los linfocitos T, que alternadamente orquestarán a otras células inmunocompetentes para desplegar la defensa inmune local de la pulpa dental²⁸.

Elementos extracelulares de la pulpa dentaria

Fibras y sustancia fundamental o matriz extracelular

Fibras:

La mayoría de las fibras presentes en el tejido pulpar son fibras de colágeno,²⁹ que forman una estructura reticular laxa para sostener a los elementos estructurales del tejido pulpar.

El colágeno es sintetizado y secretado por los odontoblastos y los fibroblastos. El colágeno producido por los odontoblastos luego es mineralizado a diferencia del producido por los fibroblastos, que no calcifica, también se diferencia por el contenido de hidroxilisina³⁰.

Sustancia fundamental:

Denominada actualmente matriz extracelular, constituye la mayor parte del tejido pulpar y ocupa el espacio entre los elementos formados. Está básicamente constituida por proteínas, carbohidratos, y agua, combinaciones de glucosaminoglucanos tales como ácido hialurónico, condroitín sulfato y otras glucoproteínas^{31, 32}. La matriz extracelular de la pulpa dental está compuesta primariamente por colágeno tipo I y III³³. Esta sustancia es hidrófila, o sea que puede alojar una gran cantidad de agua. El agua no es libre como en otros tejidos, sino que está combinada formando un estado coloidal o de gel que favorece el paso de metabolitos y residuos hidrosolubles a través del medio. La sustancia fundamental puede liberar agua libre rápidamente en caso de lesión e inflamación³⁴.

Las propiedades de la matriz extracelular son las que le confieren a cada tipo de tejido conectivo sus características funcionales. Por su resistencia a la tracción y elasticidad, las fibras elásticas son la base de la función mecánica de sostén. Debido a su consistencia y contenido hídrico, la matriz amorfa es el medio de transporte de sustancias entre la sangre y las células de los tejidos, a la vez que amortigua y se opone a las fuerzas de presión.

Las glucoproteínas adhesivas presentes en la sustancia fundamental, tales como fibronectina y laminina, fijan las células a la matriz extracelular, actúan sobre la morfología de las células al influir sobre la organización del citoesqueleto y contribuyen a orientar a la célula migrante, tanto durante el desarrollo embrionario como, por ejemplo, en los procesos de cicatrización³⁵.

La sustancia fundamental rodea y da sustento a las estructuras y es el medio por el cual los metabolitos y productos de desecho son transportados desde las células hacia los vasos.

Los principales proteoglicanos en la sustancia fundamental de la pulpa son: ácido hialurónico, dermatán sulfato y condroitín sulfato³⁶.

El hialuronano, es la sal sódica del ácido hialurónico, y así se denomina a los polisacáridos. El ácido hialurónico formado por unidades de ácido D glucurónico y N acetilglucosamina, es el glicosaminoglicano más abundante del tejido conectivo, y es de gran importancia para la formación de agregados de proteoglucanos³⁷. Es producido por la Hialuronato sintetasa (HAS) que está localizada en la cara interna de la membrana plasmática, mientras que otros glicosaminoglicanos son sintetizados en el citoplasma celular, mas concretamente en enzimas del aparato de Golgi de la célula.

El ácido hialurónico es una molécula de alto peso molecular (cerca de 2.000 kiloDalton)³⁸.

Durante la dentinogénesis, el condroitín sulfato es el principal proteoglicano, sobre todo en la capa de odontoblastos y predentina, ya que participa de la mineralización; al erupcionar el diente, aumenta el ácido hialurónico y el dermatan sulfato y disminuye el condroitín sulfato.

El hialuronato tiene una fuerte afinidad por el agua y controla el estado de hidratación. Es un componente importante de la sustancia fundamental en los tejidos con un contenido elevado de fluido, como la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Es el mayor componente de las matrices extracelulares, interviene en la regeneración post inflamatoria con actividad específica en la migración de los fibroblastos y la fibrogénesis y el receptor celular mejor conocido para el hialuronato es el CD44³⁹. También se sabe que los fibroblastos son los que sintetizan principalmente hialuronato en respuesta a la estimulación con citoquinas tales como Interleuquina 1- β (IL - 1 β) y Factor de Necrosis Tumoral α (TNF - α).

El contenido hídrico de la pulpa dental es muy elevado, aproximadamente del 90%; así pues, la sustancia fundamental forma un almohadillado que puede proteger a los componentes celulares y vasculares de la pieza dentaria vital.

La degradación de la sustancia fundamental se puede producir en ciertas lesiones inflamatorias, caracterizadas por una concentración aumentada de enzimas lisosómicas. Las enzimas proteolíticas, las hilauronidasas y las condroitín sulfatasas de origen lisosomal y bacteriano, son ejemplo de enzimas hidrolíticas capaces de atacar a los componentes de la matriz extracelular. Las vías de la inflamación y la infección están fuertemente influidas por el estado de polimerización de los componentes de la sustancia fundamental⁴⁰.

Cuando la pulpa envejece, esta sustancia fundamental se modifica⁴¹. Estudios morfológicos e histológicos han mostrado que el volumen pulpar se reduce con la edad y que este proceso está acompañado por fibrosis, calcificación, atrofia reticular, pérdida de celularidad y degeneración odontoblástica⁴².

Elementos de soporte del tejido pulpar

El riego sanguíneo de la pulpa ha sido descrito por varios investigadores^{43,44}. Como la pulpa es un tejido pequeño, sus vasos no alcanzan un gran tamaño y por el foramen apical ingresan una o más arteriolas que se ramifica en arteriolas mas pequeñas o metaarteriolas, surgen anastomosis arteriovenosas y lechos microcirculatorios⁴⁵.

Hay una densidad capilar mayor en la zona subodontoblástica⁴⁶. Los capilares desembocan en pequeñas vénulas, que luego salen por el ápice y se comunican con vasos del ligamento periodontal o el hueso alveolar adyacente.

El sistema vascular en la pulpa dental juega un rol importante en el aporte nutritivo; de oxígeno y remueve los productos de desecho metabólico. Los elementos celulares de los vasos sanguíneos tales como las células endoteliales, pericitos y células asociadas contribuyen a la homeostasis junto con los nervios⁴⁷.

La presencia de linfáticos es discutida, pero algunos autores afirman que se hallan presentes en el tejido pulpar⁴⁸.

Los nervios también ingresan por el foramen apical, algunos mielinizados y otros desmielinizados, que son la mayoría y se ha demostrado que éstos reducen el flujo sanguíneo pulpar cuando son estimulados^{49, 50, 51}.

Los nervios pulpares juegan un rol crítico en la regulación del flujo sanguíneo, en el fluido del flujo dentinario y la presión^{52, 53}. También hay evidencia de regulación neuronal de fibroblastos pulpares, inflamación e inmunidad^{57, 54, 55}. Además, la inervación pulpar participa de la homeostasis de la misma. La invasión de células inmunes e inflamatorias en el sitio de injuria de la pulpa está estimulada por nervios sensitivos⁵⁶.

Las fibras nerviosas pulpares contribuyen en la angiogénesis, extravasación de células inmunes y regulan la inflamación para minimizar el daño inicial, manteniendo al tejido pulpar y consolidan los mecanismos de defensa pulpares⁵⁷.

El proceso inflamatorio

La inflamación es un proceso tisular formado por una serie de eventos moleculares, celulares y vasculares, con el objeto de defender al organismo frente a agresiones químicas, físicas o biológicas a los cuales estamos expuestos permanentemente. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, y por lo tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, además, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes^{58, 59}.

En el sitio de la injuria se produce calor y rubor como consecuencia de las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. También se produce tumor por el edema y el acumulo de células inmunes, y el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor. Clásicamente se denominó a estos cuatro signos de la inflamación como Signos de Celso.

Fases de la inflamación:

De forma teórica se puede dividir a la inflamación en cinco etapas:

- 1- Liberación de mediadores, que son moléculas, en su mayor parte son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
- 2- Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- 3- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- 4- Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendientes a finalizar o equilibrar el proceso.
- 5- Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

Liberación de mediadores de la inflamación

La fuente principal de liberación de mediadores de la inflamación es el mastocito. Esta es una célula inmune inespecífica que procede de la médula ósea. El mastocito contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados. La liberación de mediadores ocurre por distintas causas, pero quizás la más frecuente sea la lesión directa de la célula por el agente agresivo. Cuando la inflamación progresa, se acumulan en el foco suficientes factores activados del complemento, tales como los factores C3a y el C5a que actuando sobre receptores de membrana, inducen la activación del mastocito y la consiguiente liberación de mediadores. Otro mecanismo de activación se desarrolla mediante la Inmunoglobulina E que es captada en la membrana del mastocito, ya que éste presenta receptores para la porción Fc de esta inmunoglobulina (FcεR). El antígeno activa al mastocito cuando conecta específicamente con dos Inmunoglobulinas E contiguas sobre la membrana^{60,61}.

Los mecanismos bioquímicos que subyacen a este proceso no son aún bien conocidos. Parece que el proceso se inicia en la membrana con activación de adenilciclase y de fosfolipasa A2. La adenilciclase determina un incremento inicial de la concentración intracitoplasmática de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP), mientras que la fosfolipasa A2 ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico⁶². También aumenta la permeabilidad de membrana al Calcio, con lo que se incrementa la concentración de este ión en el citoplasma y la liberación de mediadores al espacio extracelular. Estos mediadores, que se encontraban preformados en los gránulos, son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo, factor quimiotáctico del neutrófilo y heparina⁶³.

El ácido araquidónico formado puede seguir dos vías metabólicas, la de la enzima ciclo-oxigenasa que determina la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos y la de la lipo-oxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos (LT). Todas estas sustancias de carácter lipídico, sintetizadas de novo por el mastocito, son un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación.

El basófilo es una célula preponderantemente sanguínea, que acude a los tejidos durante el proceso inflamatorio y supone un refuerzo en la liberación de mediadores ya que se activa por los mismos mecanismos que el mastocito y libera mediadores equivalentes a los de esta célula⁶⁴.

Efectos de los mediadores

Mediadores preformados

La Histamina es un mediador ampliamente distribuido por el organismo aunque se detecta principalmente en el mastocito y basófilo. Actúa sobre los receptores H1 (histamina 1) de los vasos produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad. Cuando la histamina actúa sobre receptores H2 (histamina 2) produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación⁶⁵.

De las distintas enzimas proteolíticas liberadas por el mastocito, la más interesante es la kininogenasa que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre y denominadas kininógenos, produciendo su ruptura en péptidos más pequeños denominados kininas. Las kininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor⁶⁶.

Los factores quimiotácticos como el ECF-A. atrae eosinófilos al foco inflamatorio, induciendo simultáneamente la activación de estas células. El NCF es una proteína con capacidad de atraer y activar al neutrófilo⁶⁷.

La heparina al inhibir la coagulación, favorece la llegada al foco inflamatorio desde la sangre de moléculas y células. Es, además, un factor regulador.

Mediadores sintetizados de novo

La prostaglandina PGE2 es la más importante en el proceso inflamatorio. Produce vasodilatación y dolor. En coordinación con el factor C5a del complemento y LTB4 aumenta la permeabilidad vascular.

LTB4. Es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos.

Factor activador de plaquetas (PAF: Platelets Activating Factor). Este factor tiene varias propiedades. Activa las plaquetas determinando su agregación, con la liberación de mediadores por parte de estos cuerpos e inicio de los procesos de coagulación. Produce además, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Por otra parte, es un potente factor quimiotáctico y activador de neutrófilos⁶⁸.

Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

Los mediadores de la inflamación van a producir básicamente dos efectos. En una primera fase inicial, alteraciones vasculares que facilitan el traspaso de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En una segunda fase, más tardía, las propias alteraciones vasculares, así también como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes⁶⁹.

Fase inicial del proceso inflamatorio en general. Llegada de moléculas

1. Inmunoglobulinas. Los anticuerpos se unen y bloquean a la bacteria y sus toxinas. La Inmunoglobulina M e Inmunoglobulina G activan el complemento por la vía clásica. La Inmunoglobulina G, a su vez, se une a los receptores por la porción Fc (FcR) que presentan los fagocitos en su membrana, potenciando la fagocitosis⁷⁰.
2. Factores del complemento. Además de la activación de la vía clásica indicada anteriormente, el complemento se puede activar por la vía alternativa, por productos liberados directamente por la bacteria o elemento agresor. Cuando el complemento, siguiendo una u otra vía, alcanza la vía común produce la lisis del germen o la célula extraña inductora de la inflamación. Los factores C3a y C5a, actuando sobre receptores de membrana, activan al mastocito y basófilo induciendo la liberación de mediadores y amplificando, de esta forma, el fenómeno inflamatorio. El C5a es un potente factor quimiotáctico, mientras que el C3b, uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis⁷¹.
3. Kininógenos. Sobre estas moléculas actúan las kininogenasas liberadas por el mastocito y basófilo dando lugar a las quininas.
4. Proteínas de la fase aguda. Se destacan entre ellas, a la proteína C Reactiva (PCR) que tiene la capacidad de fijar determinados gérmenes y de activar el complemento por la vía clásica (9).
5. Factores de la coagulación.

Fase tardía. Llegada de células

El Basófilo contribuye, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores.

El Neutrófilo es una de las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Elimina la bacteria mediante fagocitosis o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos y produciéndole, así, una muerte extracelular

El Monocito/Macrófago procedente de la sangre y de los tejidos cercanos, llegan al foco más tardíamente. El monocito, en los tejidos, se diferencia en macrófago. Esta célula presenta idénticas funciones a las señaladas para el neutrófilo. Actúa además, como célula presentadora del antígeno a las células específicas linfocitos T y B, iniciando, de esta forma, la respuesta específica⁷².

El macrófago sintetiza un péptido inespecífico, la Interleuquina 1 (IL - 1), que es una auténtica hormona del Sistema Inmune, ya que pasando a la sangre produce efectos sobre distintas partes del organismo. Determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de Prostaglandina E en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del hipotálamo; a su vez la Prostaglandina E actúa sobre el centro termorregulador. Sobre la médula ósea favorece la producción y liberación de neutrófilos, con la consiguiente neutrofilia.

A nivel local, la Interleuquina 1(IL - 1) activa la proliferación y diferenciación de las células T y B contribuyendo, así a la respuesta específica. También activa la

proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, fenómenos incluidos en la fase de reparación de la inflamación

Los Linfocitos T y B potenciados por el macrófago inician la *respuesta específica*. Las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan Inmunoglobulina E, que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada⁷³.

El Eosinófilo, es abundante en las infecciones parasitarias, parece además tener una función reguladora en la inflamación.

Reparación

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación. Estos procesos integran la llegada a la zona de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno, proliferación de células epiteliales y proliferación de vasos dentro de la herida⁷⁴.

La reacción de la pulpa frente los irritantes

El proceso inflamatorio que ocurre en el tejido pulpar es extremadamente complejo. Los cambios inflamatorios en la pulpa dental están acompañados por una amplia variedad de mediadores químicos, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y extravasación leucocitaria que son mediadas por muchos mediadores endógenos (quininas, prostaglandinas y neuropéptidos).

En la matriz dentinaria se han detectado varios factores de crecimiento tales como VEGF (Factor Vascular Endotelial de Crecimiento), PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas), EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), y FGF-2 (Factor de Crecimiento de Fibroblasto). Estos mediadores se hallan presentes en la dentina luego de una injuria como estímulos mecánicos, químicos o por caries y es probable que desempeñen un papel importante en las respuestas inflamatorias y cicatrización del tejido pulpar dañado.

El Factor Vascular Endotelial de Crecimiento (VEGF) es conocido como un factor promotor de la angiogénesis, al igual que FGF-2. Un estudio reciente demostró que IL - 1 α y TNF α aumentan la expresión del gen de VEGF en células de la pulpa dental y fue sugerido que la citoquina pro inflamatoria inducida VEGF contribuye parcialmente a la destrucción de tejido pulpar y periapical⁷⁵. FGF-2 y VEGF se pueden asociar por separado a la reparación tisular y a la progresión de la inflamación a pesar del hecho de que ambas citoquinas promueven la angiogénesis con la proliferación y migración de células endoteliales.

Durante el proceso inflamatorio en la pulpa se produce degeneración de las proteínas de la matriz, y ésta requiere de la actividad de distintas endopeptidasas, enzimas proteolíticas que son indispensables para la degradación de la matriz extracelular, cuyo principal componente es el hialuronato.

Autores como O'Boskey y Panagakos propusieron que las citoquinas estimulan la producción de niveles elevados de metalproteinasas de la matriz MMP-2 y metalproteinasas de la matriz MMP-9 por células de la pulpa humana en cultivos celulares y que esas metalproteinasas de la matriz (MMPs) juegan un rol importante en la inflamación pulpar⁷⁶.

Otros autores como Tjaderhane y colaboradores sugirieron que muchas metalproteinasas de la matriz (MMPs) son activadas por ácidos bacterianos y que tienen un rol clave en la destrucción de dentina por caries⁷⁷.

A nivel celular, las células linfocitos T son la población celular predominante en pulpa dental inflamada^{78, 79}. Generalmente, en lesiones inflamatorias las células T expresan marcador activado de memoria (CD45 RO⁺ /CD29⁺) en contraste con su marcador normal CD45RA⁺ / CD29⁻⁸⁰.

El movimiento de células T activadas desde los nódulos linfáticos al sitio efector está regulado por quimioquinas y moléculas de adhesión⁸¹. Los linfocitos T se pueden desarrollar a células maduras que expresan marcadores de superficie por cluster de diferenciación (CD) que tienen diferentes funciones. El rol de estas moléculas marcadoras de superficie es importante en el reconocimiento de antígenos y citoquinas. Las células T Helper o ayudadoras son clasificadas en Th1 y Th2 según la producción de citoquinas. Las células T Helper Th1 produce Interferón IFN- γ cuya función es activar a los macrófagos y Las células T Helper Th2 produce la citoquina IL-4 que es inductor de producción de Inmunoglobulina E por parte de las células B⁸².

La presencia de macrófagos, células dendríticas y Linfocitos T indican que la pulpa dental está lista para reaccionar a la invasión bacteriana y otros irritantes.

Las células dendríticas son células inmunocompetentes que funcionan morfológica y fenotípicamente procesando los antígenos o presentándolos a las células T, de tal modo que estimulan la inmunidad celular.

Algunos estudios sugieren que las células T son las responsables de la regulación de los cambios inmunológicos pulpares bajo la lesión de caries⁸³.

La inflamación y la reparación son fenómenos interdependientes. No deben considerarse como procesos separados, sino como las fases exudativa (aguda) y proliferativa (crónica) de un mismo proceso: la inflamación. Entre la dinámica de la inflamación pulpar y la periapical existe una variación de entorno.

Las células que predominan en la fase aguda son los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), mientras que en la crónica se caracteriza por la presencia de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, fibroblastos, angioblastos y fibras⁸⁴.

Tabla 1. Diferencias entre inflamación aguda y crónica

Inflamación	Estímulos	Tipos de reacción	Células principales	Dolor	Mediadores químicos
Aguda	Pasajeros	Exudativa	Leucocitos PMN	(+)	Aminas, Cininas Complemento Derivados del AA (Prostaglandinas, leucotrienos)
Crónica	Persistentes	Proliferativa	Macrófagos Linfocitos Células plasmáticas	(-) (+) si es subaguda	Anticuerpos Enzimas liso Linfocinas

Modificada con permiso del Dr. Mahmoud Torabinejad.

En Tratamiento Endodóncico. Weine F. 5º Ed. Harcourt Brace. 1997. Cap 3. Pág131

CD44

La molécula de CD44 (**C**luster de **D**iferenciación 44) es una molécula de adhesión ampliamente expresada que pesa aproximadamente de 80 a 250 kiloDalton⁸⁵. Fue denominada CD44 por el Third International Workshop and Conference on leukocyte differentiation antigen en 1994⁸⁶. Esta molécula había sido denominada PgpD-1(phagocytic glycoprotein-1), Ly-24, ECMIII, gp90^{Hermes}, ECMRIII (extracellular matrix receptor type III), H-CAM y el receptor hialuronato^{87, 88}. Esta multiplicidad de terminología deriva del hecho de que estas proteínas habían sido estudiadas independientemente por diversos laboratorios en contextos funcionales distintos, tales como linfocitos target, adhesión celular, activación leucocitaria y migración celular. El uso de anticuerpos monoclonales y de la tecnología ordenó el reconocimiento de que estas proteínas eran de hecho idénticas a CD44^{89, 90, 91, 92, 93}.

La forma estándar y predominante del CD44 es la CD44H (hematopoyética), la cual está construida con un dominio extracelular distal que es la región primariamente responsable de unión al hialuronato⁹⁴.

La conexión entre el receptor de hialuronato y CD44 fue sugerida inicialmente por estudios de Goldstein y colaboradores, Stamenkovic y colaboradores^{95, 96}. Estos investigadores informaron independientemente que el dominio extracelular de CD44 es homólogo a la región de unión de hialuronato de la proteína que une cartílago. Estos hallazgos sugieren que CD44 puede ser capaz de unir Hialuronato. Varios acontecimientos proinflamatorios podrían estar regulados por CD44 bajo la interacción con HA (hialuronato)⁹⁷.

Otro estudio confirmó que el receptor de Hialuronato es idéntico a CD44, *primero*, porque ambas proteínas tienen el mismo patrón de distribución, están presentes en los mismos tipos celulares, macrófagos, células epiteliales, *segundo*, el receptor de Hialuronato es similar a CD44 con respecto al peso molecular, punto isoeléctrico, presencia de grupos fosfatos y comportamiento en cromatografía molecular, *tercero*, un número de anticuerpos monoclonales dirigidos a CD44 reaccionaron cruzados con receptores de Hialuronato de células humanas y ratones⁹⁸.

Algunas de las moléculas que se expresan en la membrana celular permiten la adhesión reversible y selectiva con diversos elementos celulares entre sí y de estos con los componentes de la matriz extracelular. A las moléculas que participan en estas funciones de interacción se las denomina moléculas de adhesión y tienen un papel muy importante no solo en la fisiología de las células inmunes sino también son las responsables de la interacción que se establece en procesos patológicos⁹⁹.

El fenómeno de adhesión celular está involucrado en distintos mecanismos: en el desarrollo celular, en la diferenciación de células en la respuesta inmune (transplante), en el reclutamiento de linfocitos de una reacción inflamatoria, en cáncer, en la reparación de lesiones. Para que el mecanismo de adhesión se lleve a cabo deberán estar presentes distintas células, como plaquetas, leucocitos, células

endoteliales, en los cuales el mecanismo de adhesión es bien conocido, aunque en los glóbulos rojos, todavía hay mucho por dilucidar.

Las moléculas de superficie involucradas en la adhesión pueden pertenecer a alguna de las seis familias siguientes:

- ➔ Familia de las selectinas
- ➔ Familia de las integrinas
- ➔ Superfamilia de las inmunoglobulinas (IGSF: Immunoglobulin superfamily)
- ➔ Metalproteinasas de la matriz (MMPs: Matriz metalproteinasas)
- ➔ Cadherinas
- ➔ Moléculas de CD44. **Fig1**

La familia de CD44 en seres humanos deriva de un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 11¹⁰⁰ (locus11p13). Con empalmes alternativos del ARN nuevamente sintetizado, este gen puede dar lugar a cinco isoformas diferentes de CD44¹⁰¹. Una de estas isoformas (CD44Tr) carece de un dominio citoplásmico, mientras que las otras contienen secciones de tamaños variados en el dominio medio de la molécula. Las dos isoformas más importantes son CD44H (hematopoyética), que se asocia a las células mesenquimatosas (por Ej. los leucocitos y células hematopoyéticas), y CD44E (R1), que está asociada activamente a la división de las células epiteliales (por Ej. queratinocitos)^{102, 103, 104, 105}.

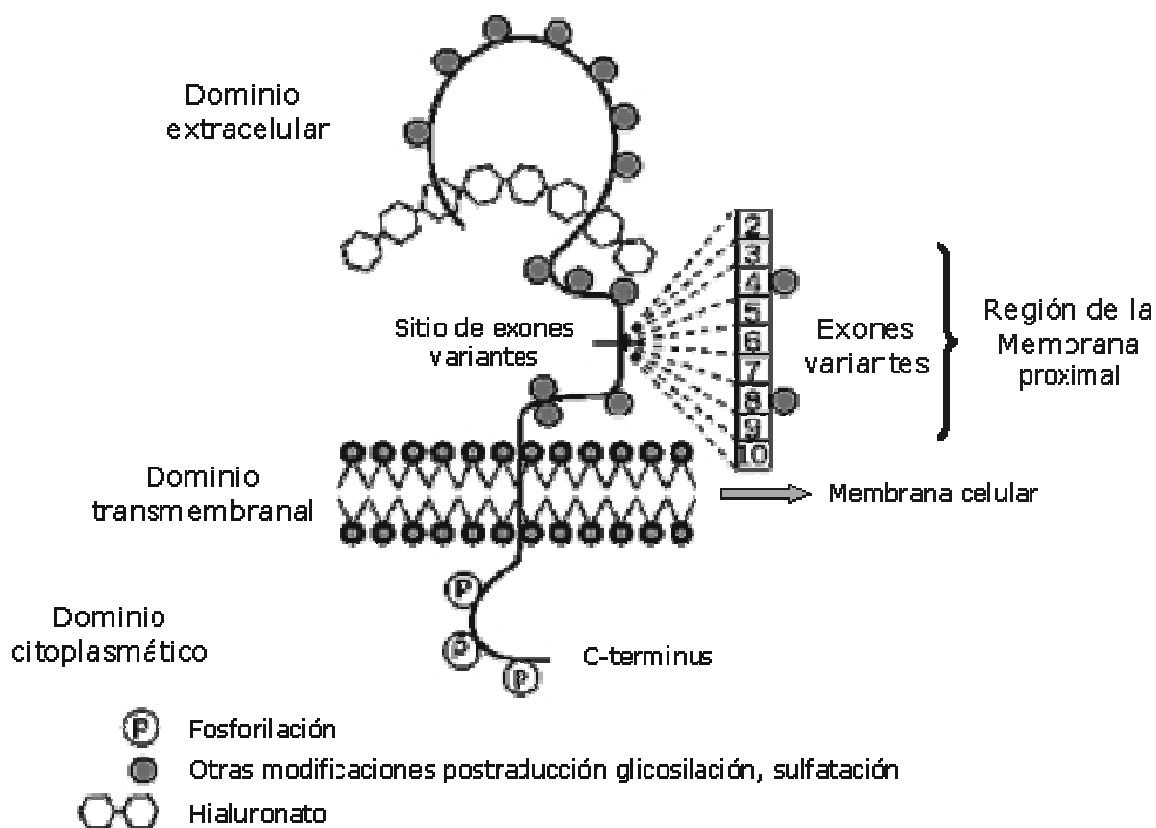


Fig.1 de Jane Bradbury. The Lancet, Volume 359, Number 9322

Estas dos isoformas se diferencian porque CD44H puede ligar a Hialuronato y mediar al linfocito hacia el blanco, mientras que CD44E no puede realizar ninguna de estas funciones^{106,107} (Tabla 2).

La expresión de la mayoría de las isoformas variantes que se han descrito, están altamente restringidas en tejidos normales, y algunas de ellas solo han sido encontradas en células malignas y líneas celulares derivadas de tumores¹⁰⁸.

Todas las isoformas de CD44 están altamente glicosiladas, conteniendo cadenas N y O ligadas del carbohidrato^{109, 110, 111}. Las variaciones en el grado de glicosilación dan lugar a formas moleculares múltiples de CD44. En el caso de la isoforma CD44H, la masa molecular se extiende desde 80 a 100 kDa, mientras que para la isoforma CD44E este valor es a partir de 100 a 160 kDa.

Tabla 2. Características de las diferentes isoformas de CD44

Isoforma* Cantidad	Característica estructural	Localización relativa
CD44H ^{1,2} Mayor	Forma mas común, proteína central es 37kDa	Células hematopoyéticas, leucocitos, y otras células mesodérmicas
CD44TR ³ Menor	Carece de dominio Citoplasmático	Hematopoyéticas y otras líneas celulares
CD44E (R1) ^{4,5} Mayor	132 aminoácidos insertos en el dominio medio	Epitelio y otras células
CD44E (R2) ^{V,6} Menor	69 aminoácidos insertos en el dominio medio	Epitelio, granulocitos y células mononucleares
CD44M ⁷ Desconocido	162 aminoácidos insertos en el dominio medio	Células de tumor maligno de ratas

*Las isoformas son identificadas usando la nomenclatura propuesta por Haynes y col. (1991).

Referencias:

¹, Goldstein y col. (1989)

², Stamenkovic y col. (1991)

³, Goldstein y Butcher (1990)

⁴, Picker y col, (1989)

⁵, Dougherty y col, (1991)

⁶, Cooper y col, (1992)

⁷, Gunthert y col, (1991)

Además, el condroitin y heparan sulfato se pueden ligar a CD44, aumentando aparentemente su masa molecular evidente a la gama 180-200 kDa⁴⁰.

Estudios bioquímicos del receptor CD44 han revelado que es una glicoproteína elíptica que está fosforilada y tiene una alta carga negativa^{112, 113}.

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano de elevado peso molecular, componente ubicuo del desarrollo de la matriz extracelular (ECM)¹¹⁴ que está integrado por la repetición de unidades de [glucuronic acid β -1-3N-acetylglucosamine β 1-4].

Según algunos autores, el hialuronato es el mayor componente de la matriz extracelular, y está naturalmente presente en cartílago y fluido sinovial¹¹⁵. Algunos de los efectos celulares y de matriz del hialuronato se establecen por medio de la vía de interacción con diferentes proteínas receptoras como las hialadherinas^{116, 117, 118}. Un miembro de este grupo es el receptor de superficie celular CD44¹¹⁹ que es una molécula de funcionamientos múltiples de la adherencia y se ha demostrado que participa en funciones diversas incluyendo la maduración del linfocito, autoguiado hacia el blanco y la activación, hematopoyesis, embriogénesis, apoptosis así como la adherencia primaria durante la migración del leucocito a los sitios de la inflamación^{120, 121, 122}.

La molécula CD44 se expresa en diversas células del organismo, tales como leucocitos y células parenquimatosas, incluyendo células endoteliales, epiteliales y células del músculo liso. Interacciona con ácido hialurónico, colágeno, laminina y fibronectina y existen datos que indican un papel importante en la migración de leucocitos del torrente sanguíneo hacia sitios de inflamación¹²³. Observaciones realizadas sugirieron que isoformas de CD44 están involucradas en una amplia variedad de eventos celulares mediados por hialuronato, como la migración proliferación y diferenciación, los cuales tienen un importante rol en la morfogénesis^{124, 125, 126}. El hialuronato está presente particularmente en matrices extracelulares alrededor de células migrando y proliferando durante el desarrollo embrionario, reparación tisular, inflamación y tumorigénesis¹²⁷.

CD44 activa a una variedad de células parenquimatosas como células endoteliales, células musculares lisas, fibroblastos y células epiteliales por estimulación de la proliferación y migración celular ambos de los cuales están asociados con la remodelación tisular^{128, 129}.

Tanto funcional como físicamente, la molécula CD44 se puede dividir en tres dominios importantes; el dominio citoplásmico, que media la interacción con el citoesqueleto; el dominio medio, que es responsable de guiar al linfocito hacia el blanco; y el dominio del amino-terminal, que liga hialuronato(HA).

La comparación entre diversas especies ha revelado que la secuencia del dominio amino-terminal y citoplásmico están altamente conservados, mientras que el dominio medio ha experimentado un índice más alto de cambio evolutivo¹³⁰.

El dominio extracelular de esta proteína de membrana integral esta variablemente enrollada, pero su parte distal siempre contiene un dominio que liga hialuronato¹³¹.

El CD44 interviene en numerosos procesos: diferenciación de antígenos durante la linfopoyesis; molécula de adhesión para las interacciones celulares linfocito-endotelio; remodelación de la matriz extracelular durante el desarrollo embriológico; como marcador potencial de malignidad y metástasis. Esta

versatilidad en funciones resulta de la expresión del CD44, glucoproteína polimórfica, cuyas isoformas difieren en la secuencia de aminoácidos y composición de carbohidratos. Las múltiples isoformas de CD44 forman parte de células con diferentes funciones, que operan en la vida fetal y adulta, en células normales y malignas, en el sistema inmune y otros tejidos.

Dos regiones (aminoácidos 21-45 y aminoácidos 144-167) del dominio extracelular del CD44 contiene los clusters de residuos básicos conservados y han sido implicados en la unión de HA (hialuronato). El dominio de unión al HA localizado en la región N-terminal del CD44 está presente en todas las isoformas^{132 133}. La región de la membrana proximal del CD44 está menos bien conservada y contiene el sitio de inserción los dominios de exones variantes. El exon es la región de un gen que contiene la información para producir la proteína del gen. Cada exon codifica una porción específica de la proteína completa. La terminal-C, dominio transmembranal y citoplasmático están altamente conservados, y el dominio citoplasmático contiene numerosos sitios de fosforilación que parecen regular la interacción de CD44 con el citoesqueleto.

Los mecanismos moleculares que están bajo la inducción de CD44 mediado por ligar hialuronato incluye: aumento de expresión; glicosilación variable; fosforilación; inclusión de exones variantes y sulfatación del receptor^{134 135 136}. La sulfatación podría ser un mecanismo por el cual es regulado el paso inicial del leucocito en la extravasación.

El rol para CD44 en la activación de macrófagos ha sido bien establecido, y estudios en curso involucran al CD44 en el reclutamiento de macrófagos¹³⁷.

Mediadores proinflamatorios como la Interleuquina-1 α también regula la expresión de CD44 en células endoteliales¹³⁸. Numerosos eventos proinflamatorios podrían estar regulados por CD44 bajo la interacción con hialuronato¹³⁹. CD44 se ha mostrado unido no solo a hialuronato, también al colágeno, fibronectina y osteopontina¹⁴⁰.

Ha sido demostrado que fragmentos de hialuronato inducen a mediadores proinflamatorios *in vitro*, incluyendo citoquinas IL - 1 β y TNF - α ¹⁴¹, miembros de las familias de quimiocinas CXC y CC^{142 143}, metalproteinasas de la matriz (MMPs)¹⁴⁴ y inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS)¹⁴⁵.

Los niveles altos de Ácido Hialurónico se encuentran en los sitios de inflamación, no solamente como alto peso molecular nativo de hialuronato (HMW-HA), sino también como los fragmentos de bajo peso molecular (LMW-HA) que se pueden generar de hialuronato nativo por las enzimas degradantes, o que pueden resultar de la síntesis de novo^{146, 147}. Entre los sitios de inflamación ocurre la acumulación de formas de bajo peso molecular de hialuronato. La actividad biológica de bajo peso molecular de hialuronato es diferente de las formas de elevado peso molecular de hialuronato. Mas notablemente, el hialuronato de bajo peso molecular tiene múltiples efectos proinflamatorios que no se observan en el hialuronato de elevado peso molecular. De hecho el hialuronato de elevado peso puede bloquear los efectos proinflamatorios de los de bajo peso molecular¹⁴⁸.

El hialuronato de bajo peso molecular presente en el tejido inflamado, también se encuentra en las inmediaciones del tejido tumoral. Autores como Yasuda, Nakano y otros sugieren que el hialuronato de elevado peso molecular inhibe funciones celulares, mientras que fragmentos de bajo peso molecular tienen efectos estimulantes, incluyendo producción de citoquinas de fibroblastos sinoviales y angiogénesis^{149, 150}.

Durante el proceso inflamatorio, la expresión de CD44 está sobrerregulada en células hematopoyéticas y parenquimatosas^{151, 152}.

El movimiento hacia la zona blanco de linfocitos puede requerir una interacción entre CD44 y otras moléculas de la adhesión en las superficies de linfocitos que preste especificidad a la interacción¹⁵³.

La expresión de hialuronato en las células de la microvasculatura endotelial está inducida por factor de necrosis tumoral (TNF) e Interleuquina 1 (IL-1). La expresión de hialuronato endotelial resulta en interacciones aumentadas CD44-adhesión dependiente. De este modo, la producción local de citoquina en el interior del lecho vascular inflamado aumenta la expresión de hialuronato sobre las células endoteliales y por esa razón posibilita las interacciones CD44-hialuronato y consecuentemente la extravasación de células inflamatorias.

Objetivo:

Determinar la presencia de CD44 en tejido pulpar inflamado en procesos clínicamente presentados como asintomáticos y sintomáticos

Objetivos particulares:

Determinar el nivel de CD44 relacionado con la gravedad de la enfermedad pulpar

Comparar el tejido inflamado con tejido pulpar de dientes sanos

Comparar cuantitativamente los niveles de expresión entre los procesos asintomáticos y sintomáticos

Comparar con resultados de pulpas sanas

Articular los resultados obtenidos al diagnóstico clínico

Hipótesis:

Altos niveles de CD44 podría ser indicativo de magnitud de la agresión y complejidad de la respuesta inflamatoria

Materiales y método:

Se trabajó con tejido pulpar de pacientes de la Cátedra de Cirugía, Servicio de Guardia nocturna y Endodoncia de la Facultad de Odontología de Rosario previo consentimiento informado (terceros molares y piezas dentarias sanas que se extrajeron por causas de ortodoncia, y piezas dentarias cuyo diagnóstico era de pulpitis irreversible, y se les realizó la endodoncia).

La edad de los pacientes varió entre 18 y 45 años. El sexo fue registrado, pero no fue analizado. En la selección de las piezas dentarias, éstas deberían tener el ápice completamente desarrollado.

Se consideraron como factores de exclusión a aquellos pacientes cuya edad estuvo por fuera de la anteriormente establecida y aquellos en los cuales de la Historia Clínica se desprendió alguna enfermedad sistémica, la cual podría incidir en la respuesta biológica de reparación. También quedaron excluidos aquellos pacientes cuyo diagnóstico no fue bien determinado o fue confuso. Otro factor de exclusión fue la falta de vitalidad pulpar.

El método de procedimiento de análisis estadístico aplicado fue el test de Kruskal Wallis y el Test de contrates múltiples.

A las piezas dentarias sanas extraídas se les practicaron dos ranuras longitudinales en caras opuestas con una pieza de mano de alta velocidad con refrigeración. Luego se les aplicó un escoplo para hueso para separar las partes, y la pulpa sana expuesta se removió con una cucharita de tipo Black.

Las muestras de tejido pulpar inflamado se extirparon con instrumental del tipo tiranervios.

Todas las muestras fueron conservadas hasta su procesamiento en solución fisiológica en tubos de Eppendorf y congeladas a -20° Centígrados.

Se utilizó tejido pulpar de 66 pacientes:

***10 sanos,**

***56 patológicos** de los cuales:

- * 23 fueron procesos cerrados o sintomáticos y**
- * 33 fueron procesos abiertos o asintomáticos.**

En las reacciones de inhibición de la aglutinación, la estimación de especificidad y título de anticuerpo se realizó en base a la competencia entre antígenos particulados y solubles por los sitios de combinación. Esto puede ser homologado a la reacción Receptor de Hialuronato (CD44)-Hialuronato.

En estas reacciones, se combina primero el ligando con el receptor soluble, inhibiendo luego la adhesión (aglutinación) indirecta de células indicadoras.

Para dosar el CD44 soluble (CD44s) se aplicó la técnica inmunohematológica de Inhibición de Aglutinación del Sistema CD44-Hialuronato que consta de dos etapas: en la primera, se neutraliza el CD44 soluble por su ligando (ácido hialurónico); en la

segunda etapa, se agrega una suspensión de eritrocitos previamente tratados con bromelina, portadores de CD44.

Interpretación: en presencia del CD44s, el ácido hialurónico es consumido, produciendo una disminución de la agregación de los eritrocitos.

Estandarización de las condiciones de trabajo

Puede esquematizarse el desarrollo del test de inhibición sobre el Receptor de Hialuronato (CD44) en dos etapas:

1-Etapa de inhibición: donde se conjuga el Hialuronato con su receptor (CD44). Constituyendo el sistema principal. Para ello se emplea un lisado del tejido pulpar en estudio, donde se desea investigar el Receptor de Hialuronato (CD44) soluble y una solución de Hialuronato.

2-Etapa de revelado: donde se manifiesta el efecto de adhesión de hialuronato remanente sobre las células indicadoras. (Sistema Secundario, constituido por eritrocitos del mismo grupo y Rh del paciente portadores de receptores de membrana para el Hialuronato)

Se determinó la dosis subaglutinante del ligando (Hialuronato) y se estandarizó la expresión de resultados.

Materiales Reactivos:

Bromelina (Sigma.B22.52)

PBS (buffer fosfato salino)

Hialuronato (Sigma –Aldrich.H 1876.Hyaluronic acid, sodium salt from human umbilical cord)

Anti-D (Wiener lab)

Material Biológico:

Lisado de tejido pulpar (donde se investigó los niveles de Receptor de Hialuronato (CD44) soluble)

Se utilizó tejido pulpar humano extraído de:

- a)-piezas dentarias que requerían la extracción dentaria por causas ortodóncicas
- b)-piezas dentarias que requerían tratamiento endodóntico.

Para obtener proteína soluble CD44, se congeló y descongeló de tres a cinco veces el tejido pulpar que se encontraba conservado en solución fisiológica en tubos de Eppendorf.

Células indicadoras

Se trabajó con eritrocitos del mismo grupo sanguíneo (ABO compatibles) y Rh del paciente, los cuales fueron bromelinizados.

Se adicionó un volumen y medio de Bromelina de concentración 5mg/ml, a un volumen de "coulot" de glóbulos rojos, se incubó 15 minutos a 37° centígrados. Luego los glóbulos rojos fueron lavados 3 veces en PBS y se suspendieron al 2% en el mismo medio.

Técnica de cuantificación de la inhibición de la adhesión (aglutinación)

Materiales:

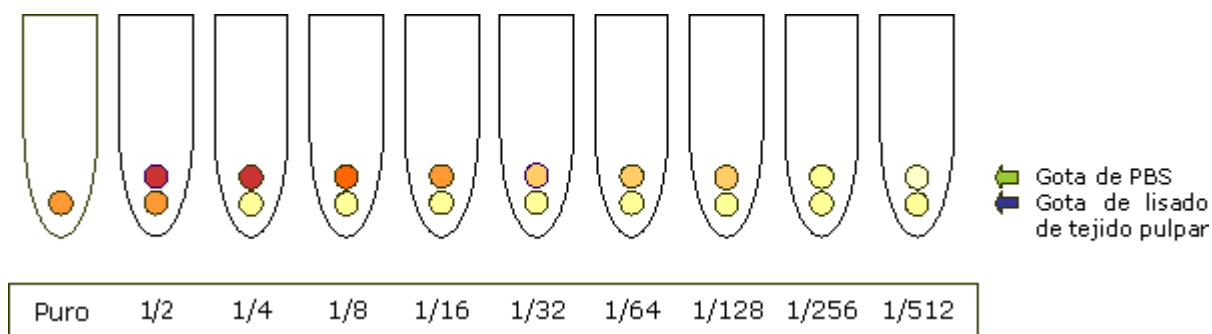
Se emplearon para el sistema principal:

- ➔ Solución de Hialuronato en dosis óptimas (1:128)
- ➔ Lisado de tejido pulpar
- ➔ Sistema revelador: eritrocitos bromelinizados del mismo grupo y Rh del paciente en estudio, suspendidos al 2% en PBS.
- ➔ Testigo positivo para la adhesión: solución de Hialuronato en dosis óptima +PBS+Sistema revelador.
- ➔ Testigo negativo: PBS+Sistema revelador

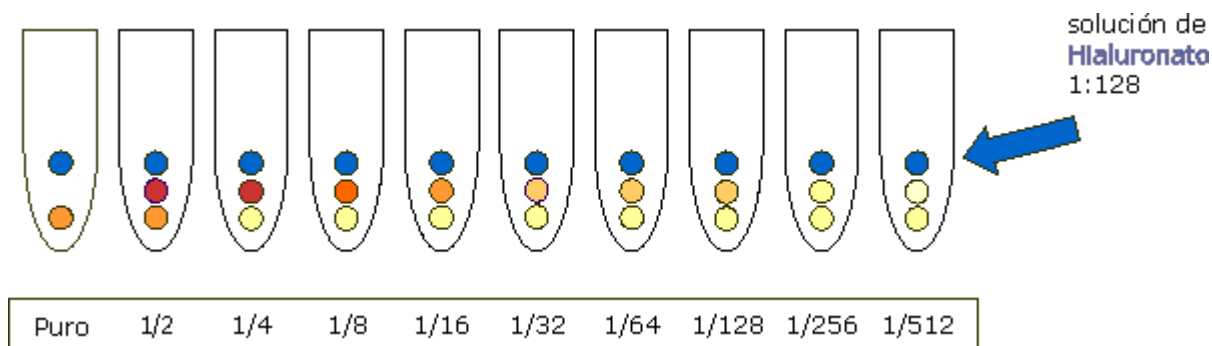
Método

En la primera etapa se enfrentaron volúmenes iguales de hialuronato en dosis subaglutinante, con lisado de tejido pulpar en diluciones geométricas y se incubó 15 minutos a 4° Centígrados.

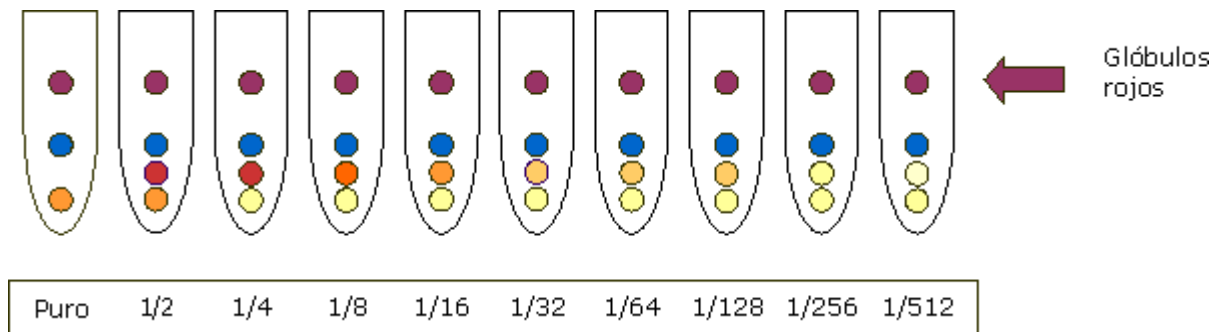
Luego se midió la actividad del hialuronato no neutralizado a través de su acción adherente (aglutinante) sobre el sistema revelador.



También se realizó una dilución del suero del paciente del mismo grupo de la muestra para utilizar como testigo.



Luego se le agregaron los glóbulos rojos bromelinizados y se incubó 24 horas en heladera.



Se realizó la lectura pasadas las 24 horas. Los resultados se expresaron en escore a los que luego se le aplicó el parámetro de sensibilidad.

Los resultados se expresaron por medio del escore, tal como lo señalan

Score 10	+++	1 a 3 aglutinados grandes.
Score 8	++	3 a 10 aglutinados.
Score 5	+	más de 10 aglutinados.
Score 2	±	trazas
Score 0	-	sin aglutinados

Resultados

Los resultados obtenidos se expresaron numéricamente con una expresión matemática empírica llamada: "parámetro de sensibilidad"¹⁵⁵ (α).

La agregación se evalúa en base al escore (E) que es una medida del grado de adhesión eritrocitaria que combinado con la dilución del suero (D), permite determinar el Parámetro de Sensibilidad (α), parámetro adimensional y definido por la expresión matemática

$$\alpha = \sum \frac{E_i}{D_i} \times 10^{-3}$$

Este valor debe ser calculado independientemente para cada tiempo de incubación (parámetro constante), sobre la base de los otros dos variables: título y escore.

La utilización del parámetro de sensibilidad, por su parte, posibilitó cuantificar con más precisión el aumento de sensibilidad de una técnica con relación a otra menos perfeccionada o estándar. Ver **Tabla 3**

Tabla 3

Identificación			Dilución geométrica									Parámetro de Sensibilidad
N° muestra	Procesos	Grupo Sanguíneo	Puro	2	4	8	16	32	64	128	256	α_s
9	A / A	A+	±	±	±	+	-	-	-	-	-	0,004125
10	A / A	O+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
14	A / A	O+	±	±	±	±	-	-	-	-	-	0,00375
15	A / A	O+	+	±	±	±	-	-	-	-	-	0,00675
16	A / A	A+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	0,008
22	A / A	A+	+	-	-	±	-	-	-	-	-	0,00525
35	A / A	O+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	0,006
37	A / A	O+	+	±	-	±	±	-	±	-	-	0,006375

38	A / A	O+	+	+	±	±	±	±	±	-	-	0,0084062
19	A / A	O+	+	+	+	+	±	±	-	-	-	0,0095623
25	A / A	O+	-	±	+	+	±	-	-	-	-	0,003
43	A / A	O+	±	+	±	-	-	-	-	-	-	0,005
2	A / A	O+	±	++	++	±	-	-	-	-	-	0.00825
40	A / A	O+	++	++	++	+	+	+	±	-	-	0,015125
48	A / A	A+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	0,0095
44	A / A	O+	+	+	+	±	±	±	±	-	-	0,009218
70	A / A	O+	++	++	+	+	±	+	±	±	-	0,0142031
71	A / A	O+	++	+	±	±	-	-	-	-	-	0,1125
60	A / A	O+	+	+	±	+	+	+	+	+	±	0,0092187
96	A / A	O+	+++	±	++ +	++	+	±	±	±	-	0,0149218
62	A / A	O+	+++	++	++	+	±	±	-	-	-	0,0288125
101	A / A	O+	+	+	++	±	+	±	-	-	-	0,0101406
99	A / A	O+	++	++	+	+	±	±	-	-	-	0,140625
98	A / A	A+	+	++	++	++	+	±	±	-	-	0,0124062
31	A / A	A+	++	++	+	+	±	±	-	-	-	0,140625
51	A / A	A+	-	±	+	+	±	-	-	-	-	0,003
73	A / A	A+	-	+	+	±	-	-	-	-	-	0,004
79	A / A	A+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	0,009
72	A / A	O+	++	+	++	++	++	±	±	±	-	0,0141093
77	A / A	O+	++	++	+	+	-	±	±	-	-	0,0139687
38	A / A	O+	+	++	++	+	±	±	-	-	-	0,01175

106	A/A	O+	+++	±	++ +	++	+	±	±	±	-	0,0149218
107	A/A	O+	+	+	+	+	±	±	-	-	-	0,0095623
109	A/A	O+	++	+	±	±	-	-	-	-	-	0,01125
39	C/S	O+	-	-	-	±	-	-	-	-	-	0,00025
47	C/S	O+	++	+	+	+	+	+	±	-	-	0,012875
41	C/S	O+	++	++	+	+	+	±	±	-	-	0,0142812
42	C/S	A+	++	++ +	++	+	±	+	±	±	-	0,015953
23	C/S	B+	+	++	±	+	+	+	±	-	-	0,010625
30	C/S	O+	+	+	±	+	+	±	±	±	-	0,0092343
11	C/S	A+	+	±	-	±	-	-	-	-	-	0,00625
12	C/S	O+	±	±	±	±	±	-	-	-	-	0,003875
17	C/S	A+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	0,008
21	C/S	A+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	0,008
33	C/S	A+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	0,0065
36	C/S	O+	+	+	+	±	±	±	±	±	-	0,0092343
45	C/S	A+	+	++	++	+	±	±	±	±	-	0,118593
50	C/S	O+	+	++	++	±	±	±	-	-	-	0,01143
46	C/S	O+	++	+	++	++	+++	+	±	±	-	0,0143281
5	C/S	O+	-	±	±	±	±	+	+	+	±	0,002152
80	C/S	O+	++	++	++ +	++	++	+	+	±	-	0,01625
81	C/S	A+	+	++	++	+	+	±	-	-	-	0,012
82	C/S	A+	++	++	+	++	+	±	+	-	-	0,0147031
110	C/S	O+	-	±	±	±	±	+	+	+	±	0,002152

112	C/S	A+	+	++	++	+	±	±	±	±	-	0,0118593
113	C/S	A+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	0,008
56	C/S	A+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	0,008
34	Sana	O+	+	±	±	-	-	±	±	-	-	0,006593
57	Sana	B+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	0,0065
58	Sana	A+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	0,003
102	Sana	O+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	0,003
103	Sana	O+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	0,002
105	Sana	O+	±	-	±	-	-	-	-	-	-	0,0025
115	Sana	A+	±	-	±	-	-	-	-	-	-	0,0025
116	Sana	A+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	0,0065
117	Sana	O+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	0,002

A/A: Abierto o asintomático

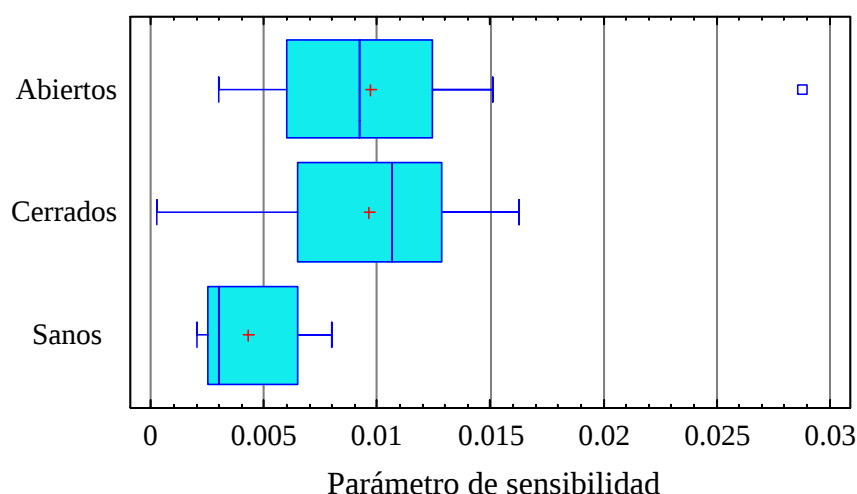
C/S: Cerrado o sintomático

Análisis

Resultados Estadísticos

Grupo	n	Media	Mediana	Rango intercuartil
Abiertos	33	0.00972864	0.0092187	0.0064062
Cerrados	23	0.00961137	0.010625	0.006375
Sanos	10	0.0042593	0.003	0.004

Box Plot Múltiple

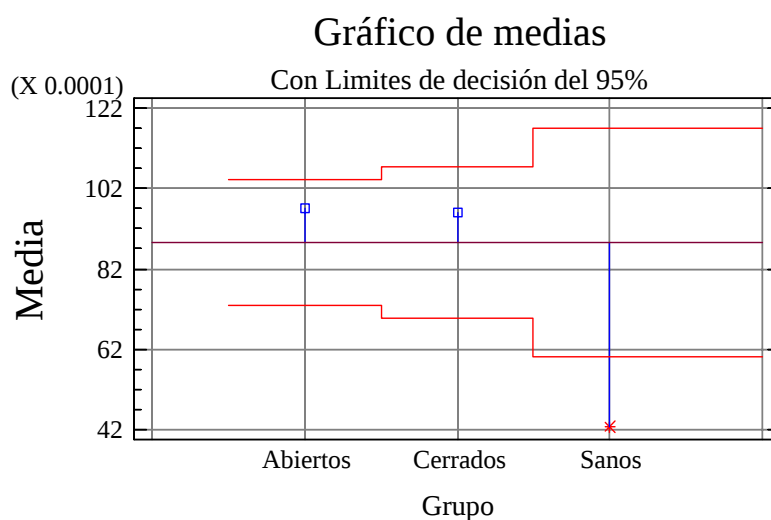


Luego de aplicado el test de Kruskal Wallis se concluyó que existen diferencias significativas en las medianas del parámetro de sensibilidad de los grupos considerados ($p=0.001$).

Luego de aplicado el test de contrates múltiples se concluyó que las medianas correspondientes a los grupos abiertos y asintomáticos y cerrados y sintomáticos son significativamente mayores que los correspondientes a los sanos ($p<0.05$), no habiendo diferencias significativas entre asintomáticos y sintomáticos.

Se trataron los especímenes de $N= 66$ pacientes, cuyas edades oscilaron entre los 18 y 45 años con un promedio de edad de 31,5 años. De ellos, 33 que representaban un 50% fueron procesos abiertos asintomáticos (**grupo A**), 23 que representaban un 34.84% fueron procesos cerrados sintomáticos (**grupo B**) y 10 que representaban un 15.15% fueron casos sanos (**grupo C**)

Del **grupo A**: 9 casos pertenecían al grupo sanguíneo A
 Del **grupo A**: 0 casos pertenecían al grupo sanguíneo B
 Del **grupo A**: 25 casos pertenecían al grupo sanguíneo O
 Del **grupo B**: 11 casos pertenecían al grupo sanguíneo A
 Del **grupo B**: 1 caso pertenecía al grupo sanguíneo B
 Del **grupo B**: 11 casos pertenecían al grupo sanguíneo O
 Del **grupo C**: 3 casos pertenecían al grupo sanguíneo A
 Del **grupo C**: 1 caso pertenecían al grupo sanguíneo B
 Del **grupo C**: 5 casos pertenecían al grupo sanguíneo O



Discusión

El daño pulpar es la consecuencia de la infección bacteriana que proviene del proceso de caries; de algún trauma ocasionado sobre la pieza dentaria o alguna acción iatrogénica que actúa sobre la misma.

En las últimas décadas se le ha dedicado un tiempo considerable al estudio de la biología de la pulpa y esto ha conducido a importantes avances en el conocimiento de la reparación en el tejido pulpar. En el comienzo de un nuevo milenio, el uso de las moléculas biológicas para el desarrollo de nuevas modalidades restaurativas en odontología clínica está basado en tecnologías que emergen de la visión molecular y la biología celular.

En el presente estudio se ha demostrado que la expresión del receptor de hialuronato (CD44) está sobrerregulada en tejido pulpar de pacientes con procesos inflamatorios sintomáticos y asintomáticos. Estos procesos inflamatorios que ocurren en el tejido pulpar son extremadamente complejos. Los cambios inflamatorios en la pulpa dental están acompañados por una amplia variedad de mediadores químicos. Se produce vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y extravasación leucocitaria, que son mediadas por muchos mediadores endógenos tales como quininas, prostaglandinas y neuropéptidos.

En la matriz dentinaria se han detectado varios factores de crecimiento tales como PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas), VEGF (Factor Vascular Endotelial de Crecimiento), FGF-2 (Factor de Crecimiento de Fibroblasto) y EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico). Estos mediadores se hallan presentes en la dentina luego de una injuria como estímulos mecánicos, químicos o por caries y es probable que desempeñen un papel importante en las respuestas inflamatorias y cicatrización del tejido pulpar dañado.

Cuando la pulpa es afectada e invadida por sustancias tóxicas como bacterias y sus productos, ésta reacciona inflamándose produciéndose una hiperemia, hasta que llega al límite de su capacidad defensiva, la inflamación progresa y se produce una pulpitis. Cuando la congestión, la infiltración celular y el edema se hacen presentes, se produce compresión de la circulación sanguínea del resto del tejido pulpar que rodea a la zona afectada. Además durante el proceso inflamatorio se produce el estancamiento de la sangre y se producen cambios reológicos, caracterizados por agregación eritrocitaria, aumento de la viscosidad sanguínea. También se produce un aumento de las concentraciones de dióxido de carbono y disminución de pH en la sangre. El elevado nivel de dióxido de carbono CO₂ se produce por la dificultad de eliminación de los productos de desecho en los tejidos¹⁵⁶.

Si existe comunicación directa entre el tejido pulpar y la cavidad de caries, se produce un proceso inflamatorio abierto, generalmente asintomático, caracterizado histológicamente por tejido inflamatorio con células de la fase aguda como los

leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos). Clínicamente no hay dolor, pero puede manifestarse una leve respuesta sintomática a la exploración, o la masticación. La cavidad de caries está cubierta por una escara de tejido necrótico, bacterias muertas, detritus, que aíslan a la pulpa de la cavidad de caries.

Si no existe una comunicación directa entre la pulpa dental y la cavidad de caries, el proceso inflamatorio es cerrado, sintomático, con presión intrapulpar elevada. En general el paciente puede localizar la pieza afectada y responder positivamente a los estímulos como el frío, calor, presión, dulces, en forma espontánea o provocada.

Histológicamente, el proceso inflamatorio crónico se caracteriza por la presencia de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, fibroblastos, angioblastos y fibras¹⁵⁷.

Todos estos cambios en el metabolismo local generan la vasodilatación del área adyacente y la extensión gradual de la inflamación.

La distribución del receptor CD44 fue estudiada por Mohamadzadeh y col. en diferentes tejidos, tanto normales como patológicos, incluyendo células endoteliales activadas de pequeños vasos sanguíneos¹⁵⁸, tejido embrionario, tumores, pero no ha sido estudiado en el tejido pulpar dental humano.

Según Borland y col. la expresión de la mayoría de las isoformas variantes de la molécula de CD44 que se han descrito, están altamente restringidas en tejidos normales, y algunas de ellas solo han sido encontradas en células malignas y líneas celulares derivadas de tumores¹⁵⁹.

En este trabajo se estudió y se demostró la presencia del CD44 en tejido pulpar humano de una población de 66 pacientes a los que se los dividió en tres grupos, según el diagnóstico clínico:

- a. un primer grupo sano o control,
- b. un segundo grupo de procesos abiertos asintomáticos y
- c. un tercer grupo de procesos cerrados sintomáticos.

Los pacientes incluidos en el presente estudio fueron comprendidos en edades desde 18 y hasta los 45 años. El sexo, si bien fue registrado en la ficha de recolección de datos del paciente, no fue tenido en cuenta para el análisis en relación con las distintas patologías. Para la selección de las piezas dentarias, éstas debieron tener el ápice completamente desarrollado, ya que no se analizaron piezas con ápices inmaduros, incompletamente desarrollados, lo cual podría aportar mayor información o abrir nuevas líneas de investigación futura.

El grupo sanguíneo y factor de cada paciente también fue registrado, pero no fue tomado como una variable a analizar. Para poder realizar el análisis de la presencia del receptor CD44, se requiere enfrentar una suspensión de eritrocitos del mismo grupo y factor del paciente analizado.

El estudio de la distribución de esta molécula de adhesión en el tejido pulpar dental se realizó para establecer el patrón de expresión bajo condiciones normales *in vitro* comparándolo con condiciones patológicas.

Este estudio demostró que los niveles del receptor CD44-hialuronato están aumentados en pulpitis diagnosticadas como irreversibles, tanto sintomáticas como asintomáticas en contraste con las pulpas clínicamente sanas.

La interacción CD44-HA ha sido involucrada en enfermedades autos inmunes y cánceres, y han sido estudiadas intensamente en los últimos años¹⁶⁰.

Ha sido demostrado que el CD44 es una molécula de adhesión, que participa en la migración leucocitaria hacia los sitios de inflamación^{161 162} y que también induce a los mediadores proinflamatorios^{163, 164}. La producción local de citoquina en el interior del lecho vascular inflamado aumenta la expresión de hialuronato sobre las células endoteliales y por esa razón posibilita las interacciones CD44-hialuronato y consecuentemente la extravasación de células inflamatorias.

El Hialuronato, el ligando para CD44, es un componente importante del fluido sinovial, sustancia fundamental, y juega un rol crítico en el mantenimiento de su viscosidad en el tejido normal.

La matriz extracelular o sustancia fundamental tiene como funciones rellenar el espacio existente entre las células, otorgando resistencia a la compresión y al estiramiento, también constituye un medio por donde circulan los nutrientes y se eliminan los desechos titulares. Constituye un espacio por donde migran las células cuando se desplazan de un punto a otro del tejido, y también viajan a través de ella señales bioquímicas provenientes de otras células.

Cuando se produce el proceso inflamatorio, el grado de polimerización de la sustancia fundamental decrece y queda expuesto al ataque de las bacterias y sus productos.

Los niveles de CD44 aumentan en proporción directa al grado de inflamación presente en el tejido pulpar. CD44 puede interactuar con hialuronato, colágeno y potencialmente otras moléculas del estroma que permite a los linfocitos migrar a través de la matriz extracelular.

Durante el proceso inflamatorio en la pulpa se produce degeneración de las proteínas de la matriz extracelular, y ésta requiere de la actividad de distintas endopeptidasas, enzimas proteolíticas que son indispensables para la degradación de la matriz extracelular, cuyo principal componente de dicha matriz es el hialuronato.

Otros datos de estudios *in vitro* recientes ya han implicado interacciones CD44-HA en asma y aterosclerosis. Fue demostrado que CD44 regula el reclutamiento y la función de leucocitos involucrados en aterosclerosis y asma, incluyendo a los macrófagos, células T y eosinófilos. Además CD44 está expresado y regula la función de células parenquimatosas a las que están dirigidas en estas enfermedades, por ejemplo CD44 está inducido sobre células vasculares de la

túnica muscular y podría mediar su proliferación y migración hacia la íntima de las lesiones de aterosclerosis¹⁶⁵.

Las interacciones CD44-Hialuronato pueden promover la inflamación a través de múltiples mecanismos, Puré y Cuff en su trabajo de investigación han propuesto que el balance entre estos múltiples mecanismos determinan las consecuencias en su totalidad tiene en la progresión y resolución de la respuesta inflamatoria local, reparación tisular y cicatrización¹⁶⁶.

Inicialmente el reclutamiento de leucocitos involucra el "rolling" o rodamiento de leucocitos activados a lo largo del endotelio vascular, lo que conduce a la formación de interacciones de adhesión adicionales que median una unión firme, y luego se produce la migración transendotelial. La adhesión primaria puede estar mediada por selectinas y sus ligandos¹⁶⁷. Las citoquinas y quimiocinas producidas localmente en los sitios de inflamación pueden activar rápidamente al CD44 sobre las células T. Además la activación de CD44 expresado en la superficie de células endoteliales estimuladas por citoquinas proporciona un sitio de acoplamiento para hialuronato¹⁶⁸.

En un estudio realizado por Oksala y col. investigaron la expresión de hialuronato durante la cicatrización de mucosa humana. El área de epitelio por debajo de la herida contenía nuevas fibras colágenas sintetizadas y el tejido de granulación era fuertemente positivo tanto para Hialuronato como para CD44, sugiriendo que influyen sobre la migración y diferenciación de los queratinocitos durante la reepitelización¹⁶⁹.

Formas de CD44 de varias medidas han sido descritas en varios tipos celulares^{170,171,172,173}, y activa a una variedad de células parenquimatosas como por ejemplo a las células endoteliales, células musculares lisas, fibroblastos y células epiteliales mediante la estimulación de proliferación celular y migración celular; ambos están asociados en la remodelación tisular^{174,175}.

CD44 también liga miembros de la metaloproteinasas de la matriz (MMP); familia de proteasas que degradan la matriz extracelular en los sitios de inflamación y de ese modo podría jugar un rol en la remodelación tisular¹⁷⁶.

La degradación de los componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno y proteoglucanos está regulada por una familia de endopeptidasas dependientes de zinc llamadas MMPs o metaloproteinasas de la matriz¹⁷⁷. Su actividad está regulada en parte por su interacción con Inhibidores Tisulares de metaloproteinasas de la matriz. Se ha informado que fueron halladas actividades colagenolíticas y elastinolíticas en pulpas necróticas, mientras que ninguna actividad enzimática fue detectada en pulpas sanas¹⁷⁸.

En estudios previos realizados por Shin y Gusman, informaron que numerosas metaloproteinasas de la matriz (MMPs) tales como MMP-1, MMP-2, MMP-3 Y MMP-9, están implicadas en la destrucción del tejido pulpar^{179, 180}. Se cree que MMP-1 (colagenasa-1) es la enzima clave involucrada en la degradación de la triple

hélice de colágenos tipo I y III¹⁸¹. La actividad de MMP-1 está regulada en parte por TIMPs (Inhibidores tisulares de metaloproteinasas de la matriz) los cuales pueden formar un complejo estequiométrico 1:1 con una MMP-1 inactivada. Por lo tanto el equilibrio entre MMP-1 como de otras MMPs y las TIMPs (Inhibidores Tisulares de metaloproteinasas de la matriz) pueden jugar el rol más importante en la remodelación del tejido conectivo.

MMP-3 (estromelisina-1) es capaz de adherirse a numerosos componentes de la matriz extracelular como al colágeno tipo IV, V y IX, fibronectina y laminina¹⁸². En estudios previos fue demostrada la expresión de MMP-3 en cultivos de odontoblastos y células de la pulpa dental¹⁸³. El aumento de niveles de MMP-3 en pulpitis aguda y lesiones periapicales comparada con pulpas sanas, también fue informado¹⁸⁴. Autores como Shin y col. han informado niveles elevados de algunas MMPs en pulpa inflamada y lesiones periapicales. La concentración de MMP-1 estaba significativamente aumentado en pulpitis agudas y crónicas y también en lesiones periapicales. Concentraciones elevadas de MMP-2 y MMP-3 han sido asociadas con pulpitis agudas y lesiones periapicales en comparación con tejidos sanos¹⁸⁵.

Se ha demostrado que numerosas citoquinas son inducidas durante la respuesta inflamatoria en pulpa dental humana. Esto incluye IL-1 α (Interleuquina 1 α), IL-1 β (Interleuquina 1 β), IL-6 (Interleuquina 6), IL-8 (Interleuquina 8), IL-10 (Interleuquina 10), TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral) y miembros de la familia de factores de crecimiento de hueso morfogénico^{186, 187}.

Aunque numerosos estudios *in vitro* han contribuido a comprender la importancia de CD44 en la inducción de eventos proinflamatorios, no se sabe con certeza si estos mecanismos están presentes en el ser vivo, pero la sensibilidad de la técnica de cuantificación de la inhibición de la adhesión (aglutinación) aplicada en el presente estudio, permitió demostrar la presencia de receptores de Hialuronato (CD44) solubles en el lisado de tejido pulpar, donde se observó un poder inhibitorio.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observaron diferencias significativas de ambos grupos de procesos inflamatorios pulpares al compararlo con los casos sanos. En las pulpas sanas se pudo inferir que su presencia es prácticamente muy baja o inexistente¹⁸⁸, coincidiendo con la bibliografía, en la cual se describe la presencia de dicha molécula en estadios tempranos de desarrollo embriológico con una amplia expresión, la cual disminuye a medida que los tejidos maduran, volviendo a expresarse cuando alguna noxa atraviesa las barreras defensivas del organismo, para permitir el rodamiento leucocitario y el pasaje de células inflamatorias al espacio extravascular desencadenando de esta forma el proceso inflamatorio¹⁸⁹.

Se han identificado células dendríticas pulpares, que si bien no pueden identificar específicamente a antígenos extraños proporcionan señales necesarias para activar a células específicas como los linfocitos T, que combinados con otros

tipos celulares y mediadores químicos desplegarán la respuesta inmune específica de la pulpa dental¹⁹⁰.

Todos estos cambios en el metabolismo local generan la vasodilatación del área adyacente y la extensión gradual de la inflamación.

Según Haynes y col. formas de CD44 de varias dimensiones han sido descritas en varios tipos celulares^{191, 192}. De este modo, la producción local de citoquina en el interior del lecho vascular inflamado aumenta la expresión de hialuronato sobre las células endoteliales y por esa razón posibilita las interacciones CD44-hialuronato y consecuentemente la extravasación de células inflamatorias.

Se cree que la degradación del colágeno de la matriz extracelular juega un rol clave en la destrucción tisular durante la inflamación pulpar.

Se puede aseverar que a mayor expresión de la molécula de CD44 representaría de alguna manera la iniciación de los procesos inflamatorios y el comienzo de la destrucción de la matriz extracelular o sustancia fundamental del tejido pulpar.

También podría pensarse que en los procesos inflamatorios crónicos, donde la organización del tejido de granulación intenta neutralizar a la noxa y organiza a las células de la reparación, justifica que los resultados obtenidos revelaron niveles ligeramente inferiores del receptor CD44.

Conclusiones

CD44 representa una familia de las proteínas de transmembrana que realizan una variedad de funciones. Durante el desarrollo embrionario, CD44 puede jugar un papel dominante en la morfogénesis y organogénesis con la degradación localizada de hialuronato. En el adulto, CD44 media la adherencia del linfocito guiado hacia el blanco, y de la célula de hialuronato-dependiente. Es posible que en el futuro sean descubiertas funciones adicionales.

Con el presente trabajo se concluye que este modelo puede ser aplicado a tejido pulpar sano e inflamado.

Con los resultados obtenidos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pulpitis sintomáticas y asintomáticas, cuando fueron comparadas con el tejido pulpar sano, y cuando se compararon ambos grupos entre sí, se pudo observar una ligera o mínima diferencia entre ambos grupos patológicos, con mayor expresión en el grupo cerrado.

Para articular los resultados obtenidos con la clínica, a partir del presente estudio se concluye que en procesos agudos la expresión de esta molécula es mayor que en los procesos pulpares crónicos, en los cuales hay mas destrucción y desorganización tisular y que en el tejido pulpar sano su presencia es casi inexistente.

Estos hallazgos se apoyan en la hipótesis que CD44 está presente en el tejido pulpar dental inflamado y podría modular la respuesta inflamatoria y jugar así un rol en la remodelación tisular.

Esto introduciría otras alternativas terapéuticas para la protección pulpar, ya que si fuera colocado sobre una pulpa expuesta por un proceso de caries, en una pieza dentaria que presenta una hiperemia con ausencia de sintomatología espontánea, intervendría en la remodelación tisular y podría actuar como iniciador de la reparación del tejido pulpar.

Esta técnica podría ser aplicada como indicador del grado de inflamación del tejido pulpar, y se podría inferir que si el hialuronato es aplicado localmente sobre el tejido pulpar expuesto podría actuar para modular la respuesta inflamatoria de la pulpa, lo que daría origen a nuevos estudios de investigación.

Fotos



Foto 2:
Muestra de tejido pulpar en tubo de Eppendorf



Foto 3:
Dilución de Hialuronato



Foto 4:
Presentación comercial del Ácido Hialurónico



Foto 5:
Dilución geométrica con el lisado pulpar



Foto 6:
Dilución geométrica con el hialuronato



Foto 7:
Lavado de glóbulos rojos



Foto 8:
Incubación de glóbulos rojos con Bromelina



Foto 9:
Solución de glóbulos rojos bromelinizados al 5%

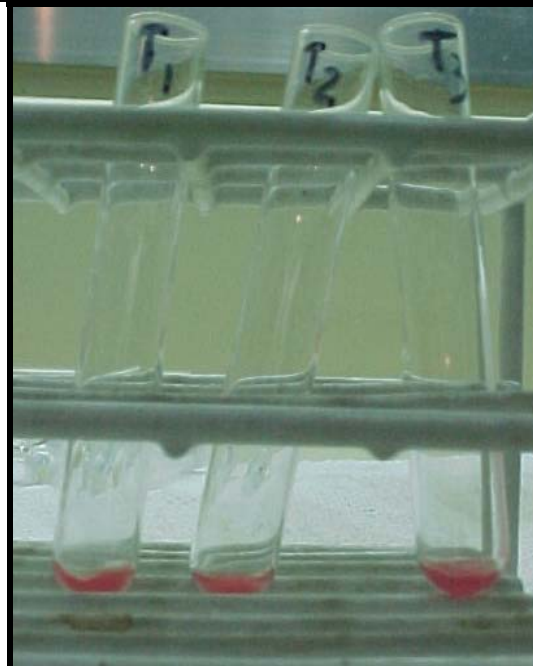


Foto 10:
Testigos de la bromelinización

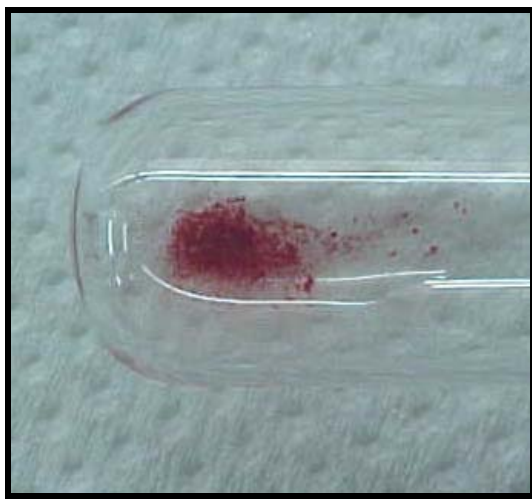


Foto 11:
Bromelinización Positiva (+)



Foto 12:
Bromelinización negativa (-)



Foto 13:
Colocación de glóbulos rojos bromelinizados

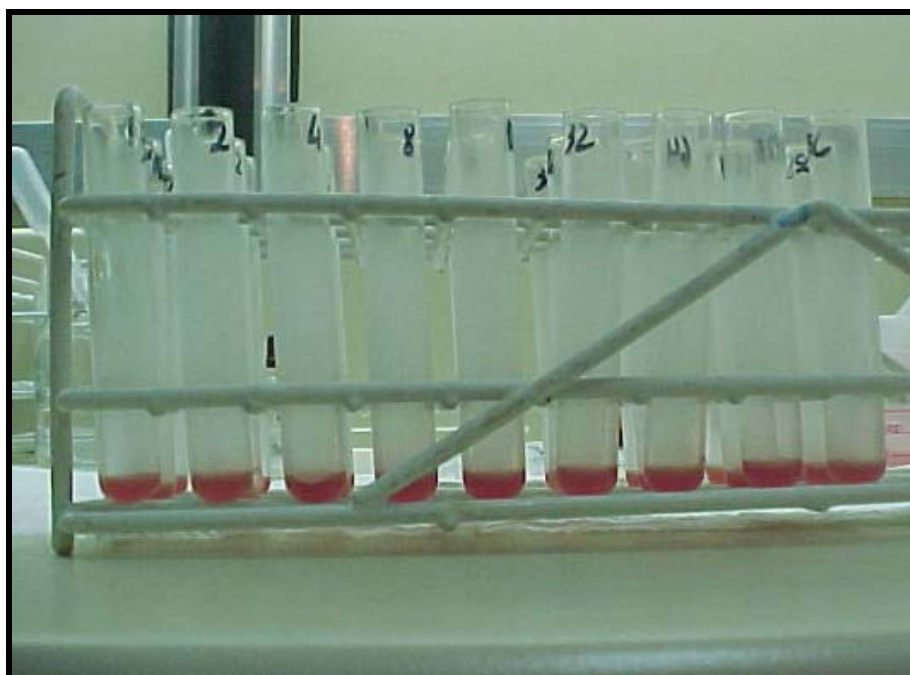


Foto 14:
Tubos preparados para incubar

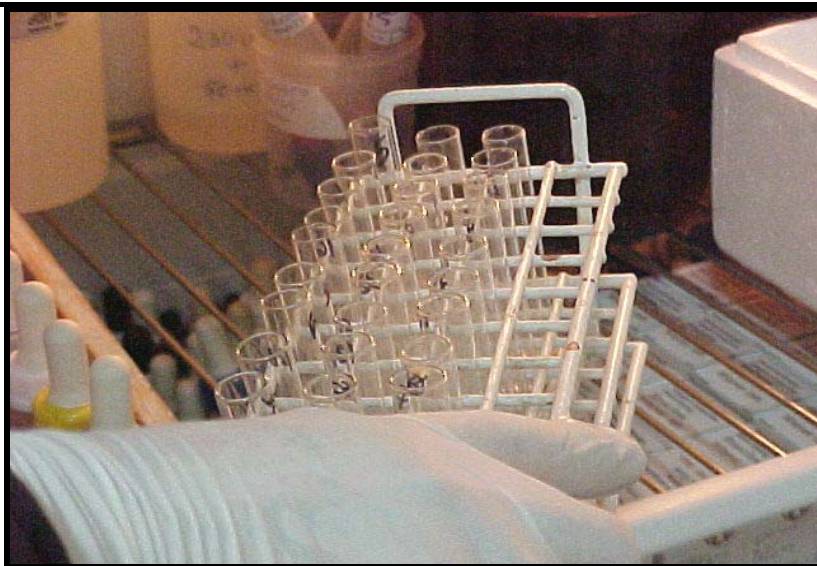


Foto 15:
Se incubó 12 horas en heladera

Lectura pasadas las 24 horas



Foto 16:
Reacción positiva (+)

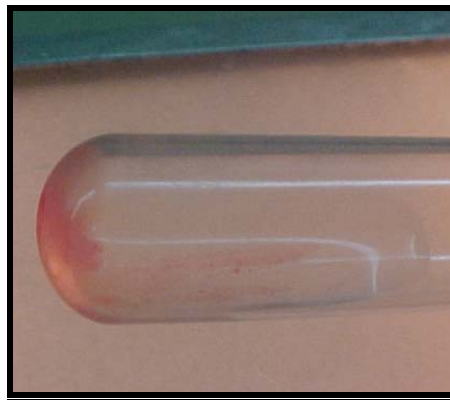


Foto 17:
Reacción negativa (-)

FICHA DE INCLUSION-EXCLUSION PARA LA RECOLECCION DE LAS MUESTRAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE ODONTOLOGIA-CARRERA DEL DOCTORADO

Operador: _____

Fecha: __ / __ / ____

DATOS PERSONALES DEL PACIENTE

APELLIDO: _____ NOMBRE: _____ EDAD: _____

DOMICILIO: _____ TELEFONO: _____ CODIGO POSTAL: _____

NACIONALIDAD: _____ DNI: _____ SEXO: _____

PROFESION: _____ OBRA SOCIAL: _____ GRUPO SANGUINEO: _____

Historia Médica

MEDICO DE CABECERA: _____

ASOCIADO A SERVICIO DE URGENCIA SI NO

¿DEBIO SER HOSPITALIZADO EN LOS ULTIMOS 2 AÑOS? SI NO

¿ESTA BAJO TRATAMIENTO MEDICO POR ALGUNA ENFERMEDAD? SI NO ¿CUAL? _____

¿TUVO ALGUNA VEZ REACCIONES ALERGICAS, COMO ASPIRINAS, PENICILINAS, ANESTESIAS? SI NO

CUANDO SE LASTIMA O EXTRAE UN DIENTE ¿LE SANGRA EXCESIVAMENTE Y NECESITA ATENCION PARA DETENER EL SANGRADO? SI NO

PROBLEMAS CARDIACOS	HEPATITIS	ARTRITIS
PRESION SANGUINEA ALTA	ULCERA DE ESTOMAGO	ALTERACIONES NERVIOSAS
PRESION SANGUINEA BAJA	DOLORES DE CABEZA	TOMA MEDICAMENTO
		SI NO CUAL _____
ENFERMEDADES VENEREAS	SIDA	SE CANSA AL SUBIR O BAJAR ESCALERAS

FIEBRE REUMATICA	EPILEPSIA	FUMA BEBE
PACIENTE MUJER ¿EMBARAZADA?		SINUSITIS
CANCER	DIABETES	¿HA RECIBIDO TERAPIA RADIANTE?
		SI NO

Historia Clínica

DIAGNOSTICO PULPAR: _____

PIEZA DENTARIA A EXTRAER: _____ SANA CON PATOLOGIA

GRUPOS

- ➡ pulpitis infiltrativa, con sintomatología
- ➡ pulpitis ulcerosa secundaria, asintomáticos
- ➡ pulpas sanas

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA SOMETERSE A TRATAMIENTO ODONTOLÓGICO

Por la presente reconozco que la Od. Gabriela Pisterna y/o ayudante de su elección me han informado del tipo de tratamiento que debe efectuarse en base al diagnóstico realizado. A su pedido he manifestado todo lo que conozco respecto de mi salud.

Se me ha explicado en términos comprensibles para mí, y reconozco haber entendido acabadamente, la tarea propuesta. De la misma manera se me ha informado de los riesgos y complicaciones que puedan surgir, y ante la posibilidad que aparezcan consecuencias no previsibles, dada la capacidad que le reconozco los aceptaré como inherentes y propios a la tarea a realizar. Comprendo el uso correcto de la aparatología así como el cumplimiento de las indicaciones del profesional, hacen al éxito del tratamiento y son mi exclusiva responsabilidad.

También se me han descrito todas las variantes y sus correspondientes posibilidades y riesgos y, en ejercicio de mi derecho, considerándome suficientemente informado/a al respecto, opto por lo que se ha detallado en esta ficha, firmando de conformidad la misma. Autorizo a proveer los servicios o tratamientos adicionales que considere razonables, incluyendo, aunque no limitados a ellos, la administración de anestesia local, prácticas radiológicas, otros métodos de diagnóstico, y someter los desechos biológicos resultantes del tratamiento a procesos experimentales que no involucren mi salud.

FIRMA

ACLARACION

Bibliografía

- ¹ Cohen, S., Burns, R., 2002. Vías de la pulpa. Mosby. Cap. 11. pág. 405 y 406.
- ² Butler WT. Dentin matrix proteins. European Journal of Oral Sciences 1988 ;106 (Suppl.1), 204-10.
- ³ Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, y col. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. J Periodontal Res 1999;34:425-30.
- ⁴ Odell L, Baumgartner J, Xia T, David L. Detection of collagenase gene in *P. Gingivalis* and *P. endodontalis* from endodontics infections. J Endodon 1999; 25(8):555.
- ⁵ Cohen, S., Burns, R., 2002. Vías de la pulpa. Mosby. Cap. 11. pag. 566-567.
- ⁶ Bajorath J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. Proteins 2000; 39: 103-11.
- ⁷ Pure, E., Cuff, C.A. A crucial role for CD44 in inflammation. Trends in Molecular Medicine 2001.; 7: 213-21.
- ⁸ Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B., CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 1990;61, 1303-1313.
- ⁹ Felszeghy, S., Módos, L., Tammi, M., Tammi, R. The distribution pattern of the hyaluronan receptor CD44 during human tooth development. Arch. Oral Biol. 2001;46, 939-945.
- ¹⁰ Stanley HR, y col. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and death tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age, J pathol. 1983;12:257.
- ¹¹ Martinez, JP: 1998. Inmunología. Ediciones Pirámide, SA. Cap 8. Pág 150.
- ¹² Cichy, J., Puré, E. Oncostatin M and transforming growth factor- β 1 induce post-translational modification and hyaluronan binding to CD44 in lung-derived epithelial tumor cells. J. Biol. Chem. 2000; 275:18061-18069.
- ¹³ Levesque, M.C., B.F. Haynes, and W.T. Lewis. Cytokine induction of the ability of human monocyte CD44 to bind hyaluronan is mediated primarily by TNF- and is inhibited by IL-4 and IL-13. J. Immunol. 1997;159:6184-6194.
- ¹⁴ Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med 1993;4:197-250.
- ¹⁵ Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontal Res 1993;28:500-10.
- ¹⁶ Owen C, Campbell E. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. J Leukoc Biol 1999; 65: 137-50.
- ¹⁷ Cappuccino C, Sheenan R. The biology of dental pulp. In Shaw JH, Sweeney EA, Cappuccino CC, Meller SM, editors textbook of oral biology. Philadelphia: WB Saunders;1978.
- ¹⁸ Avery JK. Structural elements of the young and normal human pulp. Oral Surg 1971;32:113.
- ¹⁹ Zach I, Topal R, Cohen G. Pulpal repair following operative procedure: radioautographic demonstration with tritiated thymidine. Oral surg 1969;28:587.
- ²⁰ Han SS. 1968. The fine structure of cells and intercellular substance in the dental pulp. En: Finn SB, editor. Biology of the dental pulp organ. Birmingham (AL) University of Alabama Press.
- ²¹ Weinstock M, Leblond CP. Synthesis, migration and release of precursor collagen odontoblasts as visualized by radioautography after H-proline administration. J Cell Biol 1974;60:92.
- ²² Torneck CD. Intracellular destruction of collagen in the human dental pulp. Arch Oral Biol 1978;23: 745.
- ²³ Watts A, Paterson RC. Migration of materials and microorganisms in the dental pulp of dogs and rats. Journal of Endodontics 1982;8:53.
- ²⁴ Kogushi M, Nakamura S, Kishi Y y Col. A study of leukocyte extravasation in early inflammatory changes in the pulp. Journal of Endodontics 1988;14: 475.
- ²⁵ Zaczrisson BU. Mast cells in human dental pulp. Arch Oral Biol 1971;16:555.
- ²⁶ Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. Journal of Endodontics 1984;10:250.

-
- ²⁷ Ingle; Bakland. 2002 Endodoncia. 5º Edición. ED Mc Graw Hill. Cap 2 .Pág 35-37.
- ²⁸ M. Jontell, T. Okiji, U. Dahlgren and G. Bergenholtz . Immune defense mechanisms of the dental pulp. Critical Rev in Oral Biol & Medicine, Vol 9, 179-200, Copyright © 1998 by International & American Associations for Dental Research
- ²⁹ Griffin CJ, Harris R. Ultrastructure of collagen fibrils and fibroblasts of the developing human dental pulp. Arch Oral Biol 1966;11:656.
- ³⁰ Barbanell RL, Lian JB, Keith DA. 1978. Structural proteins of the connective tissues. En Shaw JH, Sweeney EA, Cappuccino CC, Meller SM, editors. Textbook of oral biology. Philadelphia:WB Saunders p.419.
- ³¹ Embery G. Glycosaminoglycans of human dental pulp. J Biol Buccale . 1976; 4:229
- ³² Torneck CD. En Ten Cate AR, editor. 1980. Dentin-pulp complex. Oral histology. Toronto:CV Mosby Co. P 169.
- ³³ van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. Arch Oral Biol 1983;28:339-45.
- ³⁴ Weine F. En Tratamiento endodóncico. 5º Ed. Harcourt Brace. 1997. Cap 3. Pág. 96
- ³⁵ Geneser F. 2000. En Histología sobre bases moleculares. Ed. Panamericana. 3º Edición. Cap 8, Pág 198.
- ³⁶ Mangkornkarn C, Steiner JC. In vivo and in vitro glycosaminoglycans from human dental pulp. J Endod. 1992;18: 327.
- ³⁷ Geneser F. 2000. En Histología sobre bases moleculares. Ed. Panamericana. 3º Edición. Cap 8, Pág 204.
- ³⁸ Lee J.Y y Spicer A.P. (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule. Curr. Opin. Cell. Biol. 12, 581-586.
- ³⁹ Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C., y Seed B. (1990), CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 61, 1303-1313
- ⁴⁰ Cohen S, Burns R. 2002. En Vías de la pulpa. Ed. Mosby. Cap 11 Pág 422-423
- ⁴¹ Zerlotti E. Histochemical study of the connective tissue of the dental pulp. Arch Oral Biol 1964;9:149.
- ⁴² Stanley HR, Ranney RR. Age changes in the human dental pulp. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1962;15:1396-404.
- ⁴³ Boling LR. Blood vessels of the dental pulp. Anat Rec 1942;82:25
- ⁴⁴ Cutright DE, Bhaskar SN. Pulpal vasculature as demonstrated by a new method. Oral Surg. 1969;27:678
- ⁴⁵ Kim S, et al. Iovenous distribution of hemodynamic parameters in the rat dental pulp. Microvasc Res. 1984;27:28
- ⁴⁶ Dahl E, Mjor IA. The fine structure of the vessels in the human dental pulp. Acta Odontol Scand. 1973;31:223
- ⁴⁷ Tjäderhane L. The mechanism of pulpal wound healing. Aust Endod J 2002;28:68-74.
- ⁴⁸ Isokava S. Über das lymph System des Zahnes. Z Zellforsch 1960; 52:140
- ⁴⁹ Johnsen D, Johns D. Quantitation of nerve fibers in the primary and permanent canine and incisor teeth in man. Arch Oral Biol 1978;23:825
- ⁵⁰ Edwall L, Kindlova M. The effect of sympathetic nerve stimulation on the rate of disappearance of tracers from various oral tissues. Acta Odont Scand. 1971;29:387
- ⁵¹ Tönder KH, Naess G. Nervous control of blood flow in the dental pulp in dogs. Acta Physiol Scand 1978;104:13
- ⁵² Olgart LM. The role of local factors in dentin and pulp in intradental pain mechanisms. J Dent Res 1985;64:572-8.
- ⁵³ Vongsavan N, Matthews B. Changes in pulpal blood flow and in fluid flow through dentine produced by autonomic and sensory nerve stimulation in the cat. Proc Finnish Dent Soc 1992;88(Suppl 1):491-7
- ⁵⁴ Bongenhielm U, Haegerstrand A, Theodorsson E, Fried K. Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. Regul Pept 1995;60:91-8.
- ⁵⁵ Kerzoudis NP, Olgart L, Edwall L. Involvement of substance P but not nitric oxide or calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation in rat incisor pulp and lip. Arch Oral Biol 1994;39:769-74.

-
- ⁵⁶ Fristad I. Dental innervation: functions and plasticity after peripheral injury. *Acta Odontol Scand* 1997;55:236–54.
- ⁵⁷ Lein P, Guo X, Hedges AM, Rueger D, Johnson M, Higgins D. The effects of extracellular matrix and osteogenic protein-1 on the morphological differentiation of rat sympathetic neurons. *Int J Dev Neurosci* 1996;14:203–15.
- ⁵⁸ Male DK, Champion B, Cooke A, Owen M. 1991. Cell troffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London-New York.
- ⁵⁹ Roit IM, Brostoff J, Male DK. 1992. *Inmunología*. 2ª ed. Barcelona: Salvat.
- ⁶⁰ Ishizaka, K. Most cell activation an mediator release. *Progress in Allergy*, 1984; vol. 34.
- ⁶¹ Koo, CH; Sherman, JW; Band, L; Goetzl, E. Molecular diversity of human leukocyte receptors. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leucotriene Res.* 1989; 191 (19)
- ⁶² David, P; Bailey, PJ; Glodenberg, MM; Ford-Hutchinson, AW. The role of the arachidonic acid products in pain and inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 1984; 335 (2)
- ⁶³ Ishizaka, K. Most cell activation an mediator release. *Progress in Allergy*, 1984; vol. 34
- ⁶⁴ Roit, IM; Brostoff, J; Male, DK. 1992. *Inmunología*. 2ª Ed. Barcelona: Salvat.
- ⁶⁵ Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 1989: 721-733.
- ⁶⁶ Gallin, JI; Goldstein, IM; Snyderman, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press, New York, 1988
- ⁶⁷ Snyderman, R; Pike, MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 1984; 257 (2). 1984
- ⁶⁸ Larsen, GL; Herison, PM. Mediators of inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 1983; 335 (1)
- ⁶⁹ Roit, IM; Brostoff, J; Male, DK: *Inmunología*. 2ª Ed. Barcelona: Salvat, 1992
- ⁷⁰ Male, DK; Champion, B; Cooke, A; Owen, M. Cell troffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London-New York 1991.
- ⁷¹ Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 1989: 721-733
- ⁷² Snyderman, R; Pike, MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 1984; 257 (2).
- ⁷³ Roit, IM; Brostoff, J; Male, DK. 1992. *Inmunología*. 2ª Ed. Barcelona: Salvat.
- ⁷⁴ Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 1989: 721-733.
- ⁷⁵ Chu SC, Tsai CH, Yang SF, y col. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod* 2004;30:704–7.
- ⁷⁶ O'Boskey FJ Jr, Panagakos FS. Cytokines stimulate matriz metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture. *J Endo* 1998;24:7-10.
- ⁷⁷ Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77:1622-9.
- ⁷⁸ Hahn CL, Falkler WA, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endodon* 1989;15:20-6.
- ⁷⁹ 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;40:609-14.
- ⁸⁰ Pitzalis C, Kingsley G, Haskard D, Panashi G. The preferential accumulation of helper-inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion. *Eur J Immunol* 1988;18:1397-404.
- ⁸¹ Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-6.
- ⁸² Abbs AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-93.
- ⁸³ Hahn CL, Falkler WA, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J of Endodon* 1989; 15:20-6.
- ⁸⁴ Weine F. En *Tratamiento endodónico*. 5º Ed. Harcourt Brace. 1997. Cap 3. Pág131
- ⁸⁵ Bartolazzi, A et al. Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluran. *J. Cell Biol.* 1996;132, 1199-1208

-
- ⁸⁶ Underhill C. CD44: The hyaluronan receptor. *J. of Cell Science* 1992;103:293-298
- ⁸⁷ Haynes BF, Teklen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44: a molecule involved in leukocyte adherence and T cell activation. *Immunol. Today* 1989;10:423-428
- ⁸⁸ Haynes, B. F., Liao, H.-X. and Patton, K. L. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44); Multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* 1991;3, 347-350.
- ⁸⁹ MacKay, C. R., Maddox, J. F., Wijffels, G. L., MacKay, I. R. And Walker, I. D. Characterization of a 95,000 molecule on sheep leucocytes homologous to murine Pgp-1 and human CD44. *Immunol.* 1988;65,93-99
- ⁹⁰ Omary, M. B., Trowbridge, I. S., Letarte, M., Kagnoff, M. F. And Isacke, C. M. Structural heterogeneity of human Pgp-1 and its relationship with p85. *Immunogenetics* 1988; 27, 460-465.
- ⁹¹ Picker, L. J., Toyos, J. D. L., Telen, M. J., Haynes, B. F. and Butcher, E.C. Monoclonal antibodies against the CD44 [In(Lu)-related p80], and Pgp-1 antigens in man recognize the Hermes class of lymphocyte homing receptors. *J. Immunol.* 1989;142, 2046-2051.
- ⁹² Gallatin, W. M., Wayner, E. A., Hoffman, P. A., St. John, T., Butcher, E. C. and Carter, W. G. Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 1989;4654-4658.
- ⁹³ Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. and Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990;61, 1303-1313.
- ⁹⁴ Kincade P.W. Zheng Z...Katoh S. Y Hanson L. 1997. The importance of cellular environment to function of the CD44 matrix receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 635-642.
- ⁹⁵ Goldstein LA, Zhou, D.F., Picker, C.N, Minty, R.F., Bargatze, J.F, Ding, y Butcher E.C. A Human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link protein. *Cell.* 1989;56:1063-1072.
- ⁹⁶ Stamenkovic, I. Amiot, M., Pesando. J.M, Seed,B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell.* 1989;56:1059-1062.
- ⁹⁷ Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K, Tanaka Y. CD44: functional relevance to inflammation and malignancy. *Histol Histopathol* 2002; 17: 945-50.
- ⁹⁸ Culty, M., Miyake,K., kincade, P., Silorski, E., Butcher, C., Underhill, C.,. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cel surface glycoproteins. *The J. Of Cell Biol.* 1990; V111:2765-2774
- ⁹⁹ Martinez, JP: 1998. *Inmunología*. Ediciones Pirámide, SA. Cap 10. Pág 179
- ¹⁰⁰ Goodfellow, P.N., Banting, G., Wiles, M.V., Tunnaccliffe, A., Parker., Solomon, E., Dalchau, R., Fabre, J.W. The gene, MIC 4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2 is on human chromosome 11. *Eur. J. Immunol.* 1982;12, 659-663
- ¹⁰¹ Haynes, B.F., Liao, H.-X and Patton, K.L.I. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44); multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* 1991;3, 347-350
- ¹⁰² Goldstein, L.A., Zhou, D.F.H., Picker, L.J., Minty, C.N., Bargatze, R.F., Ding, J.F., Butcher, E.C. A human lymphocyte homing receptor, yhe Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 1989;56, 1063-1072
- ¹⁰³ Alho, A.M. Underhill, C.B. The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J. Cell Biol.* 1989;108, 1557-1565.
- ¹⁰⁴ Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amist, M. and Seed, B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronan-bearing cells. *EMBO J.* 1991;10, 343-347.
- ¹⁰⁵ Brown, T., Bouchard, T., St. John, T., Wagner, E. and Carter, W. G. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparin-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell Biol.* 1991;113, 207-221
- ¹⁰⁶ Berg, E. L., Goldstein, L. A., Jutila, M. A., Nakache, M., Picker, L. P., Streeter, P. R., Wu, N. W., Zhou, D. and Butcher, E. C. Homing receptors and vascular addressins: Cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol. Rev.* 1989; 108, 5-18.
- ¹⁰⁷ Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amist, M. and Seed, B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronan-bearing cells. *EMBO J.* 1991;10, 343-347.
- ¹⁰⁸ Borland, Ross, Guy. Forms and functions of CD44. *Immunology.* Volume 93 Issue 2 Page 139 - February 1998

-
- ¹⁰⁹ Brown, T., Bouchard, T., St. John, T., Wagner, E. and Carter, W. G. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparin-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell Biol.* 1991;113, 207-221.
- ¹¹⁰ Carter, W. G. and Wayner, E. A. Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J. Biol. Chem.* 1988;263, 4193-4201.
- ¹¹¹ Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M. and Butcher, E. C. Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J. Immunol.* 1988;141, 1615-1623.
- ¹¹² Culty, M., Miyake, K., Kincade, P.W., Silorski, E., Butcher, E.C y Underhill, C.B. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 1990;111:2765-2774.
- ¹¹³ Underhill, C.B. The interaction of hyaluronate with the cell surface: the hyaluronate receptor and the core protein. In the biology of hyaluronan. T.C. Laurent, editor. Wiley, Chichester. CIBA Found. Symp. 1989;143:87-106.
- ¹¹⁴ Toole, B.P., 1991 Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In: Hay, E.D (Ed.), *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd edn. Plenum, New York, pp.305-341.
- ¹¹⁵ Bajorath J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* 2000; 39: 103–11.
- ¹¹⁶ Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990;61,1303-1313.
- ¹¹⁷ Hall, C.L., Wang, C., Lange, L.A., Turley, E.A. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J. Cell Biol* 1994;126,575-588.
- ¹¹⁸ Knudson, W., Aguiar, D.J., Hua, Q., Knudson, C.B. CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis. *Exp. Cell Res* 1996;228, 216-228
- ¹¹⁹ Entwistle, J., Hall, C.L., Turley, E.A. HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* 1996;61, 569-577.
- ¹²⁰ Siegelman M, DeGrendele H, Estess P. Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 315–21.
- ¹²¹ Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci* 2002; 39: 527–79.
- ¹²² Johnson P, Maiti A, Brown K, Li R. A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 455–65.
- ¹²³ Martinez, JP: 1998. *Inmunología*. Ediciones Pirámide, SA. Cap 10. Pág 188
- ¹²⁴ Gakunga, P., Frost, G., Shuster, S., Cunha, G., Formby, B., Stern, R. Hyaluronan is a prerequisite for ductal branching morphogenesis. *Development* 1997;124, 3897-3997.
- ¹²⁵ Goodison, S., Urquidí, V., Trin, D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* 1999 ;52,189-196.
- ¹²⁶ Zhu, D., Bourguignon, L.Y.W. Interaction between CD44 and the repeat domain of ankyrin promotes hyaluronic acid-mediated ovarian tumor cell migration. *J. Cell. Physiol.* 2000 ;183, 182-195.
- ¹²⁷ Fraser, J.R. et al. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Inter. Med.* 1997;242, 27-33
- ¹²⁸ Nonogaki, K. et al. Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2c} receptor gene. *Mat. Med.* 1998;4, 1152-1156
- ¹²⁹ Horton, M.R. et al. Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J. Immunol.* 1999;162, 4171-4176
- ¹³⁰ Goldstein, L. A. and Butcher, E. C. Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM (CD44) in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Immunogenetics* 1990;32, 389-397.
- ¹³¹ Borland, G., Ross, J.A., Guy, K. Forms and functions of CD44. *Immunology* 1998;93, 139-148.
- ¹³² Liao, H-X. et al. N-terminal and central regions of the human CD44 extracellular domain participate in cell surface hyaluronan binding. *J. Immunol.* 1995;155 (Suppl.3) 3938-3945
- ¹³³ Bajorath, J. et al. Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site. *J. Biol. Chem.* 1998;273, 338-343
- ¹³⁴ Katoh, S. et al. Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J. Exp. Med.* 1995;182, 419-429

-
- ¹³⁵ Lesley, J. et al. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J. Exp. Med.* 1995;182, 431-437
- ¹³⁶ Puré, E. Y col. Defective phosphorylation and hyaluronate binding of CD44 with point mutations in the cytoplasmic domain. *J. Exp. Med.* 1995;181, 55-62
- ¹³⁷ Hodge-Dufour, J. Et al. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunol.* 1997;159,2492-2500
- ¹³⁸ Fitzgerald, K.A. and O'Neill, L.A. Characterization of CD44 induction by IL-1: a critical role for Erg-1. *J. Immunol.* 1999;153, 3440-3449
- ¹³⁹ Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K, Tanaka Y. CD44: functional relevance to inflammation and malignancy. *Histol Histopathol* 2002; 17: 945-50.
- ¹⁴⁰ Weber, G.F. et al. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 1996;271, 509-512.
- ¹⁴¹ Noble P, Lake F, Henson P, Riches D. 1993. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor- α -dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest*; 91: 2368-77.
- ¹⁴² Horton M, McKee C, Bao C, Liao F, Farber J, Hodge-Dufour J et al. Hyaluronan fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines Mig e interferon-inducible-protein-10 in mouse macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273: 35088-94.
- ¹⁴³ Horton M, Burdick M, Strieter R, Bao C, Noble P. Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages. *J Immunol* 1998; 160: 3023-30.
- ¹⁴⁴ Horton M, Shapiro S, Bao C, Lowenstein C, Noble P. Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J Immunol* 1999; 162: 4171-6.
- ¹⁴⁵ Mc Kee C, Lowenstein C, Horton M, Wu J, Bao C, Chin B et al. Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 8013-8
- ¹⁴⁶ Poole A, Dieppe P. Biological markers in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1994; 3: 7-31.
- ¹⁴⁷ Generini S, Matucci-Cerinic M, Partsch G, Stancikova M, Pignone A, Kontinen YT et al. Evidence for hyaluronan production in the air pouch model in rats. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19:271-6.
- ¹⁴⁸ Hodge-Dufour, J. Et al. Inhibition of IFN- γ induced IL-12 production : a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of TNF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95, 13806-13811
- ¹⁴⁹ Yasuda M, Nakano K, Yasumoto K y Tanaka Y. CD44 Functional relevante to inflammation and malignancy. Review. *Histol Histopathol* (2002) 17: 945-950.
- ¹⁵⁰ Savani R.C, Cao G, Pooler P.M, Zaman A. Zhou Z. Y De Lissar H. (2001) Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 276. 36770-36778.
- ¹⁵¹ Budd, R.C. et al. Distinction of virgin and memory T lymphocytes: stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J. Immunol.* 1987 ;138, 3120-3129.
- ¹⁵² Foster L.C. et al. Regulation of CD44 gene expression by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1998 ;273, 20341-20346
- ¹⁵³ Dougherty, G. J., Lansdrop, P. M., Cooper, D. L. and Humphries, R. K. Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 1991;174, 1-5.
- ¹⁵⁴ Goudemand, M y Marsalet, I.D. Elements d'immuno-hématologie, Ed. Med. Flammarion, 1967 ;1^a ed. París.
- ¹⁵⁵ Valverde de Rasia. J.R, Rasia. R.J. Soluciones de baja fuerza iónica en las pruebas de Coombs para la detección de anticuerpos anti-Rh. *Acta bioquímica clínica Latinoamericana*, 1982; Vol XVI, N°2, 297-305,. ISSN03251-2957
- ¹⁵⁶ Cohen, S., Burns, R. Vías de la pulpa. Mosby. 2002. Cap. 15. pag.589
- ¹⁵⁷ Weine F. En Tratamiento endodóncico. 5ª Ed. Harcourt Brace. 1997. Cap 3. Pág131
- ¹⁵⁸ Mohamadzadeh, M., De Grendele, H., Arizpe H., Estess, P., Siegelman, M. *J Clin. Invest.* 1998; 101,97-108
- ¹⁵⁹ Borland, Ross, Guy. Forms and functions of CD44. *Immunology.* Volume 93 Issue 2 Page 139 - February 1998

-
- ¹⁶⁰ Puré E, Cuff C. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends in Mol Med*. 2001. Vol 7 N°5, 213-221
- ¹⁶¹ DeGrendele H, Estess P, Siegelman M. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 1997; 278: 672-5.
- ¹⁶² Stoop R, Gal I, Glant TT, McNeish JD, Mikecz K. Trafficking of CD44 deficient murine lymphocytes under normal and inflammatory conditions. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2532-42.
- ¹⁶³ Mc Kee C, Lowenstein C, Horton M, Wu J, Bao C, Chin B et al. Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 8013-8.
- ¹⁶⁴ Stoop R, Gal I, Glant TT, McNeish JD, Mikecz K. Trafficking of CD44-deficient murine lymphocytes under normal and inflammatory conditions. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2532-42
- ¹⁶⁵ Foster, L.C. et al. Regulation of CD44 gene expression by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 α in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1998. 273, 20341-20346
- ¹⁶⁶ Puré E, Cuff C. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends in Mol Med*. 2001. Vol 7 N°5, 213-221
- ¹⁶⁷ Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994. 76, 301-314
- ¹⁶⁸ Estess, P. et al. Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity. *J. Clin. Invest.* 1998. 102, 1173-1182
- ¹⁶⁹ Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, INRI P, Larjava H. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 1995. 43 (2):125-35
- ¹⁷⁰ Haynes BF, Hale LP, Denning SM, Le PT, Singer KH: The role of leukocyte adhesion molecule in cellular interaction : implications for the pathogenesis of inflammatory synovitis. *Springer Semin Immunopathol* 1989. 11:163-185.
- ¹⁷¹ Stamenkovic, I. Amiot, M., Pesando, J.M, Seed, B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell.* 1989;56:1059-1062.
- ¹⁷² Goldstein LA, Zhou, D.F., Picker, C.N, Minty, R.F., Bargatze, J.F, Ding, y Butcher E.C. A Human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link protein. *Cell.* 1989;56:1063-1072.
- ¹⁷³ Jalkanen S, Jalkanen M, Bargatze R, Tammi M, Butcher EC: Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J Immunol* 1988,141:1615-1623.
- ¹⁷⁴ Lazaar, A.L. et al. T Lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induces smooth muscle cell DNA synthesis. *J. Exp. Med.* 1994.180,807-816
- ¹⁷⁵ Horton, M.R et al. Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J Immunol.* 1999. 162,4171-4176
- ¹⁷⁶ Yu, Q. Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000.14, 163-176
- ¹⁷⁷ Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
- ¹⁷⁸ Morand MA, Schilder H, Blondin J, Stone PJ, Franzblau C. Collagenolytic and elastinolytic activities from diseased human dental pulps. *J Endod* 1981;7:156-60.
- ¹⁷⁹ Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod* 2002;28:313-5.
- ¹⁸⁰ Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 2002;110:353-7.
- ¹⁸¹ Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
- ¹⁸² Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
- ¹⁸³ Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci* 2003;111:117-27.

¹⁸⁴ Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. J Endod 2002;28:313–5.

¹⁸⁵ Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. J Endod 2002;28:313–5.

¹⁸⁶ Fouad AF. Molecular mediators of pulpal inflammation. In: Hargreaves KM, Goodis HE, eds. Seltzer and Bender's Dental Pulp, Rev. ed. Chicago: Quintessence Publishing Co.;2002:247–79.

¹⁸⁷ McLachlan JL, Smith AJ, Sloan AJ, Cooper PR. Gene expression analysis in cells of the dentine-pulp complex in healthy and carious teeth. Arch Oral Biol 2003;48:273–83.

¹⁸⁸ Borland, Ross, Guy. Forms and functions of CD44. Immunology. Volume 93 Issue 2 Page 139 - February 1998

¹⁸⁹ Odell L, Baumgartner J, Xia T, David L. Detection of collagenase gene in P Gingivalis and P endodontalis from endodontics infections. J Endodon 1999;25(8):555.

¹⁹⁰ M. Jontell, T. Okiji, U. Dahlgren and G. Bergenholz. Immune defense mechanisms of the dental pulp. Critical Rev in Oral Biol & Medicine, Vol 9, 179-200, Copyright © 1998 by International & American Associations for Dental Research

¹⁹¹ Haynes BF, Teklen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44: a molecule involved in leukocyte adherence and T cell activation. Immunol. Today 1989;10:423-428.

¹⁹² Stamenkovic, I. Amiot, M., Pesando, J.M., Seed, B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. Cell. 1989;56:1059-1062.