

FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIAS

**DETERMINACIÓN DE LA SEVERIDAD DE PULPITIS
MEDIANTE ANÁLISIS INMUNOHISTOLÓGICO
Y COMPARACIÓN CON EL CUADRO CLÍNICO**

CONSTANZA CONTRERAS PINOCHET

**Proyecto de Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Tutor de Tesis:
Dr. Oliver Schmachtenberg**

Valparaíso-Chile

2021

**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIAS**

**DETERMINACIÓN DE LA SEVERIDAD DE PULPITIS
MEDIANTE ANÁLISIS INMUNOHISTOLÓGICO
Y COMPARACIÓN CON EL CUADRO CLÍNICO**

CONSTANZA CONTRERAS PINOCHET

**Proyecto de Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Tutor de Tesis:
Dr. Oliver Schmachtenberg**

Valparaíso-Chile

2021

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Coordinación de Post-Grado de la Facultad de Ciencias que

la Tesis de Magíster presentada por la candidata

CONSTANZA ANDREA CONTRERAS PINOCHET

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, en el examen de defensa de Tesis rendido el ___ de XXXXX de 2021

Director de Tesis:

- Dr. Oliver Schmachtenberg

Evaluadores:

- Prof. Dr. Agustín Martínez
- Prof. Dr. Pablo Muñoz.....
- Prof. Dr. Isaac García.....

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Eduardo Couve por ser el gestor de este proyecto, al Prof. Oliver Schmachtenberg por dirigirlo y a Bárbara Cádiz por su ayuda con el procesamiento de muestras y toma de imágenes. Gracias por su disposición, cordialidad y entrega.

A ANID por su apoyo financiero durante el desarrollo de este proyecto a través de la beca de magíster nacional.

Al la Universidad de Valparaíso y al Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso que nos facilitó sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

Al CESFAM Dr. José Symon Ojeda que nos permitió realizar la recolección de las muestras y a los pacientes que quisieron participar de este estudio.

FINANCIAMIENTO

Este Magíster se realizó con el financiamiento de:

ANID- Beca Nacional de Magíster

Folio 22201535

Fecha de inicio: 30-03-2020

y fue apoyado por

Proyecto FONDECYT No. 1210790

ÍNDICE

RESUMEN	7
MARCO TEÓRICO	8
Introducción	8
La estructura de la pulpa dental	11
Inervación de la pulpa dental y caries.....	13
El rol de la Célula de Schwann	15
Respuesta pulpar a lesiones de caries: Pulpitis	17
Macrófagos: Más que fagocitosis	20
Neutrófilos pulpaes: ¿NET o no NET?	22
Células dendríticas: centinelas de la interfase pulpodentinaria	23
IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos específicos.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
Muestras.....	26
Inmunohistoquímica e Imágenes.....	27
Análisis Cuantitativo y Estadístico.....	27
RESULTADOS.....	28
Caracterización del fenotipo de las Célula de Schwann en pulpitis irreversible	28
Análisis cualitativo de células de Schwann y células inmunes en pulpitis	31
Análisis cuantitativo de células de Schwann y células inmune en pulpitis	37
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIÓN	47
ANEXO	48
BIBLIOGRAFÍA	52

RESUMEN

Introducción: La inflamación de la pulpa dental por caries es una patología altamente prevalente, que produce dolor y es una de las principales causas de consulta dental de urgencia. Pocos estudios han correlacionado la clínica del cuadro con la histopatología del tejido. La interacción entre los terminales neuronales nociceptivos y las células inmunes son un aspecto relevante para proteger el tejido del daño y regular la respuesta inflamatoria, sin embargo, poco ha sido estudiado sobre la red glial que acompaña este proceso y su asociación al cuadro clínico.

Objetivo: Caracterizar morfológicamente el estado celular y molecular de células de Schwann y otros componentes neuroinmunes en pulpas diagnosticadas con pulpitis reversible e irreversible.

Metodología: 12 dientes humanos fueron extraídos por razones ajenas a este estudio. Cinco diagnosticados como pulpitis reversible, 5 como pulpitis irreversible y 2 controles. Los dientes fueron procesados para realizar inmunomarcaje y luego analizar las imágenes con microscopía confocal.

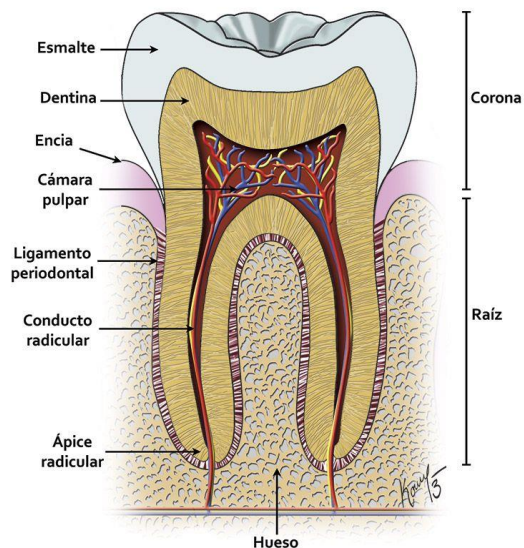
Resultados: Entre pulpitis reversible e irreversible sólo hubo diferencias estadísticamente significativas para el número de neutrófilos. Entre pulpitis irreversible y el grupo sano o control hubo diferencias significativas para el número de las células de Schwann, macrófagos y neutrófilos. Se observaron diferencias morfológicas en células de Schwann y macrófagos para ambos cuadros. Estos cambios se caracterizaron por la arborización de la célula de Schwann hacia la interfase pulpodentinaria junto a un fenotipo fusiforme o elongado de macrófagos. Además de un fenotipo arborizado, la célula de Schwann mostró un fenotipo fusiforme en pulpitis irreversible. También en pulpitis irreversible se destacó la presencia de neutrófilos y liberación de NETs (trampas extracelulares de neutrófilos).

Discusión: La pulpa tiene una compleja organización multicelular y la interfase pulpodentinaria se presenta como una verdadera barrera en la que células gliales e inmunes parecen distribuirse para detener el progreso de los patógenos. La aparición de la célula de Schwann junto a otras células inmunes crea una nueva perspectiva para la comprensión del rol de las células gliales y su activa participación en procesos como la inflamación pulpar. Además, considerar pruebas con biomarcadores como potencial examen complementario para el diagnóstico puede ser de gran valor ya que permitiría mejorar los métodos para determinar la condición inflamatoria de la pulpa.

MARCO TEÓRICO

Introducción

La caries dental es una enfermedad crónica altamente prevalente a nivel mundial y una de las principales causas de pérdida dentaria (Peres et al., 2019). Esta es una enfermedad multifactorial en la que el acceso frecuente a carbohidratos fermentables en la dieta conduce a un cambio en la población de microorganismos que se encuentran en la superficie dentaria conocida como biopelícula; pasando de una población microbiológica de baja cariogenicidad a una de alta cariogenicidad, más acidúrica y acidógena. Este proceso promueve la pérdida de minerales de los tejidos duros del diente, que con el tiempo, da como resultado una lesión cariosa (Fejerskov, 2004). Una vez que la progresión de esta patología compromete la dentina, genera inflamación en la pulpa dental -pulpitis- y, si esta no es capaz de resolverla, se produce la necrosis gradual del tejido y finalmente, pérdida ósea alrededor del ápice radicular del diente. La pulpitis es una condición sintomática, asociada a dolor y una de las principales causas por las que los pacientes buscan tratamiento odontológico de urgencia (Allareddy et al., 2014).



Anatomía general del diente y periodonto. <http://odonto-estudio.blogspot.com/2016/02/pulpa-dental.html?sref=pi&m=1>.

Detectar lesiones de caries por medios clínicos y radiográficos puede ser considerado sencillo, aunque determinar la profundidad de la lesión, la actividad, los efectos en la pulpa dental, la posibilidad de restaurar el diente junto con asegurar el pronóstico involucra un proceso mucho más complejo, por lo que las estrategias para remover el tejido comprometido han sido constantemente cuestionadas (Innes et al., 2016; Schwendicke et al., 2016).

Para obtener un diagnóstico del estado pulpar, la evaluación del paciente debe comenzar con una precisa historia del dolor, detallando si este se asocia a algún estímulo en particular como a cambios de temperatura o si es constante, de aparición espontánea e incluso produce alteraciones del sueño. La sintomatología relatada por el paciente es un indicador ampliamente aceptado del estado inflamatorio de la pulpa; síntomas leves se asocian a pulpitis reversible y sintomatología más severa y persistente indica que el proceso inflamatorio se ha hecho irreversible (Levin et al., 2009). Luego, se realiza el examen clínico y, en algunos casos, se indica una radiografía complementaria, la que generalmente señala si ya existe compromiso de los tejidos perirradiculares.

Las pruebas térmicas y eléctricas utilizadas en el examen clínico continúan siendo las más apropiadas, pero son crudas y no cuantitativas (Jespersen et al., 2014). Estas pruebas de sensibilidad forman parte del proceso diagnóstico en endodoncia y sirven para orientar al clínico acerca de la vitalidad de la pulpa. Aplicando estímulos fríos o calientes directamente sobre el diente, se produce una respuesta dolorosa que el paciente manifiesta y que sirve de guía para el clínico, sin embargo, la intensidad con que los pacientes perciben el estímulo es subjetiva y puede variar ostensiblemente. Por ejemplo, las pruebas que utilizan calor para imitar la sintomatología del paciente ofrecen una referencia, pero se ha observado que son poco precisas (Mainkar & Kim, 2018). Hasta ahora, una respuesta dolorosa al frío continúa siendo el síntoma más frecuente de pulpitis por el que los pacientes acuden a la consulta dental (Rechenberg, Held, et al., 2016), pero la capacidad de describir el continuo de la inflamación pulpar y el vínculo entre este estado inflamatorio y el potencial para reparar el tejido es bastante limitada. Debido a la falta de pruebas moleculares complementarias o menos cruentas disponibles en la actualidad, el color e intensidad del sangrado del tejido pulpar durante su exposición también pueden entregar información sobre la inflamación (Takashi Matsuo et al., 1996) y, por lo tanto, la capacidad de reparar luego del tratamiento.

La inflamación pulpar o pulpitis puede ser diagnosticada como pulpitis reversible o pulpitis irreversible de acuerdo a la sintomatología que presente el paciente. La primera hace referencia a un estado inflamatorio del tejido en el que aún es capaz de reparar si se lleva a cabo la terapia apropiada, generalmente la remoción del tejido contaminado por la lesión cariosa. En este caso, el dolor se resuelve dentro de segundos cuando se retira el estímulo frío o caliente. Por otro lado, se llama pulpitis irreversible cuando el proceso es más severo y el tejido ya no puede reparar, y si el diente no es tratado, el resultado será la necrosis y periodontitis apical. La pulpitis irreversible puede ser asintomática o sintomática. Que tome uno u otro camino ha sido atribuido a diferencias fisiopatológicas o a la adaptación de la pulpa a un proceso de inflamación de bajo grado (Michaelson & Holland, 2002), aunque hay pocos estudios que se hayan enfocado en dilucidar el origen de esta dicotomía. De cualquier forma, en la pulpitis irreversible sintomática, que es la que será tratada en este trabajo, el dolor suele ser severo, de alta intensidad y permanece a pesar de retirar el estímulo o incluso este puede ser de aparición espontánea (Goldberg, 2014; Levin et al., 2009).

Muchas veces, poder diferenciar con precisión ambos cuadros no suele ser tarea fácil para el clínico y el límite entre ambos diagnósticos resulta ser una línea difusa considerando las herramientas actuales disponibles para establecerlo. La importancia de determinar el diagnóstico

de la pulpa radica en el tratamiento que finalmente necesitará el diente sintomático. Un diagnóstico de pulpitis reversible, normalmente se resuelve eliminando la noxa, manteniendo la pulpa vital y haciendo una restauración. Por otro lado, la pulpitis irreversible tiene como tratamiento convencional la endodoncia o “tratamiento de conducto” donde se pierde completamente la vitalidad pulpar. Igualmente se han comenzado a desarrollar terapias más conservadoras como la terapia pulpar vital, donde se remueve parcialmente el tejido para intentar mantener la vitalidad del tejido (Aguilar & Linsuwanont, 2011). Lamentablemente, si el paciente no tiene los medios para realizar este tipo de tratamiento, su única alternativa será la exodoncia.

	Pulpitis Reversible	Pulpitis Irreversible
Sensibilidad o intensidad de la sensación dolorosa	Leve a moderada	Moderada a severa
Duración del dolor	Breve, dura pocos segundos Desaparece al retirar el estímulo térmico	Puede prolongarse Permanece al retirar el estímulo térmico
Aparición del dolor	Asociada al estímulo	Asociada al estímulo o de aparición espontánea
Frecuencia de aparición	Sólo asociado al estímulo	El dolor aumenta en frecuencia y puede ser constante
Localización	Localizado en el diente con la lesión	Localizado o irradiado hacia otros dientes o tejidos
Indicación de tratamiento	Restauración	Endodoncia Terapia Pulpar Vital Exodoncia
Percusión	Negativa	Puede ser positiva o negativa
Remisión síntomas	Inmediata al resolver la causa (caries)	Inicio de terapia de endodoncia o exodoncia
Sin tratamiento evoluciona a:	Pulpitis Irreversible	Necrosis Pulpar

Cuadro comparativo de las principales características a considerar para el diagnóstico diferencial entre pulpitis reversible e irreversible (Bjørndal et al., 2019; Levin et al., 2009; Zanini et al., 2017) Para efectos de este trabajo, nos referiremos sólo a pulpitis irreversible sintomática.*

En general, el principal objetivo de cualquier tratamiento restaurador o endodóntico siempre debe ser mantener la vitalidad pulpar y evitar la incomodidad para el paciente. Un diente con la pulpa vital tendrá mayor resistencia mecánica, supervivencia a largo plazo y, por ende, mejor pronóstico (Reeh et al., 1989; Schmidlin et al., 2010), y aunque las fallas tempranas de los tratamientos pueden ocurrir por múltiples factores, también se pueden deber a un diagnóstico pulpar no acertado o a una pobre evaluación del estado pulpar que puede sub- o sobre-diagnosticar la severidad de la inflamación de la pulpa (Goldberg et al., 2008). Por ahora, la historia clínica y las

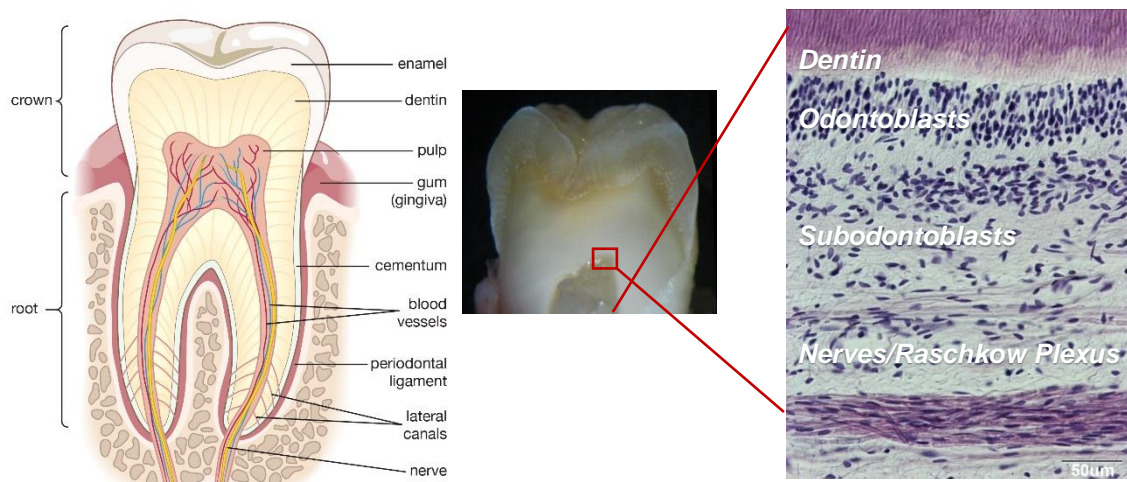
respuestas a pruebas de sensibilidad siguen siendo las herramientas disponibles para evaluar la severidad de la inflamación (Bender, 2000a, 2000b).

La estructura de la pulpa dental

Los dientes están formados por distintos tipos de tejido: el esmalte, la dentina y el cemento son tejidos mineralizados y la pulpa es el único que no lo es. Esta se encuentra en el centro del diente reproduciendo la forma de este, por lo que su anatomía cambia según la del diente. La pulpa se ha considerado tradicionalmente como un tejido conectivo laxo especializado de origen ectomesenquimático cuya función principal es formar dentina. Debido a la estrecha relación anatómica y funcional entre ambos tejidos es que se han denominado complejo pulpodentinario, el que es capaz de responder frente al daño (Couve et al., 2013).

La pulpa dental incluye una mezcla heterogénea de poblaciones celulares responsables de su mantención, defensa y reparación. Dentro de ellas se encuentran fibroblastos, células progenitoras, neuronas, células vasculares y células del sistema inmune. Se organiza de una forma muy característica, como un mosaico, que varía entre la corona y la raíz o en la periferia y la zona central del tejido (Goldberg, 2014; Hargreaves et al., 2002).

En la adultez, la capa más externa de la pulpa se organiza como una empalizada de células que participa en las dentinogénesis: los odontoblastos (Couve et al., 2013). Estos se ordenan como 4 o 5 filas en la corona del diente con el cuerpo celular en la zona periférica de la pulpa y con su proceso odontoblástico proyectado hacia la pre dentina y dentina. En la raíz, estos asumen una organización de una sola capa. Durante la formación del diente, estos participan activamente en la producción de la matriz extracelular dentinaria y la mineralización de este tejido. La dentina primaria es aquella que forma el odontoblasto secretor hasta que el diente erupciona. De ahí en adelante, el odontoblasto maduro puede secretar dentina secundaria, pero su capacidad para sintetizar dentina se va reduciendo gradualmente con el tiempo mientras que su actividad autofágica aumenta, por lo que estas células se vuelven más pequeñas, se acumula lipofuscina y aumenta la presencia de vacuolas autofágicas (Couve & Schmachtenberg, 2011). En dientes humanos, los odontoblastos maduros pueden permanecer por décadas, pero eventualmente se verán enfrentados al proceso de envejecimiento inevitablemente, caracterizado por la disminución de su tamaño y su morfología aplanada (Couve et al., 2013). A medida que los dientes envejecen, se produce una reducción de la cámara pulpar, por lo que la multicapa pseudoestratificada se reduce solo a una (Mitsiadis et al., 2008). Hasta su muerte, el odontoblasto puede mantener alguna capacidad secretora incluso cuando es reemplazado por células tipo-odontoblastos capaces de formar dentina reparativa (Couve et al., 2012, 2013; Couve & Schmachtenberg, 2011).



Esquema de la estructura dental y organización de la interfase dentinopulpar. Imagen modificada de E. Couve, no publicada.

Bajo la capa de odontoblastos se encuentra la capa subodontoblástica o de células de Höhl, la que estaría implicada en el reemplazo celular, al tener la habilidad de diferenciarse en células formadoras de tejido duro luego de la muerte de los odontoblastos en el caso de una injuria (Goldberg & Smith, 2004; Mitsiadis et al., 1999). Varios entornos sirven de nicho para células madre pulpares (progenitoras), tan necesarias para los procesos de reparación y regeneración, pero principalmente se observan en la capa rica en células de Höhl y también en zonas perivasculares (Huang et al., 2009; Shi & Gronthos, 2003). Además, clave para las respuestas regenerativas son las complejas redes vascular y neuronal que existen dentro de la pulpa (Goldberg & Smith, 2004).

Por otra parte, la mayoría de las células pulpares son residentes y juegan un rol principalmente estructural y nutritivo. Los fibroblastos son las principales células de este tipo y otras células que migran desde la circulación sanguínea, pero es la población de fibroblastos la principal responsable de la formación y renovación de la matriz extracelular no mineralizada de la pulpa. Aunque ellos aparecen morfológicamente similares en las capas superficiales, variaciones en su actividad proliferativa indican que representan una población heterogénea y que sólo algunos son capaces de formar nódulos de mineralización (Moule et al., 1995; Tsukamoto et al., 1992).

En pulpa dental sana, existen algunas células inmunocompetentes circulantes como linfocitos T, células dendríticas y macrófagos. Estas se encuentran distribuidas en la periferia, en la zona subodontoblástica y zona central de la pulpa cameral (Hahn & Liewehr, 2007c).

Por último, la matriz extracelular comprende una variedad de proteínas y polisacáridos secretados localmente conformando una red. Está formada principalmente por fibras colágenas tipo I (56%) y tipo III (41%); proteoglicanos, tales como biclycan y decorina que tendrían un efecto regulador de la fibrillogénesis y versican, asociado a formar grandes agregados de proteoglicanos, mientras glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico se mantienen sin unirse a ninguna proteína (Goldberg & Smith, 2004; Nahás-Scocate et al., 2018). Además, en la matriz extracelular pulpar se

encuentran macromoléculas de fibronectina, fibrilina, sialoproteína ósea, osteopontina, proteína morfogenética de hueso y factor de crecimiento transformante beta (Goldberg, 2014).

Inervación de la pulpa dental y caries

La dentición es crucial para la supervivencia en los mamíferos, y dado que en humanos solo ocurre un recambio de dentadura durante la vida, no sorprende que los dientes estén equipados con un sistema neurosensorial abundante y sofisticado que regula la presión de la mordedura a través de la sensación del dolor (Hildebrand et al., 1995). Incluso ha sido propuesto que los tejidos mineralizados como la dentina o esmalte evolucionaron a partir de órganos sensoriales primitivos que secundariamente adoptaron una cubierta calcificada que otorgaba soporte y protección a este sistema (Northcutt RG, 1983).

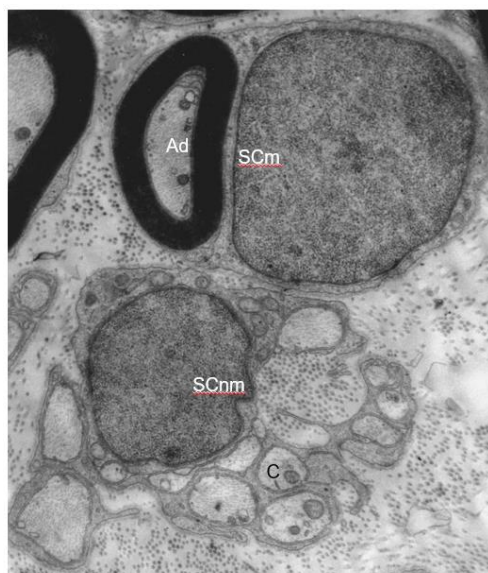
La pulpa dental humana está densamente inervada por fibras sensoriales aferentes que consisten principalmente en nociceptores polimodales morfológicamente caracterizados como fibras A δ y fibras C, que comprometen aproximadamente el 40% del volumen pulpar (França et al., 2019). Estos nociceptores son cruciales para proteger el tejido de daño, detectar estímulos nocivos y activar la percepción del dolor (Chiu et al., 2013). Además, las fibras A δ están soportadas por células de Schwann mielinizantes y las fibras C por células de Schwann no mielinizantes (Couve & Schmachtenberg, 2018). Algunos estudios morfológicos y cuantitativos en pulpa dental humana han determinado que el promedio de axones mielinizados en la región yuxtaapical de la pulpa radicular es alrededor de 312 ± 149 axones, mientras que de axones no mielinizados, alrededor de 2000 ± 1023 (Nair & Schroeder, 1995; Nair PH.U. Luder, 1992).

Las fibras nerviosas de origen trigeminal llegan a la pulpa dental a través del ápice, acompañando a vénulas y arteriolas desde la pulpa radicular central, para luego abrirse en la corona formando el plexo subodontoblástico de Raschkow (Byers, 1984). Las terminaciones nerviosas están en estrecho contacto con la membrana plasmática de las células de la capa odontoblástica y subodontoblástica y algunos axones pueden penetrar la preentina entre los cuerpos celulares de los odontoblastos, llegando hasta el tercio más profundo de los túbulos dentinarios, asociado en el lumen con el proceso odontoblástico (Byers et al., 2003; Couve et al., 2014). En ratas, se ha observado que estos terminales pueden inervar alrededor de 100 túbulos dentinarios por 0,1 mm de la dentina más profunda (Byers, 1985). Lamentablemente, el hecho que estas fibras nerviosas asociadas al proceso odontoblástico se encuentren inmersas en tejido mineralizado limita su acceso para estudios morfológicos y funcionales, por lo que muchos aspectos del complejo nervio-odontoblasto y otras posibles interacciones celulares continúan siendo un enigma.

La sensibilidad de la dentina está basada en la estimulación del plexo de terminales nerviosos en la interfase pulpodentinaria, donde los odontoblastos y fibras nerviosas interactúan en una aún incomprendida vía de transducción de dolor dentinario (Shibukawa et al., 2015).

Se ha observado que las neuronas que inervan la pulpa dental expresan neuropéptidos tales como Sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), péptido vasoactivo intestinal (VIP) y neuropéptido Y (NPY), las que tienen un efecto potente en el componente vascular e inmune al mediar la inflamación neurogénica. A nivel periférico, estos neuropéptidos regulan el flujo sanguíneo, el reclutamiento y la modulación de la actividad de células inmune y la proliferación de fibroblastos y su consecuente secreción de moléculas bioactivas (Caviedes-Bucheli et al., 2008; Richardson & Vasko, 2002). El límite entre los sistemas inmune y nervioso se ha vuelto cada vez más difuso. Las neuronas nociceptivas poseen las mismas vías de reconocimiento de peligro que las células inmunes y frente a una amenaza, el sistema nervioso periférico se comunica con el sistema inmune formando un sistema integrado de protección (Chiu et al., 2012).

Además, se han observado diferencias morfológicas en los patrones de inervación y densidad de las fibras nerviosas al comparar pulpas de dientes sanos y dientes con caries, donde la mayoría de las terminaciones axonales cruzan la capa odontoblástica y se proyectan hacia la dentina reaccional (Couve et al., 2014). Las fibras nerviosas de la pulpa experimentan cambios neuroplásticos, incluyendo la arborización de sus terminales, donde la capa de odontoblastos también sostiene esta red terminal de nociceptores que se ramifican desde la inervación pulpar. Este brote neural ha sido caracterizado en etapas tempranas frente a la injuria, asociada a la dentinogénesis reaccionaria neuronal y a la invasión de células inmune dentro de esta matriz colágena (Byers et al., 2003; Couve et al., 2014). Sin embargo, poco ha sido profundizado al respecto o asociado a la sintomatología de los diferentes cuadros pulpares.



Microscopía electrónica de fibra nerviosa A δ , célula de Schwann mielinizante y fibras C junto a célula de Schwann no mielinizante. Imagen de Couve & Schmachtenberg, 2018.

El rol de la Célula de Schwann

Las células de Schwann son células gliales que soportan y mantienen los axones del sistema nervioso periférico jugando un rol en la regeneración axonal y remielinización frente al daño nervioso. Su notable plasticidad les permite adoptar un fenotipo mielinizante y no mielinizante. Las células de Schwann no mielinizantes envuelven todos los axones de diámetro pequeño incluyendo muchos axones sensoriales y todos los del sistema nervioso autónomo, mientras que los axones de mayor diámetro, incluyendo algunos sensoriales y los axones de neuronas motoras están cubiertos por la célula de Schwann mielinizante. Estas son 2 o 3 veces más largas y mucho más voluminosas ya que poseen la vaina de mielina que envuelve múltiples veces al axón. Mientras ambos tipos de células de Schwann proveen los axones con soporte trófico y metabólico, solo las células mielinizantes tienen el rol de acelerar la conducción del impulso nervioso. A pesar de las notorias diferencias entre ambos tipos celulares, ambas se originan de una célula de Schwann inmadura y el fenotipo que adoptará es estrictamente dependiente de las señales que reciba del ambiente (Jessen et al., 2015; Jessen & Mirsky, 2019).

Tanto en la dentición temporal como permanente, las células de Schwann forman una red glial prominente en la interfase pulpodentaria de fenotipo mielinizante y no mielinizante (Couve & Schmachtenberg, 2018; Suzuki et al., 2015). Durante el desarrollo del sistema nervioso periférico, se ha observado que estas células gliales se asocian con la diferenciación arterial y remodelación angiogénica debido a la expresión de VEGF, permitiendo que estos vasos sigan el crecimiento de la fibra nerviosa (Jessen & Mirsky, 2005; Mukoyama Y. et al., 2002). Las células de Schwann son capaces de liberar un número de moléculas señalizadoras en respuesta al daño nervioso. Por ejemplo, la expresión de receptores del factor neurotrófico (NGFR), como el receptor de neurotrofina (p75NTR) está sobreexpresado por células de Schwann en nervios dañados (Tomita et al., 2007).

La capacidad que tienen los nervios periféricos lesionados de regenerarse está íntimamente asociada con la reprogramación adaptativa de la célula de Schwann para cambiar su fenotipo a uno reparativo. Frente a un daño nervioso, esta célula cambia a un fenotipo reparativo, lo que involucra autofagia de mielina, expresión de citoquinas que reclutaría a los macrófagos para cooperar con la limpieza de los escombros de mielina, la activación de la expresión del factor trófico y elongación celular para formar las pistas de reparación o *bandas Büngner* y así asegurar la supervivencia de las neuronas lesionadas (Gaudet et al., 2011; Jessen & Mirsky, 2016).

En pulpas humanas sanas, se ha observado una red prominente de células de Schwann radialmente distribuidas en la interfase pulpodentaria, ordenándose con el cuerpo celular en la capa sub-odontoblástica y proyectando sus procesos hacia la capa odontoblástica, junto a una compleja organización multicelular, red de capilares con fibras nerviosas y células dendríticas, sugiriendo una función en la defensa contra los patógenos invasores, reparación de la dentina y regeneración. En particular las células de Schwann no mielinizantes proyectan sus procesos hacia la capa de odontoblastos mientras las mielinizantes se distribuyen en gran medida en el plexo de Raschkow (Couve et al., 2018; Couve & Schmachtenberg, 2018). Frente a lesiones de caries

moderadas, se ha observado la formación de dentina asociada a la arborización de las terminaciones nerviosas en coordinación junto con una reacción neuroinmune (Couve et al., 2014). Sin embargo, el rol de las células de Schwann en la respuesta neuroinflamatoria de la pulpa durante la progresión de la caries dentinaria ha sido escasamente estudiada.

Para caracterizar los perfiles fenotípicos de las células de Schwann se han utilizado diversos marcadores moleculares (Jessen & Mirsky, 2005). En dentición humana permanente, los marcadores S100 y GFAP son expresados tanto por célula de Schwann mielinizante y no mielinizante. La célula mielinizante también expresa proteína básica de mielina (MBP) y se observa en las fibras nerviosas y el plexo de Raschkow. Mientras la no mielinizante se localiza en los haces nerviosos y en la interfase pulpodentinaria como terminales altamente arborizados. La expresión de estos marcadores en pulpas jóvenes y adultas revelan un mayor contingente de células de Schwann no mielinizantes asociadas a fibras nerviosas no mielinizadas, con una disposición radial proyectándose hacia la capa de odontoblastos y las células de Schwann mielinizantes se restringen al plexo de Raschkow (Couve et al., 2018). Otros cambios asociados a la edad han sido observados, como una disminución en el número de axones y terminaciones nerviosas pulpares (Fried & Gibbs, 2014) y una disminución en la expresión de proteínas de mielina y respuestas atenuada durante la regeneración de nervios dañados (Scheib & Höke, 2016).

El potencial regenerativo de las fibras nerviosas lesionadas está asociado a la capacidad de reprogramación adaptativa de las células de Schwann a un fenotipo reparativo (Jessen & Mirsky, 2016). Ha sido propuesto que frente a la caries dentinaria, las terminaciones nerviosas pulpares son capaces de producir un brote nervioso bajo condiciones de inflamación (Couve et al., 2014). Además, marcadores como la proteína de unión al calcio (S100) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se vuelven altamente reactivos en respuesta a la progresión de caries (Houshmandi et al., 2014).

Las células de Schwann también tendrían un rol inmunomodulador. Se sabe que estas células, humanas y de ratas, pueden expresar moléculas de MHC de clase II en su superficie, por lo que podrían considerarse presentadoras de antígenos accesorias (Tzekova et al., 2014). Se ha demostrado que este tipo celular asociado con células inmunes cooperan en la vigilancia contra patógenos y lesiones traumáticas en la regeneración de axones dañados (Scholz & Woolf, 2007). En la pulpa dental, también se observó la activación de las células de Schwann en respuesta a la degeneración axonal durante la reabsorción radicular de dientes temporales (Suzuki et al., 2015). Estos datos sugieren una relación espacial y funcional estrecha entre células de Schwann y la célula dendrítica, donde tendrían funciones complementarias de vigilancia y defensa en la interfase pulpodentinaria.

Por otro lado, la evidencia sugiere que células no neuronales, especialmente células gliales, pueden jugar un papel importante en el inicio y la resolución del dolor. Receptores expresados en células de Schwann tienen el potencial de regular condiciones de dolor, aunque el mecanismo es pobremente comprendido (Wei et al., 2019). Recientemente, se ha descubierto un tipo especializado de célula de Schwann cutáneas con extensos procesos que generan una red en forma

de malla en la capa subdérmica de la piel, formando un órgano sensorial que posiblemente iniciaría la sensación de dolor. Por lo que estas células gliales íntimamente asociadas a fibras nerviosas nociceptivas crean un órgano glio-neural, siendo capaces de iniciar la sensación de dolor (Abdo et al., 2019).

Las observaciones que han sido reportadas sobre la asociación de la célula de Schwann con las fibras nerviosas y el componente inmune crean una nueva perspectiva para el entendimiento del rol de las células gliales en la pulpa dental y en la modulación del proceso inflamatorio fisiológico y patológico, lo que promete ofrecer un escenario diferente para el tratamiento de la patología pulpar.

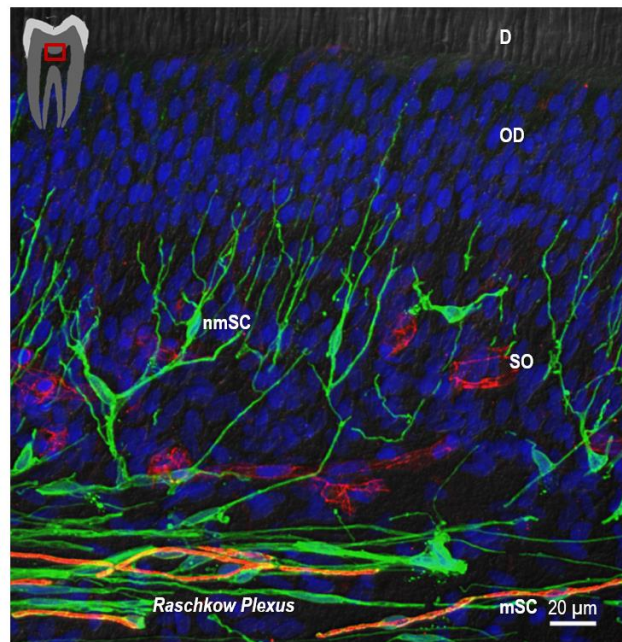


Imagen de microscopía confocal que muestra la red glial de la interfase pulpodentinaria. Células de Schwann en verde (s100) y fibras mielinizadas en naranja (MBP) en el plexo de Raschkow. OD: odontoblastos, SO: zona subodontoblástica. Imagen de Couve & Schmachtenberg, 2018.

Respuesta pulpar a lesiones de caries: Pulpitis

Las bacterias que participan en el desarrollo de la enfermedad de caries son la principal causa de inflamación e infección pulpar. Como respuesta a la noxa, comienza un proceso dinámico que dependerá de la invasión de los microorganismos y la respuesta del huésped a través de mecanismos que incluyen inflamación e inmunidad.

El primer mecanismo de defensa de la pulpa es la dentinogénesis. Esta ocurre durante toda la vida. La primaria durante la formación del diente a una tasa de $\sim 4 \mu\text{m}$ por día de deposición de dentina, mientras la secundaria disminuye a una tasa de $\sim 0.4 \mu\text{m}$ una vez que el diente está formado de manera continua durante toda la vida. La dentinogénesis terciaria es la respuesta de reparación del tejido duro frente a un daño, siendo el mecanismo natural de cicatrización de la

herida. Si el daño producido es leve, como una lesión de caries en etapa temprana, los odontoblastos secretan una dentina llamada reaccionaria, tubular y continua. Sin embargo, en respuesta a una lesión de mayor intensidad, como una lesión de progresión rápida, generalmente los odontoblastos mueren bajo la lesión, las células progenitoras de la pulpa se diferencian a células tipo-odontoblasto produciendo rápidamente dentina terciaria reparativa, una matriz dentinaria, que aunque desorganizada y sin estructura tubular, logra proteger la pulpa del daño inminente (Goldberg & Smith, 2004).

Si la lesión cariosa no es tratada en etapas tempranas, luego la pulpa responde con inflamación lo que genera un cuadro doloroso de mediano grado. El dolor es usualmente el primer signo clínico de esta patología. A diferencia de otras partes del cuerpo contenidas en tejido blando, la pulpa dental se encuentra encerrada en tejido mineralizado rígido e inextensible, limitando las posibilidades de aumentar la irrigación sanguínea. Es por esto, que se considera un ambiente poco favorable y por lo que la sintomatología es tan aguda (Närhi et al., 2016). Una inflamación severa en este ambiente cerrado inevitablemente llevará a la destrucción total de la pulpa con la consiguiente patología periapical asociada en caso de no recibir tratamiento (Van Hassel, 1971).

La inflamación pulpar involucra varios procesos biológicos evaluables a nivel macroscópico, microscópico y molecular. Los cambios macroscópicos son principalmente evidentes a nivel vascular, asociados principalmente a vasodilatación (Zanini et al., 2017), mientras que a nivel microscópico se ha observado un aumento del número de células inmunes (Izumi et al., 1995) y la liberación de biomoléculas inflamatorias, que según se ha sugerido, son sintetizadas y secretadas por el complejo pulpodentinario (Cooper et al., 2011).

La respuesta inflamatoria consiste en mecanismos de defensa innatos y no específicos que involucran fenómenos vasculares exudativos, vasodilatación, aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, así como infiltración de células inflamatorias tales como macrófagos y neutrófilos (Bergenholtz, 1990; Bruno et al., 2010; Izumi et al., 1995). Y aunque estas células juegan un papel importante en la defensa de la pulpa, también participan en la degradación de matriz extracelular por la liberación de metaloproteinasas (Gusman et al., 2002; Wahlgren et al., 2002).

Una vez que el proceso carioso rompe la integridad del esmalte dental, la biopelícula bacteriana puede avanzar a través de la dentina hacia la pulpa. La dentina es degradada inicialmente por bacterias gram-positivas como *streptococci*, *lactobacilli* y *actinomices* (Jørn A. et al., 2008). La proliferación y actividad metabólica de estos microorganismos lleva a la liberación de estos componentes dentro de los túbulos dentinarios y su difusión hacia la pulpa periférica. Después de la desmineralización del esmalte, las fibras colágenas expuestas son degradadas por metaloproteinasas del huésped, lo que facilita el avance de la lesión de caries (Chaussain-Miller et al., 2006).

Son múltiples los tipos de células pulpares que reaccionan ante la detección y propagación de bacterias y subproductos involucrados en la enfermedad de caries, desencadenando una serie de respuestas inflamatorias, antibacterianas, vasculares y neuroinmunes (Couve et al., 2014; Farges et al., 2015a). Estos eventos eliminan la infección bacteriana en etapas tempranas y bloquean la

ruta de progresión cuando se encuentran acompañados por la formación de dentina en la interfase pulpodentinaria, mientras que la invasión bacteriana no controlada da como resultado una inflamación pulpar irreversible (Farges, Alliot-Licht, et al., 2015b).

El equilibrio entre la pulpitis y la reparación es fundamental para preservar la vitalidad de la pulpa. Debe existir un proceso inflamatorio de bajo grado para estimular la respuesta reparativa y una vez eliminada la noxa, la pulpa pueda proporcionar una respuesta (Cooper et al., 2010).

Los odontoblastos son una de las primeras células con las que se encuentran los patógenos cuando invaden la dentina, debido a su ubicación en la interfaz pulpodentinaria y porque su proceso celular se encuentra embebido en el tejido dentinario. Es por esto que están involucrados en combatir la invasión bacteriana y activar la inmunidad de la pulpa. El reconocimiento de los patógenos en general ocurre por la detección de estructuras que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. Estas estructuras son pequeñas secuencias moleculares que se repiten en grupos de patógenos llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), los que son censados por Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) dentro de los que se encuentra la familia de los Toll-like receptor (TLR) (Fawzy El-Sayed et al., 2016). Ligandos de los TLR incluyen componentes de la superficie bacteriana como lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico, flagelina, peptidoglicanos y lipoproteínas. Estos receptores están presentes no sólo en odontoblastos sino también en células endoteliales, células dendríticas y macrófagos. TLR 2 y TLR 4 son expresados por el odontoblasto y este último por nociceptores de la pulpa, el cual es capaz de mediar respuesta inflamatorias severas (Veerayuthwilai et al., 2007; Wadachi & Hargreaves, 2006). Una consecuencia importante de la activación de los TLR es la sobreexpresión de efectores de la inmunidad innata, incluyendo agentes antimicrobianos, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que reclutan y activan células sanguíneas y residentes del tejido (Turner et al., 2014; Yumoto et al., 2018).

Los receptores TLR 1-6 y 9 expresados por células pulpares detectan componentes de las bacterias cariogénicas activándose la vía de señalización del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), responsable de la respuesta inflamatoria molecular y la vía más estudiada en pulpa dental (Chang et al., 2005; Farges et al., 2009; Hirao et al., 2009). En respuesta a esta señalización las células inmunes y células estructurales de los tejidos producen citoquinas y quimioquinas. Estas moléculas son capaces de regular la respuesta inflamatoria, modular la expresión génica en las células diana a través de segundos mensajeros o inducir la liberación de otras moléculas que promuevan una cascada de mayor estimulación (Taub & Oppenheim, 1994). Hasta hoy, muchas citoquinas han sido identificadas, con funciones reguladoras de reclutamiento de linfocitos, extravasación, diferenciación y producción de anticuerpos. En la respuesta pulpar a la infección, la interleukina-1 α , interleukina-1 β y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) han demostrado tener un rol importante en la respuesta proinflamatoria de este tejido (Hall et al., 2016; T Matsuo et al., 1994; Pezelj-Ribaric et al., 2002).

Un mediador inflamatorio importante asociado a respuestas inflamatorias en tejido dental inflamado y lesiones periapicales es la proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1 o CCL2), que es un elemento clave en el reclutamiento de monocitos y macrófagos (Deshmane et al., 2009;

Khorasani et al., 2020). Esta se ha visto expresada en dientes con lesiones de caries, al igual que otras quimiocinas como CXCL1, CXCL2 y CXCL8, las que son principalmente conocidas por atraer neutrófilos al sitio del daño (Abd-Elmeguid et al., 2013; Horst et al., 2011). Ha sido sugerido que la MCP-1 derivada de células de Schwann sería patológicamente relevante para la activación de los macrófagos y su migración a la fibra nerviosa dañada (Fischer, Kleinschnitz, et al., 2008; Fischer, Weishaupt, et al., 2008; Tofaris et al., 2002), pero esto no ha sido estudiado en pulpa dental.

La liberación de citoquinas proinflamatorias dentro del tejido enfermo generalmente resulta en la formación de gradientes quimiotácticos que llevan al reclutamiento y activación de células del sistema inmune, estimulando su migración extravascular. Por lo que, con la dentina desmineralizada y esta tormenta de citoquinas en acción, las células dendríticas se acumulan en posiciones estratégicas de la interfase pulpodentinaria capturar antígenos extraños. A esto le sigue la acumulación progresiva de células T, macrófagos, neutrófilos y células B, junto con la profundización de la lesión (Hahn & Liewehr, 2007a; Jontell et al., 1998).

Los leucocitos, al igual que en los órganos periféricos tejidos del cuerpo, se encuentran en la pulpa dental sana como centinelas, incluyendo algunos macrófagos, células dendríticas y células T (Farges et al., 2003; Izumi et al., 1995; Jontell et al., 1998), donde llevan a cabo una función de inmunovigilancia, muestreando continuamente el microambiente donde se encuentran para detectar cualquier alteración o microorganismo que invada el tejido donde se encuentran. Cuando aparece una lesión de caries incipiente y la respuesta inflamatoria comienza, los leucocitos del sistema circulatorio se activan y migran desde los vasos sanguíneos al sitio de la noxa. Los neutrófilos son reclutados inicialmente para engullir y destruir microorganismos. Luego, esta respuesta es seguida por la diferenciación de monocitos a macrófagos infiltrando el tejido pulpar a medida que la enfermedad se desarrolla (Cooper et al., 2010; Hahn & Liewehr, 2007a, 2007d). Los macrófagos son capaces de fagocitar bacterias y activar las células T gatillando una respuesta inmune adaptativa, la que ocurre en asociación con las células dendríticas.

Macrófagos: Más que fagocitosis

Una de las células inmunes que alcanzan la pulpa dañada en estadios tempranos de la enfermedad de caries son los macrófagos (Izumi et al., 1995). Estas células derivadas de los monocitos son altamente plásticas y muestran un elevado grado de heterogeneidad, lo que está principalmente influenciado por el microambiente en el que se encuentren (Gordon & Taylor, 2005). Se han observado en todos los tejidos del organismo y muestran una gran diversidad funcional; exhibiendo un importante rol en el desarrollo, homeostasis, reparación tisular e inmunidad (Wynn et al., 2013). Los macrófagos juegan un papel indispensable en la defensa del huésped y son ampliamente conocidos por su prominente capacidad fagocítica (Hahn & Liewehr, 2007a). Ellos no actúan como una célula inmune efectora de elite, sino más bien como una célula de limpieza, cuya función principal es eliminar del ambiente intersticial cualquier material celular extraño. Producen sustancias biológicamente activas, incluyendo enzimas microbicidas y especies de oxígeno reactivas (ROS), citoquinas como IL-1, IL-6 y TNF- α y factores de crecimiento que promueven la reparación pulpar. Además, tienen un rol activando linfocitos T, por su potencial para actuar como célula

presentadora de antígenos (Jontell et al., 1998). Los macrófagos también juegan un papel fundamental en la reparación después de la inflamación, ya que estimulan la proliferación de fibroblastos así como la revascularización (Hahn & Liewehr, 2007d). Y frente a una lesión nerviosa, los macrófagos invaden la fibra nerviosa siendo fuente adicional de citoquinas, promoviendo la vascularización (Cattin et al., 2015) y cooperando con las células de Schwann para degradar los restos de mielina (Rotshenker, 2011).

La contaminación con bacterias en el tejido y la producción de citoquinas como IFN- γ estimula a los macrófagos a secretar citoquinas proinflamatorias y aumentar la cantidad de aniones superóxidos y radicales de oxígeno y nitrógeno para incrementar su capacidad bactericida (Dale et al., 2008). Estos macrófagos efectores proinflamatorios son los activados clásicamente (M1), mientras que los activados alternativamente (M2) incluirían al menos tres fenotipos solapados y están involucrados en la resolución de la inflamación y reparación del tejido (Martinez & Gordon, 2014).

Los macrófagos tienen tres funciones principales en inflamación: presentación de antígenos, fagocitosis e inmunomodulación a través de la producción de citoquinas y factores de crecimiento (Fujiwara & Kobayashi, 2005). En pulpitis, se han observado altos niveles de macrófagos, siendo más prevalentes que las células dendríticas en todas las etapas de la invasión cariosa según algunos autores (Izumi et al., 1995; Kamal et al., 1997). Otros las señalan directamente como las células inmunes más numerosas en el tejido (Bruno et al., 2010; Jontell et al., 1998). Su presencia podría estar asociada con la expresión de quimiocinas como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (CCL2/MCP-1) y otras como proteína inflamatoria de macrófagos 3-alfa (CCL20/MIP-3) (Deshmane et al., 2009; Hahn & Liewehr, 2007c).

Además, estas células también contribuyen a la reparación de la pulpa induciendo la proliferación de fibroblastos por la liberación de factor de crecimiento de fibroblasto básico (FGFb) y revascularización debido a la liberación de factor de crecimiento endotelial (VEGF)(Hahn & Liewehr, 2007b).

Recientemente, el fenotipo alternativo M2 se observó asociado a células de Schwann en pulpa dental, pero se desconoce el mecanismo de modulación entre ambos tipos celulares (Yoshida et al., 2020a). Otros estudios en animales señalan que los macrófagos serían clave en el proceso de dentinogénesis terciaria durante el daño pulpar, siendo necesarios para la activación de las células progenitoras y para la formación de dentina reparativa. Además, se observaron cambios que sugieren que la ausencia de macrófagos en la pulpa puede crear inflamación excesiva en el sitio del daño, reafirmando la importancia del fenotipo M2 reparativo dentro de la pulpa (Neves et al., 2020).

Neutrófilos pulpaes: ¿NET o no NET?

Los neutrófilos o polimorfonucleares (PMN) son los leucocitos más abundantes en la circulación y han sido considerados como el principal efector innato del sistema inmunológico. Pueden capturar y destruir microorganismos invasores a través de la fagocitosis, liberación de gránulos y formación de trampas extracelulares (Amulic et al., 2012). Tradicionalmente se ha considerado una población celular homogénea cuya función principal era la destrucción de patógenos, sin embargo, la evidencia acumulada señala que no sólo presentan una gran heterogeneidad fenotípica sino que son células complejas con un amplio repertorio funcional que median la respuestas a través de producción de citoquinas y factores inflamatorios que influyen y regulan la inflamación contribuyendo a su resolución (Scapini & Cassatella, 2014; Tecchio & Cassatella, 2016).

Una de las primeras células inmunes en alcanzar la pulpa dañada son los neutrófilos que, como fue mencionado, juegan un rol fundamental en el inicio y amplificación de la respuesta inflamatoria (Cavalcanti et al., 2011). Los neutrófilos son inicialmente reclutados a la pulpa inflamada para engullir y destruir los microorganismos invasores, infiltrando la totalidad del tejido junto a los macrófagos. Por un lado, pueden combatir la enfermedad promoviendo la reparación o por otro producir la destrucción de la pulpa (Selders et al., 2017). Una vez en la pulpa dental, los neutrófilos pueden fagocitar bacterias para eliminarlas intracelularmente, o pueden liberar especies reactivas de oxígeno y proteínas antimicrobianas como defensinas, lactoferrina y otras enzimas a través de gránulos para su destrucción extracelular, lo que puede también causar daño al huésped (Häger et al., 2010).

Las NET o trampas extracelulares de neutrófilos son estructuras extracelulares en forma de red que contienen cromatina nuclear descondensada adornada con moléculas antimicrobianas, incluidas histonas y proteínas antimicrobianas (Brinkmann et al., 2004). Estas fueron descritas en el 2004 como una nueva forma de eliminar patógenos y se considera un mecanismo de último recurso, ya que representa una forma de muerte celular, que algunos autores llaman NETosis (Häger et al., 2010). Estas trampas, aunque pretenden proteger el tejido, también han sido asociadas a enfermedades autoinmunes o patologías inflamatorias (Hakkim et al., 2010).

En pulpa dental con lesiones de caries superficiales los neutrófilos se han mencionado como poco relevantes, ya que se han observado en menor número; mientras que en lesiones de caries profunda su número ha sido elevado y considerado significativo (Izumi et al., 1995). Recientemente, se observó la presencia de NETs en dientes con pulpitis y se asoció a un posible rol quimioattractante de macrófagos, por lo que la presencia de estas trampas podría considerarse como un marcador de pronóstico poco favorable en enfermedad pulpar (Holder et al., 2019). Además, se ha estudiado su rol en dentinogénesis, donde su presencia se asoció a mayor inflamación y dificultad para reparar la dentina, mientras su ausencia permitía que los macrófagos pudieran reparar el tejido (Neves et al., 2020).

Células dendríticas: centinelas de la interfase pulpodentinaria

Las células dendríticas son una importante población de células inmune residentes que han sido localizadas en la periferia pulpar, dentro de la zona subodontoblástica y para-odontoblástica (Couve et al., 2018a; Ohshima et al., 1999). Son consideradas las células presentadora de antígenos más eficientes, capaces de iniciar, coordinar y regular la respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas se encuentran en prácticamente todos los tejidos, donde detectan y procesan antígenos para presentarlos a las células T. Además, secretan citoquinas y factores de crecimiento que modifican la respuesta inmune (Worbs et al., 2017). En términos simples, la maduración de las células dendríticas es gatillada por alteraciones de la homeostasis, detectadas por el reconocimiento de PAMPs o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) activándose programas metabólicos y celulares de transcripción, incluso reorganizando su citoesqueleto para aumentar su motilidad (Winzler et al., 1997).

La pulpa dental no es la excepción. En ella contribuyen a la reacción inicial de defensa luego de una injuria. Junto a macrófagos forman una línea de defensa esencial (Kawashima et al., 2006). Al ser presentadoras de antígenos tan potentes, inician y modulan la respuesta inmune rápidamente, a través del procesamiento de patógenos a las células T (J. C. Farges et al., 2013). Cuando la dentina está siendo desmineralizada por la lesión cariosa, las células dendríticas se acumulan en la interfase pulpodentinaria para atrapar antígenos. A medida que aumenta la carga bacteriana, comienza una acumulación de leucocitos y se inicia el proceso inflamatorio (Hahn & Liewehr, 2007a).

La activación de las células dendríticas es un evento temprano en la progresión de la caries, que acompaña los cambios que sufre el odontoblasto para abrirle el paso a la predentina (Couve et al., 2014). En dientes sanos y con caries, las células dendríticas han sido observadas marcándolas con HLA-DR. Estas se han visto distribuidas principalmente dentro de la zona subodontoblástica y para-odontoblástica, extendiendo algunas dendritas hacia la predentina. Incluso en dientes con lesiones de caries moderada, las células dendríticas cruzan la capa odontoblástica para hacerse residentes dentro de la dentina reaccionaria (Couve et al., 2014). En epitelio intestinal y respiratorio, se ha demostrado que las células dendríticas abren uniones estrechas para enviar dendritas a través de la barrera epitelial y detectar patógenos (Kojima et al., 2013; Rescigno et al., 2001), similar a lo observado en pulpa dental.

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El sistema de fibras nerviosas dentro de la pulpa cumple un rol fundamental durante la respuesta a la enfermedad. La interacción entre los terminales nociceptivos y las células inmune son un aspecto muy relevante para proteger el tejido del daño y para regular la respuesta inflamatoria (Pinho-Ribeiro et al., 2017). En la pulpa dental, la inervación puede participar directamente liberando neuropéptidos que consiguen reclutar y activar células del sistema inmune (Fristad et al., 2010; Haug & Heyeraas, 2006), sin embargo, poco ha sido estudiado sobre la red glial que acompaña este proceso y su asociación al cuadro clínico. La pulpa dental contiene células inmune residentes y está bien equipada para dar una respuesta efectiva frente a la invasión de patógenos (Farges et al., 2015b). El reclutamiento de células inmunes al tejido pulpar durante el proceso inflamatorio refuerza su potencial defensivo pero los datos que se manejan hasta ahora indican que este podría ser más complejo de lo que pensamos (Cooper et al., 2017; Duncan & Cooper, 2020). Las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos tienen una aparición temprana en la respuesta inflamatoria, pero su presencia nunca ha sido vinculada a la red glial pulpar y pocos estudios han vinculado la histopatología del tejido con su diagnóstico clínico.

El punto de quiebre entre una pulpa inflamada de forma reversible y una de forma irreversible es difícil de descifrar clínicamente. No está claro cómo se puede detectar este umbral o qué correlación existe entre el cuadro clínico y la histopatología asociada. A pesar de la alta prevalencia de estas condiciones, pocos estudios han descrito su perfil neuroinflamatorio. Actualmente, el cuadro de la histopatología de la inflamación pulpar está incompleto y los métodos de diagnóstico son incapaces de determinar con exactitud si la pulpa sigue o no siendo viable. El presente proyecto pretende establecer diferencias entre pulpitis reversible e irreversible que permitan encontrar el punto de transición entre ambos diagnósticos.

HIPÓTESIS

Existen diferencias celulares y moleculares en la célula de Schwann y otros componentes neuroinmunes en pulpas diagnosticada con pulpitis reversible y pulpitis irreversible que permiten su diagnóstico diferencial.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológicamente el estado celular y molecular de células de Schwann y otros componentes neuroinmunes en pulpas diagnosticadas con pulpitis reversible e irreversible.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el estado y la organización de las células de Schwann, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas en pulpas con diagnóstico de pulpitis reversible y pulpitis irreversible.
2. Definir el perfil cuantitativo de células de Schwann, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas en pulpas con diagnóstico de pulpitis reversible y pulpitis irreversible.
3. Caracterizar la expresión de la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1) como biomarcador en pulpas con inflamación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se obtuvieron dientes diagnosticados clínicamente con pulpitis reversible, pulpitis irreversible sintomática y dientes sanos, en un Centro de Salud Familiar de Santiago. Los dientes controles fueron extraídos por indicación de ortodoncia (dientes sanos de pacientes de 15 años). Los dientes con pulpitis reversible fueron extraídos por indicación de extracción de terceros molares (28-31 años) y los dientes con pulpitis irreversible, por decisión del paciente luego de rechazar el tratamiento conservador (33-59 años). En cada caso se informó sobre las alternativas de tratamiento, los objetivos de la intervención, consecuencias, beneficios y riesgos de las opciones del tratamiento.

El procedimiento fue realizado bajo anestesia local por indicación del clínico o por común acuerdo con el paciente. Las muestras fueron donadas bajo consentimiento informado acorde a los protocolos del Comité de ética de la Universidad de Valparaíso. Los criterios de inclusión para pulpitis reversible fueron dientes con lesiones de caries que presentaran sensibilidad aumentada, de leve a moderada, a los cambios de temperatura y que esta remitiera al remover el estímulo. Esto de acuerdo a lo registrado en la anamnesis y examen clínico. Para pulpitis irreversible se consideró sintomatología aguda en dientes con lesiones de caries, dolor descrito como severo, constante o de aparición espontánea. También se consideró para este grupo de pacientes que al examen tuvieran sensibilidad aumentada al frío y que esta no remitiera al retirar el estímulo. Para el grupo control se consideró aquellos dientes sin lesiones de caries, asintomáticos y con respuesta normal a la prueba de sensibilidad al frío. Los criterios de exclusión para este trabajo fueron dientes con periodontitis, con historia de trauma, sintomatología clínica de pulpitis irreversible asintomática, necrosis pulpar, absceso dentoalveolar o lesión periapical. Todos los grupos fueron evaluados por el mismo examinador.

Los dientes extraídos, fueron fijados en solución de paraformaldehído 4%, pH 7.4 por 6 horas, seccionados longitudinalmente con una sierra de diamante de baja velocidad isomet (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) y desmineralizados en EDTA 4%, pH7.4 por 3 meses. Las muestras fueron clasificadas en 3 grupos de acuerdo con el diagnóstico clínico: pulpitis reversible (n=12), pulpitis irreversible (n=12) y sano o control (n=4). Además, las lesiones de caries fueron clasificadas mediante examinación visual según el *Sistema Internacional de Evaluación y Detección de Caries* (Ismail et al., 2013). Los dientes con pulpitis reversible obtuvieron puntaje 4 y 5 (*caries moderada*) y los dientes con pulpitis irreversible, puntaje 5 y 6 (*caries severa*).

Inmunohistoquímica e Imágenes

Las muestras desmineralizadas fueron criopreservadas en 30% sacarosa y congeladas en medio de congelación de tejidos (Tissue-Tek; Sakura Finetek USA). Se obtuvieron criosecciones longitudinales en el plano coronal de 25 μm de grosor con un criostato (Leica CM-1900, Germany) a -20°C y se montaron en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina. Las muestras fueron rehidratadas en buffer fosfato salino (PBS), lavadas 3 veces por 10 minutos e incubadas por 1 hora en solución de bloqueo que contiene albúmina de suero bovino (BSA) 1%, suero de caballo 1% y Tritón X-100 0,3%. Luego, se agregaron los anticuerpos primarios en solución de bloqueo y se dejó actuar durante 12 horas a 4°C . Se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBS y luego se agregaron los anticuerpos secundarios en solución de bloqueo 1:500 por 1 hora a temperatura ambiente libre de luz. Se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBS y se tiñeron los núcleos con DAPI (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 10 minutos. Se volvió a lavar con PBS y finalmente se cubrieron las muestras con medio de montaje para fluorescencia (Dako Industries, Carpintería, CA, USA). Para su mantención, las muestras se mantuvieron a 4°C .

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Proveedor
Anti-S100	Conejo	1:250	DAKO
Anti-GFAP	Conejo	1:500	DAKO
Anti-MBP	Ratón	1:250	DAKO
Anti-CD68	Ratón	1:200	DAKO
Anti-MCP-1	Ratón	1:100	DAKO
Anti-ELA	Ratón	1:100	DAKO
Anti-HLA-DR	Ratón	1:100	Abcam

Se tomaron imágenes de las secciones inmunomarcadas de la pulpa dental coronal con un microscopio confocal (Nikon C1 plus, Japón) con líneas láser de 409, 488 y 543 nm. Las pilas de imágenes se procesaron con el software CZ (Nikon, Japón) y se mostraron como proyección de máxima intensidad con el software ImageJ. Los ajustes de brillo y contraste se realizaron con Adobe Photoshop CS4.

Análisis Cuantitativo y Estadístico

La cuantificación de las células inmune se realizó utilizando imágenes confocales obtenidas de secciones longitudinales de dientes diagnosticados clínicamente con pulpitis reversible, irreversible y control. Se contaron las células de un área de $95 \times 145 \mu\text{m}^2$ en el programa ImageJ. Esto se repitió 3 veces de forma aleatoria para cada pulpa. Los datos fueron presentados en un gráfico como promedio.

Los datos utilizados para el análisis estadístico fueron testados con la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los datos. La significancia estadística fue determinada con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunn usando el programa Graph Pad Prism, con una diferencia significativa definida como $p < 0,05$. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar (DE).

RESULTADOS

Caracterización del fenotipo de las Célula de Schwann en pulpitis irreversible

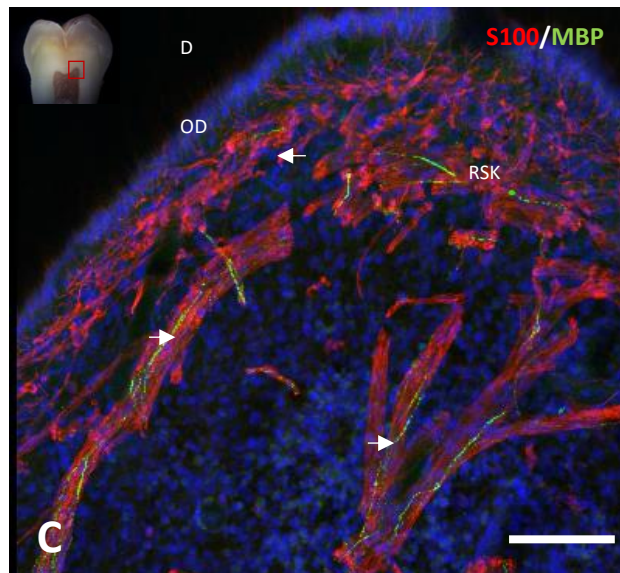
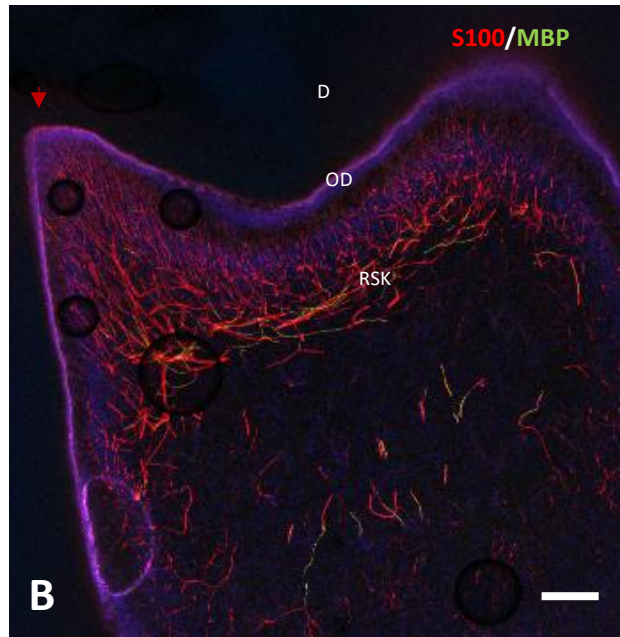
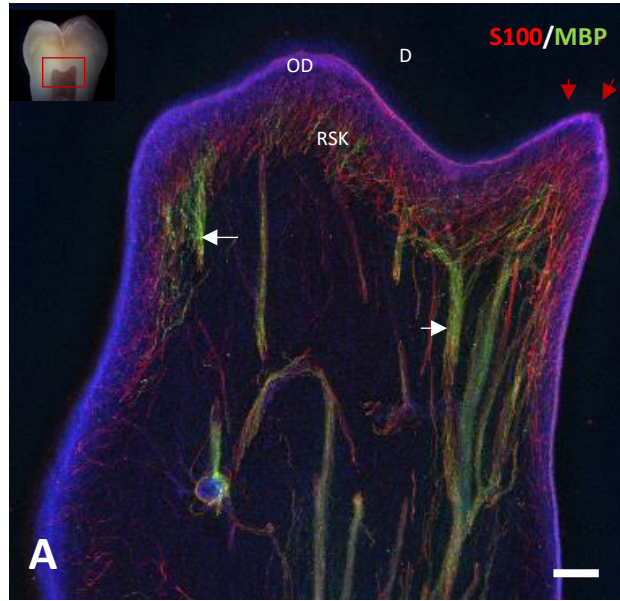
La proteína de unión a calcio S100 (S100) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) fueron utilizadas para caracterizar la organización de las células gliales del sistema nervioso periférico y MBP para detectar axones mielinizados presentes en la pulpa dental inflamada adulta.

El patrón de arborización de las fibras nerviosas de pulpas inflamadas inmunomarcadas con anticuerpos contra GFAP o S100 y MBP, revela un incremento en la densidad de los terminales en la periferia pulpar que se acentúa incluso más en la zona cercana a la lesión de caries. En la **Figura 1** se observa la organización de las células de Schwann dentro de la pulpa dental con sintomatología inflamatoria debido a la enfermedad de caries. En **A** se puede apreciar cómo los haces nerviosos de la pulpa se dirigen hacia la interfase pulpodentinaria, formando arborizaciones en la zona del plexo de Raschkow dentro de la pulpa coronal. Se observa cómo las células de Schwann forman una prominente red glial en la interfase pulpodentinaria con fenotipo mielinizante y no mielinizante.

En la **Figura 1** se ve cómo los axones mielinizados identificados con anticuerpo contra MBP, se restringen a los haces nerviosos más profundos de la pulpa y al plexo de Raschkow. Mientras, las células de Schwann no mielinizantes fueron identificadas como células elongadas en los haces nerviosos (**Fig. 1A, C**) y, además, en la interfase pulpodentinaria. Aquí se presentan como células altamente ramificadas cuyos cuerpos celulares se localizan en la capa subodontoblástica proyectando radialmente sus prolongaciones hacia la capa odontoblástica alcanzando incluso el dominio dentinario (**Fig. 1D**).

Cabe mencionar que en el cuerno pulpar afectado por la lesión cariosa (flechas rojas, **Fig 1A-B**), las células de Schwann están especialmente arborizadas con un aumento de la expresión en el área de la injuria. En la zona afectada, estas células gliales envían sus prolongaciones hacia la dentina, donde además se observa una capa de odontoblastos que pierde su forma columnar polarizada.

Además, en **D, E** se aprecia con mayor detalle cómo la activación de las células de Schwann no mielinizantes, distribuidas en la capa pulpar más superficial, es acompañada de la degradación de la mielina con una inicial fragmentación en la zona del plexo de Raschkow. Aunque las finas proyecciones de estas células cruzan la capa odontoblástica extendiéndose hacia la dentina, las células de Schwann mielinizantes permanecen en la zona del plexo de Raschkow.



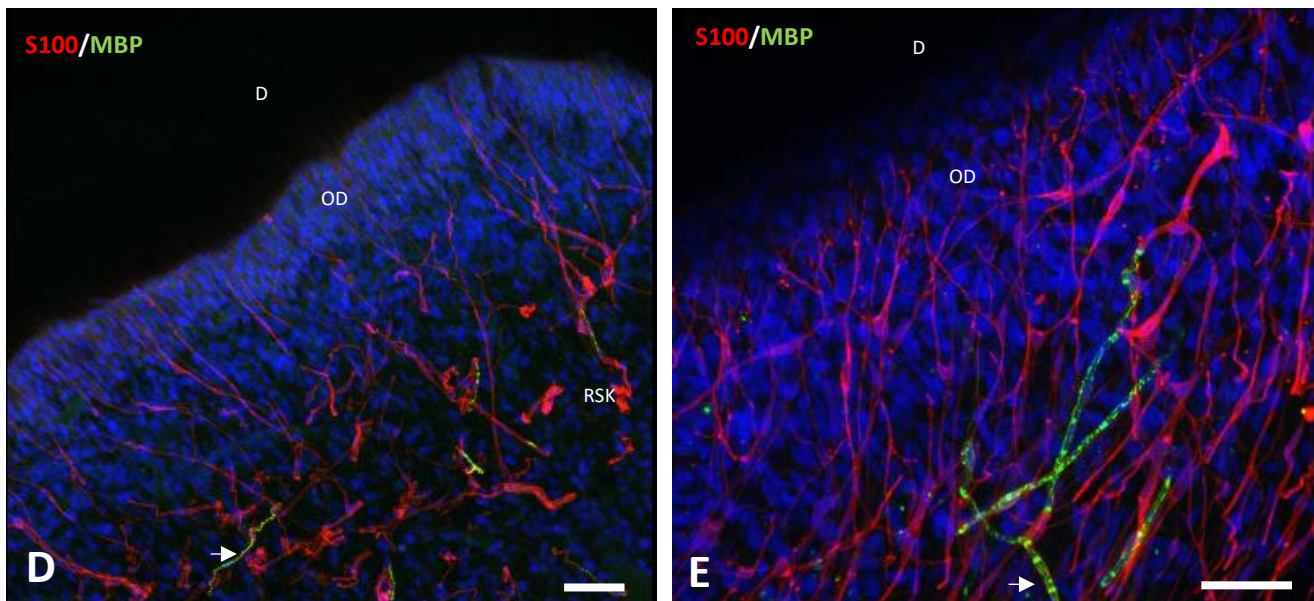


Figura 1 Caracterización de Célula de Schwann en pulpa dental inflamada. Imágenes representativas de microscopía confocal con doble marcaje, S100 (rojo) y MBP (verde) en dientes con pulpa dental inflamada por caries. (A, C) Distribución de célula de Schwann no mielinizante (rojo) altamente ramificada en la periferia pulpar. Las flechas rojas indican la zona de la lesión de caries donde se observa mayor densidad de la célula de Schwann en la zona del cuerno pulpar, mientras las flechas blancas señalan los axones mielinizados distribuidos dentro de la pulpa central y su ramificación hacia el plexo de Raschkow. (B) Red glial prominente, distribuida en la zona del plexo de Raschkow y las prolongaciones de la célula de Schwann no mielinizante hacia la capa odontoblástica siendo especialmente marcada en el cuerno pulpar cercano a la lesión cariosa. (D, E) Red glial no mielinizante enviando sus ramificaciones a la dentina a través de la capa odontoblástica, mientras los axones mielinizados parecen comenzar a fragmentarse siempre limitados a la zona del plexo de Raschkow (flechas blancas). D: Dentina, OD: capa de odontoblastos, RSK: plexo de Raschkow. A, B, C Barra de escala 100 μm , D y E: Escala 50 μm . A y E corresponden al mismo diente, al igual que C y D.

Análisis cualitativo de células de Schwann y células inmunes en pulpitis

También, se estudiaron algunas células inmunes asociadas a los cambios neuroinflamatorios de la pulpa con pulpitis. Igualmente se utilizó inmunomarcaje con microscopía confocal para caracterizar morfológicamente la célula de Schwann junto al infiltrado inflamatorio, tanto en pulpas sanas como con diagnóstico de pulpitis reversible e irreversible. Primero, para detectar las células de Schwann se utilizó anti-S100 y anti-GFAP, y anti-CD68 para macrófagos (**Figura 2, Anexo**). En pulpa sana, se observa una red glial terminal con algunas proyecciones de las células de Schwann desde el plexo de Raschkow hacia la dentina, aunque el diente no presente ninguna lesión cariosa. Además, se observan algunos macrófagos distribuidos en la zona subodontoblástica y plexo de Raschkow (**Fig. 2A**).

Cuando se compararon las condiciones de inflamación pulpar por caries con la pulpa sana, se observaron diferencias morfológicas importantes asociadas a la densidad de la red glial y al patrón de inervación. Nuevamente se ve cómo en la pulpa inflamada, en este caso de forma reversible (**Fig. 2B-D; Anexo**), aparece la célula de Schwann con una organización arborizada. Este fenómeno es evidente en la interfase pulpodentinaria, ramificándose desde la zona del plexo de Raschkow hacia emitir sus últimas proyecciones hacia la dentina. Junto con ello, aumenta el reclutamiento de macrófagos que se distribuyen en la interfase pulpodentinaria y capa subodontoblástica con un fenotipo fusiforme o de estrella elongada. Estos se localizan en todo el cuerpo pulpar, en estrecha relación y siguiendo el mismo recorrido que las células de Schwann.

Este doble inmunomarcaje (anti-S100 o anti-GFAP y anti-CD68) muestra que a medida que la inflamación de la pulpa aumenta y esta se hace irreversible (**Fig. 2E**), la población de células de Schwann adquiere una organización aún más prominente y con mayor expresión especialmente en la periferia. Esta densa población de células distribuida a lo largo del plexo de Raschkow se encuentra totalmente arborizada y escoltada por los macrófagos que ya han infiltrado progresivamente el tejido. En pulpitis irreversible, estos también presentan un fenotipo bipolar o de estrella elongada que parece acompañar el recorrido de las células de Schwann durante su respuesta frente a la lesión.

Luego, con un anticuerpo contra MCP-1 se observó la presencia de esta quimiocina distribuida en la pulpa central irreversiblemente inflamada e interfase pulpodentinaria, tanto en las células de Schwann y otros componentes, incluyendo haces nerviosos bajo el plexo de Raschkow, donde se observa que colocaliza con las células de Schwann (**Fig. 2F-G; Anexo**).

Para continuar caracterizando el perfil del infiltrado inflamatorio en pulpas con pulpitis reversible, irreversible y pulpa sana, se utilizó un anticuerpo contra S100 para las células de Schwann y anticuerpo contra ELA para observar neutrófilos (**Fig. 3; Anexo**). En la zona más superficial de la pulpa sana (**Fig. 3A**), se ve la empalizada de odontoblastos bien organizada que mantiene su estructura columnar de multicapas. Bajo esta el plexo de Raschkow presenta algunas ramificaciones hacia las capas más superficiales. En condiciones de salud pulpar, sólo aparecen algunos neutrófilos en la zona del plexo de Raschkow.

Cuando la inflamación pulpar es reversible, nuevamente llama la atención la prominente red de ramificaciones gliales que se proyectan desde la pulpa central hacia las capas más superficiales. La distribución de neutrófilos resultó discreta, presentándose en la zona del plexo de Raschkow y pulpa central muy próximos a las células de Schwann, aunque sí se observan algunos gránulos de elastasa distribuidos por el tejido (**Fig. 3B**). Por otro lado, cuando la pulpitis fue irreversible, por primera vez se observa un fenotipo bipolar y elongado en las células de Schwann, muy diferente de otras imágenes con su morfología arborizada hacia capas superficiales. Además, los neutrófilos ocuparon ampliamente la cámara pulpar (**Fig. 3**), algunos de ellos cercanos a las delgadas prolongaciones nerviosas y con una apariencia ovoidea o poligonal con proyecciones que se corresponde con la liberación de NETs.

Por último, se caracterizaron las células dendríticas pulpares en pulpitis reversible e irreversible utilizando un anticuerpo contra HLA-DR (**Fig. 4**). En general, se observó que las células dendríticas se distribuyeron principalmente en la periferia pulpar, dentro de la región subodontoblástica o paraodontoblástica. Estas extienden sus procesos hacia la capa odontoblástica quedando en algunos casos con algunas dendritas dentro de la matriz dentinaria.

En la pulpitis reversible (**Fig. 4A, B**), se destaca una red glial marcada en la zona del plexo de Raschkow con sus ramificaciones proyectadas hacia la capa de odontoblastos muy próximas a la dentina. Por otra parte, las células dendríticas aparecen como células de morfología estrellada y fusiforme en la zona del plexo de Raschkow que se ordenan radialmente en la zona subodontoblástica enviando sus dendritas hacia la capa de odontoblastos, similar a la organización de las células de Schwann en la interfase pulpodentinaria. En **Fig. 4B** se aprecia la interfase pulpodentinaria de la pulpa inflamada de forma reversible. Las células dendríticas se encuentran en la capa odontoblástica y subodontoblástica enviando sus prolongaciones hacia la dentina, de forma muy similar a la organización que presentan las dendritas de las células de Schwann en las capas más superficiales de la pulpa. Ambos tipos celulares se observan en estrecha relación en esta zona de la pulpa dental inflamada siguiendo un patrón de arborización similar.

Cuando la pulpitis fue diagnosticada como irreversible, las células dendríticas también se observaron dentro de la región subodontoblástica y para-odontoblástica, extendiendo sus procesos hacia las capas más superficiales, los que ocasionalmente se ven en la matriz dentinaria (**Fig. 4C**).

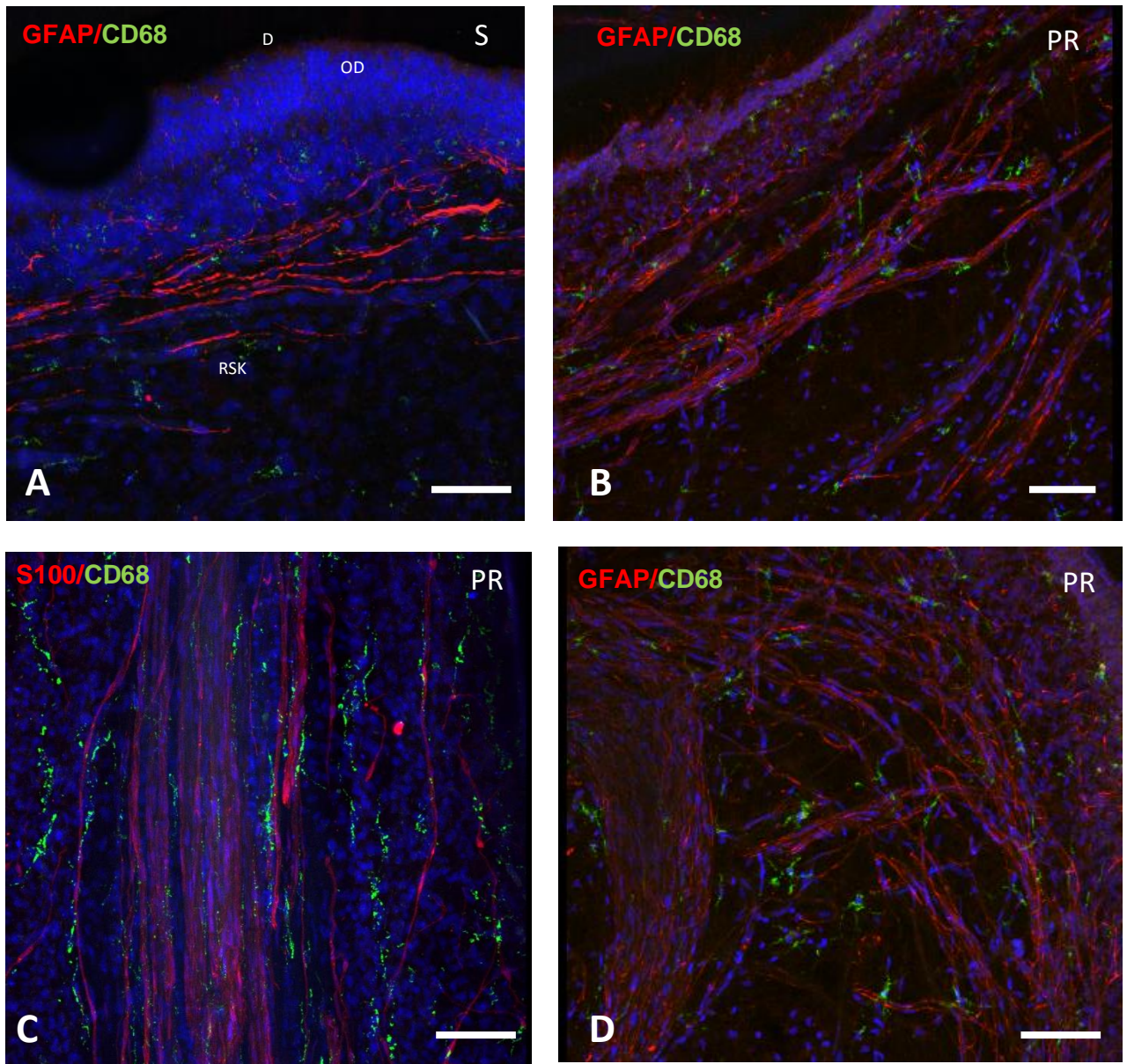


Figura 2.1 Células de Schwann y macrófagos en pulpitis reversible. Imágenes representativas de microscopía confocal con doble marcaje para célula de Schwann (S100 o GFAP, rojo) y macrófagos (CD68, verde) en diente con pulpa sana y dientes con diagnóstico clínico de pulpitis reversible. **(A)** Imagen de pulpa dental sin lesión de caries y asintomática **(B-D)** Pulpas con diagnóstico de pulpitis reversible. Macrófagos con morfología alargada o de estrella elongada en estrecha relación con la célula de Schwann. B y D corresponden a imágenes del mismo diente. Barra de escala: 100 μ m

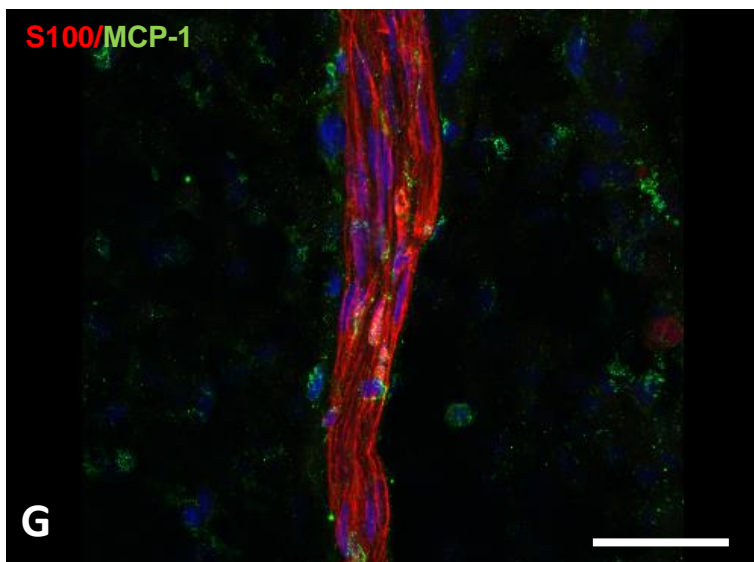
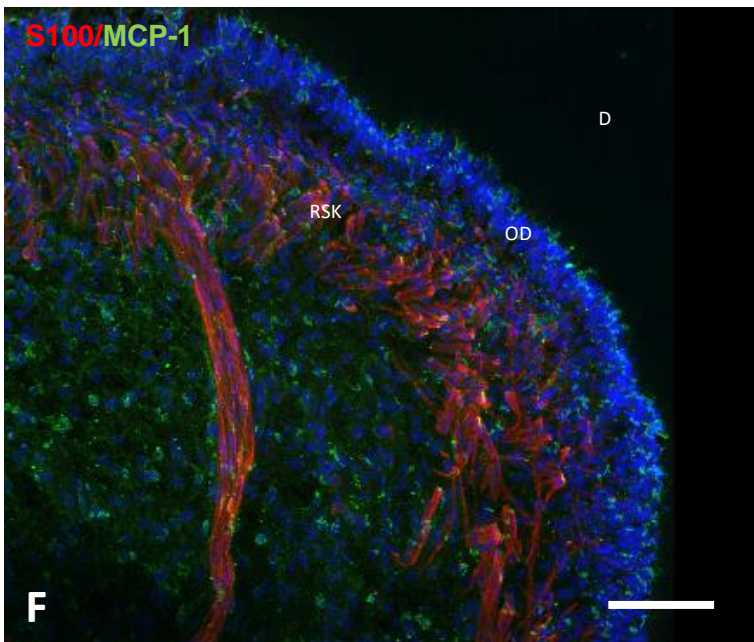
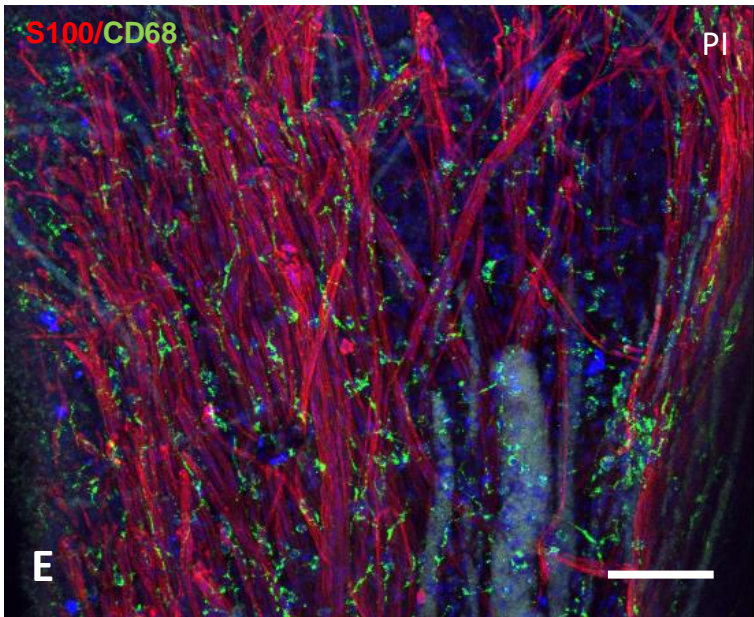


Figura 2.2 Células de Schwann, macrófagos y MCP-1 en pulpitis irreversible (E) El doble marcaje con S100 (rojo) y CD68 (verde) muestra la célula de Schwann especialmente arborizada en pulpitis irreversible (PI) y el aumento en la densidad de ambos tipos celulares como respuesta al daño por caries. Macrófagos con fenotipo fusiforme en estrecha relación con la célula de Schwann en inflamación pulpar. **(F-G)** MCP-1 se distribuye en a lo largo de todo el tejido pulpar, tanto en las células de Schwann como en otros componentes incluyendo haces nerviosos bajo el plexo de Raschkow. Barra de escala E, F: 100 μm G: 50 μm .

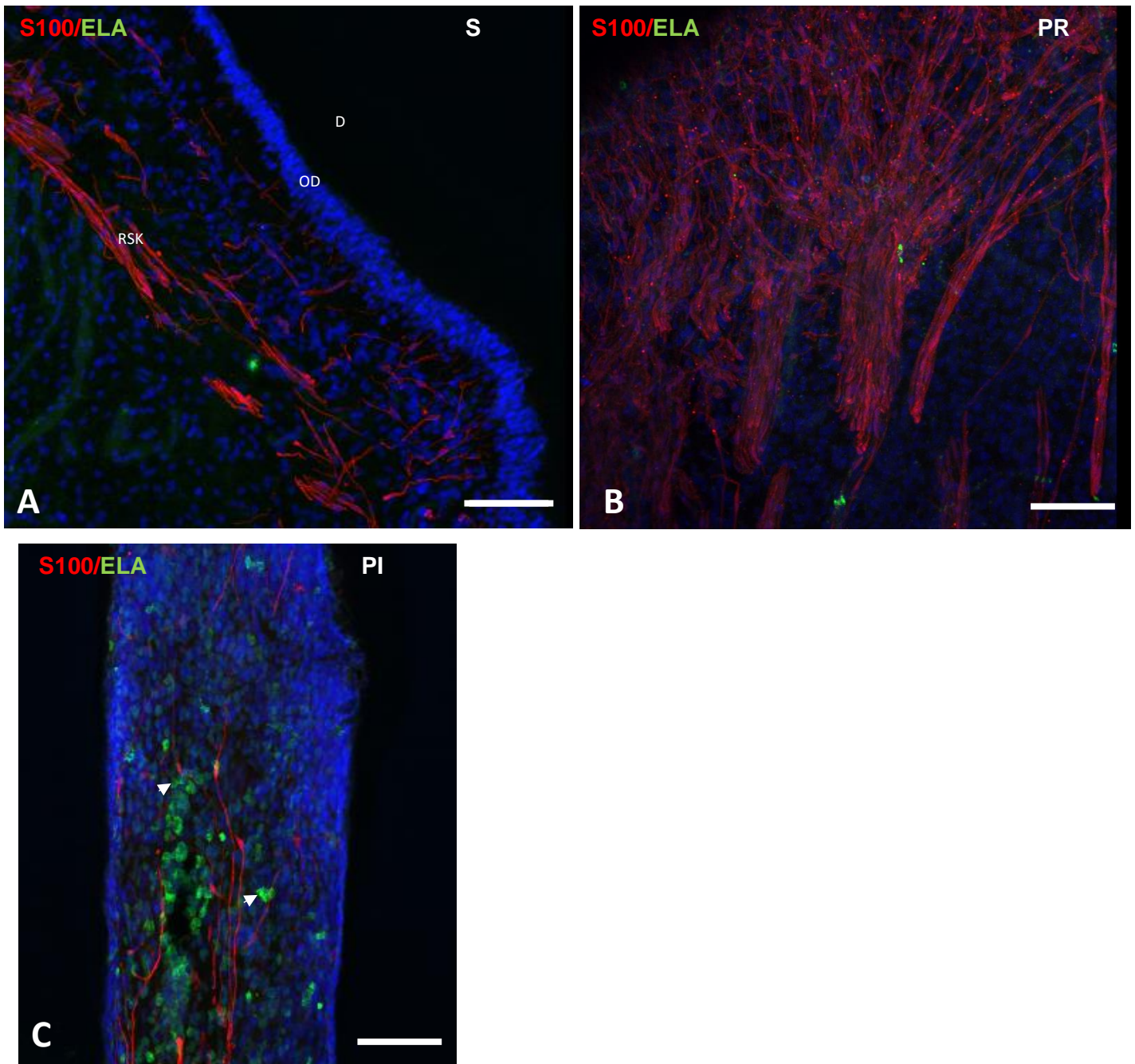


Figura 3. Células de Schwann y neutrófilos en pulpa sana y pulpitis. Imágenes representativas de microscopía confocal con doble marcaje (S100, rojo y ELA, verde) en dientes con pulpa sana, reversible e irreversiblemente inflamada. **(A)** En la condición de salud, se observa una estructura bien definida del plexo de Raschkow con un neutrófilo residente **(B)** Haces nerviosos que forman una red en las capas más superficiales de la pulpa enviando sus ramificaciones hacia la dentina. Se observa un aumento en el reclutamiento de neutrófilos en la pulpa central y zona del plexo de Raschkow. **(C)** Cuando la condición es irreversible, los neutrófilos infiltran todo el tejido pulpar. Las cabezas de flecha señalan neutrófilos experimentando NETosis. Barra de escala 100 μm

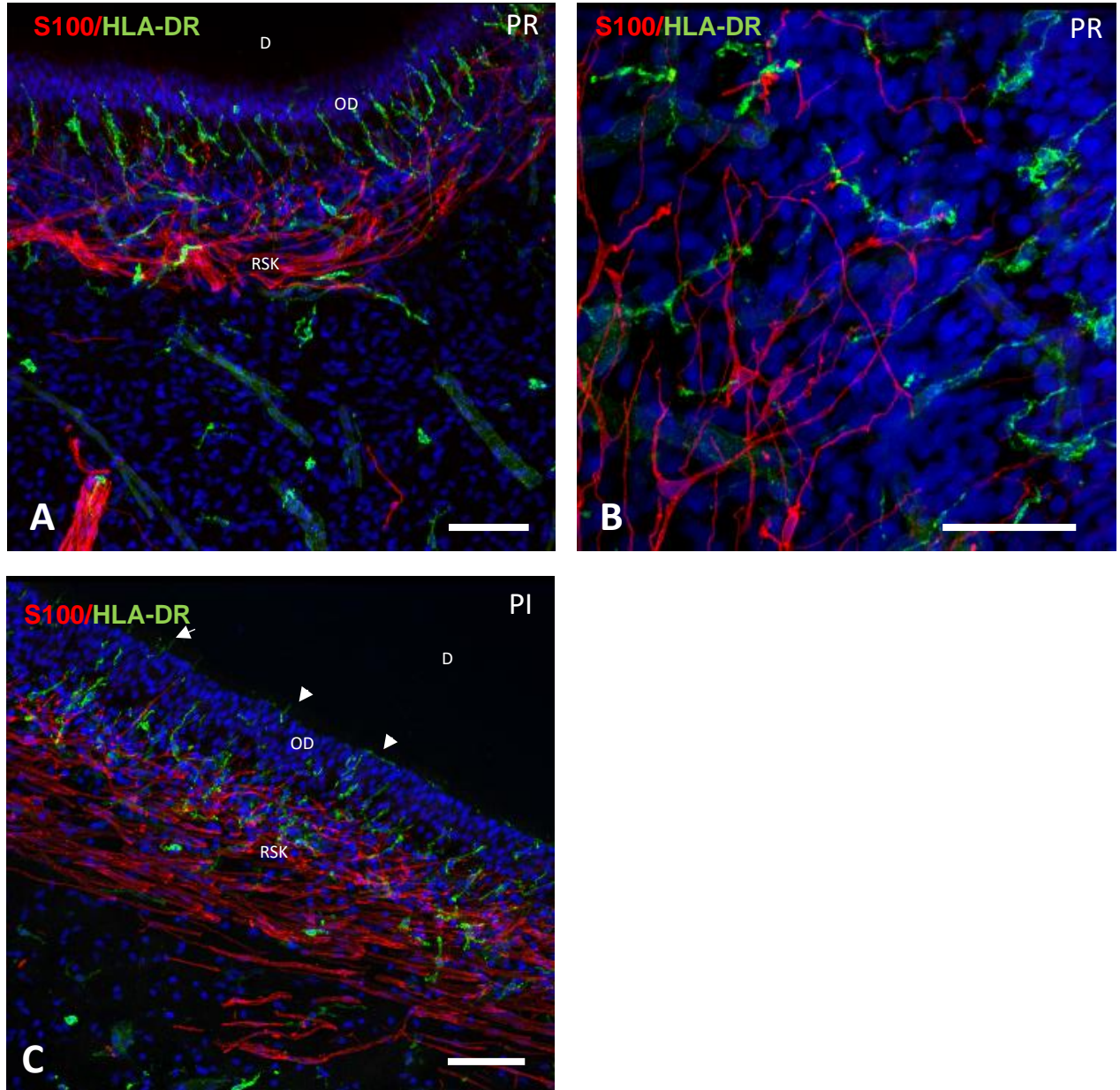


Figura 4. Células de Schwann y células dendríticas en pulpitis reversible e irreversible. Doble marcaje para célula de Schwann (S100, rojo) y célula dendrítica (HLA, verde). **(A)** En pulpitis reversible, las ramificaciones de las células gliales se distribuyen desde el plexo de Raschkow hacia la capa odontoblástica. Con la misma disposición radial, las células dendríticas se organizan en la zona sub y paraodontoblástica con un fenotipo estrellada o fusiforme. **(B)** Ambos tipos celulares en estrecha relación dentro de la interfase pulpodentinaria extendiendo sus prolongaciones hacia el dominio dentinario. **(C)** En pulpitis irreversible, se observa un incremento en las células de Schwann y células dendríticas en la zona subodontoblástica y paraodontoblástica. Algunas dendritas llegan incluso a dentina (cabezas de flecha). Barra de escala A, C: 100 μ m; B: 50 μ m

Análisis cuantitativo de células de Schwann y células inmune en pulpitis

Al comparar el número de células de Schwann por área entre los tres grupos estudiados, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el de pulpitis irreversible (**A, Fig 5**). También se adjuntan los gráficos que cuantifican las células inmunes para completar la caracterización de ambos cuadros (**B, Fig 5 y Anexo 1**).

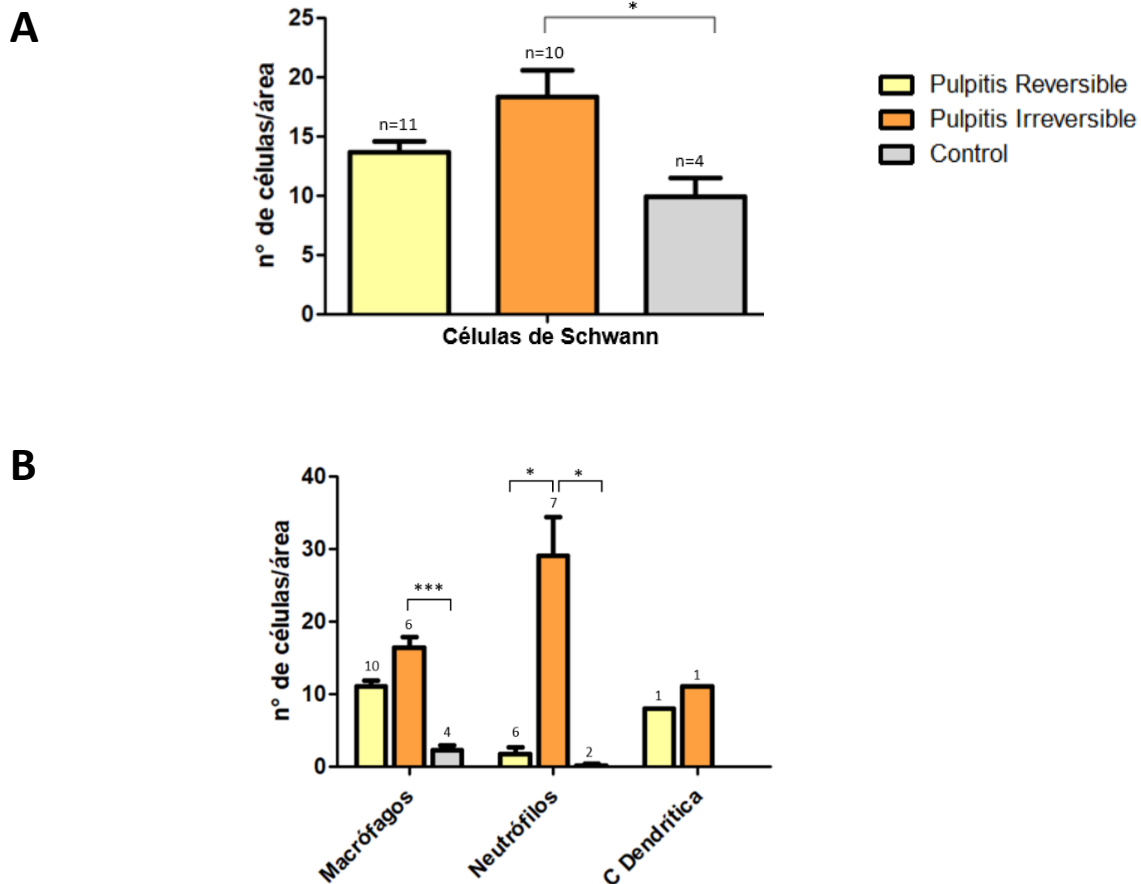


Figura 5. Análisis cuantitativo de células de Schwann y células inmunes en inflamación de pulpa dental. (A) El mayor número de células de Schwann se encontró en el grupo de pulpitis irreversible pero no tuvo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de pulpitis reversible. Se observaron los valores más bajos para el control (n=11, PR= 12,3; n=10, PI=18,3; n=4, Control= 9,8). **(B)** Se observa mayor número de células inmune para pulpitis irreversible. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre pulpitis irreversible y el grupo control respecto al número de macrófagos y neutrófilos. Entre pulpitis irreversible e irreversible sólo hubo diferencias significativas al evaluar el número de neutrófilos. Debido al tamaño de la muestra para células dendríticas no se realizó análisis estadístico (Macrófagos: PR= 10.9, n=10; PI= 16.3, n= 6; control=2.2, n=4. Neutrófilos: PR=1.6, n=6; PI=30.8, n=7; control=0,2, n=2. Células dendríticas: PR= 8, n=1; PI=11, n=1).

DISCUSIÓN

Comprender los mecanismos de defensa de la pulpa dental frente al daño producido por la caries es crucial para desarrollar mejores tratamientos y para que estos sean capaces de mantener la vitalidad pulpar el mayor tiempo posible, lo que contribuye a prolongar la vida útil del diente (Caplan et al., 2005; Edwards et al., 2021; Giacaman et al., 2018). Durante el ejercicio clínico, es frecuente que los odontólogos tengan que decidir si un diente debe o no permanecer vital o si la pulpa puede o no ser mantenida de acuerdo con su posibilidad de reparar. Sin embargo, las herramientas que dispone para tomar esta decisión continúan siendo muy limitadas.

Los síntomas relatados por los pacientes son indicadores ampliamente aceptados por los clínicos para determinar el estado inflamatorio de la pulpa. Sin embargo, una revisión sistemática determinó que la presencia, naturaleza y duración de los síntomas, junto a las pruebas de sensibilidad más frecuentemente utilizadas, resultan insuficientes para ofrecer información precisa sobre el grado de inflamación pulpar (Mejàre et al., 2012). Pocos estudios han podido relacionar el cuadro clínico con la histología del tejido frente al daño o las metodologías utilizadas para su análisis han sido muy diversas. Por lo mismo, también ha sido objeto de debate si las características de la sintomatología de los pacientes se correlacionan con el diagnóstico histológico de la pulpa (Ricucci et al., 2014, 2017). El estudio de la pulpa dental no es sencillo. Es por esto que ha pasado por alto elementos que podrían otorgar una nueva mirada para la comprensión de las patologías pulpares.

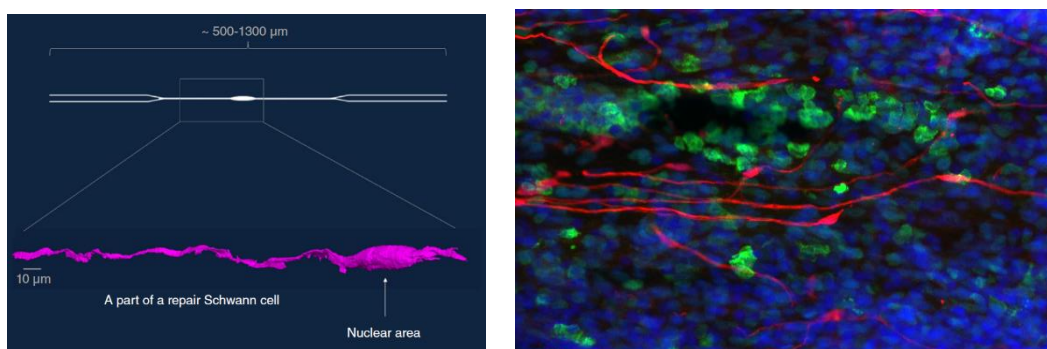
La pulpitis es una patología muy prevalente y la pulpa dental es un tejido altamente innervado (França et al., 2019), sin embargo, el rol de las células de Schwann en la respuesta neuroinflamatoria de la pulpa durante la progresión de la caries ha sido escasamente estudiada (Couve et al., 2018a; Couve & Schmachtenberg, 2018; Suzuki et al., 2015). Las células de Schwann, mielinizantes y no mielinizantes, son esenciales para el mantenimiento y soporte trófico de las fibras nerviosas además de participar en la regeneración nerviosa para preservar su función sensorial (Jessen et al., 2015). Es por esto, que algunos investigadores se han dedicado a observar el papel de estas células dentro de la pulpa dental y han encontrado que forman una densa red glial en la interfase pulpodentinaria, la que se reduce a medida que los dientes envejecen (Couve et al., 2018b) y que frente a lesiones de caries se arboriza notoriamente hasta alcanzar la zona de la dentina (Couve & Schmachtenberg, 2018). Estos resultados se pudieron confirmar en el presente estudio, ya que, frente a lesiones de caries, tanto en el cuadro de pulpitis reversible como de irreversible, las células de Schwann se observaron arborizadas proyectando sus ramificaciones hacia la interfase pulpodentinaria llegando incluso a la predentina, lo que fue mucho más notorio en el cuadro de pulpitis irreversible, respuesta asociada a una lesión de caries profunda.

En el caso del cuadro pulpar irreversible, se pudo observar con mayor claridad la distribución de las células de Schwann no mielinizantes en las capas más superficiales de la interfase pulpodentinaria, mientras las células de Schwann mielinizantes se limitaban a la zona del plexo de Raschkow, siendo las primeras mucho más numerosas, similar a lo que han descrito otros autores (Couve & Schmachtenberg, 2018; Nair & Schroeder, 1995; Luder, 1992). En la zona afectada por la lesión de caries, las células de Schwann envían sus prolongaciones hacia la dentina, donde además

se observa una capa de odontoblastos que pierde su forma columnar polarizada, lo que sugiere una lesión cariosa de avance rápido que produce este daño celular (Couve et al., 2013).

Aunque se observaron cambios en la morfología de las células de Schwann, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de células entre el cuadro reversible e irreversible. Sólo se apreciaron diferencias entre el grupo control y el de pulpitis irreversible, lo que hace sentido, considerando que la pulpitis irreversible es un cuadro inflamatorio importante y muy sintomático. Tal como ha sido señalado en otros trabajos (Hartlehnert et al., 2017; Trias et al., 2020), estas células están asociadas a cuadros de inflamación y dolor, lo que también se estaría replicando en pulpa dental. A pesar de que no hubo diferencias significativas entre las distintas pulpitis, esto podría indicar que estas células están presentes tanto en inflamación como en salud pulpar, pero cumpliendo roles diferentes. Tal como mencionamos previamente, las células de Schwann tienen una marcada plasticidad (Couve & Schmachtenberg, 2018; Jessen & Mirsky, 2019) que adopta diferentes fenotipos de acuerdo a las señales que recibe, lo que podría explicar el cambio de morfología de estas células sin un cambio de número evidente. Sin embargo, debido al tamaño de la muestra (n=12 pulpitis reversible; n=12 pulpitis irreversible; n=4 controles), son necesarios más estudios para poder extrapolar estas observaciones.

Llama la atención que, en imágenes del cuadro pulpar irreversible se observó un fenotipo menos arborizado, bipolar y elongado de la célula de Schwann en la zona central de la pulpa al marcarlas con el anticuerpo S100 (**C, Fig. 3**). Esta morfología se asemeja a la descrita como célula de Schwann de reparación (Jessen & Mirsky, 2016). En este estado, el daño nervioso desencadena una serie de cambios en la diferenciación de neuronas y de células de Schwann cercanas a la lesión, donde esta última responde con procesos de desdiferenciación y activación conjuntamente, por lo que se conoce como reprogramación adaptativa. Este cambio de fenotipo para promover la reparación tiene una estructura bipolar alargada que le permite alinearse para proporcionar un sustrato esencial junto a las señales de orientación para que los axones puedan reconectarse.



A la izquierda, imagen del fenotipo de la célula de Schwann reparativa tomada de Jessen & Mirsky, 2016 y a la derecha, detalle de C, Fig.3.

Es importante mencionar que la red glial se proyecta desde el plexo de Raschkow hacia la dentina también en la pulpa dental sana, y no sólo en presencia de caries o en el cuadro inflamatorio. Las células de Schwann aparecen distribuidas y especialmente arborizadas en la periferia pulpar, acompañando a los odontoblastos y células dendríticas (**Fig. 4**). Se podría sugerir

un rol como centinela en la detección de estímulos nocivos desde la dentina, considerando la ubicación estratégica donde se disponen su organización y morfología. Otras células inmunovigilantes, como las células dendríticas, también aparecieron en la zona pulpar más superficial enviando sus ramificaciones hacia la dentina de forma muy similar a lo observado en las células de Schwann. La distribución radial de las células dendríticas en la interfase pulpodentinaria también ha sido observada previamente como respuesta a lesiones de caries (Couve et al., 2014), lo que sugiere que ambos tipos celulares acompañarían esta compleja organización multicelular formando parte de la barrera de defensa contra patógenos.

En este trabajo, se observaron células de Schwann más arborizadas y formando una población más densa en la zona de la lesión cariosa, lo que refuerza la teoría de que la red glial también puede estar asociada a un rol de respuesta frente a la noxa (Fig. 1A, B). Aunque la expresión de MHC-II generalmente está limitada a células presentadoras de antígenos profesionales, otros tipos celulares, como las células endoteliales, pueden expresar MHC-II bajo condiciones inflamatorias *in vitro* (Mai et al., 2013). Algunos estudios señalan que las células de Schwann pueden expresar MHC-II luego de un trauma o frente a inflamación y que también pueden presentar antígenos *in vitro* (Meyer Zu Hörste et al., 2010), por lo que varios autores la consideran una célula inmunocompetente (Liu et al., 2012; Meyer Zu Hörste et al., 2008). También se ha encontrado evidencia de que las células de Schwann presentan antígenos y modulan la respuesta inmune local, además de promover el dolor neuropático en animales (Hartlehnert et al., 2017). Estos datos sugieren una función no apreciada de las células de Schwann como células presentadoras de antígenos condicionales, además de sus funciones de mielinización o soporte axonal, como un importante inmunomodulador frente a la noxa. Sin embargo, la significancia biológica de esta condición en pulpa sigue siendo desconocida.

Este tipo de arborización de estas células hacia capas más externas del tejido también ha sido observado en células gliales de la piel, donde sus prolongaciones se dirigen hacia las capas de la subdermis. Pero estas células de Schwann, consideradas como un tipo celular especializado, estarían implicadas incluso en iniciar la sensación de dolor (Abdo et al., 2019).

Además, en la pulpitis irreversible se observa la degradación de la mielina, fragmentándose en la zona del plexo de Raschkow (Fig.1, D, E) tal como ha sido observado en otros procesos inflamatorios de la pulpa como la exfoliación de dientes temporales (Suzuki et al., 2015), caracterizada por la denervación progresiva de la pulpa y conocido como degeneración walleriana (Gaudet et al., 2011). Muy similar a lo visto en las pulpas inflamadas, este proceso se caracteriza por la degradación del citoesqueleto axonal y una activación importante de la célula de Schwann, que se desdiferencia y estimula el reclutamiento de macrófagos para remover la mielina.

En general, los datos obtenidos en este estudio sugieren que frente a lesiones de caries con la consiguiente pulpitis se produce un brote neuronal con la invasión de células inmune. Cuando la pulpitis es reversible, esta invasión parece limitarse a la interfase pulpodentinaria y capas más superficiales, sin embargo, cuando el cuadro se diagnosticó como irreversible aparecen en todo el

cuerpo pulpar. Este aumento de células inmune frente a lesiones de caries o pulpitis irreversible también son observaciones mencionadas previamente por otros autores (Farges et al., 2015b; Hahn & Liewehr, 2007d, 2007a). **Macrófagos y células dendríticas aumentaron de forma gradual respecto a la severidad de la inflamación mientras los neutrófilos adoptaron una apariencia destacada cuando el cuadro de inflamación pulpar ya se había hecho irreversible.**

Aunque los macrófagos fueron numerosos en todos los dientes con caries, sólo hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de macrófagos cuando se comparó el grupo **control con el grupo de pulpitis irreversible**. Esto coincide con lo reportado por otros autores que le otorgan un rol protagónico en **inflamación pulpar** a este tipo celular (Bruno et al., 2010; Izumi et al., 1995). En pulpas dentales sanas, encontramos macrófagos en bajo número lo que también se corresponde con trabajos recientes (Yoshida et al., 2020a), aunque estudios antiguos no reportan macrófagos en pulpas sanas (Izumi et al., 1995).

En pulpitis reversible, además del aumento en la densidad y arborización de células de Schwann ya mencionado, los macrófagos presentaron un fenotipo de **estrella elongada o bipolar que sigue de cerca el recorrido de las células de Schwann (Fig.2, C-E)**. La relación entre estos dos tipos celulares frente al daño nervioso ha sido previamente documentada. La lesión aguda de nervios periféricos desencadena un entorno protector y de reparación induciendo fenotipo M2 de macrófagos (Ydens et al., 2012). Este es un proceso activo y sincronizado con axones sufriendo degeneración progresiva y la pérdida de la vaina de mielina, donde las células de Schwann liberan factores solubles que permiten el reclutamiento de macrófagos para que estos puedan remover de forma eficiente restos de axones y de mielina (Gaudet et al., 2011; Tofaris et al., 2002). A su vez, los macrófagos son fundamentales regulando la función de las células de Schwann durante la regeneración nerviosa, facilitando la migración del extremo distal de estas con la consiguiente regeneración axonal (Jessen & Mirsky, 2016; Stratton et al., 2018). Esto podría explicar la estrecha relación espaciotemporal entre macrófagos y células de Schwann una vez que la pulpa está inflamada y sintomática. Frente al daño crónico causado por la lesión de caries, ya existe degeneración axonal (Byers et al., 2003; Fristad et al., 2010), lo que justificaría el evidente aumento de macrófagos elongados tan estrechamente asociados a la células de Schwann.

Para marcar macrófagos, sólo se utilizó el anticuerpo anti-CD68, por lo que no es posible establecer con exactitud si estas células fueran clásicamente activadas o proinflamatorias (M1), o si se trata de su activación alternativa o antiinflamatoria (M2). Posiblemente, corresponden a M2 debido a su morfología fusiforme y elongada, pero para corroborarlo sería necesario utilizar otros anticuerpos como CD68 junto a CD163 (Yoshida et al., 2020a) o CD206 (Neves et al., 2020).

La polarización de los macrófagos de un fenotipo M1 a uno M2 está regulada bioquímicamente, pero también se sabe que esta puede ser inducida por estímulos físicos (Mantovani et al., 2013; McWhorter et al., 2013), es decir, que el alargamiento por sí mismo conduce a la expresión del fenotipo M2 sin tener necesariamente citoquinas exógenas que lo promuevan en el medio. Precisamente, Yoshida et al., 2020 observaron que al cultivar células de Schwann junto a macrófagos, estos comenzaron a elongarse para ser posteriormente identificados como M2 al expresar marcadores específicos. Los mismos autores encontraron que el fenotipo M2

se observó en procesos reparativos, como durante la formación del puente mineralizado en recubrimientos pulpaes directos; y con inmunofluorescencia detectaron una estrecha relación de estos macrófagos con células de Schwann justo en la zona de la lesión en dientes con caries. **Neves et al., 2020 señalan a los macrófagos** como piezas clave en el control de la inflamación pulpar y en la producción de dentina reparativa, ya que, al ser experimentalmente removidos, disminuyen las señales de reparación y ocurre la invasión de neutrófilos en el sitio dañado, generando una reacción inflamatoria exagerada y disminuyendo la dentinogénesis reparativa.

Estos antecedentes explicarían **la presencia tan prominente de macrófagos observada en inflamación pulpar reversible e irreversible.** Aunque en este último caso, observamos especialmente cómo invadían todo el tejido (**Fig.2, E**), probablemente como señal de un último intento para reparar el tejido antes de que este comience a morir.

Sin embargo, la relación de M2 y células de Schwann también ha sido estudiada en otros tejidos en el contexto de cáncer. Los M2 han sido asociadas al crecimiento e invasión de células tumorales (Van Overmeire et al., 2016; Zanganeh et al., 2016) **y existe evidencia que indica que las células de Schwann también están asociadas con la progresión de algunos tipos de cáncer (Bunimovich et al., 2017; Zhou et al., 2018).** En esa línea, recientes estudios *in vitro* han demostrado que las células de Schwann inducen la polarización de M2 en pulpa dental (Yoshida et al., 2020b) a través de citoquinas como CCL2 y que estos co-cultivados muestran actividad que promueve la proliferación de células cancerosas en pulmón (Zhou et al., 2020). Lo que no se sabe es si este aumento se debe a un aumento de M2, o si estos tendrían alguna función aún no conocida junto a las células de Schwann. Por lo mismo, **se ha considerado que existen subpoblaciones diferentes de estos macrófagos (Martinez & Gordon, 2014),** cuestión que vale la pena continuar esclareciendo.

En este trabajo también observamos la expresión de la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2), que es una de las quimiocinas claves que regulan la migración de monocitos y macrófagos (Deshmane et al., 2009). Ha sido encontrada previamente en pulpas con inflamación reversible e irreversible (Abd-Elmeguid et al., 2013) y en este caso fue observada en células de Schwann y otros componentes celulares de pulpas con pulpitis irreversible (**Fig. 2, F, G**). La expresión de esta quimiocina se ha visto en células endoteliales, células dendríticas, linfocitos, odontoblastos, monocitos y macrófagos (Sozzani et al., 1995), lo que explica que se haya distribuido en gran parte de la pulpa inflamada, tanto en la interfase pulpodentinaria como en capas más profundas. Además, esta expresión evidenció la colocalización de MCP-1 con células de Schwann, lo que podría estar asociado al reclutamiento espaciotemporal de macrófagos, ya que en otros **trabajos se ha visto que las células de Schwann atraen macrófagos por las secreción de esta quimiocina (Fischer, Weishaupt, et al., 2008; Tofaris et al., 2002).** Esto va de la mano con lo descrito en otros tejidos respecto al rol neuroinflamatorio de la célula de Schwann propuesto por algunos autores (Tzekova et al., 2014; Wei et al., 2019; Ydens et al., 2013): la células de Schwann expresa receptores de reconocimiento de patrones que le permite reconocer señales de peligro, y que tras su activación, estas inician y regulan respuestas inmunitarias locales presentando antígenos y secretando quimiocinas y citoquinas que atraerán más células al sitio de la lesión.

De todas formas, cómo la célula de Schwann regula todos los procesos mencionados sigue sin ser comprendido y mantener el fenotipo M2 en pulpa dental aparece como una posibilidad prometedora para proteger la pulpa dental. La relación entre ambos tipos celulares toma protagonismo en distintos escenarios y su vínculo también podría ser esencial en pulpa dental. Más estudios son necesarios para considerar este vínculo como una posible vía para el desarrollo de nuevas estrategias de terapias en pulpa dental para preservar el tejido vital.

Por otra parte, el patrón de los neutrófilos fue muy diferente al observado en macrófagos y células dendríticas, que parecen haber aumentado proporcionalmente a medida que la pulpitis pasaba de reversible a irreversible. En el caso de los neutrófilos, hubo diferencias estadísticamente significativas entre pulpitis irreversible y los otros dos grupos estudiados. La pulpitis reversible tiene más semejanzas con el grupo control donde se ven algunas células distribuidas en el cuerpo pulpar mientras en pulpitis irreversible, los neutrófilos aparecen distribuidos por toda la cámara pulpar (**Fig. 3, B Fig. 5**). Esto se corresponde con lo reportado por otros autores. A medida que las lesiones de caries progresan, tanto macrófagos como neutrófilos infiltran el tejido pulpar para destruir microorganismos (Cooper et al., 2011), y tal como se observó en este trabajo, otros investigadores mencionan a los neutrófilos como poco relevantes en pulpitis reversible, ya que no son muy numerosos bajo lesiones de caries menos profundas (Hahn & Liewehr, 2007a; Izumi et al., 1995). Estas células sí aparecen en estadios de caries superficiales, pero un aumento significativo ocurre cuando las lesiones cariosas son profundas (Izumi et al., 1995).

Ricucci et al., 2014, 2019 menciona la aparición de neutrófilos, asociados a microabscesos y bacterias que ya han infiltrado la pulpa dental, y en otras etapas más avanzadas del continuo de destrucción pulpar tales como fases agudas de periodontitis apical (Graunaite et al., 2011; Nair, 2004). Recientemente, Neves et al., 2020 observaron que la disminución experimental de neutrófilos suprimió la inflamación, favoreciendo la reparación y la producción de dentina reparativa. Es por esto que parece coherente que este tipo celular aparezca infiltrando fuertemente la pulpa durante el cuadro irreversible, cuando la sintomatología del paciente es aguda y el daño ya estaría en una fase crítica.

También, en inflamación pulpar los neutrófilos parecen encontrarse espaciotemporalmente cercanos a las fibras nerviosas (**Fig. 3**), lo que podría ser debido al rol en la remoción de mielina frente al daño nervioso. Una vez más se menciona a las células de Schwann como capaces de reclutar macrófagos y otras células inmunes como neutrófilos para promover la reparación nerviosa. Algunos autores han señalado incluso que su papel sería crítico frente al daño del sistema nervioso periférico, relevando a los macrófagos en la remoción de mielina durante la reparación axonal. (Jessen & Mirsky, 2019; Lindborg et al., 2017).

Los componentes de los gránulos primarios de los neutrófilos han sido implicados como mediadores importantes en la inflamación pulpar. La elastasa es uno de ellos, enzima proteolítica con actividad antibacteriana que rompe la elastina y los proteoglicanos de la matriz extracelular facilitando el daño del tejido (Amulic et al., 2012; Rechenberg, Galicia, et al., 2016). En pulpitis reversible, aunque los neutrófilos no se observaron como una población tan importante como lo

fue la de las células de Schwann, sí se puede reparar en la distribución de los pequeños gránulos de elastasa que se observan especialmente en la capa pulpar más superficial, posiblemente con el fin de destruir microorganismos invasores o sus subproductos (**Fig.3, B**). En estudios previos, esta proteasa ha sido cuantificada demostrando diferencias significativas entre pulpas severamente inflamadas y sanas (Cootauco et al., 1993; Nakanishi et al., 1995), sin embargo, la comparación con pulpitis reversible no ha sido estudiada. Vale la pena considerar esta enzima como un posible biomarcador de inflamación pulpar irreversible para investigaciones futuras (Rechenberg, Galicia, et al., 2016).

También, en las imágenes de pulpitis irreversible obtenidas en este trabajo (**C Fig. 3**) se observó un fenotipo de neutrófilos más grande y de apariencia ovoidea o poligonal con protrusiones. Esta morfología sugiere su muerte celular por liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) o NETosis, lo que ha sido asociado a cuadros inflamatorios agudos en otros tejidos humanos como en apendicitis o disentería (Brinkmann et al., 2004). También en pulpa dental inflamada se ha encontrado la presencia de NETs (Cooper et al., 2017) donde se encontró la misma morfología expandida y con protrusiones. Aunque su liberación tiene como objetivo combatir la presencia de bacterias, las histonas y otras moléculas liberadas al medio extracelular pueden ejercer un efecto citotóxico y proinflamatorio. Estas trampas se han considerado un importante mecanismo patogénico con efectos nocivos sobre el tejido pulpar, contribuyendo a su destrucción y posiblemente a la progresión de la enfermedad (Duncan & Cooper, 2020; Holder et al., 2019). Sin embargo, más estudios son necesarios para establecer si la activación de neutrófilos en este fenotipo de NETs es efectivamente un evento crucial en pulpitis irreversible tal como ha sido propuesto.

Respecto a las células dendríticas, han sido descritas como la población de células inmune residentes más numerosa en pulpa dental y predominantemente localizadas en la región subodontoblástica y para odontoblástica (Couve et al., 2014; Jontell et al., 1998; Ohshima et al., 1999). En este trabajo, también fueron observadas en la periferia pulpar, dentro de la zona subodontoblástica y para-odontoblástica, extendiendo largos procesos en la capa odontoblástica y ocasionalmente apareciendo algunas dendritas en la dentina (**Fig. 4**). Esta morfología también ha sido descrita por Couve et al., 2014; Couve & Schmachtenberg, 2018, aunque en sus reportes incluso llegan a ser residentes en la dentina reaccionaria frente a lesiones de caries.

Estas eficientes células presentadoras de antígenos actúan como centinelas. Se distribuyen en las capas más superficiales de la pulpa, aparentemente para estar alertas frente a la aparición de una posible amenaza (Couve et al., 2014; Farges et al., 2015). En este trabajo se observó un aumento gradual de células dendríticas a medida que la inflamación se hacía irreversible, y durante todo el avance de la enfermedad presentaron esta distribución radial, en la zona sub y paraodontoblástica proyectando sus dendritas hacia la dentina. Otros trabajos también han mencionado el aumento de estas células a medida que se produce el avance de la lesión cariosa (Couve et al., 2014; Hahn & Liewehr, 2007c), y en dientes sanos también aparecen como células inmunovigilantes de la periferia pulpar (Eduardo Couve & Schmachtenberg, 2018).

Llama la atención la similitud de la morfología entre las dendritas y prolongaciones proyectadas hacia la dentina que surgen en la zona odontoblástica, tanto de las células de Schwann como de las células dendríticas. Ambos tipos celulares envían sus prolongaciones hacia la dentina tal como las fibras nerviosas lo hacen para responder frente a la noxa (Byers et al., 2003; Eduardo Couve & Schmachtenberg, 2018; Fristad et al., 2010). Por un lado, recordando el papel de la célula de Schwann como célula inmunocompetente y por otro, reconociendo la importancia de las interacciones entre el sistema nervioso e inmune, que han demostrado modular respuestas inflamatorias frente al daño y la infección (Pinho-Ribeiro et al., 2017; Talbot et al., 2016) que también parecerían manifestarse dentro del tejido pulpar.

De acuerdo a esto, la pulpa dental se comportaría como otros tejidos altamente inervados, en los que el brote de las fibras nerviosas está asociado con la respuesta inmune frente al daño causado por bacterias, activando el dolor neurogénico (Baral et al., 2019). Interacciones entre nociceptores y células inmune han mostrado modular y coordinar respuestas inflamatorias frente a daño o infección en el tejido (Patente et al., 2018), pero cómo ocurre el proceso y qué rol tienen los actores de este escenario permanece sin ser completamente entendido.

Lo interesante de estas observaciones es que la interfase pulpodentinaria se presenta como una verdadera barrera multicelular, en la que odontoblastos, fibras nerviosas, células gliales e inmunes parecen distribuirse para detener el progreso de los patógenos que avanzan desde la dentina y así mantener la viabilidad de la pulpa. La asociación de la célula de Schwann con otras células inmunes crea una nueva perspectiva para la comprensión del rol de las células gliales y su activa participación en procesos como la inflamación pulpar.

A pesar de la alta prevalencia de pulpitis en la población mundial, pocos estudios han descrito su perfil inflamatorio e inmunológico (Bruno et al., 2010; Izumi et al., 1995; Jontell et al., 1998), tal vez debido a la dificultad que tiene estudiar la pulpa dental humana, encapsulada dentro de capas de tejido densamente mineralizado.

Mejorar los métodos para determinar la condición inflamatoria de la pulpa puede ser de gran valor, especialmente cuando se realiza una pulpectomía en dientes que podrían haber permanecido vitales. Un análisis detallado de biomarcadores de inflamación pulpar que permita diferenciar cuadros clínicos diferentes puede ser el inicio para el desarrollo de pruebas menos invasivas que sirvan como examen complementario para el diagnóstico pulpar. En una revisión sistemática se encontraron diferencias significativas a nivel molecular entre pulpas sanas e irreversiblemente inflamadas (Rechenberg, Galicia, et al., 2016), lo que es sin duda un comienzo.

El fluido dentinario es el líquido extracelular que se encuentra dentro de los túbulos dentinarios y su composición incluye mediadores inflamatorios. Su recolección se puede realizar en la clínica y podría ser una técnica menos invasiva como examen complementario para el diagnóstico (Zehnder et al., 2014). El fluido gingival crevicular también contiene información relevante. Es un

exudado del crévice gingival que incluye varios factores del huésped, incluidos anticuerpos, antígenos bacterianos y citoquinas, pero la principal desventaja es que estos pueden indicar la salud del periodonto y no sólo del tejido pulpar (Griffiths, 2003). De todas formas, clínicos e investigadores han demostrado interés en lograr un mejor diagnóstico clínico mediante pruebas innovadoras que permitan a los pacientes tener experiencia más cómoda en el sillón.

Realizar el diagnóstico de pulpitis reversible e irreversible con las herramientas disponibles no es tarea fácil y las opciones de tratamiento son limitadas debido a la comprensión parcial del proceso inflamatorio durante la enfermedad y la reparación. El equilibrio entre ambos es fundamental para preservar la anhelada vitalidad pulpar y con ello la sobrevivencia de los dientes (Cooper et al., 2014; Duncan & Cooper, 2020). El mejoramiento de los tratamientos de endodoncia hacia alternativas más conservadoras requiere un entendimiento de la clínica combinado con la comprensión de la biología e histología de la pulpa dental (Lin et al., 2020; Ricucci et al., 2014, 2019).

Las respuestas neuroinmunes necesitan ser tomadas en consideración en el desarrollo de nuevos enfoques para el tratamiento de la caries dental y la inflamación pulpar. Para mejorar los diagnósticos y terapias pulpares resulta clave conocer cómo se comporta este tejido durante la salud, la enfermedad y la reparación para poder relacionarlo con la sintomatología tan aguda que presentan los pacientes.

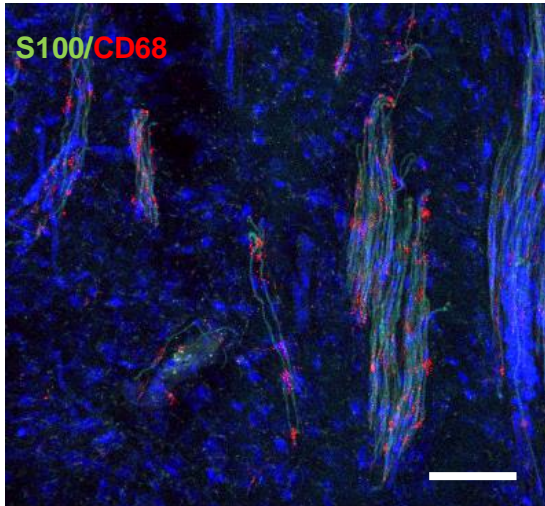
CONCLUSIÓN

La pulpa dental es un tejido altamente innervado. La interacción entre fibras nerviosas y células inmunes son un aspecto muy relevante para proteger el tejido frente al daño por caries, sin embargo, poco ha sido estudiado sobre la red glial que acompaña el proceso y su relación con el cuadro clínico inflamatorio producido por esta enfermedad. A pesar de la alta prevalencia de estas condiciones, pocos estudios han descrito su perfil neuroinflamatorio o descrito la histopatología asociada.

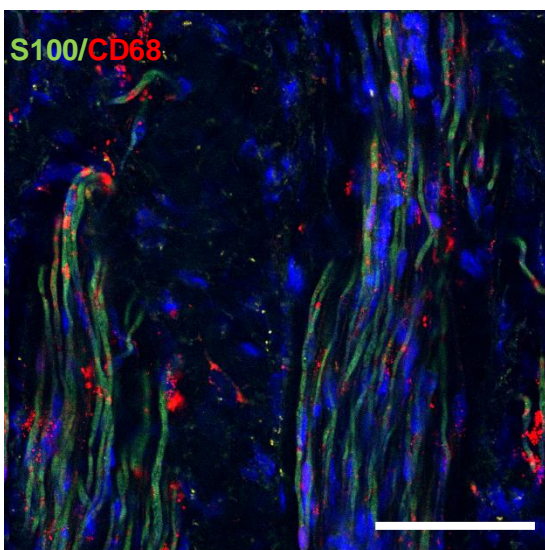
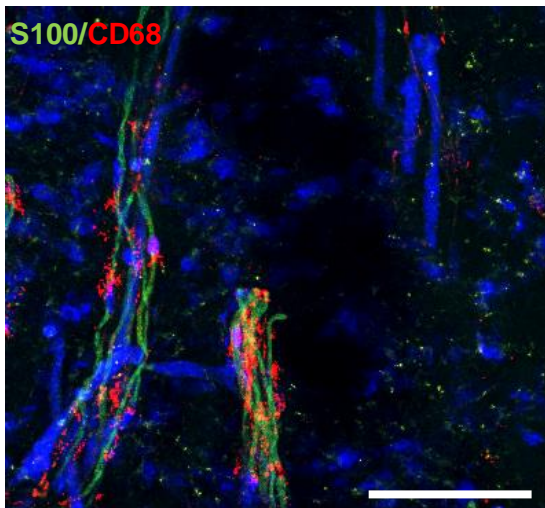
Mediante imágenes obtenidas con inmunomarcaje y microscopía confocal de pulpas humanas donadas con pulpitis reversible e irreversible, se determinó que existen diferencias en células de Schwann y otros componentes neuroinmunes para ambos diagnósticos. Se observó un aumento del infiltrado de células inmune a medida que aumentó la inflamación y cambios morfológicos en los fenotipos de la célula de Schwann, macrófagos y neutrófilos para ambos diagnósticos. Especialmente notable fue la arborización de la célula de Schwann junto a la proximidad de macrófagos fusiformes o elongados para pulpitis reversible. Mientras para pulpitis irreversible destacó la marcada presencia de neutrófilos y su muerte celular por liberación de NETs. Estas diferencias observadas con anti-ELA, posiblemente permitan realizar el diagnóstico diferencial de ambos cuadros clínicos, aunque más estudios son necesarios.

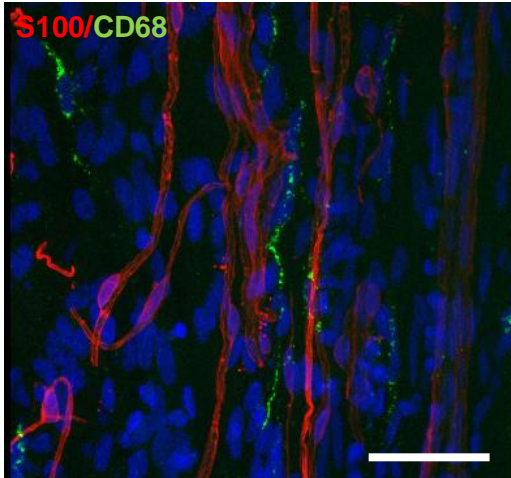
Caracterizar la red glial pulpar junto al infiltrado inflamatorio, contribuye a mejorar la comprensión de este complejo escenario multicelular. Esto no sólo podría facilitar el diagnóstico, sino considerar nuevas estrategias para el tratamiento de pulpitis y así mantener la tan anhelada viabilidad pulpar.

ANEXO

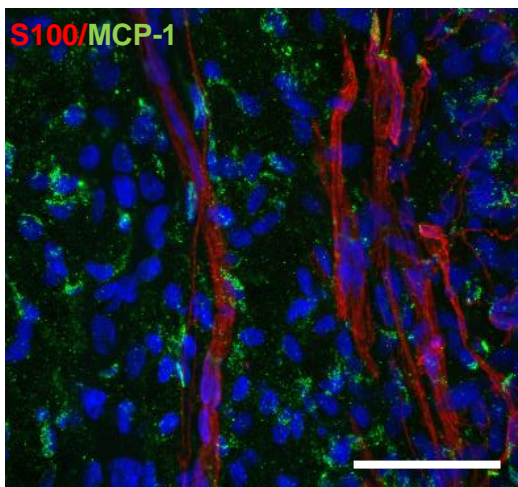
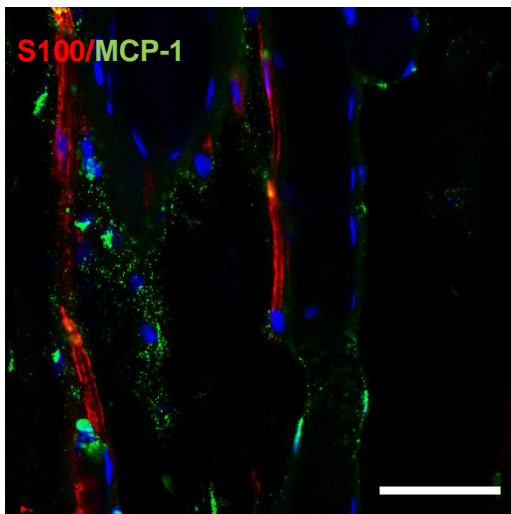


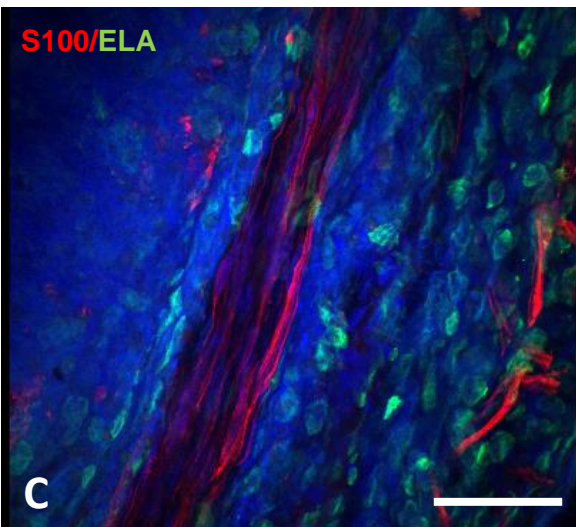
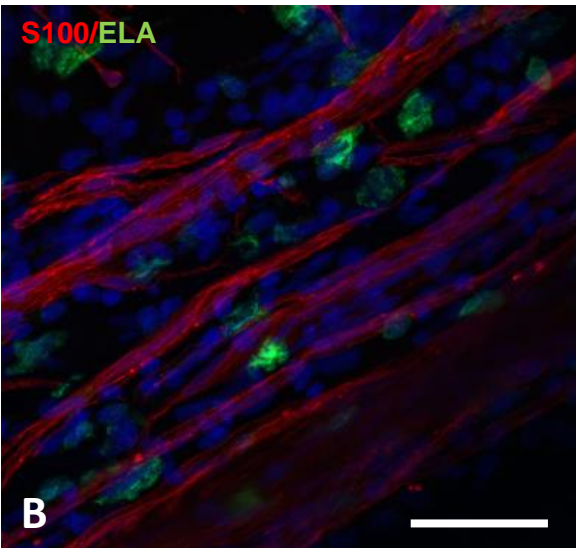
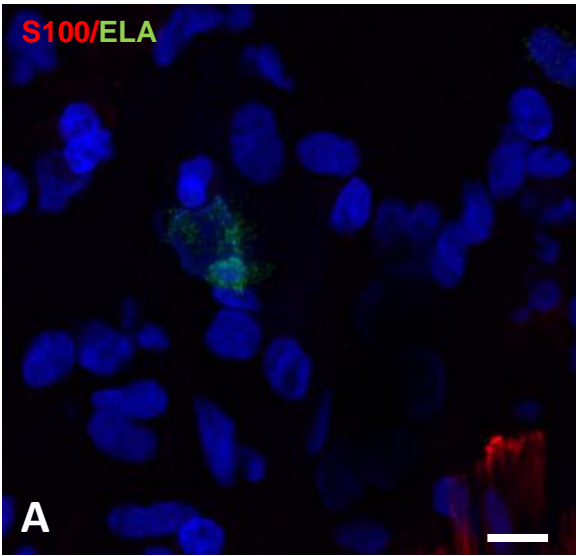
Doble marcaje para células de Schwann (S100, verde) y macrófagos (CD68, rojo) en dientes diagnosticados con pulpitis reversible. Barra de escala 100 μm .





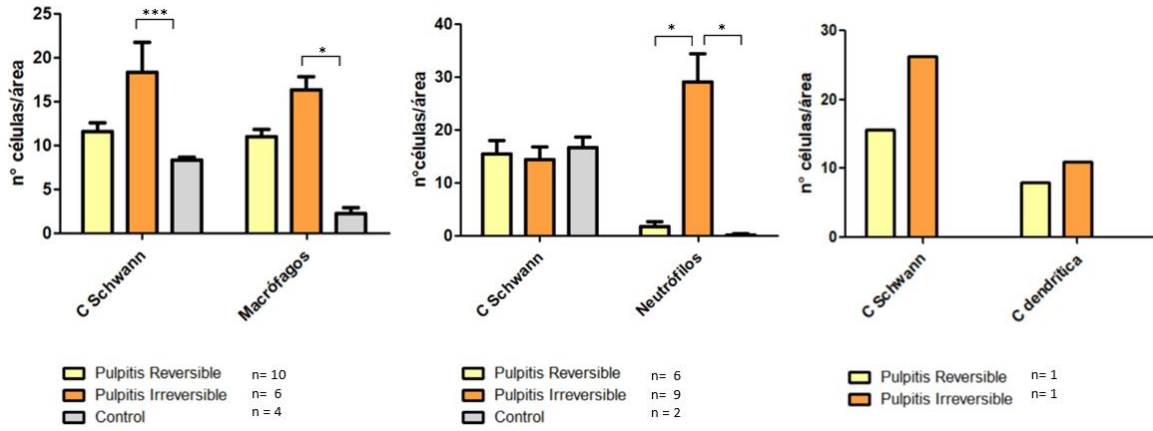
Doble marcaje para células de Schwann (s100, rojo) y MCP-1 o macrófagos (CD68, verde) en dientes diagnosticados con pulpitis irreversible. Barra de escala 50 μ m.





Doble marcaje para células de Schwann (s100, rojo) y neutrófilos (ELA, verde) en dientes diagnosticados con pulpitis irreversible. Barra de escala: A 10 μ m, B -C 50 μ m.

Gráfico del número de células de Schwann y células inmune



BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elmeguid, A., Abdeldayem, M., Kline, L. W., Moqbel, R., Vliagoftis, H., & Yu, D. C. (2013). Osteocalcin expression in pulp inflammation. *Journal of Endodontics*, *39*(7), 865–872. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.035>
- Abdo, H., Calvo-Enrique, L., Lopez, J. M., Song, J., Zhang, M. D., Usoskin, D., Manira, A. El, Adameyko, I., Hjerling-Leffler, J., & Ernfors, P. (2019). Specialized cutaneous schwann cells initiate pain sensation. *Science*, *365*(6454), 695–699. <https://doi.org/10.1126/science.aax6452>
- Aguilar, P., & Linsuwanont, P. (2011). Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: A systematic review. *Journal of Endodontics*, *37*(5), 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.12.004>
- Allareddy, V., Rampa, S., Lee, M. K., Allareddy, V., & Nalliah, R. P. (2014). Hospital-based emergency department visits involving dental conditions : Profile and predictors of poor outcomes and resource utilization. *Journal of the American Dental Association*, *145*(4), 331–337. <https://doi.org/10.14219/jada.2014.7>
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, *30*, 459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
- Baral, P., Udit, S., & Chiu, I. M. (2019). Pain and immunity: implications for host defence. *Nature Reviews Immunology*, *19*(7), 433–447. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0147-2>
- Bender, I. B. (2000a). Pulpal pain diagnosis--a review. *Journal of Endodontics*, *26*(3), 175–179. <https://doi.org/10.1097/00004770-200003000-00012>
- Bender, I. B. (2000b). Reversible and irreversible painful pulpitis: Diagnosis and treatment. *Australian Endodontic Journal*, *26*(1), 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2000.tb00144.x>
- Bergenholtz, G. (1990). Pathogenic mechanisms in pulpal disease. *Journal of Endodontics*, *16*(2), 98–101. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81571-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81571-2)
- Bjørndal, L., Simon, S., Tomson, P. L., & Duncan, H. F. (2019). Management of deep caries and the exposed pulp. *International Endodontic Journal*, *52*(7), 949–973. <https://doi.org/10.1111/iej.13128>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, *303*(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Bruno, K. F., Silva, J. A., Silva, T. A., Batista, A. C., Alencar, A. H. G., & Estrela, C. (2010). Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. *International Endodontic Journal*, *43*(11), 1013–1021. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01757.x>
- Bunimovich, Y. L., Keskinov, A. A., Shurin, G. V., & Shurin, M. R. (2017). Schwann cells: a new player in the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *66*(8), 959–968. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1929-z>
- Byers, M. R. (1984). Dental Sensory Receptors. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 25, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60677-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60677-7)
- Byers, M. R. (1985). Terminal arborization of individual sensory axons in dentin and pulp of rat molars. *Brain Research*, *345*(1), 181–185. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90851-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90851-0)
- Byers, M. R., Suzuki, H., & Maeda, T. (2003). Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microscopy Research and Technique*, *60*(5), 503–515. <https://doi.org/10.1002/jemt.10291>
- Caplan, D. J., Cai, J., Yin, G., & White, B. A. (2005). Root canal filled versus non-root canal filled teeth: A retrospective comparison of survival times. *Journal of Public Health Dentistry*, *65*(2), 90–96. <https://doi.org/10.1111/j.1752-7325.2005.tb02792.x>

- Cattin, A. L., Burden, J. J., Van Emmenis, L., MacKenzie, F. E., Hoving, J. J. A., Garcia Calavia, N., Guo, Y., McLaughlin, M., Rosenberg, L. H., Quereda, V., Jamecna, D., Napoli, I., Parrinello, S., Enver, T., Ruhrberg, C., & Lloyd, A. C. (2015). Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell*, *162*(5), 1127–1139. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.021>
- Cavalcanti, B. N., de Mello Rode, S., França, C. M., & Marques, M. M. (2011). Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. *Brazilian Oral Research*, *25*(1), 13–18. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242011000100003>
- Caviedes-Bucheli, J., Muñoz, H. R., Azuero-Holguín, M. M., & Ulate, E. (2008). Neuropeptides in Dental Pulp: The Silent Protagonists. *Journal of Endodontics*, *34*(7), 773–788. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.03.010>
- Chang, J., Zhang, C., Tani-Ishii, N., Shi, S., & Wang, C.-Y. (2005). NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *Journal of Dental Research*, *84*(11), 994–998. <https://doi.org/10.1177/154405910508401105>
- Chaussain-Miller, C., Fioretti, F., Goldberg, M., & Menashi, S. (2006). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *Journal of Dental Research*, *85*(1), 22–32. <https://doi.org/10.1177/154405910608500104>
- Chiu, I. M., Heesters, B. A., Ghasemlou, N., Von Hehn, C. A., Zhao, F., Tran, J., Wainger, B., Strominger, A., Muralidharan, S., Horswill, A. R., Wardenburg, J. B., Hwang, S. W., Carroll, M. C., & Woolf, C. J. (2013). Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature*, *501*(7465), 52–57. <https://doi.org/10.1038/nature12479>
- Chiu, I. M., Von Hehn, C. A., & Woolf, C. J. (2012). Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nature Neuroscience*, *15*(8), 1063–1067. <https://doi.org/10.1038/nn.3144>
- Cooper, P R, McLachlan, J. L., Simon, S., Graham, L. W., & Smith, A. J. (2011). Mediators of inflammation and regeneration. *Advances in Dental Research*, *23*(3), 290–295. <https://doi.org/10.1177/0022034511405389>
- Cooper, Paul R., Chicca, I. J., Holder, M. J., & Milward, M. R. (2017). Inflammation and Regeneration in the Dentin-pulp Complex: Net Gain or Net Loss? *Journal of Endodontics*, *43*(9), S87–S94. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.011>
- Cooper, Paul R., Holder, M. J., & Smith, A. J. (2014). Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: A double-edged sword. *Journal of Endodontics*, *40*(4 SUPPL.), S46–S51. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.021>
- Cooper, Paul R., Takahashi, Y., Graham, L. W., Simon, S., Imazato, S., & Smith, A. J. (2010). Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of Dentistry*, *38*(9), 687–697. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.05.016>
- Cootauco, C. J., Rauschenberger, C. R., & Nauman, R. K. (1993). Immunocytochemical Distribution of Human PMN Elastase and Cathepsin-G in Dental Pulp. *Journal of Dental Research*, *72*(11), 1485–1490. <https://doi.org/10.1177/00220345930720110501>
- Couve, E., Lovera, M., Suzuki, K., & Schmachtenberg, O. (2018a). Schwann Cell Phenotype Changes in Aging Human Dental Pulp. *Journal of Dental Research*, *97*(3), 347–355. <https://doi.org/10.1177/0022034517733967>
- Couve, E., Lovera, M., Suzuki, K., & Schmachtenberg, O. (2018b). Schwann Cell Phenotype Changes in Aging Human Dental Pulp. *Journal of Dental Research*, *97*(3), 347–355. <https://doi.org/10.1177/0022034517733967>
- Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2012). Mitochondrial autophagy and lipofuscin accumulation in aging odontoblasts. *Journal of Dental Research*, *91*(7), 696–701. <https://doi.org/10.1177/0022034512449347>
- Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2013). The amazing odontoblast: Activity, autophagy, and aging. *Journal of Dental Research*, *92*(9), 765–772. <https://doi.org/10.1177/0022034513495874>
- Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2014). Reactionary dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries. *Journal of Dental Research*, *93*(8), 788–793. <https://doi.org/10.1177/0022034514539507>
- Couve, E., & Schmachtenberg, O. (2011). Autophagic activity and aging in human odontoblasts. *Journal of Dental Research*, *90*(4), 523–528. <https://doi.org/10.1177/0022034510393347>
- Couve, Eduardo, & Schmachtenberg, O. (2018). Schwann cell responses and plasticity in different dental pulp scenarios. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00299>
- Dale, D. C., Boxer, L., & Conrad Liles, W. (2008). The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood*, *112*(4), 935–945.

<https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-077917>

- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–325. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Duncan, H. F., & Cooper, P. R. (2020). Pulp Innate Immune Defense: Translational Opportunities. *Journal of Endodontics*, 46(9), S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.019>
- Edwards, D., Stone, S., Bailey, O., & Tomson, P. (2021). Preserving pulp vitality: part one - strategies for managing deep caries in permanent teeth. *British Dental Journal*, 230(2), 77–82. <https://doi.org/10.1038/s41415-020-2590-7>
- Farges, J.-C., Romeas, A., Melin, M., Pin, J.-J., Lebecque, S., Lucchini, M., Bleicher, F., & Magloire, H. (2003). TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. *Journal of Dental Research*, 82(8), 652–656. <https://doi.org/10.1177/154405910308200816>
- Farges, J. C., Alliot-Licht, B., Baudouin, C., Msika, P., Bleicher, F., & Carrouel, F. (2013). Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria. *Frontiers in Physiology*, 4 NOV(November), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00326>
- Farges, J. C., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2015a). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators of Inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/230251>
- Farges, J. C., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2015b). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators of Inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/230251>
- Farges, J. C., Keller, J. F., Carrouel, F., Durand, S. H., Romeas, A., Bleicher, F., Lebecque, S., & Staquet, M. J. (2009). Odontoblasts in the dental pulp immune response. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312(5), 425–436. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21259>
- Fawzy El-Sayed, K. M., Klingebiel, P., & Dörfer, C. E. (2016). Toll-like Receptor Expression Profile of Human Dental Pulp Stem/Progenitor Cells. *Journal of Endodontics*, 42(3), 413–417. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.11.014>
- Fejerskov, O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. *Caries Research*, 38(3), 182–191. <https://doi.org/10.1159/000077753>
- Fischer, S., Kleinschnitz, C., Müller, M., Kobsar, I., Ip, C. W., Rollins, B., & Martini, R. (2008). Monocyte chemoattractant protein-1 is a pathogenic component in a model for a hereditary peripheral neuropathy. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 37(2), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.10.012>
- Fischer, S., Weishaupt, A., Troppmair, J., & Martini, R. (2008). Increase of MCP-1 (CCL2) in myelin mutant Schwann cells is mediated by MEK-ERK signaling pathway. *Glia*, 56(8), 836–843. <https://doi.org/10.1002/glia.20657>
- França, C. M., Riggers, R., Muschler, J. L., Widbiller, M., Lococo, P. M., Diogenes, A., & Bertassoni, L. E. (2019). 3D-Imaging of Whole Neuronal and Vascular Networks of the Human Dental Pulp via CLARITY and Light Sheet Microscopy. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47221-5>
- Fried, K., & Gibbs, J. . (2014). Dental pulp innervation. In *The Dental Pulp: Biology, Pathology and Regenerative Therapies* (pp. 75–95).
- Fristad, I., BLETSA, A., & BYERS, M. (2010). Inflammatory nerve responses in the dental pulp. *Endodontic Topics*, 17(1), 12–41. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2010.00247.x>
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 4(3), 281–286. <https://doi.org/10.2174/1568010054022024>
- Gaudet, A. D., Popovich, P. G., & Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-110>
- Giacaman, R. A., Muñoz-Sandoval, C., Neuhaus, K. W., Fontana, M., & Chañas, R. (2018). Evidence-based strategies for the minimally invasive treatment of carious lesions: Review of the literature. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(7), 1009–1016. <https://doi.org/10.17219/acem/77022>
- Goldberg, M. (2014). The Dental Pulp. In *The Dental Pulp*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55160-4>

- Goldberg, M., Farges, J. C., Lacerda-Pinheiro, S., Six, N., Jegat, N., Decup, F., Septier, D., Carrouel, F., Durand, S., Chaussain-Miller, C., DenBesten, P., Veis, A., & Poliard, A. (2008). Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacological Research*, *58*(2), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.05.013>
- Goldberg, M., & Smith, A. J. (2004). *C ELLS AND E XTRACELLULAR M ATRICES OF D ENTIN AND P ULP : A B IOLOGICAL B ASIS FOR R EPAIR AND T ISSUE E NGINEERING*. *Ea* *2496*, 13–27.
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, *5*(12), 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Graunaite, I., Lodiene, G., & Maciulskiene, V. (2011). Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, *2*(4), 1–15. <https://doi.org/10.5037/jomr.2011.2401>
- Griffiths, G. S. (2003). Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, *31*, 32–42. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03103.x>
- Gusman, H., Santana, R. B., & Zehnder, M. (2002). Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *European Journal of Oral Sciences*, *110*(5), 353–357. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2002.21347.x>
- Häger, M., Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2010). Neutrophil granules in health and disease. *Journal of Internal Medicine*, *268*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x>
- Hahn, C. Lo, & Liewehr, F. R. (2007a). Innate Immune Responses of the Dental Pulp to Caries. *Journal of Endodontics*, *33*(6), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.001>
- Hahn, C. Lo, & Liewehr, F. R. (2007b). Innate Immune Responses of the Dental Pulp to Caries. *Journal of Endodontics*, *33*(6), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.001>
- Hahn, C. Lo, & Liewehr, F. R. (2007c). Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, *33*(7), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.002>
- Hahn, C. Lo, & Liewehr, F. R. (2007d). Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, *33*(7), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.002>
- Hakkim, A., Fürnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R. E., & Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(21), 9813–9818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909927107>
- Hall, B. E., Zhang, L., Sun, Z. J., Utreras, E., Prochazkova, M., Cho, A., Terse, A., Arany, P., Dolan, J. C., Schmidt, B. L., & Kulkarni, A. B. (2016). Conditional TNF- α Overexpression in the Tooth and Alveolar Bone Results in Painful Pulpitis and Osteitis. *Journal of Dental Research*, *95*(2), 188–195. <https://doi.org/10.1177/0022034515612022>
- Hargreaves, K. M., Goodis, H. E., & Seltzer, S. (2002). Seltzer and Bender's Dental Pulp. In *World* (Vol. 3, Issue February 2004).
- Hartlehnert, M., Derksen, A., Hagenacker, T., Kindermann, D., Schäfers, M., Pawlak, M., Kieseier, B. C., & Meyer Zu Horste, G. (2017). Schwann cells promote post-traumatic nerve inflammation and neuropathic pain through MHC class II. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12744-2>
- Haug, S. R., & Heyeraas, K. J. (2006). Modulation of dental inflammation by the sympathetic nervous system. *Journal of Dental Research*, *85*(6), 488–495. <https://doi.org/10.1177/154405910608500602>
- Hildebrand, C., Fried, K., Tuisku, F., & Johansson, C. S. (1995). Teeth and tooth nerves. *Progress in Neurobiology*, *45*(3). [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)00045-J](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)00045-J)
- Hirao, K., Yumoto, H., Takahashi, K., Mukai, K., Nakanishi, T., & Matsuo, T. (2009). Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. *Journal of Dental Research*, *88*(8), 762–767. <https://doi.org/10.1177/0022034509341779>
- Holder, M. J., Wright, H. J., Couve, E., Milward, M. R., & Cooper, P. R. (2019). Neutrophil Extracellular Traps Exert Potential Cytotoxic and Proinflammatory Effects in the Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, *45*(5), 513-520.e3. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.02.014>

- Horst, O. V., Horst, J. A., Samudrala, R., & Dale, B. A. (2011). Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunology*, *12*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-9>
- Houshmandi, M., Ye, P., & Hunter, N. (2014). Glial network responses to polymicrobial invasion of dentin. *Caries Research*, *48*(6), 534–548. <https://doi.org/10.1159/000360610>
- Huang, G. T.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, *88*(9), 792–806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
- Innes, N. P. T., Frencken, J. E., Bjørndal, L., Maltz, M., Manton, D. J., Ricketts, D., Van Landuyt, K., Banerjee, A., Campus, G., Doméjean, S., Fontana, M., Leal, S., Lo, E., Machiulskiene, V., Schulte, A., Splieth, C., Zandona, A., & Schwendicke, F. (2016). Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. *Advances in Dental Research*, *28*(2), 49–57. <https://doi.org/10.1177/0022034516639276>
- Izumi, T., Kobayashi, J., Okamura, K., Matsuo, K., Kiyoshima, T., Ishibashi, Y., Inoue, H., & Sakai, H. (1995). Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-cariou and cariou teeth. *Archives of Oral Biology*, *41*(7), 627–630. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(96\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(96)00075-1)
- Jespersen, J. J., Hellstein, J., Williamson, A., Johnson, W. T., & Qian, F. (2014). Evaluation of Dental Pulp Sensibility Tests in a Clinical Setting. *Journal of Endodontics*, *40*(3), 351–354. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.11.009>
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *Journal of Physiology*, *594*(13), 3521–3531. <https://doi.org/10.1113/JP270874>
- Jessen, Kristjan R., & Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(9), 671–682. <https://doi.org/10.1038/nrn1746>
- Jessen, Kristjan R., & Mirsky, R. (2019). The success and failure of the schwann cell response to nerve injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00033>
- Jessen, Kristjan R., Mirsky, R., & Arthur-Farraj, P. (2015). The Role of Cell Plasticity in Tissue Repair: Adaptive Cellular Reprogramming. *Developmental Cell*, *34*(6), 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.09.005>
- Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., & Bergenholtz, G. (1998). Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *9*(2), 179–200. <https://doi.org/10.1177/10454411980090020301>
- Jørn A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J., & Paster, B. J. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(4), 1407–1417. <https://doi.org/10.1128/JCM.01410-07>
- Kamal, A. M., Okiji, T., Kawashima, N., & Suda, H. (1997). Defense responses of dentin/pulp complex to experimentally induced caries in rat molars: an immunohistochemical study on kinetics of pulpal Ia antigen-expressing cells and macrophages. *Journal of Endodontics*, *23*(2), 115–120. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(97\)80257-9](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(97)80257-9)
- Kawashima, N., Wongyaofa, I., Suzuki, N., Kawanishi, H. N., & Suda, H. (2006). NK and NKT cells in the rat dental pulp tissues. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, *102*(4), 558–563. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.09.015>
- Khorasani, M. M. Y., Hassanshahi, G., Brodzikowska, A., & Khorramdelazad, H. (2020). Role(s) of cytokines in pulpitis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Cytokine*, *126*(October 2019), 154896. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154896>
- Kojima, T., Go, M., Takano, K., Kurose, M., Ohkuni, T., Koizumi, J., Kamekura, R., Ogasawara, N., Masaki, T., Fuchimoto, J., Obata, K., Hirakawa, S., Nomura, K., Keira, T., Miyata, R., Fujii, N., Tsutsumi, H., Himi, T., & Sawada, N. (2013). Regulation of tight junctions in upper airway epithelium. *BioMed Research International*, *2013*, 947072. <https://doi.org/10.1155/2013/947072>
- Levin, L. G., Law, A. S., Holland, G. R., Abbott, P. V., & Roda, R. S. (2009). Identify and Define All Diagnostic Terms for Pulpal Health and Disease States. *Journal of Endodontics*, *35*(12), 1645–1657. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.032>
- Lin, L. M., Ricucci, D., Saoud, T. M., Sigurdsson, A., & Kahler, B. (2020). Vital pulp therapy of mature permanent teeth with irreversible pulpitis from the perspective of pulp biology. *Australian Endodontic Journal*, *46*(1), 154–166.

<https://doi.org/10.1111/aej.12392>

- Lindborg, J. A., Mack, M., & Zigmond, R. E. (2017). Neutrophils Are Critical for Myelin Removal in a Peripheral Nerve Injury Model of Wallerian Degeneration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *37*(43), 10258–10277. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2085-17.2017>
- Liu, H., Shiryayev, S. A., Chernov, A. V., Kim, Y., Shubayev, I., Remacle, A. G., Baranovskaya, S., Golubkov, V. S., Strongin, A. Y., & Shubayev, V. I. (2012). Immunodominant fragments of myelin basic protein initiate T cell-dependent pain. *Journal of Neuroinflammation*, *9*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-119>
- Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H., & Yang, X. (2013). *An evolving new paradigm : endothelial cells – conditional innate immune cells.* 1–13.
- Mainkar, A., & Kim, S. G. (2018). Diagnostic Accuracy of 5 Dental Pulp Tests: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Endodontics*, *44*(5), 694–702. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.01.021>
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *Journal of Pathology*, *229*(2), 176–185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *1000Prime Reports*, *6*(March), 1–13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Matsuo, T., Ebisu, S., Nakanishi, T., Yonemura, K., Harada, Y., & Okada, H. (1994). Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta periapical exudates of infected root canals: correlations with the clinical findings of the involved teeth. *Journal of Endodontics*, *20*(9), 432–435. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(06\)80032-4](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(06)80032-4)
- Matsuo, Takashi, Nakanishi, T., Shimizu, H., & Ebisu, S. (1996). A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. *Journal of Endodontics*, *22*(10), 551–556. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(96\)80017-3](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(96)80017-3)
- McWhorter, F. Y., Wang, T., Nguyen, P., Chung, T., & Liu, W. F. (2013). Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(43), 17253–17258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308887110>
- Mejäre, I. A., Axelsson, S., Davidson, T., Frisk, F., Hakeberg, M., Kvist, T., Norlund, A., Petersson, A., Portenier, I., Sandberg, H., Tranæus, S., & Bergenholtz, G. (2012). Diagnosis of the condition of the dental pulp: A systematic review. *International Endodontic Journal*, *45*(7), 597–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02016.x>
- Meyer Zu Hörste, G., Heidenreich, H., Lehmann, H. C., Ferrone, S., Hartung, H. P., Wiendl, H., & Kieseier, B. C. (2010). Expression of antigen processing and presenting molecules by Schwann cells in inflammatory neuropathies. *Glia*, *58*(1), 80–92. <https://doi.org/10.1002/glia.20903>
- Meyer Zu Hörste, G., Hu, W., Hartung, H. P., Lehmann, H. C., & Kieseier, B. C. (2008). The immunocompetence of Schwann cells. *Muscle and Nerve*, *37*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1002/mus.20893>
- Michaelson, P. L., & Holland, G. R. (2002). Is pulpitis painful? *International Endodontic Journal*, *35*(10), 829–832. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00579.x>
- Mitsiadis, T. A., De Bari, C., & About, I. (2008). Apoptosis in developmental and repair-related human tooth remodeling: A view from the inside. *Experimental Cell Research*, *314*(4), 869–877. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.11.001>
- Mitsiadis, T. A., Fried, K., & Goridis, C. (1999). Reactivation of Delta-Notch signaling after injury: Complementary expression patterns of ligand and receptor in dental pulp. *Experimental Cell Research*, *246*(2), 312–318. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4285>
- Moule, A. J., Li, H., & Bartold, P. M. (1995). Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Australian Dental Journal*, *40*(2), 110–114. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1995.tb03125.x>
- Mukouyama Y., D. S., Stefan Britsch, M. T., & and David J. Anderson^{1, 2, 5}. (2002). Sensory Nerves Determine the Pattern of Arterial Differentiation and Blood Vessel Branching in the Skin. *Cell Press*, *109*, 693–705.
- Nahás-Scocate, A. C. R., de Moraes, G. F. A., Nader, H. B., Vicente, C. M., & Toma, L. (2018). Analysis of proteoglycan expression in human dental pulp. *Archives of Oral Biology*, *90*(November 2017), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.03.003>

- Nair, P. N. R. (2004). Critical Reviews in Oral Biology & Medicine AND THE CAUSES OF ENDODONTIC FAILURES. *International and American Associations for Dental Research*, 15(6), 348–381.
- Nair, P. N. R., & Schroeder, H. E. (1995). Number and size spectra of non-myelinated axons of human premolars. *Anatomy and Embryology*, 192(1), 35–41. <https://doi.org/10.1007/BF00186989>
- Nair PH.U. Luder, and H. E. S. (1992). Number and size-spectra of myelinated nerve fibers of human premolars. *Anat Embryol*, 186, 563–571. https://doi.org/10.1007/978-3-642-86429-2_1
- Nakanishi, T., Matsuo, T., & Ebisu, S. (1995). Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *Journal of Endodontics*, 21(3), 131–136. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80438-3](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80438-3)
- Närhi, M., Bjørndal, L., Fristad, I., & Haug Rethnam, S. (2016). Acute dental pain I: pulpal and dentinal pain. *TANDLÆGEBLADET*, 2, 110–119.
- Neves, V. C. M., Yianni, V., & Sharpe, P. T. (2020). Macrophage modulation of dental pulp stem cell activity during tertiary dentinogenesis. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77161-4>
- Northcutt RG, G. C. (1983). The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins. *Q Rev Biol*, 58(1), 1–28.
- Ohshima, H., Maeda, T., & Takano, Y. (1999). The distribution and ultrastructure of class II MHC-positive cells in human dental pulp. *Cell and Tissue Research*, 295(1), 151–158. <https://doi.org/10.1007/s004410051221>
- Patente, T. A., Pinho, M. P., Oliveira, A. A., Evangelista, G. C. M., Bergami-Santos, P. C., & Barbuto, J. A. M. (2018). Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 9, 3176. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03176>
- Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benzan, H., Allison, P., & Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)
- Pezelj-Ribaric, S., Anic, I., Brekalo, I., Miletic, I., Hasan, M., & Simunovic-Soskic, M. (2002). Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. *Archives of Medical Research*, 33(5), 482–484. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(02\)00396-x](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(02)00396-x)
- Pinho-Ribeiro, F. A., Verri, W. A., & Chiu, I. M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology*, 38(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- Rechenberg, D. K., Galicia, J. C., & Peters, O. A. (2016). Biological markers for pulpal inflammation: A systematic review. *PLoS ONE*, 11(11), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167289>
- Rechenberg, D. K., Held, U., Burgstaller, J. M., Bosch, G., & Attin, T. (2016). Pain levels and typical symptoms of acute endodontic infections: A prospective, observational study. *BMC Oral Health*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0222-z>
- Reeh, E. S., Messer, H. H., & Douglas, W. H. (1989). Reduction in tooth stiffness as a result of endodontic and restorative procedures. *Journal of Endodontics*, 15(11), 512–516. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(89\)80191-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(89)80191-8)
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2(4), 361–367. <https://doi.org/10.1038/86373>
- Richardson, J. D., & Vasko, M. R. (2002). Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3), 839–845. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.032797>
- Ricucci, D., Loghin, S., & Siqueira, J. F. (2014). Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *Journal of Endodontics*, 40(12), 1932–1939. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.010>
- Ricucci, D., Siqueira, J. F., Li, Y., & Tay, F. R. (2019). Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. *Journal of Dentistry*, 86(May), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.05.022>

- Ricucci, D., Siqueira, J. F., Loghin, S., & Lin, L. M. (2017). Pulp and apical tissue response to deep caries in immature teeth: A histologic and histobacteriologic study. *Journal of Dentistry*, *56*, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.10.005>
- Rotshenker, S. (2011). Wallerian degeneration: The innate-immune response to traumatic nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, *8*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-109>
- Scapini, P., & Cassatella, M. A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, *124*(5), 710–719. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-453217>
- Scheib, J. L., & Höke, A. (2016). An attenuated immune response by Schwann cells and macrophages inhibits nerve regeneration in aged rats. *Neurobiology of Aging*, *45*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.004>
- Schmidlin, K., Schnell, N., Steiner, S., Salvi, G. E., Pjetursson, B., Matuliene, G., Zwahlen, M., Brägger, U., & Lang, N. P. (2010). Complication and failure rates in patients treated for chronic periodontitis and restored with single crowns on teeth and/or implants. *Clinical Oral Implants Research*, *21*(5), 550–557. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01907.x>
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1361–1368. <https://doi.org/10.1038/nn1992>
- Schwendicke, F., Frencken, J. E., Bjørndal, L., Maltz, M., Manton, D. J., Ricketts, D., Van Landuyt, K., Banerjee, A., Campus, G., Doméjean, S., Fontana, M., Leal, S., Lo, E., Machiulskiene, V., Schulte, A., Splieth, C., Zandona, A. F., & Innes, N. P. T. (2016). Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Advances in Dental Research*, *28*(2), 58–67. <https://doi.org/10.1177/0022034516639271>
- Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z., & Bowlin, G. L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials*, *4*(1), 55–68. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw041>
- Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *18*(4), 696–704. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.696>
- Shibukawa, Y., Sato, M., Kimura, M., Sobhan, U., Shimada, M., Nishiyama, A., Kawaguchi, A., Soya, M., Kuroda, H., Katakura, A., Ichinohe, T., & Tazaki, M. (2015). Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, *467*(4), 843–863. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1551-x>
- Sozzani, S., Locati, M., Zhou, D., Rieppi, M., Luini, W., Lamorte, G., Bianchi, G., Polentarutti, N., Allavena, P., & Mantovani, A. (1995). Receptors, signal transduction, and spectrum of action of monocyte chemoattractant protein-1 and related chemokines. *Journal of Leukocyte Biology*, *57*(5), 788–794. <https://doi.org/10.1002/jlb.57.5.788>
- Stratton, J. A., Holmes, A., Rosin, N. L., Sinha, S., Vohra, M., Burma, N. E., Trang, T., Midha, R., & Biernaskie, J. (2018). Macrophages Regulate Schwann Cell Maturation after Nerve Injury. *Cell Reports*, *24*(10), 2561–2572.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.004>
- Suzuki, K., Lovera, M., Schmachtenberg, O., & Couve, E. (2015). Axonal Degeneration in Dental Pulp Precedes Human Primary Teeth Exfoliation. *Journal of Dental Research*, *94*(10), 1446–1453. <https://doi.org/10.1177/0022034515593055>
- Talbot, S., Foster, S. L., & Woolf, C. J. (2016). Neuroimmunity: Physiology and Pathology. *Annual Review of Immunology*, *34*, 421–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055340>
- Taub, D. D., & Oppenheim, J. J. (1994). Chemokines, inflammation and the immune system. *Therapeutic Immunology*, *1*(4), 229–246.
- Tecchio, C., & Cassatella, M. A. (2016). Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Seminars in Immunology*, *28*(2), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.04.003>
- Tofaris, G. K., Patterson, P. H., Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2002). Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *Journal of Neuroscience*, *22*(15), 6696–6703. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-15->

- Tomita, K., Kubo, T., Matsuda, K., Fujiwara, T., Yano, K., Winograd, J. M., Tohyama, M., & Hosokawa, K. (2007). The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury. *Glia*, *55*(11), 1199–1208. <https://doi.org/10.1002/glia.20533>
- Trias, E., Kovacs, M., King, P. H., Si, Y., Kwon, Y., Varela, V., Ibarburu, S., Moura, I. C., Hermine, O., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2020). Schwann cells orchestrate peripheral nerve inflammation through the expression of CSF1, IL-34, and SCF in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*, *68*(6), 1165–1181. <https://doi.org/10.1002/glia.23768>
- Tsakamoto, Y., Fukutani, S., Shin-ike, T., Kubota, T., Sato, S., Suzuki, Y., & Mori, M. (1992). Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, *37*(12), 1045–1055. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(92\)90037-9](https://doi.org/10.1016/0003-9969(92)90037-9)
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1843*(11), 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Tzekova, N., Heinen, A., & Küry, P. (2014). Molecules involved in the crosstalk between immune- and peripheral nerve Schwann cells. *Journal of Clinical Immunology*, *34*(SUPPL. 1), 86–104. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0015-6>
- Van Hassel, H. J. (1971). Physiology of the human dental pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, *32*(1), 126–134. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(71\)90258-1](https://doi.org/10.1016/0030-4220(71)90258-1)
- Van Overmeire, E., Stijlemans, B., Heymann, F., Keirse, J., Morias, Y., Elkrin, Y., Brys, L., Abels, C., Lahmar, Q., Ergen, C., Vereecke, L., Tacke, F., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J. A., & Laoui, D. (2016). M-CSF and GM-CSF Receptor Signaling Differentially Regulate Monocyte Maturation and Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Cancer Research*, *76*(1), 35–42. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0869>
- Veerayutthwilai, O., Byers, M. R., Pham, T.-T. T., Darveau, R. P., & Dale, B. A. (2007). Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiology and Immunology*, *22*(1), 5–13. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00310.x>
- Wadachi, R., & Hargreaves, K. M. (2006). Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection. *Journal of Dental Research*, *85*(1), 49–53. <https://doi.org/10.1177/154405910608500108>
- Wahlgren, J., Salo, T., Teronen, O., Luoto, H., Sorsa, T., & Tjäderhane, L. (2002). Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *International Endodontic Journal*, *35*(11), 897–904. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00587.x>
- Wei, Z., Fei, Y., Su, W., & Chen, G. (2019). Emerging role of schwann cells in neuropathic pain: Receptors, glial mediators and myelination. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00116>
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., & Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *The Journal of Experimental Medicine*, *185*(2), 317–328. <https://doi.org/10.1084/jem.185.2.317>
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., & Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *17*(1), 30–48. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.116>
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, *496*(7446), 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Ydens, E., Cauwels, A., Asselbergh, B., Goethals, S., Peeraer, L., Lornet, G., Almeida-Souza, L., Van Ginderachter, J. A., Timmerman, V., & Janssens, S. (2012). Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-176>
- Ydens, E., Lornet, G., Smits, V., Goethals, S., Timmerman, V., & Janssens, S. (2013). The neuroinflammatory role of Schwann cells in disease. *Neurobiology of Disease*, *55*, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.03.005>
- Yoshida, N., Edanami, N., Ohkura, N., Maekawa, T., Takahashi, N., Tohma, A., Izumi, K., Maeda, T., Hosoya, A., Nakamura, H., Tabeta, K., Noiri, Y., & Yoshida, K. (2020a). M2 Phenotype Macrophages Colocalize with Schwann Cells in Human Dental Pulp. *Journal of Dental Research*, *99*(3), 329–338. <https://doi.org/10.1177/0022034519894957>

- Yoshida, N., Edanami, N., Ohkura, N., Maekawa, T., Takahashi, N., Tohma, A., Izumi, K., Maeda, T., Hosoya, A., Nakamura, H., Tabeta, K., Noiri, Y., & Yoshida, K. (2020b). M2 Phenotype Macrophages Colocalize with Schwann Cells in Human Dental Pulp. *Journal of Dental Research*, *99*(3), 329–338. <https://doi.org/10.1177/0022034519894957>
- Yumoto, H., Hirao, K., Hosokawa, Y., Kuramoto, H., Takegawa, D., Nakanishi, T., & Matsuo, T. (2018). The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity. *Japanese Dental Science Review*, *54*(3), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.03.001>
- Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J. S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L. M., & Daldrup-Link, H. E. (2016). Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology*, *11*(11), 986–994. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.168>
- Zanini, M., Meyer, E., & Simon, S. (2017). Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, *43*(7), 1033–1051. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.02.009>
- Zehnder, M., Rechenberg, D. K., Bostanci, N., Sisman, F., & Attin, T. (2014). Comparison of vehicles to collect dentinal fluid for molecular analysis. *Journal of Dentistry*, *42*(8), 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.01.014>
- Zhou, Y., Li, J., Han, B., Zhong, R., & Zhong, H. (2020). Schwann cells promote lung cancer proliferation by promoting the M2 polarization of macrophages. *Cellular Immunology*, *357*(August), 104211. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104211>
- Zhou, Y., Shurin, G. V., Zhong, H., Bunimovich, Y. L., Han, B., & Shurin, M. R. (2018). Schwann cells augment cell spreading and metastasis of lung cancer. *Cancer Research*, *78*(20), 5927–5939. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1702>