

# ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

---

---

IZTACALA - U. N. A. M.,  
CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA



## MASTOCITOS EN LA PULPITIS EXPERIMENTAL DE RATA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
CIRUJANO DENTISTA  
P R E S E N T A

JOSE FRANCISCO GOMEZ CLAVEL

SAN JUAN IZTACALA, MEXICO 1981



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## I N D I C E.

RESUMEN -----	2
ANTECEDENTES CIENTIFICOS -----	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	11
HIPOTESIS -----	12
OBJETIVO -----	13
JUSTIFICACION -----	14
DESARROLLO EXPERIMENTAL -----	15
RESULTADOS -----	19
DISCUSION -----	24
BIBLIOGRAFIA -----	26

**RESUMEN.**

Se estudió la población y distribución normal de los mastocitos en la pulpa de ratas Wistar. Los resultados se compararon con los obtenidos después de inducir una inflamación experimental en la pulpa. Nuestros datos - muestran un cambio significativo en la distribución y número de mastocitos(  $p < 0.025$ )

## ANTECEDENTES CIENTIFICOS.

Ehrlich en 1877 observó ciertas células con gránulos en su citoplasma, los cuales se tñían de un tono diferente al del colorante empleado, fenómeno al que denominó metacromacia. Supuso que los gránulos eran producto de la actividad fagocitaria de éstas células por lo que las designó con el nombre de MASTZELLEN, que en alemán quiere decir buen comer (15).

Los mastocitos o células cebadas presentan una gama de formas que va desde la esférica hasta la fusiforme. Esta variabilidad morfológica depende de la consistencia del me dio en el que se encuentren los mastocitos: en el tejido conectivo laxo tienden a adoptar formas esféricas, en tanto que en tejido conectivo denso, donde se hallan rodeados de fibras, son fusiformes (Angelopoulos, 1973). Miden tanto en el hombre como en la rata de 20 a 30 micrómetros -- (14); vistos al microscopio se les han reconocido estructuras subcelulares como mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi. En las células maduras estos organitos son desplazados por los gránulos que miden de .2 a 1.4 micrómetros (3). Los gránulos aparecen constituidos por una fina capa de líneas paralelas densas y otras menos densas,

con una periodicidad de 7.5 a 10 nanómetros (5). También se observan en el citoplasma numerosas estructuras - fibrilares, ribosomas distribuidos en forma difusa y gránulos de glucógeno dispersos; la membrana citoplásmica presenta microvellosidades. El núcleo es de forma irregular y central, aunque al microscopio óptico se observa oval y - nunca lobulado.

#### Bioquímica y Fisiología de los Gránulos de los Mastocitos.

Los mastocitos son considerados como glándulas unicelulares del tejido conectivo. Los estudios de sus gránulos - fueron iniciados en 1937 por Jorpes y colaboradores después del descubrimiento de la heparina en estas células. Más - tarde fueron detectadas aminas biógenas: en 1953 la histamina, 1954 la serotonina y en 1958 la dopamina. Los mastocitos también sintetizan enzimas proteolíticas como la tripsina (9) (20) y prostaglandinas (31).

Las sustancias de los gránulos participan en la inflamación. La histamina es un vasodilatador que no tiene acción directa sobre los capilares, sino que actúa alterando la - permeabilidad venular al separar las células endoteliales con lo que permite la salida de plasma (21). Otras propie-

dades farmacológicas de la histamina son: contracción de músculo liso y estimulación de la secreción de las glándulas exócrinas.

La histamina se encuentra unida iónicamente a otro constituyente de los gránulos, la heparina (13)(17)(35), que es un mucopolisacárido ácido sulfatado que posee propiedades anticoagulantes. La heparina inhibe la coagulación por dos mecanismos diferentes, evitando la activación de protrombina en trombina y la reacción de trombina fibrinógeno. La heparina inactiva los productos bacterianos y otros agentes nocivos, posee un efecto inhibitorio de la respuesta linfocitaria (18), y es un facilitador de la colagenolisis y de la resorción ósea (12).

Los mastocitos de la rata y ratón contienen además otras aminas: la 5-hidroxitriptamina (serotonina), la cual aumenta la contracción del músculo liso y la permeabilidad capilar. También secretan un factor quimiotáctico para eosinófilos, el cual se relaciona con los fenómenos alérgicos y una sustancia de reacción lenta (SRL), que aumenta y prolonga la acción de la histamina (35).

Los mastocitos se encuentran situados en la vecindad de los pequeños vasos sanguíneos, y de acuerdo con esta posición sus productos de secreción pasan tanto al sistema vascular como al tejido circundante. Los estímulos que causan



la degranulación son numerosos: estímulos físicos (trauma mecánico, calor, irradiación); ciertos agentes químicos - (toxinas, venenos de serpiente, abejas, dextrán) (29); -- procesos inmunológicos por combinación de antígenos con Ige (la cual se encuentra adherida a la superficie de los mastocitos), o bien por la activación del complemento del que se liberan dos sustancias conocidas con el nombre de - anafilotoxinas (C3a y C5a), que a su vez son dos potentes liberadoras de los gránulos (19) (25).

#### Mastocitos en la Pulpa Dental.

Los mastocitos ó células cebadas se encuentran amplia - mente distribuidas en el tejido conectivo, incluyendo todas las regiones de la cavidad oral a excepción de la pulpa.

En 1929, Orban reportó la ausencia de mastocitos en la pulpa dental humana (23); Todaro en 1939 realizó un estudio sobre la distribución de los mastocitos en el territorio dentario, paradentario y bucal de 15 especies diferentes de mamíferos, entre las cuales se incluyeron 3 humanos de diferentes edades, y no observó mastocitos en la pulpa ni en el ligamento periodontal (30).

Wislocki, Singer y Waldo (1948), reportan haber encontrado un solo mastocito después de examinar cuidadosamente una docena de cortes de dos dientes humanos (primer caso - en que se registra la presencia de células cebadas en pulpa dental), y ninguno en un número similar de cortes de un diente de mono (33). Wislocki y Sognnaes (1950) estudiaron diferentes tejidos de mamíferos y encontraron que las células cebadas son numerosas en el estroma del tejido gingival pero que están ausentes en la pulpa (34).

Dockrill en 1961, utilizando biopsias y material post-mortem de la cavidad oral, no pudo observar mastocitos en pulpa normal, pero sí observó numerosos mastocitos en dientes con pólipos pulperos, lo que le llevó a enunciar la hipótesis de que las células cebadas pueden aparecer en tejidos en los que normalmente no existen si en un momento determinado aumentan de volumen, como en los pólipos de la pulpa dental, y plantea que la función de las células cebadas es la de proveer una sustancia que permita a los tejidos tener la suficiente resistencia a la tensión, proporcionando el grado necesario de elasticidad (7).

Anneroth y Brannstrom (1964) estudiaron biopsias de la pulpa y encía de 18 pacientes. Los dientes estaban clínicamente sanos y la encía no mostraba signos apreciables de -

inflamación. Fijando sus muestras en alcohol etílico-formol durante 24 a 48 horas, incluyeron sus especímenes en parafina e hicieron cortes seriados. Fueron examinados -- con luz ultravioleta (UV) 12 cortes de cada muestra (pulpa y encía) después de montarlos en un medio no fluorescente; los restantes fueron teñidos con azul de toluidina. Observaron células con gránulos autofluorescentes tan to en la pulpa como en la encía. Células con gránulos metacromáticos que "sugieren mastocitos" fueron observadas en todas las muestras de encía, y sólo en una de las muestras de pulpa que pertenecía a un incisivo inferior de un hombre de 36 años; en la mayoría de los cortes del diente se observó que los mastocitos se agrupaban (2).

Sulzmann (1966) describió la presencia de células plasmáticas y de pequeñas células cebadas en cantidades significativas en pulpas normales de dientes de perro. Las células plasmáticas no se encuentran presentes en la pulpa dental humana, por lo que las observaciones de Sulzmann nos llevan a pensar que se trataba de dientes con pulpitis crónica (28).

Pohto y Antila (1970) intentaron obtener evidencias cuantitativas de la presencia de histamina en pulpa dental de origen diferente al de las células cebadas, para lo cual -

separaron histamina por electroforesis en gel de pulpas de rata, conejo y humano y la caracterizaron espectrofluorométricamente. Sus resultados no fueron significativos (24).

Ede y Langeland (1970) estudiando la alteración de la tinción de células cebadas debida a varios agentes fijadores y descalcificadores, encontraron en material descalcificado en EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y teñido con azul de toluidina, "auténticas células cebadas" en la encía y ligamento periodontal, pero no en el tejido pulpar del mismo bloque (8).

Zacchrisson y Skogedal (1971), usaron material pulpar de 45 dientes clínicamente sin caries y 24 dientes con lesiones cariosas. Su método no utiliza descalcificación, va que después de extraer los dientes los parten con discos de diamante, fijando solamente la pulpa, a la que incluyeron en parafina; los cortes seriados obtenidos los tiñeron con azul astrá (astrá blue) y rojo nuclear rápido. En todas las pulpas de dientes cariados observaron mastocitos, no encontrándolos en ninguna de las pulpas de los dientes sin caries (37).

Por último, Miller y colaboradores (1978), previo acceso endodóntico, extrajeron con la ayuda de sondas barbadas la pulpa de dientes con sintomatología de pulpitis (grupo

experimental) y de dientes sanos extraídos por razones ortodóncicas. Sólo encontraron mastocitos en 2 de las 25 pulpas extraídas endodónticamente de los dientes con caries profundas, y no los encontraron en su grupo testigo de 10 dientes "vírgenes" sin patosis parispicales (22).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La inflamación como respuesta a la agresión se caracteriza por la afluencia de elementos del lecho vascular al tejido lesionado, para lo cual es necesario que ocurran -- ciertos eventos en la pared de los vasos. Estos eventos se presentan al degradarse los mastocitos que contienen histamina, pero los mastocitos sólo han sido reportados en -- pulpitis crónicas y no en pulpas normales: el hecho de que el tejido pulpar sea el único tejido conectivo laxo exento de mastocitos es un enigma, por lo que podría suponerse que en la pulpa existen otros sistemas por los cuales se logra la vasodilatación, si bien estos sistemas que involucran -- factores de la coagulación y prostaglandinas existen, el único mediador químico para el cual se ha establecido claramente su papel en la inflamación es la histamina.

**HIPOTESIS.**

Aunque en condiciones normales no hay mastocitos en la pulpa dental, es factible que una lesión experimental pueda inducir su migración hacia el tejido conectivo pulpar.

**OBJETIVO.**

**Nuestro trabajo tiene como objetivos:**

**Establecer el número y distribución de mastocitos en la pulpa y periodonto de rata en condiciones normales y determinar los posibles cambios después de inducir un proceso - inflamatorio en la pulpa.**



**JUSTIFICACION.**

Ya que la pulpa es el único tejido conectivo laxo en el que no se encuentran mastocitos, ofrece la oportunidad de ser utilizada como modelo biológico para observar la migración de estas células.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Previo anestesia con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal, se produjo en 12 ratas Wistar machos con un peso aproximado de 350 grs. una pulpitis experimental.

Con una turbina dental y fresas de diamante del número cero se practicaron cavidades en los primeros molares inferiores derechos de cada rata hasta lograr comunicación pulpar, que fue tratada con la colocación de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  USP (White). Se obturó la cavidad con amalgama de plata de fase dispersa (Tytin S.S White Pennwalt). Los molares inferiores izquierdos se utilizaron como testigo.

Las ratas se mantuvieron en condiciones de bioterio proporcionándoles agua y alimentos ad libitum durante nueve días, fecha en que fueron sacrificadas con una sobredosis de cloroformo por inhalación.

Se obtuvieron las mandíbulas por disección y se fijaron en formaldehído al 10% durante 24 horas; todas fueron descalcificadas utilizando una solución de ácido tricloroacético formaldehído al 10% (5 grs. a 100 ml. P.V), durante un promedio de 10 días a 37°C. Se escogió esta solución desmineralizante ya que previene la destrucción de los tejidos blandos por el ácido y conserva las relaciones morfo

lógicas evitando el hinchamiento de los tejidos ricos en colágena (dentina y hueso) (10). Una vez realizada la descalcificación, procedimos a obtener de las mandíbulas sólo la región de los molares la cual luego de ser llevada a al alcohol absoluto (deshidratación) y xilol, fue incluida en parafina.

Se obtuvieron cortes de 7 micrómetros de espesor utilizando un microtomo American Optical "820". Los cortes fueron teñidos con la técnica metacromática del Nitrato de Uranilo de Hugheson (32) utilizada específicamente para teñir mastocitos de muestras que han sido descalcificadas, ya que durante el proceso de descalcificación, los gránulos pierden la metacromacia y no son observables con técnicas convencionales para muestras de tejidos blandos. El colorante utilizado es el azul de toluidina I.C.5-2040 (Sigma Chemical Co.).

Una vez realizada la técnica histológica se observaron los cortes en un microscopio FOMI III de Carl Zeiss con un objetivo de 16.5 X, y se determinó el número y distribución de mastocitos en la pulpa y tejidos periodontales.



**Figura 1.- Fotografía del procedimiento operatorio para hacer una cavidad en el primer molar de rata.**



**Figura 2.- Fotografía mostrando la cavidad.**



Figura 3.- Fotografía de la colocación de Hidroxi-do de calcio en la cavidad.



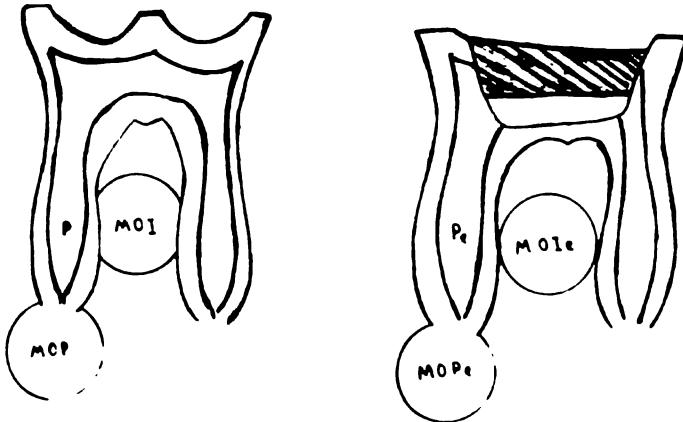
Figura 4.- Fotografía después de obturar la -  
cavidad con amalgama de plata.

## RESULTADOS.

No observamos células cebadas en la pulpa de los dientes intactos de nuestro grupo testigo; por otro lado, encontramos mastocitos en 5 de los dientes experimentales lo que nos dió una media de 0.92 .

Utilizando la prueba de T de student resultó una  $p < .025$ , por lo que los resultados obtenidos son estadísticamente significativos.

También se determinó la distribución de mastocitos en médula ósea de las áreas marcadas en el esquema.



P= Pulpa Dental

MOP= Médula Ósea Periapical

MOI= Médula Ósea Interradicular

Hubo una disminución estadísticamente significativa de la población experimental MOPe con respecto a los testigos MOPt. No se determinaron cambios significativos en las áreas MOI.

En ninguno de los casos se pudo establecer la presencia de células cebadas en la encía y ligamento periodontal propiamente dicho, pero si asociadas al paquete vasculonervioso. En algunos testigos las células cebadas se encontraron en el conducto cementario.

TABLA I. Población de Células Cebadas.

	$\bar{x}$	$\sigma$		$\bar{x}$	$\sigma$
Pt	0	± 0	Pe	0.92	± 1.74
MOPt	8.2	± 4.67	MOPe	4.5	± 2.53
MOIt	8.3	± 14.67	MOIe	7.4	± 6.24



**Figura 6.- Microfotografía de un corte mesio -  
distal de una raíz de un ler. molar (objetiv  
vo 2.5 X, Optovar 1.25).**





Figura 7.- Microfotografía , acercamiento de -  
la figura anterior, se observan 2 mastocitos  
en la pulpa. (objetivo 16.5 X, Optovar 1.25).



**Figura 8.-** Microfotografía en la que se muestran 3 células cebadas en pulpa (objetivo 40 X, optovar 1.25).

## DISCUSION.

Los resultados obtenidos en el grupo testigo concuerdan con los reportes de los autores que niegan la existencia de mastocitos en la pulpa.

Los datos del grupo experimental sugieren una tendencia de los mastocitos a migrar al tejido conectivo pulpar, probablemente para participar de manera directa en el proceso inflamatorio.

Según Bourne y colaboradores (1974), la histamina si bien es un mediador químico de la inflamación por sus ya conocidos efectos en la microvasculatura, también es capaz de aumentar la cantidad de AMP cíclico en otras células como leucocitos o las mismas células cebadas cercanas a la lesión, con lo cual inhibirá la tendencia de éstas a estar descargando su contenido enzimático y de mediadores químicos y, de esta manera, participar como modulador de la inflamación en la pulpa (4)(26)(27).

Comparando los resultados obtenidos de las zonas MOP la disminución significativa de MOPE respecto a MOPT, nos hace pensar que las células cebadas de la pulpa migraron de la zona MOP; pero no hay una relación biunívoca, es decir, de uno a uno entre la disminución de mastocitos de la zona

MOPE con el número de los mismos en pulpa, lo que podría explicarse con base en su actividad secretora, ya que el método que usamos para detectar estas células se basa en la metacromacia que dan sus gránulos debido a su contenido de mucopolisacáridos ácidos sulfatados, específicamente heparina, ya que, de estar participando activamente los mastocitos en la inflamación, estarían descargando continuamente sus gránulos y éstos serían metabolizados y por lo tanto desaparecerían dentro de las 4 horas siguientes a la degranulación (Higginbotham y colaboradores 1958) y, por lo tanto no se podrían observar con la técnica que utilizamos.

Otra posibilidad es que las células cebadas de la región MOPE no hayan migrado, sino que disminuy<sup>ó</sup> aparentemente su número debido a que fueron disparados los mecanismos de degranulación (inducida por los productos de la necrosis e inflamación) y a que proteínas desnaturalizadas y otros elementos de la necrosis promuevan la diferenciación de linfocitos o células endoteliales linfáticas (Ginsburg y Lagunoff, 1967) o bien de células mesenquimatosas indiferenciadas hacia células cebadas (Combs, 1966).

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Angelopoulos, A.P.: Studies of mast cells in the human gingiva I Morphology. J.Periodont Research 8:28-36, 1973.
- 2.- Anneroth, G., y Brannstrom, M.: Autofluorescent Granular Cells and Mast Cells in the Human Gingiva and Dental Pulp, Odont. Revy 15:10-14, 1964.
- 3.- Barnett, M. L. : The Fine Structure of Human Connective Tissue Mast Cells in Periodontal Disease, J. Periodontal Res. 9:84-91, 1974.
- 4.- Bourne, H.R., Lichtenstein, L.M., Melmon, K.L., Henney C.S., Weinstein, Y., Shearer, G.M.: Modulation of inflammation and Immunity by Cyclic AMP. Science 184:19-28 , 1974.
- 5.- Cobb, Ch.M., Heneghan, J., Le Blanc, D. y Davis, M.: - Mast Cell distribution in oral tissues of germ- free - vs. Conventional Beagle Dogs, J. Periodontol 47(4):230 -5, 1976.
- 6.- Combs, J.W.: Maturation of rat mast cells an Electron Microscope Study. J. Cell Biol 31:563-575, 1966.
- 7.- Dockrill, T.E.: Tissue Mast Cells in the Oral Cavity . Aust. Dent J. 6: 210-214, 1961.

- 8.- Ede, S., y Langeland, K.: The Alteration of Mast Cell Staining Due to Various Fixatives and Demineralizing Agents. Scand J Dent Res 78: 217-231, 1970.
- 9.- Fernex, M.: Mast Cell System. The Williams & Wilkins Co. Baltimore 1967.
- 10.- Gabe, M.: Techniques Histologiques. Masson et Cie eds. Paris 1968.
- 11.- Ginsburg, H., Legunoff, D.: The in Vitro Differentiation of Mast Cells (Cultures of Cells from Immunized - Mouse Lymph nodes and Thoracic Duct Lymph on Fibroblast Monolayers). J. Cell Biol 35: 685-697, 1967.
- 12.- Goldhaber, P.: Heparin Enhancement of Factors Stimulating Bone Resorption in Tissue Culture. Science 147: 407, 1965.
- 13.- Goth, A., Jhonson, A.R.: Current Concepts on the Secretory Function of Mast Cells. Life Science 16: 1201 - 1214, 1975.
- 14.- Greep, R.O. y Weiss, L. editors: Histology, 4a. Ed. Mc. Graw-Hill Book Co. New York, 1977.
- 15.- Ham, A.W., Histologia, 7a. Ed. Interamericana. México. 1977.
- 16.- Higginbotham, R.D., Dougherty, T.F., Jee, W.S.S.: Fate of Shed Mast Cell Granules. Proc. Soc Exp Biol Med 92: 266-261, 1956.

- 17.- Jaques, L.B.: Heparin: and Old Drug with a New Para -  
digm Science 206(2): 528-533, 1979.
- 18.- Jaques, L.B.: Heparins- Amionic Polyelectrolyte Drugs  
Pharmacological Reviews 31(2): 99-166, 1979.
- 19.- Korotzer, J., Waddad, Z. y Lopapa, A.: Detection of -  
Human IgE Antibody by a Modified rat Mast Cell Degra-  
dation Technique, Immunology 20: 545-548, 1971.
- 20.- Legunoff, D. 1968. Citado por Barnett. (3)
- 21.- Najno, G. y Palade, G.E.: Studies on Inflammation I. -  
Citado por Pérez Tamayo, R. Serendipia, Siglo XXI Ed.  
México 1980.
- 22.- Miller, G., Sternberg, R., Piliero, S., y Rosenberg,  
P.: Histologic Identification of Mast Cells in Human  
Dental Pulp. Oral Surg 46: 559-566, 1978.
- 23.- Orben: Citado por Todaro. (30)
- 24.- Pohto, P., y Antila, R.: Assay of Histamine in Dental  
Pulps. Acta Odontol Scan 28: 691-699, 1970.
- 25.- Schwartz, J. y Dibblee, M.: The Role of IgE in The Re  
lease of Histamine from Human Gingival Mast Cells, J.  
Periodontal 46: 171-177, 1975.
- 26.- Sullivan, T.J., Parker, K.L., Stenson, W., Parker, Ch.  
W.: Modulation of Cyclic AMP in Purified rat Mast Cells.  
I Responses to Pharmacologic, Metabolic and Physical  
Stimuli. Immunology 114: 1473-1479, 1975.

- 27.- Sullivan, T.J., Parker, K.L., Eisen, S.A., Parker, Ch. W.: Modulation of Cyclic AMP in Purified rat Mast Cells. II Studies on the Relationship between Intracellular Cyclic AMP concentration and Histamine Release. Immunology 114: 1480-1485, 1975.
- 28.- Sulzmann, R.: Beitrage Zur Histologie der Zahnpulpa. II Licht-und Elektronen Mikroskopische Darstellung - Von Plasmazellen und Gewebemastzellen in Permanenten Monoradikularen Hundezahnen. Anat ans 19: 202-208 , - 1966.
- 29.- Tannebaum, S. Oertel, H., Henderson, W., Kellner, M. The Biologic Activity of Mast Cell Granules. Immunology 125: 325-334, 1980.
- 30.- Todaro, F.: Morfologia, Frequenza ed Ubicazione degli Elementi Granulosi Basofili del Connettivo nei Territori Dentari, Paradentari e Buccali dell' Uomo e dei Mammiferi, La Stomatologia Italiana. Vol I: 438-449 , 1939.
- 31.- Tolone, G., Bonasera, L. Tolone, C.: Biosynthesis -- and Release of Prostaglandins by Mast Cells. Br J Exp Path 59: 105-109, 1978.
- 32.- Wellington, E.A.: Métodos Histológicos para hueso.la. ed. El Manual Moderno, México 1976.



- 33.- Wislocki, G., Singer, H., y Waldo, Ch.: Some Histochemical Reactions of Mucopolysaccharides, Glycogen, Lipids and other Substances in Teeth. Anatomical Record 101: 487-514, 1948.
- 34.- Wislocki, G.B., Sognness, R.P.: Histochemical Reactions of Normal Teeth. Am J Anat 87: 239-276, 1950.
- 35.- Weissman, G. editor: Mediators of Inflammation. Plenum Press. New York 1974.
- 36.- Zachrisson, B.V. y Skogedal, O.: Mast Cells in Inflamed Human Dental Pulp. Scand J Dent Res 79: 488-492, 1971.