

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Título de la tesis:

**Evaluación de la expresión de HOTAIR y citocinas proinflamatorias en pulpa dental
sana y con pulpitis irreversible.**

TESIS QUE PRESENTA:

C.D. JULIO CÉSAR BASURTO FLORES

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTORES:

DR. ROSALÍO RAMOS PAYÁN

DRA. MARIANA MELISSA AVENDAÑO FÉLIX

CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO. AGOSTO DE 2022



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



I. DEDICATORIA

Para Emma y Julián, mis ganas de ser mejor y salir adelante día con día. A mis padres y hermano, por su apoyo incondicional.

II. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida la oportunidad de poder realizar un posgrado, al programa de maestría en ciencias biológicas haberme tomado en cuenta y por darme la oportunidad de seguir preparándome en el ámbito de la investigación. A mi director de tesis, el Dr. Rosalio por su comprensión, ánimos y apoyo, a mi directora de tesis, Dra. Mariana, profundamente agradecido por la paciencia, comprensión y sus ganas de enseñarme a aprender nuevas cosas, y a Jorge por su ayuda y su amistad, a los alumnos y profesores del posgrado de endodoncia de la FOUAS, así como también a los alumnos de la clínica de enseñanza en exodoncia, a todos los compañeros de laboratorio que siempre estuvieron atentos a cualquier cosa que fuera necesaria, y también a cada uno de todos que directa e indirectamente me ayudaron a la conclusión de este proyecto.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Órgano dental	4
2.1.1 Esmalte	7
2.1.2 Dentina	8
2.1.3. Pulpa	8
2.1.4. Complejo dentino-pulpar	9
2.1.5. Células de la pulpa	11
2.1.5.1. Odontoblastos	11
2.1.5.2. Fibroblastos de la pulpa	12
2.1.5.3. Macrófagos	12
2.1.4.4. Células dendríticas	12
2.1.5 Anatomía de la raíz del órgano dental	13
2.2. Inflamación	15
2.2.1. Inflamación aguda	15
2.2.2. Inflamación crónica	16

2.2.4. Citocinas	17
2.2.5. Factor de necrosis tumoral (TNF- α)	17
2.2.7. Interlucina 6 (IL-6)	18
2.3. Epidemiología de la patología pulpar	20
2.4. Pulpitis	21
2.4.1. Pulpitis reversible	23
2.4.2. Pulpitis irreversible	23
2.4.3. Diagnóstico de pulpitis	25
2.5. RNA largos no codificantes (LncRNAs)	26
2.5.1. HOTAIR	28
3. ANTECEDENTES	29
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. JUSTIFICACIÓN	32
6. HIPÓTESIS	33
7. OBJETIVOS	34
6.1. Objetivo general	34
6.2. Objetivos específicos	34
7. MATERIALES Y MÉTODOS	35
7.1. Diseño experimental	35

7.2. Tipo de estudio	35
7.3. Muestra	35
7.3.1. Tipo de muestra	35
7.3.2. Obtención de la muestra	35
7.3.3. Criterios de inclusión	36
7.3.4. Criterios de exclusión	36
7.3.5. Criterios de eliminación	36
7.4. Toma, almacenamiento, proceso y análisis de la muestra	37
7.4.1. Toma de la muestra	37
7.4.2. Extracción de RNA	38
7.4.3. RT-qPCR	39
7.5. Análisis estadístico	40
7.6. Lugar de realización	40
8. Resultados	41
8.1 Caracteriscas generales de la muestra	41
8.2 Resultados de los órganos dentales obtenidos para muestra	45
8.3 Resultados obtenidos para causas de pulpitis	47
8.4 Resultados según el diagnóstico de la muestra	48
8.5 Resultados de la evaluación de la expresión de HOTAIR, IL-1β, IL-6 Y TNF-α	50

8.5.1 Expresión de TNF- α en pacientes con pulpitis irreversible	52
8.5.2 Expresión DE IL-6 en pacientes con pulpitis irreversible	53
8.5.3 Expresión de IL-1 β en pacientes con pulpitis irreversible	55
8.5.4 Expresión de HOTAIR en pacientes con pulpitis irreversible	56
9. DISCUSIÓN	57
10. CONCLUSIONES	59
11. PERSPECTIVAS	60
12. REFERENCIAS	61
13. ANEXOS	72
12.1 Anexo 1 consentimiento informado	72

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de la localización de los órganos dentales.....	7
Figura 2. Estructuras del órgano dental.....	9
Figura 3. Diagrama de las zonas de la pulpa	11
Figura 4. Estructuras del conducto radicular.....	14
Figura 5. Células de la inflamación aguda	16
Figura 6. Células de la inflamación crónica	17
Figura 7. Caries dental y su progresión hacia la pulpa.....	21
Figura 8. Proceso de la inflamación del órgano dental.....	22
Figura 9. Pulpitis reversible, corte histológico.....	23
Figura 10. Pulpitis irreversible, corte histológico	24
Figura 11. Características de los lncRNA	27
Figura 12. Rrelación de pacientes por género en general.....	42
Figura 13. Relación de pacientes por género en el grupo de pulpitis irreversible.....	42
Figura 14. Relación de pacientes por género en el grupo control	43
Figura 15. Edades del grupo pulpitis irreversible.....	43
Figura 16. Edad grupo control.....	44
Figura 17. Órganos dentales para grupo pulpitis.....	45
Figura 18. Órganos dentales para grupo control	46
Figura 19. Causas de pulpitis irreversible en los pacientes	47
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa.....	50
Figura 21. Expresión de TNF- α	52

Figura 22. Gráfico 10, expresión de IL-6	54
Figura 23. Gráfico 11, expresión IL-1 β	55
Figura 24. Gráfico 12, expresión HOTAIR.....	56

Índice de Tablas

Tabla 1. Nomenclatura de los órganos dentales según el número y cuadrante	5
Tabla 2 Células del complejo dentino-pulpar	9
Tabla 3. Muestras obtenidas según el género	41
Tabla 4. Diagnóstico de grupo pulpitis irreversible	48
Tabla 5. Pacientes del grupo control	49

1. RESUMEN

Introducción: El órgano dental está constituido por esmalte, dentina y pulpa, siendo el esmalte el tejido más duro, a pesar de su dureza, puede ser destruido por la carie la cual es una enfermedad multifactorial que puede llegar a destruir todos los tejidos duros del órgano dental llegando hasta la pulpa provocando una inflamación conocida como pulpitis, la cual puede ser reversible o irreversible, causando la necrosis y pérdida de la vitalidad del diente. El proceso inflamatorio de pulpitis esta mediado por diferentes citocinas proinflamatorias y en la actualidad se estudian los RNA largos no codificantes (lncRNA) como HOTAIR y su relación con la inflamación. **Objetivo:** El propósito de este estudio fue evaluar los perfiles de expresión de HOTAIR, IL-6, IL-1 β y TNF- α en pulpa sana y pulpitis irreversible. **Materiales y métodos:** Se obtuvieron 10 muestras de tejido pulpar para el grupo control y 10 muestras de pulpitis para el grupo experimental, se le realizó la extracción de RNA y se midió la expresión de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α y HOTAIR por RT-qPCR. **Resultados:** Se observó una mayor expresión ($p = 0.05$) de los genes HOTAIR, IL-6, IL-1 β y TNF- α en pulpitis irreversible en comparación con pulpa sana. **Conclusiones:** HOTAIR puede jugar un papel fundamental para la expresión de citocinas inflamatorias en el tejido pulpar, sin embargo, se requieren más muestras para confirmar definitivamente estos resultados.

Palabras clave: Pulpitis, HOTAIR, citocinas, lncRNA, inflamación.

2. ABSTRACT

Introduction: The dental organ is made up of enamel, dentin and pulp, with enamel being the hardest tissue, despite its hardness, it can be destroyed by caries, which is a multifactorial disease that can destroy all the hard tissues of the tooth. dental organ reaching the pulp causing an inflammation known as pulpitis, which can be reversible or irreversible, causing necrosis and loss of vitality of the tooth. The inflammatory process of pulpitis is mediated by different pro-inflammatory cytokines and long non-coding RNAs (lncRNA) such as HOTAIR and their relationship with inflammation are currently being studied. Objective: The purpose of this study was to evaluate the expression profiles of HOTAIR, IL-6, IL-1 β and TNF- α in healthy pulp and irreversible pulpitis. Materials and methods: 10 pulp tissue samples were obtained for the control group and 10 pulpitis samples for the experimental group, RNA extraction was performed and the expression of the IL-6, IL-1 β , TNF- α and HOTAIR genes was measured by RT-qPCR. Results: A higher expression ($p = 0.05$) of HOTAIR, IL-6, IL-1 β and TNF- α genes was observed in irreversible pulpitis compared to healthy pulp. Conclusions: HOTAIR may play a fundamental role for the expression of inflammatory cytokines in the pulp tissue, however, more samples are required to definitively confirm these results.

Keywords: Pulpitis, HOTAIR, cytokines, lncRNA, inflammation.

3. INTRODUCCIÓN

El órgano dental está constituido por esmalte, dentina y pulpa, siendo el esmalte el tejido más duro del cuerpo humano. A pesar de su dureza, puede ser destruido por la caries dental, la cual es una enfermedad multifactorial y progresiva que puede llegar a destruir todos los tejidos duros del diente llegando hasta la pulpa, provocando una inflamación conocida como pulpitis que puede ser reversible o irreversible, llegando a causar necrosis o pérdida de la vitalidad del diente y, posterior a ello, una lesión periapical de tipo bacteriano.

Las consecuencias de la pérdida de vitalidad de un órgano dental son diversas, el órgano al no obtener irrigación y sensibilidad está destinado a ser perdido en poco tiempo y esto compromete severamente la homeostasis del sistema estomatognático. Es por lo que el estudio de los mecanismos moleculares que se desencadenan como respuesta a un estímulo nocivo son primordiales para dilucidar cómo detener el avance del daño y evitar que un proceso inflamatorio inicial progrese a una pulpitis irreversible o a la muerte del tejido pulpar.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio tiene la finalidad de determinar los perfiles de expresión de un eje de regulación entre HOTAIR, un RNA largo no codificante, y la expresión de citocinas proinflamatorias de pulpa sana y pulpitis reversible.

4. MARCO TEÓRICO

2.1 ÓRGANO DENTAL

La cavidad oral es en parte conformada por su parte externa por los labios y piel del labio, ya por su parte interna se conforma por mucosas yugales, mucosas labiales paladar duro y blando, piso de boca, lengua y los órganos dentales; las mucosas se clasifican como mucosa de revestimiento las cuales son aquellas que no tienen gran cantidad de queratina y no tienen relación directa con los órganos dentales, mucosa masticatoria que corresponde al epitelio que tiene queratina siendo la encía y paladar duro lo que forman parte de la misma, y además una mucosa especializada que corresponde al dorso de la lengua, ya que es allí donde vamos a tener los botones gustativos que dan la percepción de los sabores ácido, dulce, salado y amargo. (Madani et al., 2014). Los órganos dentales que en el humano en la dentición adulta son 32 en total (8 incisivos, 4 caninos, 8 premolares y 12 molares) los cuales tienen la misma estructura en todos los mamíferos: esmalte, dentina, pulpa, cemento y ligamento periodontal (Figura 2) (Lacruz et al., 2017). Existen diferentes nomenclaturas para identificar los órganos dentales de manera individual mediante un sistema internacional en el cual se le asigna un número a cada órgano dental según corresponda su cuadrante, al dividirse por cuadrantes se obtienen dos superiores y dos inferiores respectivamente, una zona anterior y una zona posterior, la zona anterior corresponde incisivos a caninos, la zona posterior de premolares a molares (Tabla 1 e Figura 1) (Madani et al., 2014).

Tabla 1. Nomenclatura de los órganos dentales según el número y cuadrante

Cuadrante anterior superior lado derecho	Número de órgano dental
Incisivo central	11
Incisivo lateral	12
Canino	13
Primer premolar	14
Segundo premolar	15
Primer molar	16
Segundo molar	17
Tercer molar	18
Cuadrante anterior superior lado izquierdo	
Incisivo central	21
Incisivo lateral	22
Canino	23
Primer premolar	24
Segundo premolar	25
Primer molar	26
Segundo molar	27
Tercer molar	28
Cuadrante inferior izquierdo	
Incisivo central	31

Incisivo lateral	32
Canino	33
Primer premolar	34
Segundo premolar	35
Primer molar	36
Segundo molar	37
Tercer molar	38
Cuadrante inferior derecho	
Incisivo central	41
Incisivo lateral	42
Canino	43
Primer premolar	44
Segundo premolar	45
Primer molar	46
Segundo molar	47
Tercer molar	48

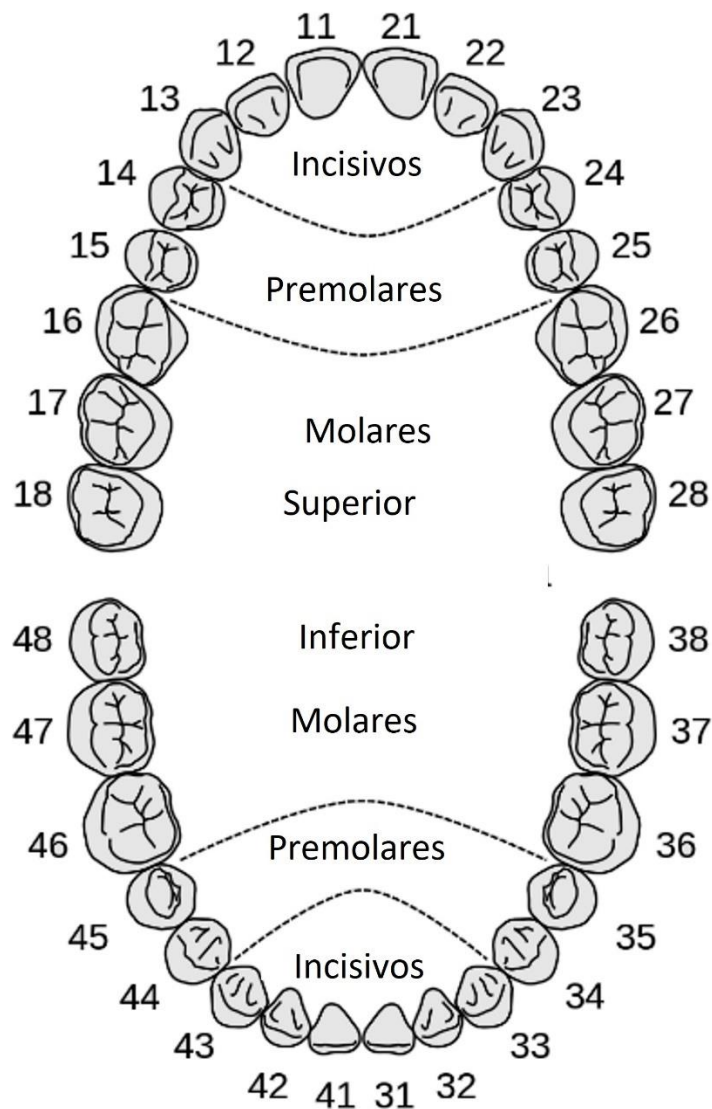


Figura 1. Diagrama de la localización de los órganos dentales

2.1.1 ESMALTE

El esmalte dental es considerado el tejido más duro de los humanos, al ser mineralizado y no contar con fibras de colágena ni presencia de más células o vascularización, una vez que se ha terminado de formar no puede ser remodelado, conforma la corona del órgano dental y biológicamente no puede ser sustituido (Figura 2). Compuesto principalmente por matriz inorgánica de cristales de hidroxiapatita en un 96%, agua en un 3% y matriz orgánica en 1%. A

pesar de su dureza puede ser destruido por los ácidos de las bacterias que se encuentran en cavidad oral formando así la caries dental. (Farooq & Bugshan, 2020; Seow, 2014).

2.1.2 DENTINA

La dentina está compuesta por matriz inorgánica que comprende el 70%, matriz orgánica 20% y agua 10%. Es producida por los odontoblastos las cuales son células diferenciadas y especializadas que continúan formando dentina a lo largo de la vida del diente (Nanci, 2008). Juegan un papel importante ya que son los potenciales iniciadores de la respuesta inflamatoria ante bacterias, ayudan a mantener la vitalidad y reparación de la pulpa (Farges et al., 2009).

2.1.3. PULPA

La pulpa dental es el único tejido blando del diente, está conformado por un tejido conectivo fibroso laxo con abundante matriz extracelular, vasos sanguíneos que le dan vascularidad, por lo tanto, vitalidad y también presencia de fibras y células nerviosas que le dan sensibilidad (Hargreaves & Lh, 2016).

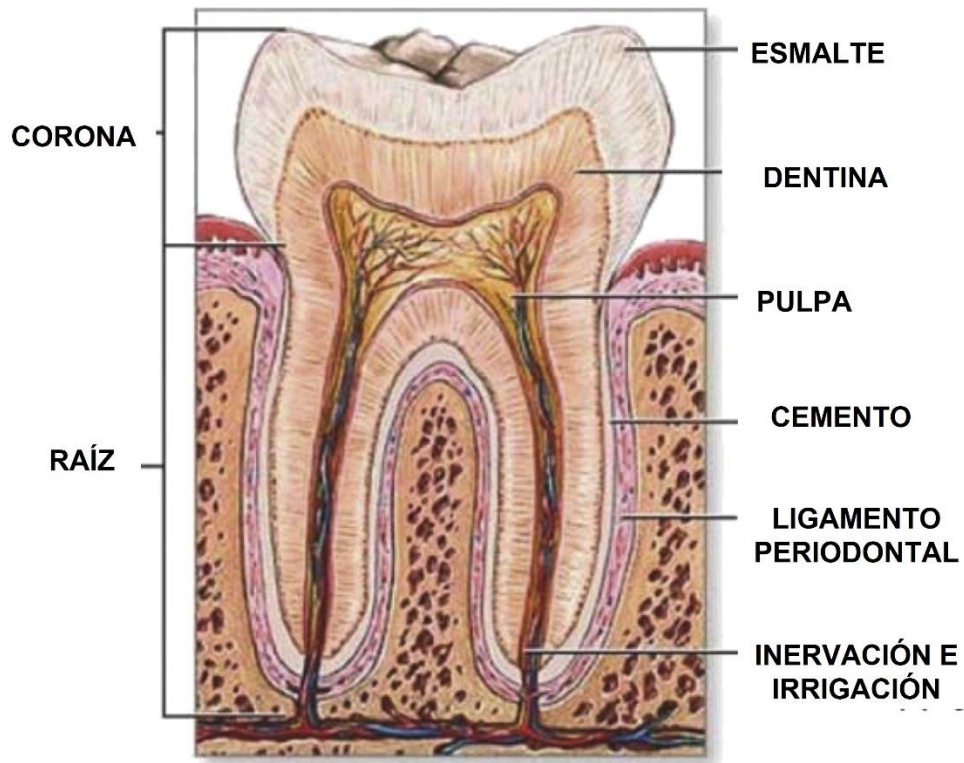


Figura 2. Estructuras del órgano dental

2.1.4. COMPLEJO DENTINO-PULPAR

La dentina junto con la pulpa va a formar el complejo dentino-pulpar (Figura 3). La capa de células más externa consta de odontoblastos (Tabla 2) que son las células encargadas de mineralizar la matriz de dentina unidos estrechamente a la pre-dentina (Emilia & Neelakantan, 2015).

Tabla 2 Células del complejo dentino-pulpar

COMPLEJO DENTINO-PULPAR	
CAPA ODONTOBLASTICA	Conformada principalmente por odontoblastos, adyacentes a la pre-dentina, puede también presentar otras células

	<p>como capilares, fibras nerviosas y células dendríticas (Couve, 1986).</p>
<p>ZONA POBRE EN CÉLULAS</p>	<p>Se encuentra subyacente a la capa odontoblástica donde en aproximadamente en una anchura de 40 μm está relativamente libre de células. Puede presentar vasos capilares y fibras nerviosas, así como procesos citoplasmáticos de fibroblastos (Couve, 1986)</p>
<p>ZONA RICA EN CÉLULAS</p>	<p>Presenta una alta proporción de fibroblastos comparado con la zona central de la pulpa. Además de los fibroblastos, se encuentran otras células como macrófagos, células dendríticas y también células madre indiferenciadas mesenquimales (Gotjamanos, 1969).</p>
<p>ZONA CENTRAL DE LA PULPA</p>	<p>Es la porción central propiamente dicha de la pulpa. La cual va a ser compuesta por un tejido conectivo fibroso laxo con vasos sanguíneos de gran calibre, presencia de plexos nerviosos, y el fibroblasto como la célula más abundante de la zona (Nanci, 2008).</p>

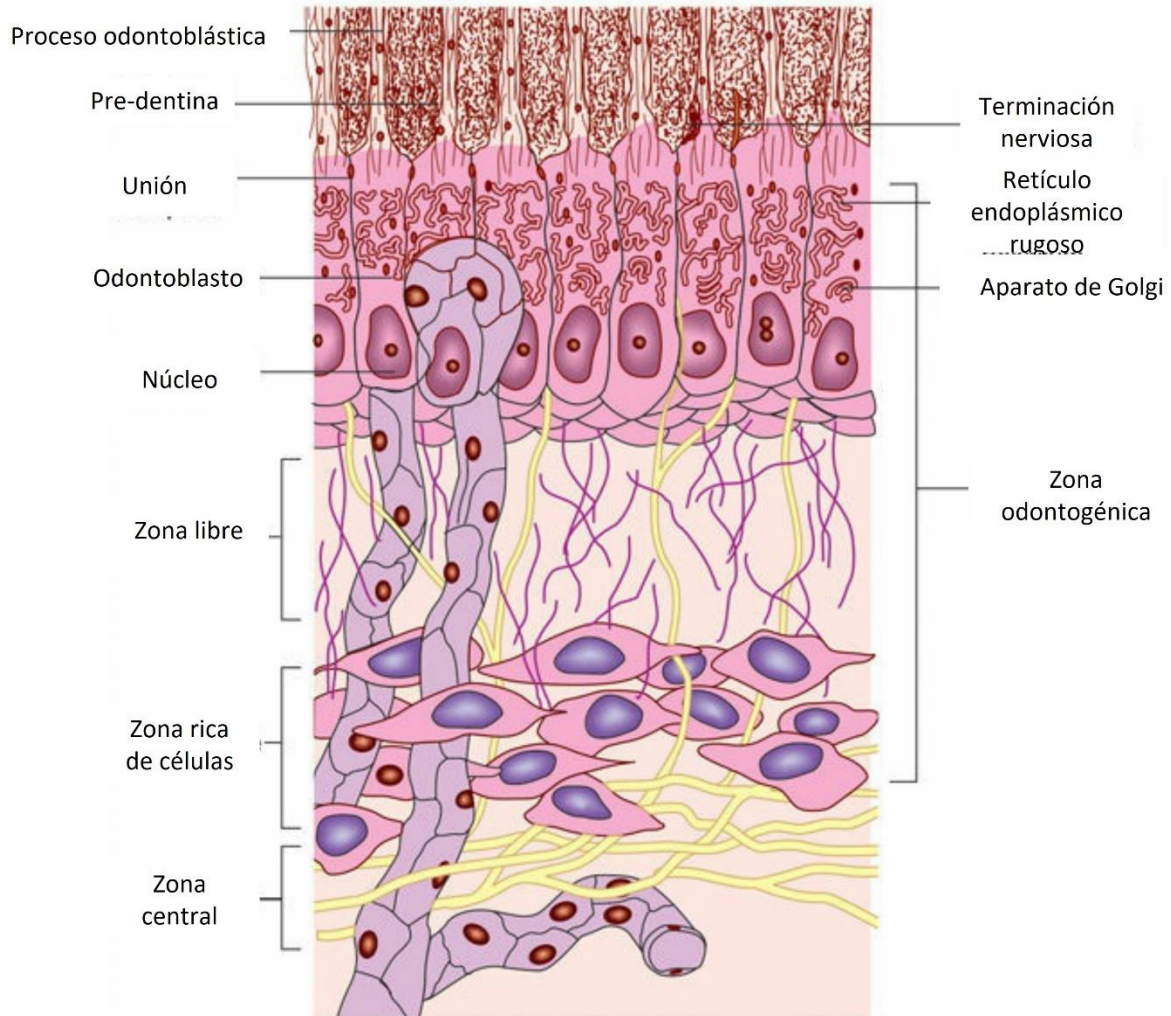


Figura 3. Diagrama de las zonas de la pulpa

2.1.5. CÉLULAS DE LA PULPA

2.1.5.1. ODONTOBLASTOS

Son los encargados de la dentinogénesis, es decir, de la mineralización de la dentina durante el desarrollo de los órganos dentales y durante el tiempo de vida de los mismos, se localizan a la periferia del tejido pulpar en contacto directo con el tejido que mineralizan, tienen la capacidad de vivir por mucho tiempo siendo células estables y no sustituibles (Kawashima & Okiji, 2016). Al formar la dentina, sus prolongaciones citoplasmáticas forman los túbulos dentinarios gracias

a sus procesos odontoblásticos, dando así nutrición y sensibilidad a la dentina. Se caracterizan por secretar colágena tipo 1 principalmente (Lee et al., 2011; Lesot et al., 1981).

2.1.5.2. FIBROBLASTOS DE LA PULPA

El fibroblasto es una de las células más abundantes del tejido conectivo e importantes para este tejido de sostén, nutrición, reparación y cicatrización. Son las células más abundantes de la pulpa, se dice que tienen la capacidad de diferenciarse dependiendo la señal que reciban. Secretan principalmente colágena tipo 1 y 3, además de proteoglicanos y glucosaminoglicanos. Muchos de los fibroblastos se consideran inmaduros o indiferenciados y se les conoce como células madre de la pulpa dental (Jeanneau et al., 2017).

2.1.5.3. MACRÓFAGOS

Los macrófagos en la pulpa juegan un papel fundamental en la respuesta del sistema inmune. Son células que mientras se encuentran en torrente sanguíneo se llaman monocitos y cambian de nombre cuando atraviesan el endotelio hacia otros tejidos. Su principal función es fagocitar, eliminan células muertas, cuerpos extraños y eritrocitos extravasados (Hahn et al., 1989; Park et al., 2017).

2.1.4.4. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Son células presentadoras de antígeno que se caracterizan por sus prolongaciones citoplasmáticas. En la pulpa normal están localizadas cerca de la pre-dentina, pero migran a la zona central después de un reto antigénico. Juegan un papel central en la inducción de células T (Zhang et al., 2006).

2.1.5 ANATOMÍA DE LA RAÍZ DEL ÓRGANO DENTAL

La morfología de la raíz del órgano dental puede variar según el órgano dental que necesite tratamiento endóntico o de la remoción de la pulpa, se toma desde la perspectiva de la cámara pulpar que es rodeada por la corona, hasta el ápice dental que es la parte final del órgano dental en estrecho contacto con el ligamento periodontal y hueso alveolar. Entre los componentes que tenemos en las raíces existe el techo de la cámara pulpar, cuerno pulpar, orificio del conducto radicular, conducto de la furca, conducto lateral, foramen apical y conducto delta apical. Estas estructuras suelen ser diferentes en cada órgano dental, los órganos dentales anteriores tienen una cámara pulpar amplia y un solo conducto, en algunas ocasiones podremos encontrar áreas dilaceradas (curvas) hacia apical. Los premolares tienen variaciones en los ductos en el tercio medio y apical donde se anastomosan conductos o ductos accesorios, en el caso de los molares también se presentan variaciones similares en los tercios cervicales y apicales, además de que en un bajo porcentaje de estos órganos dentales posteriores podemos encontrar raíces supernumerarias y dilaceraciones a nivel apical (Figura 4) (Vertucci, 2005). De igual manera en algunas zonas de la raíz dental, algunos conductos toman una conformación en forma de “C” cuya morfología suele conecta o unir un conducto a otro, en un porcentaje de 37% en segundos molares, y mayormente en población china, la distinción de esta forma ayuda o dificulta la obtención del tejido pulpar, pero es necesaria su identificación para el tratamiento de conductos tenga éxito (Fan et al., 2004).

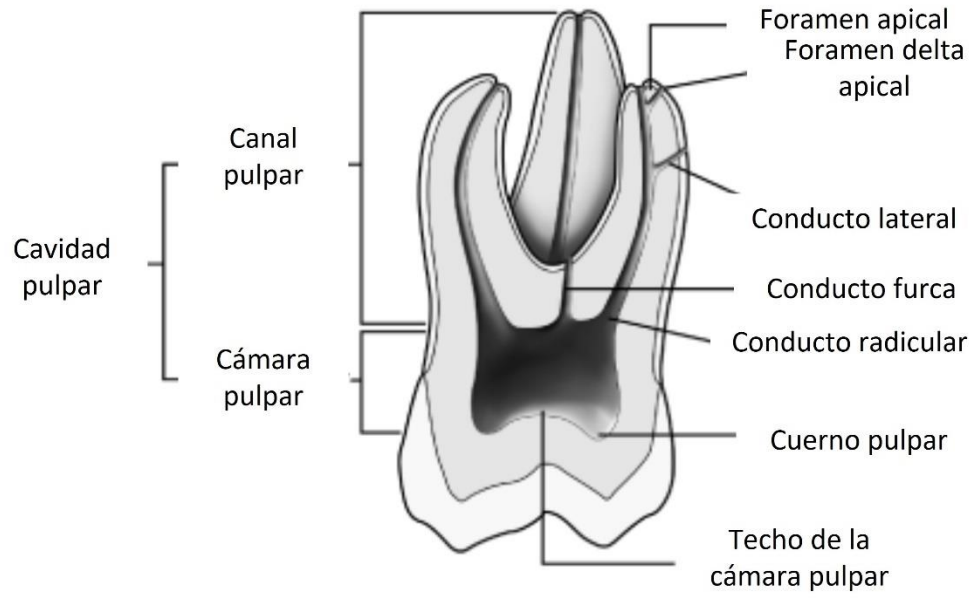


Figura 4. Estructuras del conducto radicular.

2.2. INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta del sistema inmune, es desencadenada por estímulo o condición de daño, como infección, daño al tejido o exposición a sustancias tóxicas, este proceso inflamatorio puede llevar a la curación de las lesiones producidas, pero también, una inflamación no controlada puede llevar a otras enfermedades inflamatorias de diferente grado de severidad. Clínicamente suele ser caracterizada por la presencia de rubor, calor, tumoración y pérdida de la función (Mitchell et al., 2017). Existen dos tipos de inflamación: aguda y crónica (Libby, 2007; Takeuchi & Akira, 2010).

2.2.1. INFLAMACIÓN AGUDA

La inflamación aguda es desencadenada por una infección o daño al tejido del cual recluta componentes leucocitarios como neutrófilos polimorfonucleares al sitio de infección (Figura 5). Se caracteriza por desencadenarse tras la aparición infecciones bacterianas las cuales activan al sistema inmune innato mediante los receptores tipo Toll, mediado por células como mastocitos y macrófagos, los cuales producen mediadores de la inflamación como quimiocinas, citocinas, vasoaminas, eicosanoides, y cascadas proteolíticas muchas de las cuales tienen función vasoconstrictora y vasodilatadora en un rango de tiempo corto (Barton, 2008; Germolec et al., 2018).

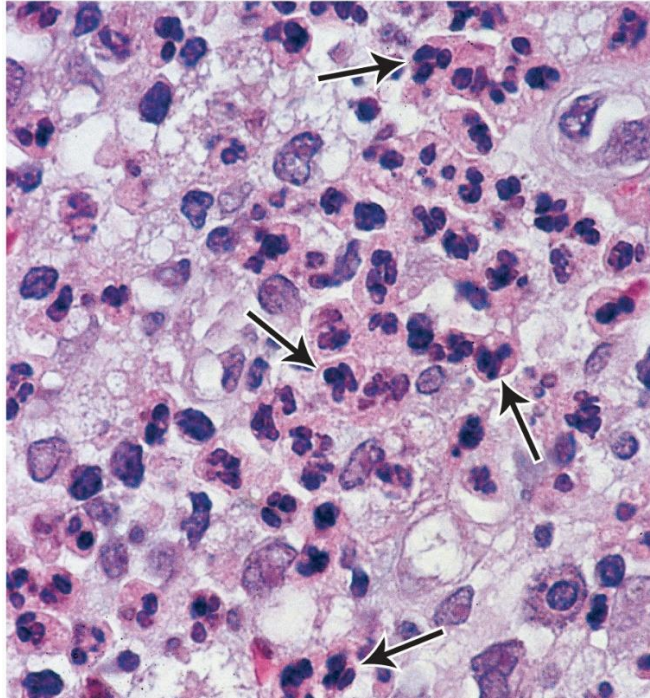


Figura 5. Células de la inflamación aguda

2.2.2. INFLAMACIÓN CRÓNICA

La inflamación crónica comienza cuando después de la inflamación aguda no hay reparación del daño por lo que el proceso inflamatorio empieza un nuevo reclutamiento de células como linfocitos T y linfocitos B, mediante la formación de granulomas cuando los macrófagos no pueden destruir al patógeno, los linfocitos B por su parte se van a convertir una vez que sea necesario en células plasmáticas que se encargaran de la creación de inmunoglobulinas necesarias para la respuesta inmune y destrucción de patógenos (Figura 6). La respuesta crónica puede ser inducida por enfermedades autoinmunes y cuerpos extraños, con largo tiempo de evolución que va desde semanas hasta meses (Medzhitov, 2008; Mitchell et al., 2017).

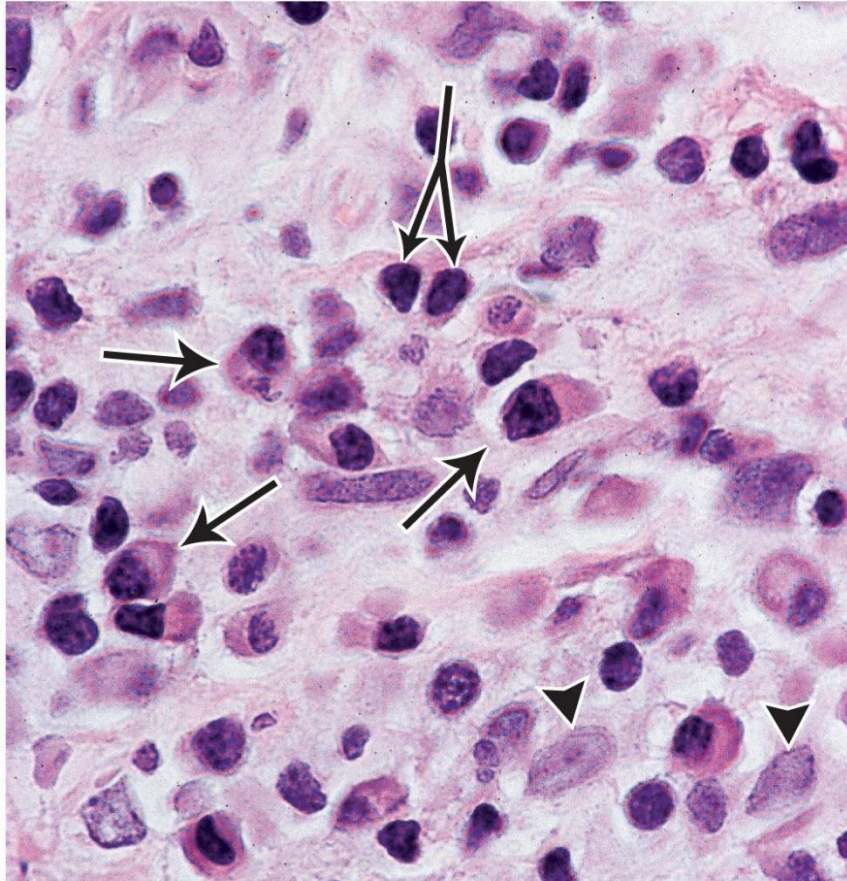


Figura 6. Células de la inflamación crónica

2.2.4. CITOCINAS

Las citocinas están involucradas en cada fase de la inmunidad y la inflamación, incluyendo la inmunidad innata, presentación de antígenos, diferenciación de la médula ósea, activación y reclutamiento celular, y adhesión de moléculas de expresión. Son secretadas mayormente por fagocitos mononucleares y otras células presentadoras de antígenos (Borish & Steinke, 2003).

2.2.5. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α)

Es un mediador clave para la regulación de la respuesta inmune en organismos sanos y condiciones de enfermedad. Modula el desarrollo del sistema inmune, vías de señalización, regula los procesos metabólicos y la proliferación celular (Varfolomeev & Vucic, 2018). Puede

iniciar la cascada de la inflamación y la inducción de producción de citocinas, activación y expresión de moléculas de adhesión (Elsalhy et al., 2013). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina inflamatoria producida por macrófagos y monocitos durante la inflamación aguda, y es responsable de los diversos tipos de señalización dentro de las células, llevándola a necrosis o apoptosis. Ésta proteína también es importante en la resistencia de infección y algunos cánceres (Idriss & Naismith, 2000). Se ha encontrado que además es secretado por los odontoblastos de la pulpa dental, y sus niveles de expresión aumentan cuando el tejido pulpar este inflamado y estimula a las células dendríticas que también suelen encontrarse en el tejido pulpar e incluso se ha podido demostrar que juegan un papel fundamental en la dentinogénesis (creación de nueva dentina a los estímulos inflamatorios) (Farges et al., 2003; Lucchini et al., 2002; Piattelli et al., 2004).

2.2.6. INTERLEUCINA 1 (IL-1)

La interleucina 1 (IL-1) es reconocida como un componente clave en la respuesta celular inmune. Regula la diferenciación de los linfocitos B, estimula la producción de anticuerpos, genera células T citotóxicas y potencializa a los linfocitos (Dinarello, 1997). Además suele actuar a nivel de las células endoteliales que se encuentren en el sitio de infección como una molécula promotora de la expresión de adhesión que promueven la extravasación de macrófagos hacia afuera del torrente sanguíneo (Hahn & Liewehr, 2007). Consta de diferentes proteínas pro- y antiinflamatorias, siendo IL-1 β el miembro más representativo (Yazdi & Ghoreschi, 2016).

2.2.7. INTERLEUCINA 6 (IL-6)

La interleucina 6 (IL-6) es producida en respuesta a las infecciones o daño a los tejidos, contribuye en la defensa del huésped y la estimulación de las respuestas de la fase aguda,

hematopoyesis, y reacciones inmunes. Aunque su expresión está estrictamente controlada por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, la desregularización continua de la síntesis de IL-6 juega un efecto patológico en la inflamación crónica y autoinmunidad (Tanaka et al., 2014). IL-6 también se ha encontrado en tejido pulpar, tanto pulpa dental sana como tejido pulpar inflamado (Hahn et al., 2000).

2.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PATOLOGÍA PULPAR

Se reportó que cerca de 4 billones de personas en 2013 fueron afectadas por enfermedades bucales, encontrando caries dental no tratada en un 35% de los casos, y en más del 65% de los individuos (Marcenes et al., 2013). La alta prevalencia de la caries dental, así como la enfermedad periodontal, resulta en un costo anual estimado de 30 billones de dólares a nivel mundial (Listl et al., 2015). Y sigue creciendo debido a la inequidad de la salud bucal entre y dentro los países (Fejerskov et al., 2013; Glick et al., 2012; Watt & Sheiham, 1999). La enfermedad pulpar es frecuente, con una incidencia que va del 16.4% (Weiger et al., 1997) y hasta más del 30% (Scavo et al., 2011). Sin embargo, la pulpitis irreversible puede ser asintomática, y por lo tanto indetectable en el 40% de los casos (Michaelson & Holland, 2002). Para la gente que constantemente tiene cuidados dentales, la emergencia de un tratamiento endodóntico es relativamente baja, con una incidencia de 5-14% (Eriksen, 1991).

Por otro lado, se cree que en general la periodontitis periapical o lesión apical es a menudo asintomática y afecta al 40-50% de las personas, aumentando con la edad la cantidad de dientes con tratamiento de conducto (Eriksen et al., 2002). Como la caries dental es muy frecuente en países en desarrollo con acceso a alimentos azucarados, se estima que el tratamiento para el dolor pulpar es alto y con frecuencia termina en exodoncia de los órganos dentales. Actualmente no se tienen cifras actuales de necesidad mundial del tratamiento endodóntico debido a trauma, pero se estima que afecta hasta mil millones de personas (Petti et al., 2018) (Peters & Gk, 2019).

2.4. PULPITIS

Se define como pulpitis a la inflamación de la pulpa dental, clínicamente descrita como aguda, crónica o hiperplásica (American Association of, 2003). Puede ser causada por una infección oportunista en el espacio pulpar por microorganismos comensales, asociado comúnmente a caries dental, la cual es una enfermedad multifactorial que daña los tejidos dentales (Hahn et al., 1991). En estadios iniciales de la caries, el tejido del esmalte se vuelve suave y no se puede observar aun una lesión radiográficamente, en un estadio moderado, la caries comienza a invadir dentina y empieza a formar una cavidad en el órgano dental, se considera avanzado cuando la caries empieza a invadir tejido pulpar e inicia el proceso de pulpitis, tornando el área de la cavidad en un color de marrón a negro (Figura 7) (Zero et al., 2011). Sin embargo, otras vías de infección microbiana de la pulpa incluyen trauma, fisuras de la dentina, exposición de los túbulos dentinarios o del foramen apical que pueden derivar en pulpitis reversible, irreversible y necrosis pulpar. (Bergenholtz, 1981).

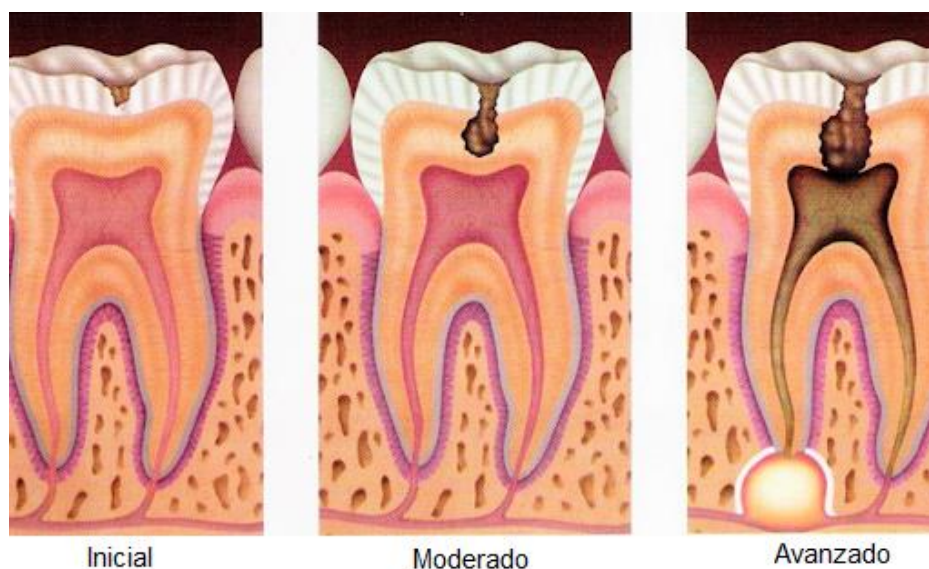


Figura 7. Caries dental y su progresión hacia la pulpa

Dentro de la pulpa podemos localizar IL-1 en macrófagos y rodeando células endoteliales, ausentes en terceros molares asintomáticos (D'Souza et al., 1989). Interleucina 6 (IL-6) facilita la respuesta inmune del tejido dañado. Ayuda a la maduración de los linfocitos B hacia las células plasmáticas encargadas de producir inmunoglobulinas, activa linfocitos T y aumenta la hematopoyesis dando lugar a una leucocitosis. La podemos encontrar en pulpa inflamada, así como en lesiones periapicales, e incluso podemos localizar en pulpa sana (Barkhordar et al., 1999) .Podemos encontrar altas cantidades de TNF- α en pulpitis irreversible sintomática, en progresión, los niveles de TNF- α bajan, lo cual pudiera especularse como una antesala a la necrosis tisular. En pulpas sanas se detectan bajos niveles de TNF- α (Bradley, 2008). Así es como en cualquier otro órgano del cuerpo humano, la pulpa dental presenta entonces las mismas características de un proceso inflamatorio ya que se observan mecanismos de vasodilatación por diferentes mediadores químicos que liberan mediante sustancias efectoras a las células inflamatorias hacia el intersticio alrededor del órgano dental (Figura 8) (Rechenberg et al., 2016).

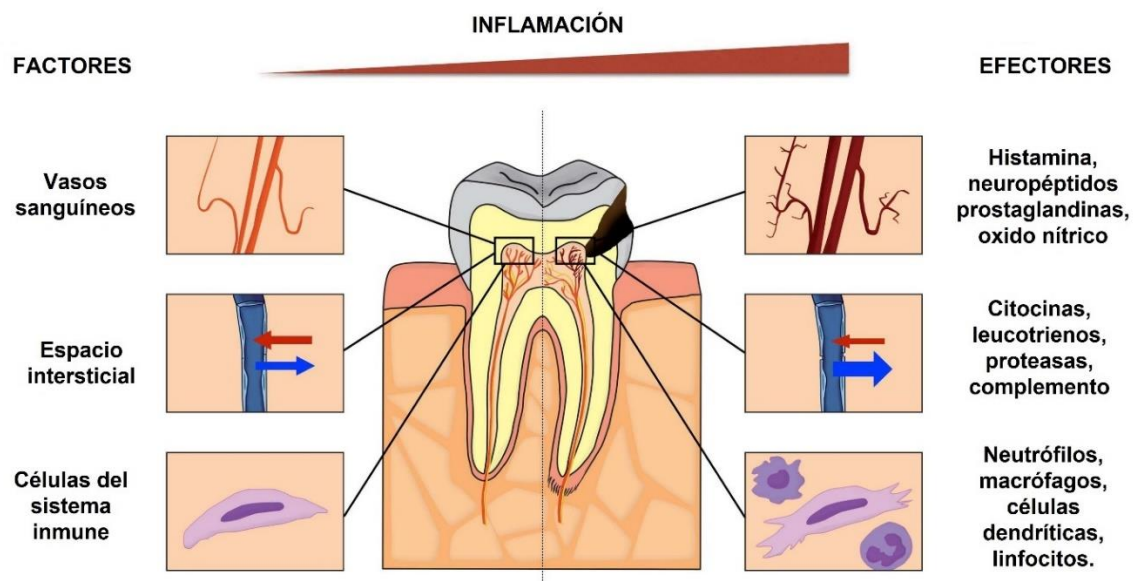


Figura 8. Proceso de la inflamación del órgano dental

2.4.1. PULPITIS REVERSIBLE

Se considera pulpitis reversible cuando la pulpa puede volver a las condiciones normales una vez que se remueve el estímulo irritante, por lo que se entiende que tiene un proceso inflamatorio con diversos mecanismos de reparación (Nakanishi et al., 2011).

Histológicamente podemos encontrar en una pulpitis reversible la presencia de algunos fibroblastos, pero abundantes fibras de colágena. La capa odontoblástica puede estar reducida, y podemos encontrar islas de calcificaciones en el tejido pulpar con capas gruesas de dentina terciaria, la cual reduce el espacio pulpar (Figura 9). Puede haber presencia de linfocitos y células plasmáticas en concentraciones moderadas (Anderson et al., 1981; Giuroiu et al., 2015).

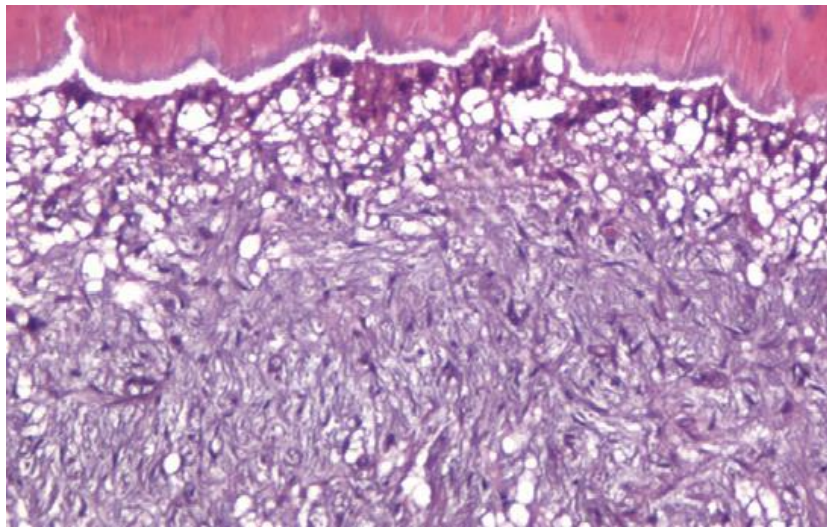


Figura 9. Pulpitis reversible, corte histológico

2.4.2. PULPITIS IRREVERSIBLE

En los dientes con pulpitis irreversible, los dientes tienen pocas probabilidades de revertir su situación de un diente normal solo con la remoción de los irritantes, la gran mayoría necesitan retirar total o parcialmente parte del tejido pulpar afectado (Nakanishi et al., 2011).

En pulpitis irreversible, hay presencia de necrosis total o parcial de la cámara pulpar. Al menos un área donde haya licuefacción o coagulación rodeado por neutrófilos polimorfonucleares vivos y muertos. A la periferia, concentraciones de células inflamatorias de tipo crónico con un halo alrededor de las mismas. Presencia de bacterias cercanas a la pared dentinaria (Figura 10). Mientras que, en una pulpa normal no hay cambios en el complejo dentino-pulpar. No hay reducción entre la dentina y pre-dentina además de que no hay cambios en la capa odontoblástica o en el tamaño de las mismas. Ausente se encuentra la dentina terciaria y otras calcificaciones, así como la presencia de bacteria o de infiltrado inflamatorio (Bruno et al., 2010; Ricucci et al., 2014)

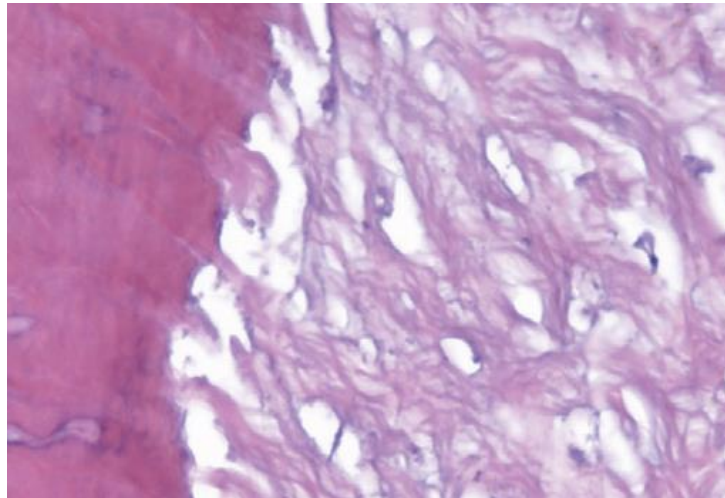


Figura 10. Pulpitis irreversible, corte histológico

Se consideran con mayor relevancia algunas citocinas expresadas en diversas células dentro de la pulpa ya sea en condiciones de pulpitis reversible o irreversible como factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), ligando CC de quimiocina 2 (CCL2), defensinas beta-humano (hBDs), interleucina 8 (IL-8), quimiocina ligando CXC 10 (CXCL10), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 2 (IL-2), interleucina 4

(IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Carswell et al., 1975; Renard et al., 2016).

2.4.3. DIAGNÓSTICO DE PULPITIS

El tejido pulpar sano cuando es expuesto a contacto frío va a emitir una respuesta tardía posterior al haber colocado el material frío, en una pulpitis reversible suele ser una molestia casi inmediata pero no es un dolor que moleste a la persona, así que el paciente no tiene dolor espontáneo, además de que tampoco presentará molestia a la percusión y no habrá cambios radiográficos. Dentro de los cambios radiográficos podemos encontrar un ensanchamiento del ligamento periodontal y/o una lesión periapical causada por osteomielitis cuando exista ya una pulpitis irreversible. En este caso de pulpitis irreversible puede ser caracterizada como sintomática o asintomática, en pulpitis sintomática el paciente puede referir dolor espontáneo y ligero, potencializado por la exposición al frío y radiográficamente se puede encontrar ensanchamiento del ligamento periodontal. En el caso de una pulpa necrótica puede no haber sintomatología, todo esto dependiendo de las características clínicas de la inflamación periapical, ya que por el contrario en algunas ocasiones suele ser muy doloroso y asociado a exudado purulento y un trayecto fistuloso (Anderson et al., 1981; Michaelson & Holland, 2002; Weiger et al., 1997; Zero et al., 2011).

2.5. RNA LARGOS NO CODIFICANTES (lncRNAs)

Las moléculas de RNA que no presentan un potencial de codificación de proteínas se conocen como RNAs no codificantes, sin embargo, son expresados constitutivamente y juegan un papel muy importante en la biosíntesis de proteínas. Los RNA no codificantes se subdividen en dos grupos: pequeños RNAs no codificantes menores a 200 nucleótidos y RNAs largos (Gutschner & Diederichs, 2012). Se estima que hay de momento alrededor de 10,000 lncRNAs, los cuales se pueden clasificar dependiendo su origen en: lncRNA intrónicos cuando provienen de las regiones intrónicas de un gen, divergente cuando provienen de la dirección opuesta de un gen que codifica para proteínas, intergénica cuando la secuencia pertenece a dos genes en una distinta unidad, y sentido y antisentido cuando se encuentra localizado entre dos o más exones transcrito en el mismo sentido o en sentido opuesto. (Bermúdez et al., 2019)

Los lncRNA son RNAs con una longitud mayor a 200 nucleótidos, fueron considerados inicialmente ruido transcripcional y sin función aparente (Shi et al., 2013). Se sabe que participan en diferentes procesos, de desarrollo y patológicos como la apoptosis y diferenciación celular (Brosius, 2005; Li et al., 2016), tumorogénesis (Perry & Ulitsky, 2016), y la respuesta inmune (Satpathy & Chang, 2015), que tienen un papel importante en diferentes enfermedades, incluyendo cáncer (Gupta et al., 2010).

Los lncRNA en las células eucariotas, son transcritos por la RNA polimerasa II y la RNA polimerasa III en diferentes locus del genoma. Muestran características funcionales únicas participando en la modulación de varios procesos celulares como la modificación de histonas, metilación de ADN y transcripción celular, puede alterar la estructura de la cromatina y el acceso al ADN, por lo tanto, regulan patrones de expresión génica (Dahariya et al., 2019).

Se dividen en tres amplias categorías, según su rol: los lncRNAs no funcionales los cuales resultan en ruido transcripcional y lncRNAs funcional que puede actuar en *cis* o *trans* (Quinn & Chang, 2016).

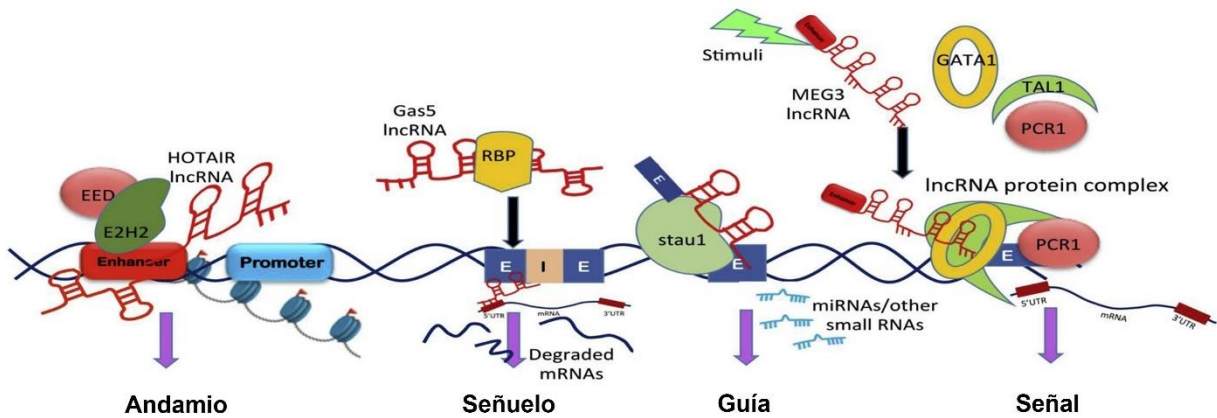


Figura 11. Características de los lncRNA

2.5.1. HOTAIR

El LncRNA HOX transcrip antisense intergenic RNA (HOTAIR) fue identificado por primera vez por Rinn *et al* en el año 2007 mediante un experimento de microarreglos en mosaico. Se encuentra situado en el locus del cromosoma 12q13.13 entre el locus HOXC11 y HOXC12. Es transcrito por la RNA polimerasa II a partir de la hebra antisentido (Fu et al., 2020).

Se ha demostrado que HOTAIR juega un papel muy importante en la regulación de la programación epigenética y promueve el crecimiento tumoral y metástasis, al igual que induce la transición epitelio-mesénquima (Pádua Alves et al., 2013). Se ha encontrado que HOTAIR puede regular genes a distancia y que también juega un papel importante en distintas formas de malignidad, ya sea cáncer de mama, pulmón, gástrico y otros sarcomas. Participa como andamios para que algunas proteínas lleven a cabo algunas funciones, facilita la transcripción para algunos genes específicos y también es un potencializador del proceso inflamatorio (Yu & Li, 2015). En el proceso inflamatorio se le ha asociado directamente como promotor de la activación del factor nuclear kappa B, así como su asociación con diferentes citocinas, reprogramación metabólica y activación de los macrófagos, por lo que se cree que está estrechamente ligado al proceso inflamatorio (Price et al., 2021).

3. ANTECEDENTES

Rechenberg *et al* realizaron una revisión sistemática de algunos marcadores moleculares con una cantidad de 89 marcadores entre los cuales destacan algunas proteínas pro y antiinflamatorias donde pudieron destacar principalmente IL-1 tanto α y β donde ambos regulan la respuesta inflamatoria e inmune de la pulpa; en el caso de IL-6 se encontró como regulador de células T y B; TNF- α retrasa la apoptosis de los neutrófilos (Rechenberg et al., 2016). Silva et al menciona que IL-1 β tuvo una mayor expresión en las células de la pulpa con inflamación mediante una prueba de ELISA pudo detectar niveles significativos de esta citocina (Silva et al., 2009)

Lu *et al* encontró que HOTAIR actúa como promotor a la respuesta inflamatoria en cardiomiocitos donde pudieron observar niveles de expresión elevados de TNF- α e IL-6 en grupos experimentales de infarto agudo al miocardio, concluyendo que HOTAIR podría promover la inflamación de los cardiomiocitos (Lu et al., 2018).

Zhang J. *et al* estimularon células normales del hígado y células con carcinoma hepatocelular con lipopolisacáridos, teniendo como resultado un aumento en la expresión HOTAIR, además se constató que la sobreexpresión de HOTAIR estimuló la secreción de citocinas entre las cuales se destacan IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Zhang et al., 2020).

Zhang C *et al* demostraron que HOTAIR contribuye a que IL-1 β induzca la sobreexpresión de metaloproteinasas y apoptosis de los condrocitos condilares en la articulación temporomandibular en conejos, sugiriendo un rol importante de HOTAIR en el proceso inflamatorio (Zhang et al., 2016).

Zhang H. *et al* en un estudio de artritis reumatoide que es una enfermedad inflamatoria de las articulaciones, se demostró que la expresión de HOTAIR es subregulada en condrocitos

inducidos por lipopolisacáridos y la sobre-expresión de HOTAIR juega un papel protector elevando los niveles de proliferación celular e inhibiendo la inflamación tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo que se sugiere que HOTAIR tiene potencial terapéutico para artritis reumatoide (Zhang et al., 2017).

Wu *et al* estudió en ratones con sepsis inducida por lipopolisacáridos, la sobre-regulación de HOTAIR en cardiomiocitos promueve la producción de TNF- α en la circulación mediante la activación de Nf-k β , involucrado en la fosforilación de la subunidad p65. HOTAIR también pudo preservar la función cardíaca durante la sepsis del ratón (Wu et al., 2016).

Obaid et al mostraron que la expresión de HOTAIR es inducida en macrófagos en respuesta al tratamiento con polisacáridos, incluyendo citocinas y genes inflamatorios como IL-6, iNOS, TNF- α , MIP-1B, demostrando el rol fundamental de HOTAIR en la expresión de citocinas e inflamación (Obaid et al., 2018).

Tao et al estudiaron la relación de HOTAIR con el carcinoma oral de células escamosas donde inhibiendo la función de HOTAIR disminuye la migración de células tumorales (Tao et al., 2020), en este mismo sentido, Wang et al juega un papel importante en la autofagia y promueve el éxito de fármacos para su uso en carcinoma oral de células escamosas (Wang et al., 2018).

Actualmente no hay antecedentes de estudios que hablen de HOTAIR y su relación con el proceso inflamatorio que tiene lugar en la pulpitis, por lo cual resulta importante evaluar dicho lncRNA en esta enfermedad.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las consecuencias de la pérdida de vitalidad de un órgano dental son múltiples, el órgano pierde el soporte nutricional y sensitivo y debe ser tratado endodónticamente. Estos órganos tienen un menor tiempo de presencia en la boca y su pérdida compromete severamente la homeostasis del sistema estomatognático, afectando funciones como la masticación, fonación y formación del bolo alimenticio en el inicio de la digestión.

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la expresión de HOTAIR es inducida en macrófagos en respuesta a estímulos nocivos, por lo que se sugiere que puede tener un papel fundamental en la expresión de citocinas y en la inflamación. Sin embargo, su papel regulatorio no ha sido estudiado en tejido pulpar.

Es por esto que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen diferencias entre los perfiles de expresión de HOTAIR y los mRNA IL-6, IL-1 β y TNF- α entre pulpa sana y pulpitis?

5. JUSTIFICACIÓN

La pulpitis irreversible es consecuencia de la caries dental, que es una patología dental la cual afecta aproximadamente un 92.6% de la población adulta en México, con un considerable 95% en pacientes mayores de 40 años (SIVEPAB 2018). También se estima que el gobierno solamente cubre el 7% de los gastos dentales de los mexicanos, según cifras de la OCDE, mientras que según datos de la Asociación Dental Mexicana se gasta aproximadamente 85 mil millones de pesos en patología asociada a la caries dental. Es por esto que el estudio de los mecanismos moleculares que se desencadenan como respuesta a un estímulo nocivo son primordiales para dilucidar cómo detener el avance del daño y evitar que un proceso inflamatorio inicial progrese a una pulpitis irreversible o a la muerte del tejido pulpar.

6. HIPÓTESIS

Los perfiles de expresión de los genes HOTAIR, IL-6, IL-1 β y TNF- α son diferentes entre pulpa sana y pulpitis irreversible.

7. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los perfiles de expresión del lncRNA HOTAIR y las citocinas IL-6, IL-1 β y TNF- α en pulpa sana y pulpitis irreversible.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión de HOTAIR, IL-6, IL-1 β y TNF- α en pulpa sana.
2. Analizar la expresión de HOTAIR, IL-6, IL-1 β y TNF- α en pulpitis irreversible.
3. Comparar los perfiles de expresión de los genes entre pulpa sana y pulpitis irreversible.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluarán los perfiles de expresión de RNA largo no codificante en pulpa sana y con pulpitis irreversible. Se extraerá tejido de la pulpa sana y con pulpitis irreversible y se realizará la extracción de RNA total.

7.2. TIPO DE ESTUDIO

Se realizará un estudio de tipo transversal y prospectivo.

7.3. MUESTRA

Se obtuvo tejido de pulpa dental de 20 órganos dentales obtenidos de diferentes individuos, de manera aleatoria subdivido en 10 muestras de pulpa normal o sana, y 10 muestras de pulpitis irreversible en órganos dentales para la conformación de pools de 4 grupos, 2 grupos control con 5 muestras cada uno, 2 grupos de pulpitis con 5 muestras cada uno.

7.3.1. TIPO DE MUESTRA

Tipo de muestra probabilística.

7.3.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se obtuvieron las muestras de pulpa dental sana en la clínica de la especialidad de Endodoncia FO-UAS y en la clínica de enseñanza de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa en la materia de exodoncia de forma aleatoria, en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México. El diagnóstico de la condición de la pulpa se realizó por el especialista en endodoncia en el caso de pulpitis irreversible y en pulpa sana según criterio de exodoncia por el

especialista siendo indicados para extracción ya sea por tratamiento de ortodoncia o funcionalidad bucal.

7.3.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Individuos que acuden a recibir atención a la clínica odontológica, en Culiacán, Sinaloa, México.
2. Que hayan aceptado formar parte del estudio y que firmen el consentimiento informado (Anexo 1).
3. Diagnosticados los órganos dentales con pulpitis irreversible que sean tratados endodónticamente o por indicación protésica con características de vitalidad pulpar.
4. Con pulpa sana órganos dentales que requieran extracciones por indicación ortodóntica.
5. Individuos aparentemente sanos que no consuman tratamiento farmacológico

7.3.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Individuos que hayan rechazado ser parte de la investigación
2. Individuos que no hayan firmado el consentimiento informado
3. Individuos con órganos dentales que tengan necrosis
4. Individuos con antecedente de enfermedades neoplásicas o cardiopatías o enfermedades crónico-degenerativas
5. Pacientes menores de edad
6. Órganos dentales cariados

7.3.5. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Individuos que hayan abandonado el tratamiento

2. Muestras insuficientes
3. Muestras que hayan presentado un error en el procesamiento

7.4. TOMA, ALMACENAMIENTO, PROCESO Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA

7.4.1. TOMA DE LA MUESTRA

Para los grupos control se obtuvo tejido pulpar de pulpa dental sana en dientes indicados para extracción, se realizó un corte transversal en la unión amelo-cementaria o donde se une la corona con la raíz dental con un disco de diamante con un micromotor a 25,000 rpm con constante irrigación con solución salina estéril, una vez decapitada la corona del órgano dental se obtuvo el tejido pulpar:

1. Obtención del tejido pulpar mediante instrumentación mecánica con una lima endodóntica tipo H (Hendström)
2. Una vez obtenido el tejido pulpar se elimina el exceso de sangre
3. Es colocado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 100 µl de Trizol
4. Macerar con pistilo estéril hasta obtener una muestra homogénea con frío
5. Congelar a -20°C y almacenar hasta procesar

De los diagnosticados con pulpitis se obtuvo la muestra de tejido pulpar con ayuda del especialista en endodoncia mediante instrumentación endodóntica:

1. Anestesia al paciente mediante técnicas no invasivas a pulpa
2. Colocación de dique de hule con grapa para aislamiento absoluto
3. Apertura de la cámara pulpar con pieza de alta velocidad con irrigación con una fresa de carburo #8

4. Obtenemos el tejido pulpar mediante instrumentación mecánica con una lima endodóntica tipo H (Hendström)
5. Una vez obtenido el tejido pulpar se elimina el exceso de sangre
6. Es colocado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 100 μ l de Trizol
7. Macerar con un pistilo estéril hasta homogenizar en frío
8. Congelar a -20°C y almacenar hasta procesar

Se colectaron 10 muestras de pulpa dental sana para formar dos pools de 5 muestras cada uno, y 10 muestras de pulpitis para formar otros dos pools de 5 muestras cada uno para la extracción del RNA.

7.4.2. EXTRACCIÓN DE RNA

Para iniciar la evaluación de la expresión a nivel transcripcional, se aisló el RNA total de los tejidos, empleando la metodología de TRIzol® Reagent (ambion®), siguiendo las especificaciones del fabricante.

1. Descongelar las muestras en frío
2. Juntar las muestras para la formación de pools de 5 muestras control y 5 muestras pulpitis en 1 μ l de Trizol
3. Centrifugar 5 minutos a 6,000 rpm
4. Eliminación de remanente
5. Aplicación de 5 μ l de glicógeno
6. 200 μ l de cloroformo
7. Incubar 5 minutos en hielo
8. Centrifugar 14,000 rpm por 10 minutos
9. Recuperar sobrenadante

10. Agregar 450 μ l de isopropanol
11. Incubar en hielo
12. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm
13. Agregar etanol a 80% 1 ml
14. Centrifugar 5 minutos por 6,000 rpm
15. Incubar durante 5 minutos
16. Agregar 22 μ l agua inyectable
17. Incubar a 45 °C baño maría 1 minuto hasta solubilizar la pastilla
18. Homogenizar

Posteriormente, se cuantificó la concentración y la pureza a longitudes de onda de 260 y 280 nm en un Nanodrop one (Thermo Scientific) y se verificó su integridad 50 V durante 50 min en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con Gel-Red, luego se observa el patrón de bandeo mediante un transiluminador de UV.

7.4.3. RT-qPCR

La transcripción inversa para la síntesis del cDNA se realizó en el termociclador T100 BioRad con un templado de 20 μ L (2,000 ng/ μ L de RNA) usando el kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante:

1. Incubar a 25°C por 10 min;
2. Incubar a 37°C por 2:00 h
3. Seguido de un paso de 85°C por 5 min
4. Por último, un paso final a 4°C.

Una vez obtenido el cDNA, se realizó la qPCR para lo cual se emplearon sondas TaqMan específicas para la detección de la expresión de HOTAIR, IL-1 β , IL-6 TNF- α y utilizaron ACTB como gen constitutivo. El nivel de expresión relativa se calculó con el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se representaron como promedios \pm SD. Se utilizó el análisis de ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los grupos. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Se utilizó el programa Graphpad prism v.8.

7.6. LUGAR DE REALIZACIÓN

El proyecto se realizó en las instalaciones del laboratorio de Inmunología y Microbiología Molecular en la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicada en Ciudad Universitaria Av. Universitarios s/n en Culiacán, Sinaloa.

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

Se obtuvieron 20 muestras de individuos que cumplían con los criterios de inclusión los cuales fueron incluidos en un tubo Eppendorf con 100 µl de Trizol para la conformación de dos grupos control y dos grupos de pulpitis irreversible, un total de 10 muestras fueron usadas para la formación de dos pools de 5 muestras respectivamente recolectadas en la clínica de Endodoncia de la facultad de odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa (Figura 12 y Tabla 3).

Tabla 3. Muestras obtenidas según el género

Género	Control		Pulpitis	
	N	%	N	%
Masculino	5	50%	6	60%
Femenino	5	50%	4	40%

De manera general se obtuvieron un total de 20 participantes 55% (n=11) para el género masculino y 45% (n=9) para el género femenino (Figura 12).

En el caso del grupo de pulpitis irreversible se obtuvo un 60% (n=6) para el género masculino y 40% (n=4) (Figura 13). Para el grupo control se obtuvo una distribución del género masculino en un 50% (n=5) y 50% (n=5) género femenino.

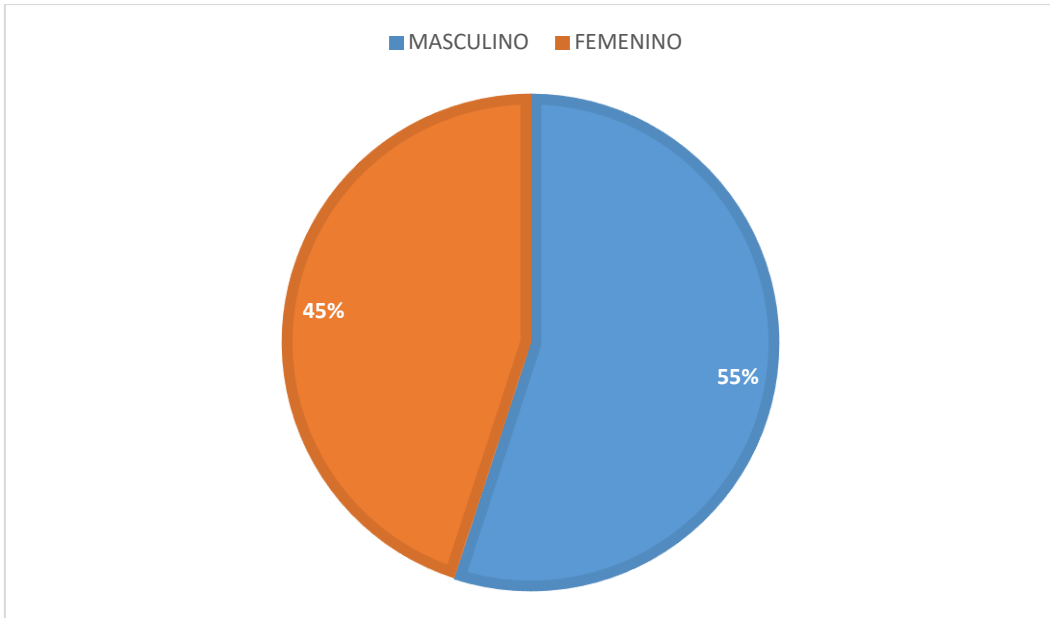


Figura 12. Relación de pacientes por género en general

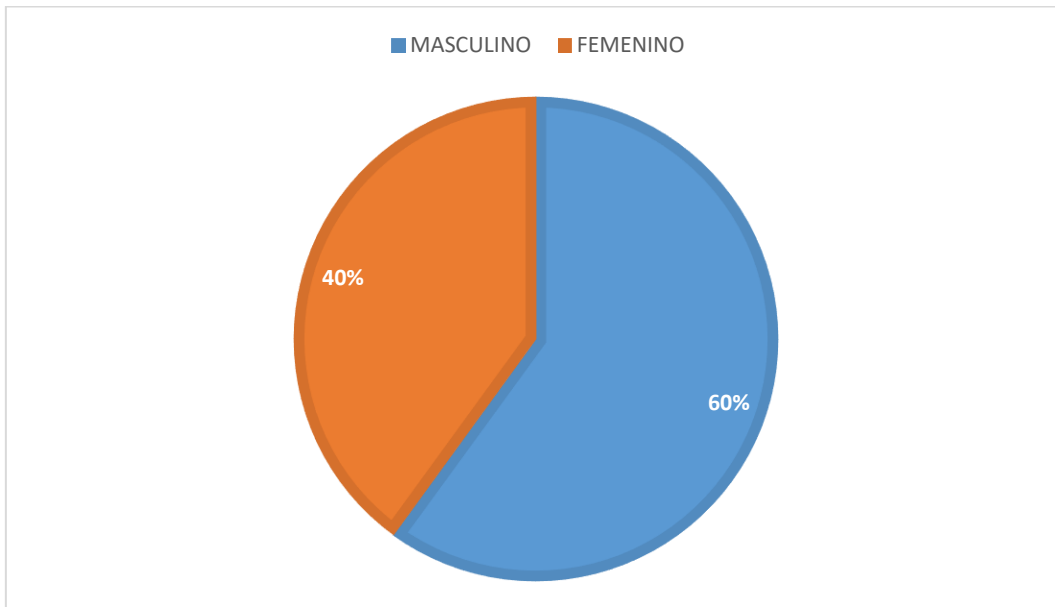


Figura 13. Relación de pacientes por género en el grupo de pulpitis irreversible

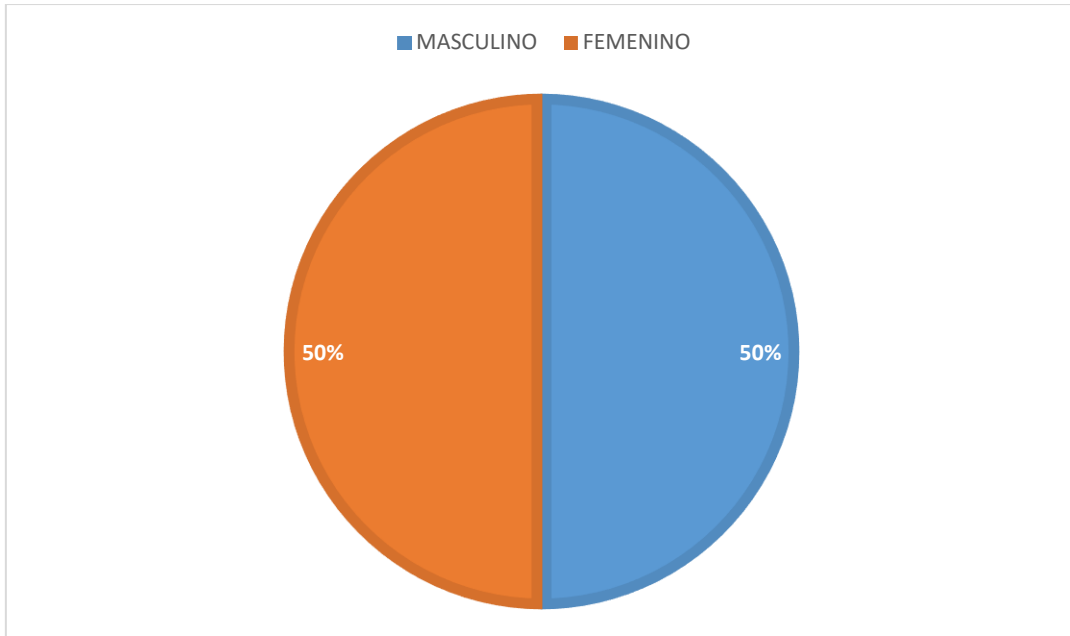


Figura 14. Relación de pacientes por género en el grupo control

Respecto a la edad el rango es de 18 a 51 años de edad. Para el grupo de pulpitis irreversible el rango de edad es de 19 a 51 años de edad con un promedio de 33.9 (Figura 15), para el grupo control el rango de edad fue de 18 a 24 años de edad con un promedio de 21.6 (Figura 16).

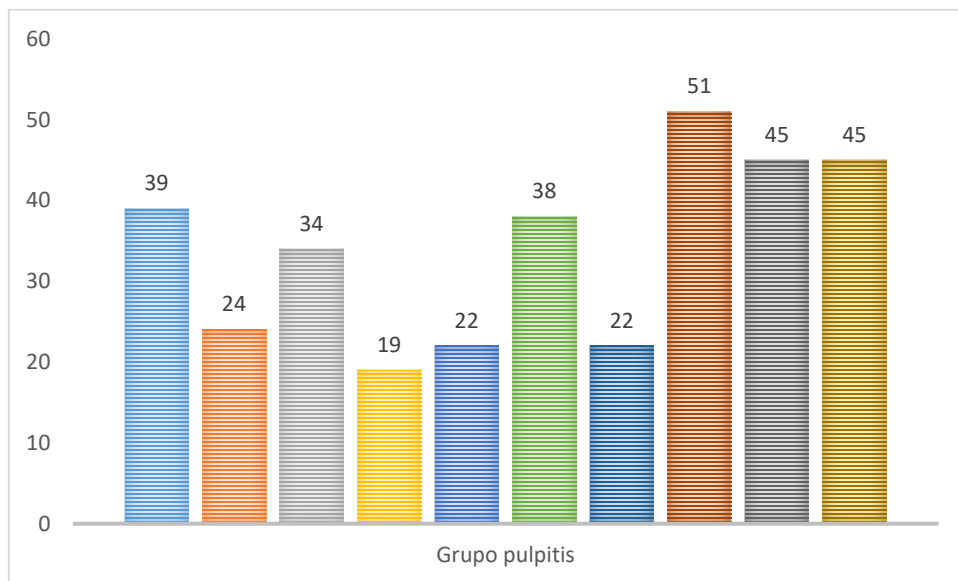


Figura 15. Edades del grupo pulpitis irreversible

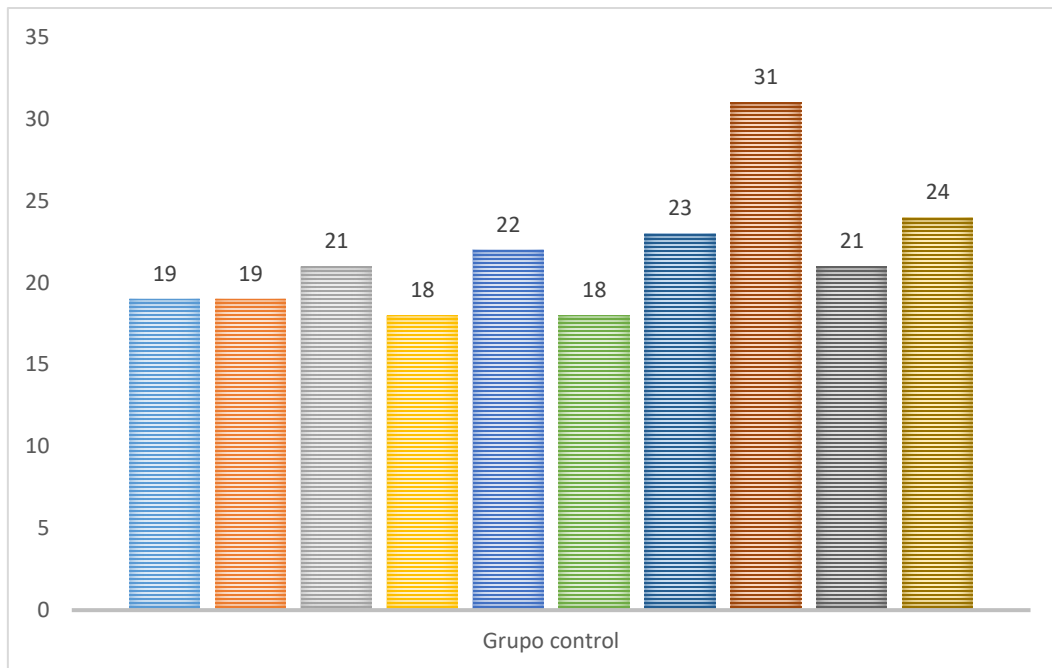


Figura 16. Edad grupo control

8.2 RESULTADOS DE LOS ÓRGANOS DENTALES OBTENIDOS PARA MUESTRA

Se obtuvieron 10 pulpas de diferentes órganos dentales para el grupo pulpitis de órganos dentales posteriores (Figura 17) y para el grupo control diferentes órganos dentales también de la zona posterior (Figura 18) con 10 pulpas sanas.

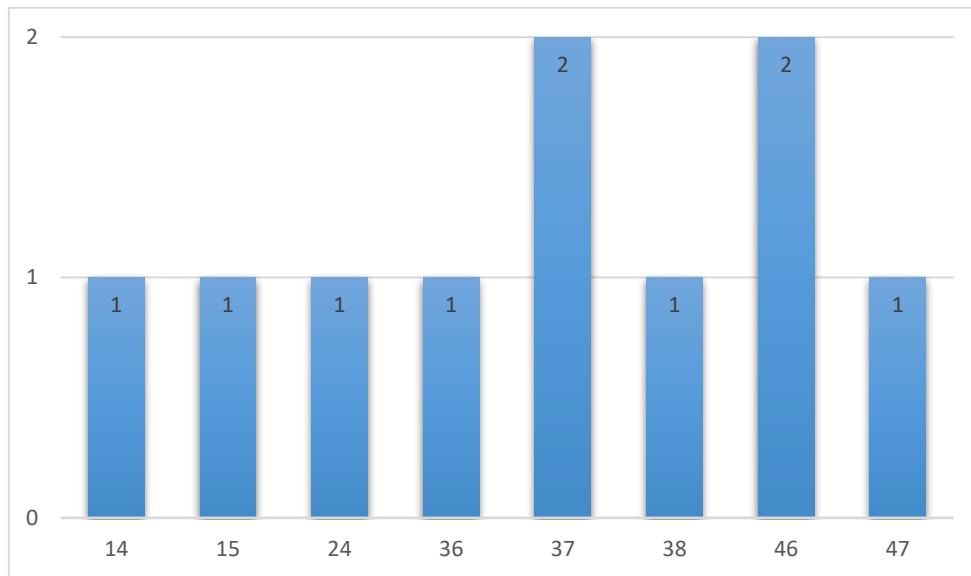


Figura 17. Órganos dentales para grupo pulpitis

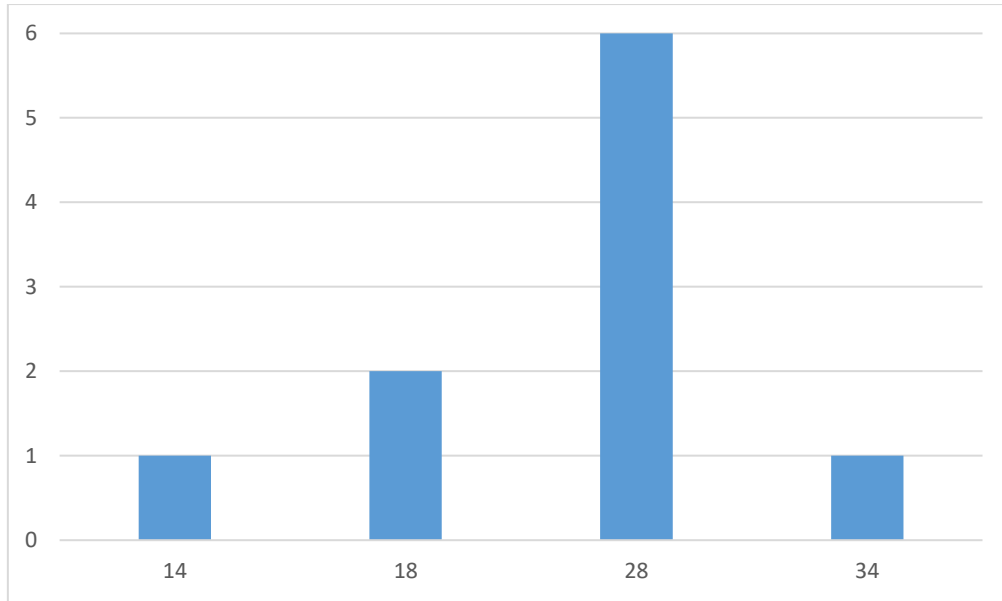


Figura 18. Órganos dentales para grupo control

8.3 RESULTADOS OBTENIDOS PARA CAUSAS DE PULPITIS

Los 10 individuos que tuvieron diagnóstico de pulpitis era por diferentes causas, la primera en número fue la caries dental con un 60% (n=6), restauración defectuosa 30% (n=3) y por último indicación protésica (Figura 19).

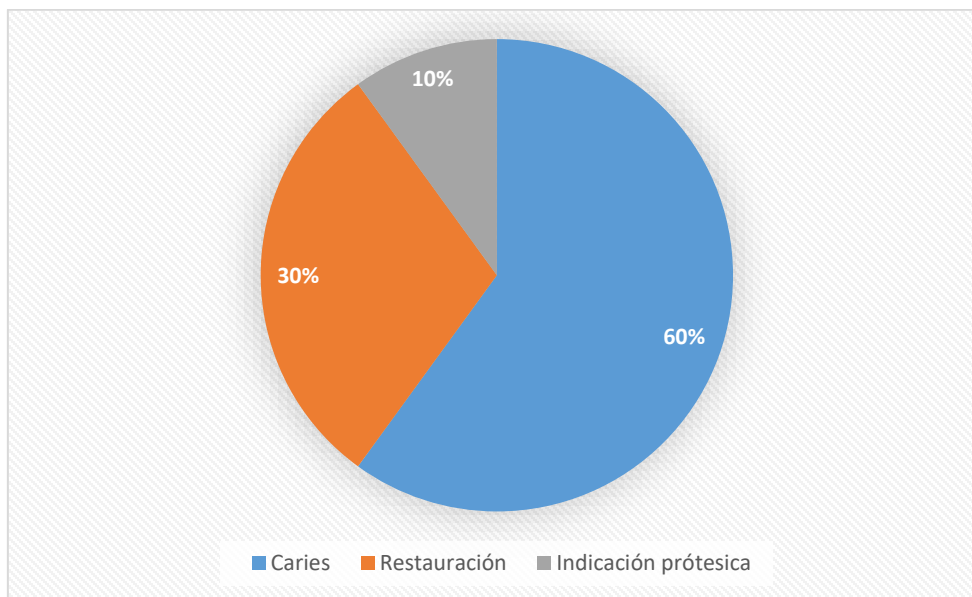


Figura 19. Causas de pulpitis irreversible en los pacientes

8.4 RESULTADOS SEGÚN EL DIAGNÓSTICO DE LA MUESTRA

Para la conformación de los pools los pacientes fueron diagnosticados por el especialista en endodoncia, tanto el pool 1 (n=5), como el pool 2 (n=5) de pacientes con pulpitis irreversible, tuvieron un diagnóstico de pulpitis irreversible sintomática (Tabla 4). Las muestras se obtuvieron en la clínica del posgrado de endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Tabla 4. Diagnóstico de grupo pulpitis irreversible

Pool 1	Edad	Sexo	Órgano dental	Diagnóstico pulpitis
1	39	Femenino	15	Irreversible sintomática
2	24	Femenino	24	Irreversible sintomática
3	34	Masculino	37	Irreversible sintomática
4	19	Masculino	46	Irreversible sintomática
5	22	Masculino	46	Irreversible sintomática
Pool 2				
1	38	Femenino	47	Irreversible sintomática
2	22	Femenino	14	Irreversible sintomática
3	51	Masculino	37	Irreversible sintomática
4	45	Masculino	36	Irreversible sintomática
5	45	Masculino	38	Irreversible sintomática

Así mismo en la conformación de los pools para el grupo control de los pools los pacientes fueron diagnosticados por el adscrito a la clínica de exodoncia, en el pool 1 del grupo control se

obtuvo un 100% (n=5) de diagnóstico de pulpa sana, de igual manera en el pool 2 del grupo control un 100% (n=5) (Tabla 5). Las muestras se obtuvieron en la clínica de enseñanza de la Facultad de Oontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Tabla 5. Pacientes del grupo control

Pool 1	Edad	Sexo	Órgano dental	Diagnóstico
1	19	Masculino	18	Pulpa sana
2	19	Masculino	28	Pulpa sana
3	21	Femenino	28	Pulpa sana
4	18	Femenino	14	Pulpa sana
5	22	Femenino	28	Pulpa sana
Pool 2				
1	18	Masculino	34	Pulpa sana
2	23	Masculino	14	Pulpa sana
3	31	Femenino	28	Pulpa sana
4	21	Femenino	28	Pulpa sana
5	24	Masculino	18	Pulpa sana

8.5 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HOTAIR, IL-1 β , IL-6 Y TNF- α

Para la evaluación de la expresión de HOTAIR, IL1- β , IL-6, TNF- α en las muestras control y pacientes con pulpitis irreversible, se procedió en primer lugar a la extracción de RNA, a continuación, se puede apreciar la integridad de los RNAs obtenidos de ambos pools de controles y pacientes con pulpitis irreversible (Figura 20).

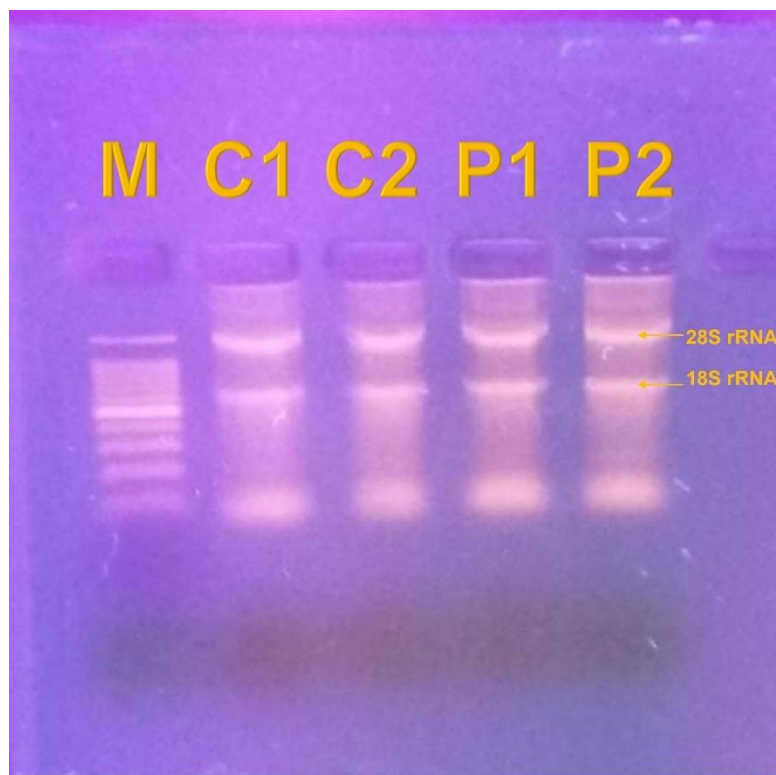


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa

M: marcador, C1: control 1, C2: control 2, P1: pulpitis 1, P2: pulpitis 2.

Una vez comprobada la integridad del RNA se llevó a cabo la síntesis de cDNA, seguido del análisis de expresión génica de TNF- α , IL-6, IL-1 β y HOTAIR, utilizando ACTB como gen constitutivo y analizados los datos correspondientes en Graphpad Prism 8.

8.5.1 EXPRESIÓN DE TNF- α EN LOS PACIENTES CON PULPITIS IRREVERSIBLE

Para el análisis de la expresión para TNF- α , se encontró una tendencia marcada a una mayor expresión de este gen tanto en el pool 1 (FC = 11.90, $p = 0.246$) como en el pool 2 (FC = 50.99, $p = 0.0053$) en los pacientes con pulpitis irreversible en comparación a los pools de los grupos control, sin embargo, solamente siendo esta sobreexpresión significativa en el pool 2 de pulpitis irreversible (Figura 21).

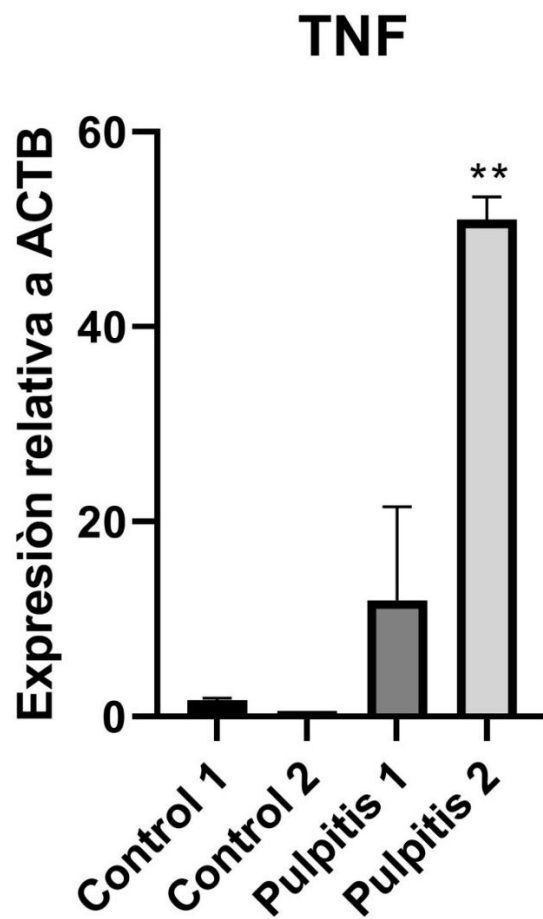


Figura 21. Expresión de TNF- α

8.5.2 EXPRESIÓN DE IL-6 EN PACIENTES CON PULPITIS IRREVERSIBLE

Resultados similares a TNF- α , fueron obtenidos para la expresión génica de IL-6, donde hubo una mayor expresión de este gen en ambos pools de los pacientes con pulpitis en comparación a los controles, sin embargo, no se encontró significancia estadística para el pool 1 de pulpitis irreversible (FC = 10.26, $p = 0.3249$), solamente la sobreexpresión de IL-6 encontrada en el pool 2 de pacientes con pulpitis irreversible fue estadísticamente significativa (FC = 51.36, $p = 0.0051$) (Figura 22).

IL6

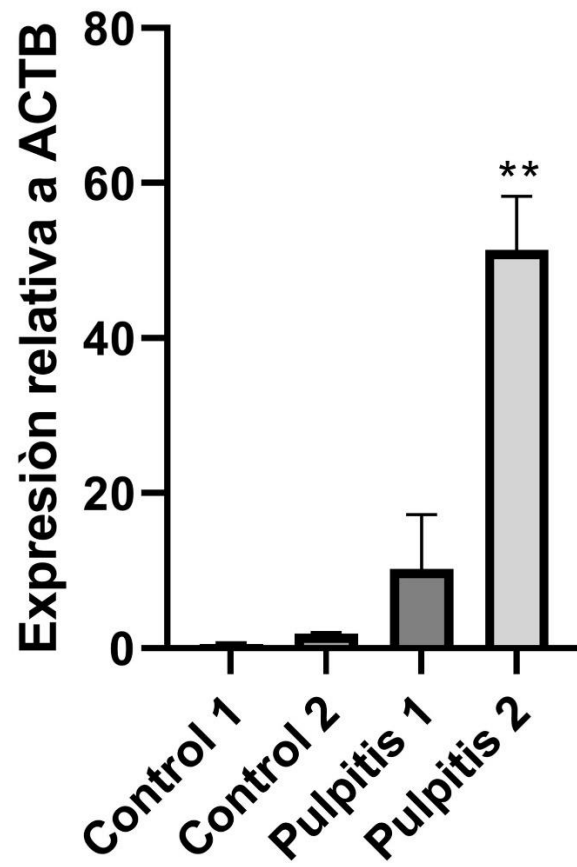


Figura 22. Expresión de IL-6

8.5.3 EXPRESIÓN DE IL-1 β EN LOS PACIENTES CON PULPITIS IRREVERSIBLE

De igual manera, IL-1 β se encontró sobreexpresado de manera significativa tanto para el pool 1 (FC = 12.12, p = 0.0084) como para el pool 2 (FC = 40.86, p = 0.0002) de pacientes con pulpitis irreversible (Figura 23).

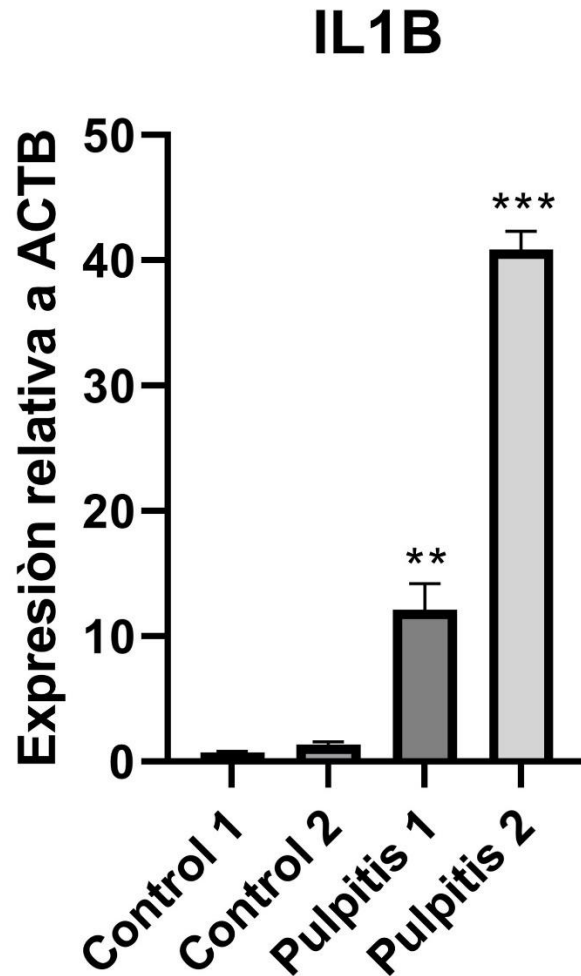


Figura 23. Expresión IL-1 β

8.5.4 EXPRESIÓN DE HOTAIR EN PACIENTES CON PULPITIS IRREVERSIBLE

Los resultados obtenidos para HOTAIR muestran sobreexpresión de dicho lncRNA en ambos grupos de pulpitis, siendo estadísticamente significativo tanto para el pool 1 (FC = 4.85, $p = 0.0028$) como para el pool 2 (FC = 3.06, $p = 0.0164$) de pacientes con pulpitis (Figura 24).

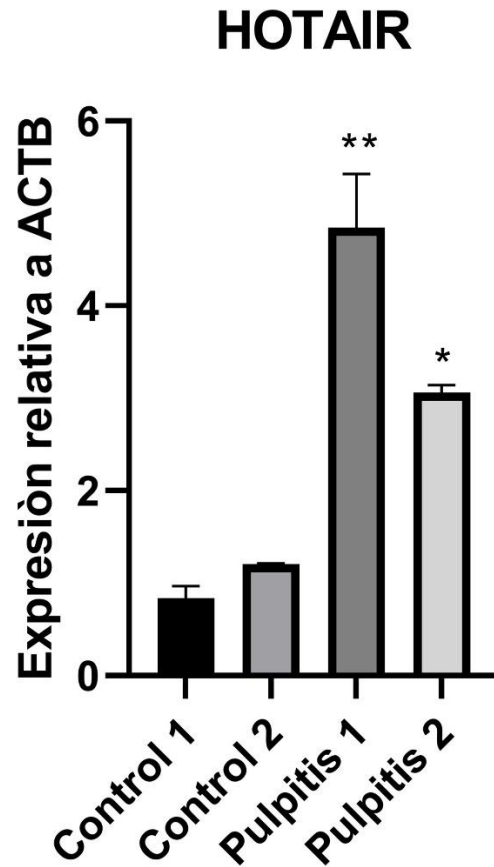


Figura 24. Expresión HOTAIR

9. DISCUSIÓN

Las citocinas inflamatorias en la pulpa han sido ampliamente estudiadas, algunos estudios previos muestran que juegan un papel fundamental en el proceso de pulpitis (Rechenberg et al., 2016). IL-1 β , IL-6, TNF- α y HOTAIR pueden coincidir juntos en algunos estudios en diferentes partes del cuerpo y diferentes células de los órganos (da Silva et al., 2020; Price et al., 2021). Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron encontrados por Piattelli et al, respecto a la sobreexpresión de TNF- α en el tejido pulpar en las capas odontoblásticas y subodontoblásticas en pacientes con pulpitis irreversible(n=20) en comparación con el grupo control de órganos dentales sanos (n=23) (Piattelli et al., 2004), de igual manera Kokkas et al, realizaron la identificación de TNF- α empleando PCR y describieron que hay una marcada diferencia entre el grupo control de dientes sanos (n=6) con el de pulpitis irreversible (n=6) siendo el grupo de pulpitis irreversible el cual tuvo una sobreexpresión significativa de dicho factor (Kokkas et al., 2007). Además, Pezelj *et al* realizó identificación de TNF- α mediante el método de ELISA haciendo comparaciones de pulpas normales (n=20) con pulpitis irreversible sintomática (n=20), y otro grupo más con pulpitis irreversible asintomática (n=20) obteniendo mayores cantidades de este factor en los pacientes con pulpitis irreversible sintomática, en este caso, no hubo comparación entre los tipos clínica de pulpitis pero coincide que se expresan en ambos procesos inflamatorios por lo que en el caso de la pulpitis irreversible sintomática sí obtuvieron resultados similares con el de nuestro estudio (Pezelj-Ribaric et al., 2002). IL-6 e IL-1 β fueron estudiados por Zehnder *et al* por RT-qPCR en los tejidos pulpares de pacientes sanos y órganos dentales libres de pulpitis (n=10) y con pulpitis irreversible sintomática (n=10) obteniendo resultados significativos de los niveles de expresión tanto de IL-6 e IL-1 β en comparación con los grupos controles, los cuales son resultados similares a nuestro estudio

(Zehnder et al., 2003). Elsalhy *et al* encontró mediante ELISA que hay una mayor cantidad de IL-6 en el grupo de pulpitis irreversible (n=46) frente a la pulpa normal (n=20), coincidiendo con nuestro trabajo (Elsalhy et al., 2013). Además, Barkhordar *et al*, encontró que IL-6 fue mayormente encontrada en órganos dentales diagnosticados con caries y pulpitis en comparación a órganos dentales sanos, esto mediante la técnica de ELISA, coincidiendo con nuestros hallazgos (Barkhordar et al., 1999). Silva *et al* realizaron un estudio comparativo en pulpas sanas (n=10) y pulpitis irreversible (n=10) en un estudio de inmunohistoquímica, no encontrando expresión de IL-1 β , pero con el método de ELISA pudieron encontrar que IL-1 β mayormente presente en comparación con el grupo control (Silva et al., 2009). Abd-Elmeguid *et al* encontró en células de la pulpa inflamadas de pulpitis irreversible (n=12), una mayor expresión de IL-1 β coincidiendo con nuestros resultados. Para el gen HOTAIR no hay al momento de la realización de este estudio artículos publicados de su expresión en tejido pulpar, sin embargo, HOTAIR ha sido publicado en procesos inflamatorios no neoplásicos (Abd-Elmeguid et al., 2013), Zhan *et al* en un primer estudio encontraron la relación de HOTAIR con TNF- α e IL-6 en un grupo experimental de miocitos cardiacos lo cual coincide con nuestro estudio ya que en el proceso inflamatorio de pulpitis irreversible también hubo una sobreexpresión de HOTAIR en comparación a los grupos control, coincidiendo con IL-1 β en ambos grupos de pulpitis y TNF- α en pulpitis 2 así como IL-6 en pulpitis 2 de igual manera. Para Zhang et al HOTAIR estimula la secreción de citocinas IL-6, IL-1 β y TNF- α , este resultado también se ve reflejado en nuestro estudio, sin embargo, no podemos afirmar si es mediante las mismas vías la promoción de estas vías en el tejido pulpar, para lo cual más experimentos necesitan ser realizados para confirmar estas aseveraciones.

10. CONCLUSIÓN

Este es el primer estudio donde se analiza la expresión de HOTAIR en el tejido pulpar sano y enfermo, encontrado una mayor expresión de este lncRNA en el tejido pulpar inflamado (pulpitis irreversible), por lo cual, este resultado junto, con la sobreexpresión encontrada de las citocinas analizadas IL-6, IL-1 β and TNF- α , podría establecerse que si podría haber una relación entre estos factores con HOTAIR, sin embargo, más estudios necesitan ser realizados para conocer a profundidad los mecanismos por los cuales HOTAIR está participando en el proceso de inflamación.

11. PERSPECTIVAS

Son necesarios más estudios respecto al HOTAIR y citocinas proinflamatorias de la pulpa dental o en el proceso inflamatorio de cavidad oral, así como estudios de mayor rango de individuos, perfeccionar el manejo del tejido pulpar y su obtención de la muestra, para obtener resultados que a futuro puedan tener una perspectiva clínica.

12. REFERENCIAS

- Abd-Elmeguid, A., Abdeldayem, M., Kline, L. W., Moqbel, R., Vliagoftis, H., & Yu, D. C. (2013). Osteocalcin expression in pulp inflammation. *J Endod*, *39*(7), 865-872.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.035>
- American Association of, E. (2003). *Glossary of endodontic terms*. American Association of Endodontists.
- Anderson, D. M., Langeland, K., Clark, G. E., & Galich, J. W. (1981). *Diagnostic Criteria for the Treatment of Caries-Induced Pulpitis*.
- Barkhordar, R. A., Hayashi, C., & Hussain, M. Z. (1999). Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endodontics & dental traumatology*, *15*(1), 26-27.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1999.tb00744.x>
- Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*, *118*(2), 413-420. <https://doi.org/10.1172/JCI34431>
- Bergenholtz, G. (1981). Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *Journal of endodontics*, *7*(3), 100-104. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(81\)80122-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(81)80122-7)
- Bermúdez, M., Aguilar-Medina, M., Lizárraga-Verdugo, E., Avendaño-Félix, M., Silva-Benítez, E., López-Camarillo, C., & Ramos-Payán, R. (2019). LncRNAs as regulators of autophagy and drug resistance in colorectal cancer. *Frontiers in oncology*, *9*, 1008.
- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *111*(2 Suppl), S460-S475. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.108>
- Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology*, *214*(2), 149-160. <https://doi.org/10.1002/path.2287>
- Brosius, J. (2005). Waste not, want not--transcript excess in multicellular eukaryotes. *Trends in genetics : TIG*, *21*(5), 287-288. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.02.014>

- 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>
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), 3666-3670. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3666>
- Couve, E. (1986). Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Archives of oral biology*, 31(10), 643-651. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(86\)90093-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(86)90093-2)
- D'Souza, R., Brown, L. R., Newland, J. R., Levy, B. M., & Lachman, L. B. (1989). Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. *Archives of oral biology*, 34(5), 307-313. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(89\)90102-7](https://doi.org/10.1016/0003-9969(89)90102-7)
- da Silva, R. A., Ferreira, M. R., Gomes, A. M., & Zambuzzi, W. F. (2020). LncRNA HOTAIR is a novel endothelial mechanosensitive gene. *J Cell Physiol*, 235(5), 4631-4642. <https://doi.org/10.1002/jcp.29340>
- Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuvanshi, S., Palapati, A., & Gutti, R. K. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Molecular immunology*, 112, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.011>
- Dinarello, C. A. (1997). Interleukin-1. *Cytokine & growth factor reviews*, 8(4), 253-265. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(97\)00023-3](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(97)00023-3)
- Elsalhy, M., Azizieh, F., & Raghupathy, R. (2013). Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *International endodontic journal*, 46(6), 573-580. <https://doi.org/10.1111/iej.12030>
- Emilia, E., & Neelakantan, P. (2015). Biomarkers in the dentin-pulp complex: role in health and disease. *The Journal of clinical pediatric dentistry*, 39(2), 94-99. <https://doi.org/10.17796/jcpd.39.2.r32617516412p710>

- Eriksen, H. M. (1991). Endodontology--epidemiologic considerations. *Endodontics & dental traumatology*, 7(5), 189-195. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1991.tb00434.x>
- Eriksen, H. M., Kirkevang, L. L., & Petersson, K. (2002). Endodontic epidemiology and treatment outcome: general considerations. *Endodontic Topics*, 2(1), 1-9.
- Fan, B., Cheung, G. S., Fan, M., Gutmann, J. L., & Bian, Z. (2004). C-shaped canal system in mandibular second molars: Part I--Anatomical features. *J Endod*, 30(12), 899-903. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000136207.12204.e4>
- Farges, J.-C., Keller, J.-F., Carrouel, F., Durand, S. H., Romeas, A., Bleicher, F., . . . Staquet, M.-J. (2009). Odontoblasts in the dental pulp immune response. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 312B(5), 425-436. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21259>
- Farges, J. C., Romeas, A., Melin, M., Pin, J. J., Lebecque, S., Lucchini, M., . . . Magloire, H. (2003). TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. *J Dent Res*, 82(8), 652-656. <https://doi.org/10.1177/154405910308200816>
- Farooq, I., & Bugshan, A. (2020). The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. *F1000Res*, 9, 171. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22499.3>
- Fejerskov, O., Escobar, G., Jøssing, M., & Baelum, V. (2013). A functional natural dentition for all--and for life? The oral healthcare system needs revision. *Journal of oral rehabilitation*, 40(9), 707-722. <https://doi.org/10.1111/joor.12082>
- Fu, C.-J., Cong, J., Sun, S.-S., Ren, M.-M., Xie, S.-Y., & Wang, P.-Y. (2020). Diagnostic roles of HOX transcript antisense intergenic RNA in cancer. *Asia-Pacific journal of clinical oncology*, 10.1111/ajco.13300. <https://doi.org/10.1111/ajco.13300>
- Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P., & Evans, E. (2018). Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol*, 1803, 57-79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5

- Giuroiu, C. L., Căruntu, I.-D., Lozneau, L., Melian, A., Vataman, M., & Andrian, S. (2015). Dental Pulp: Correspondences and Contradictions between Clinical and Histological Diagnosis. *BioMed Research International*, 2015, 960321. <https://doi.org/10.1155/2015/960321>
- Glick, M., Monteiro da Silva, O., Seeberger, G. K., Xu, T., Pucca, G., Williams, D. M., . . . Séverin, T. (2012). FDI Vision 2020: shaping the future of oral health. *International dental journal*, 62(6), 278-291. <https://doi.org/10.1111/idj.12009>
- Gotjamanos, T. (1969). Cellular organization in the subodontoblastic zone of the dental pulp. II. Period and mode of development of the cell-rich layer in rat molar pulps. *Archives of oral biology*, 14(9), 1011-1019. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(69\)90071-5](https://doi.org/10.1016/0003-9969(69)90071-5)
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., . . . Chang, H. Y. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071-1076. <https://doi.org/10.1038/nature08975>
- Gutschner, T., & Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*, 9(6), 703-719. <https://doi.org/10.4161/rna.20481>
- Hahn, C. L., Best, A. M., & Tew, J. G. (2000). Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun*, 68(12), 6785-6789. <https://doi.org/10.1128/iai.68.12.6785-6789.2000>
- Hahn, C. L., Falkler, W. A., Jr., & Minah, G. E. (1991). Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Archives of oral biology*, 36(2), 147-153. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(91\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0003-9969(91)90077-8)
- Hahn, C. L., Falkler, W. A., Jr., & Siegel, M. A. (1989). A study of T and B cells in pulpal pathosis. *Journal of endodontics*, 15(1), 20-26. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(89\)80093-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(89)80093-7)
- Hahn, C. L., & Liewehr, F. R. (2007). Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod*, 33(6), 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.001>
- Hargreaves, K. M., & Lh, B. (2016). Cohen's Pathways of The Pulp. 11th Edit. In: Elsevier Health Science. USA.

- Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique*, 50(3), 184-195.
[https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H)
- Jeanneau, C., Lundy, F. T., El Karim, I. A., & About, I. (2017). Potential Therapeutic Strategy of Targeting Pulp Fibroblasts in Dentin-Pulp Regeneration. *Journal of endodontics*, 43(9S), S17-S24. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.007>
- Kawashima, N., & Okiji, T. (2016). Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto)*, 56(4), 144-153. <https://doi.org/10.1111/cga.12169>
- Kokkas, A. B., Goulas, A., Varsamidis, K., Mirtsou, V., & Tziafas, D. (2007). Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. *Int Endod J*, 40(3), 198-203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01215.x>
- Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). DENTAL ENAMEL FORMATION AND IMPLICATIONS FOR ORAL HEALTH AND DISEASE. *Physiological reviews*, 97(3), 939-993. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016>
- Lee, J. H., Lee, D. S., Choung, H. W., Shon, W. J., Seo, B. M., Lee, E. H., . . . Park, J. C. (2011). Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors. *Biomaterials*, 32(36), 9696-9706. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.007>
- Lesot, H., Osman, M., & Ruch, J. V. (1981). Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Developmental biology*, 82(2), 371-381. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90460-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90460-7)
- Li, J., Tian, H., Yang, J., & Gong, Z. (2016). Long Noncoding RNAs Regulate Cell Growth, Proliferation, and Apoptosis. *DNA and cell biology*, 35(9), 459-470.
<https://doi.org/10.1089/dna.2015.3187>

- Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition reviews*, 65(12 Pt 2), S140-S146. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x>
- Listl, S., Galloway, J., Mossey, P. A., & Marcenes, W. (2015). Global economic impact of dental diseases. *Journal of dental research*, 94(10), 1355-1361.
- Lu, W., Zhu, L., Ruan, Z. B., Wang, M. X., Ren, Y., & Li, W. (2018). HOTAIR promotes inflammatory response after acute myocardium infarction by upregulating RAGE. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(21), 7423-7430. https://doi.org/10.26355/eurev_201811_16282
- Lucchini, M., Romeas, A., Couble, M. L., Bleicher, F., Magloire, H., & Farges, J. C. (2002). TGF beta 1 signaling and stimulation of osteoadherin in human odontoblasts in vitro. *Connect Tissue Res*, 43(2-3), 345-353. <https://doi.org/10.1080/03008200290000790>
- Madani, M., Berardi, T., & Stoopler, E. T. (2014). Anatomic and examination considerations of the oral cavity. *Med Clin North Am*, 98(6), 1225-1238. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.001>
- Marcenes, W., Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Flaxman, A., Naghavi, M., Lopez, A., & Murray, C. J. L. (2013). Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *Journal of dental research*, 92(7), 592-597. <https://doi.org/10.1177/0022034513490168>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- 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>
- Mitchell, R. N., Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2017). *Compendio de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. Elsevier Health Sciences.
- Nakanishi, T., Takegawa, D., Hirao, K., Takahashi, K., Yumoto, H., & Matsuo, T. (2011). Roles of dental pulp fibroblasts in the recognition of bacterium-related factors and subsequent

development of pulpitis. *Japanese Dental Science Review*, 47(2), 161-166.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2011.02.001>

Nanci, A. (2008). Enamel: composition, formation, and structure. *Ten Cate's oral histology development, structure, and function*, 141-190.

Obaid, M., Udden, S. M. N., Deb, P., Shihabeddin, N., Zaki, M. H., & Mandal, S. S. (2018). LncRNA HOTAIR regulates lipopolysaccharide-induced cytokine expression and inflammatory response in macrophages. *Scientific reports*, 8(1), 15670-15670.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33722-2>

Palomino, D. C. T., & Marti, L. C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 13(3), 469-473. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>

Park, H. C., Quan, H., Zhu, T., Kim, Y., Kim, B., & Yang, H.-C. (2017). The Effects of M1 and M2 Macrophages on Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. *Journal of endodontics*, 43(4), 596-601. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.11.003>

Perry, R. B.-T., & Ulitsky, I. (2016). The functions of long noncoding RNAs in development and stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 143(21), 3882-3894.

<https://doi.org/10.1242/dev.140962>

Peters, O. A., & Gk, S. (2019). White Paper on Endodontic Care. *FDI World Dental Federation*.

Petti, S., Glendor, U., & Andersson, L. (2018). World traumatic dental injury prevalence and incidence, a meta-analysis-One billion living people have had traumatic dental injuries. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*, 34(2), 71-86. <https://doi.org/10.1111/edt.12389>

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. *Arch*

Med Res, 33(5), 482-484. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(02\)00396-x](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(02)00396-x)

- Piattelli, A., Rubini, C., Fioroni, M., Tripodi, D., & Strocchi, R. (2004). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. *Int Endod J*, 37(2), 114-119. <https://doi.org/10.1111/j.0143-2885.2004.00758.x>
- Price, R. L., Bhan, A., & Mandal, S. S. (2021). HOTAIR beyond repression: In protein degradation, inflammation, DNA damage response, and cell signaling. *DNA Repair (Amst)*, 105, 103141. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103141>
- Pádua Alves, C., Fonseca, A. S., Muys, B. R., de Barros E Lima Bueno, R., Bürger, M. C., de Souza, J. E. S., . . . Silva, W. A., Jr. (2013). Brief report: The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(12), 2827-2832. <https://doi.org/10.1002/stem.1547>
- Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature reviews. Genetics*, 17(1), 47-62. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>
- Rechenberg, D.-K., Galicia, J. C., & Peters, O. A. (2016). Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. *PloS one*, 11(11), e0167289-e0167289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167289>
- Renard, E., Gaudin, A., Bienvenu, G., Amiaud, J., Farges, J. C., Cuturi, M. C., . . . Alliot-Licht, B. (2016). Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *Journal of dental research*, 95(2), 196-205. <https://doi.org/10.1177/0022034515612086>
- Ricucci, D., Loghin, S., & Siqueira, J. F., Jr. (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>
- Satpathy, A. T., & Chang, H. Y. (2015). Long noncoding RNA in hematopoiesis and immunity. *Immunity*, 42(5), 792-804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.004>
- Scavo, R., Martinez Lalis, R., Zmener, O., Dipietro, S., Grana, D., & Pameijer, C. H. (2011). Frequency and distribution of teeth requiring endodontic therapy in an Argentine population

- attending a specialty clinic in endodontics. *International dental journal*, 61(5), 257-260.
<https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00069.x>
- Seow, W. K. (2014). Developmental defects of enamel and dentine: challenges for basic science research and clinical management. *Australian dental journal*, 59 Suppl 1, 143-154.
<https://doi.org/10.1111/adj.12104>
- Shi, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y., & Song, Y. (2013). Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases. *Cancer letters*, 339(2), 159-166.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.06.013>
- Silva, A. C., Faria, M. R., Fontes, A., Campos, M. S., & Cavalcanti, B. N. (2009). Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci*, 17(5), 527-532.
<https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000500031>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295-a016295.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Tao, D., Zhang, Z., Liu, X., Fu, Y., Zhang, P., Yuan, H., . . . Jiang, H. (2020). LncRNA HOTAIR promotes the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma through metastasis-associated gene 2. *Mol Carcinog*, 59(4), 353-364. <https://doi.org/10.1002/mc.23159>
- Varfolomeev, E., & Vucic, D. (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*, 101, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>
- Vertucci, F. J. (2005). Root canal morphology and its relationship to endodontic procedures. *Endodontic topics*, 10(1), 3-29.
- Wang, X., Liu, W., Wang, P., & Li, S. (2018). RNA interference of long noncoding RNA HOTAIR suppresses autophagy and promotes apoptosis and sensitivity to cisplatin in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 47(10), 930-937. <https://doi.org/10.1111/jop.12769>

- Watt, R., & Sheiham, A. (1999). Inequalities in oral health: a review of the evidence and recommendations for action. *British dental journal*, 187(1), 6-12.
<https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4800191>
- Weiger, R., Hitzler, S., Hermle, G., & Löst, C. (1997). Periapical status, quality of root canal fillings and estimated endodontic treatment needs in an urban German population. *Endodontics & dental traumatology*, 13(2), 69-74. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1997.tb00013.x>
- Wu, H., Liu, J., Li, W., Liu, G., & Li, Z. (2016). LncRNA-HOTAIR promotes TNF- α production in cardiomyocytes of LPS-induced sepsis mice by activating NF- κ B pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 471(1), 240-246.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.117>
- Yazdi, A. S., & Ghoreschi, K. (2016). The Interleukin-1 Family. *Advances in experimental medicine and biology*, 941, 21-29. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_2
- Yu, X., & Li, Z. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR: A novel oncogene (Review). *Mol Med Rep*, 12(4), 5611-5618. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4161>
- Zehnder, M., Delaleu, N., Du, Y., & Bickel, M. (2003). Cytokine gene expression--part of host defence in pulpitis. *Cytokine*, 22(3-4), 84-88. [https://doi.org/10.1016/s1043-4666\(03\)00116-9](https://doi.org/10.1016/s1043-4666(03)00116-9)
- Zero, D. T., Zandona, A. F., Vail, M. M., & Spolnik, K. J. (2011). Dental caries and pulpal disease. *Dental clinics of North America*, 55(1), 29-46. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.010>
- Zhang, C., Wang, P., Jiang, P., Lv, Y., Dong, C., Dai, X., . . . Wang, Z. (2016). Upregulation of lncRNA HOTAIR contributes to IL-1 β -induced MMP overexpression and chondrocytes apoptosis in temporomandibular joint osteoarthritis. *Gene*, 586(2), 248-253.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.016>
- Zhang, H.-J., Wei, Q.-F., Wang, S.-J., Zhang, H.-J., Zhang, X.-Y., Geng, Q., . . . Wang, X.-H. (2017). LncRNA HOTAIR alleviates rheumatoid arthritis by targeting miR-138 and inactivating NF- κ B pathway. *International immunopharmacology*, 50, 283-290.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.06.021>

Zhang, J., Chen, M., Zhai, Y., & Fu, Y. (2020). HOTAIR regulates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in hepatocytes. *Journal of cellular physiology*, 235(5), 4247-4255.
<https://doi.org/10.1002/jcp.29301>

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

13. ANEXOS

12.1 ANEXO 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO



CONSENTIMIENTO INFORMADO



Yo _____ he sido informado de las características que consiste la investigación que lleva por título **“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HOTAIR Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN PULPA DENTAL SANA Y CON PULPITIS IRREVERSIBLE”** cuyo proyecto se llevará a cabo en las instalaciones de Microbiología Molecular e Inmunología de la facultad de bioquímica en el programa de Maestría en ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Mi participación es voluntaria y entiendo que la pieza donada ayudará a desarrollar un trabajo de investigación científica que puede contribuir a la ciencia de la odontología en un futuro. Entiendo por lo tanto que mis datos personales y clínicos serán completamente confidenciales y que solo el personal de la investigación tendrá acceso a la información.

Por lo tanto, al entender la información proporcionada, en plena consciencia **ACEPTO**.

Firma del paciente

Firma padre o tutor

Firma del receptor de la muestra

Fecha: _____