



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FACTORES DE  
CRECIMIENTO ENCAPSULADOS EN UN SISTEMA DE  
LIBERACIÓN PROLONGADA SOBRE LA EXPRESIÓN DE  
DSP Y DPP EN CÉLULAS PULPARES DE RATA.**

Trabajo de tesis que como requisito parcial para optar al  
grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta el

M.C. Ricardo Oliva Rodríguez

CO-TUTORAS:

Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña U.A.A.

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera U.A.A.

ASESOR:

Dr. Héctor Eduardo Flores Reyes U.A.S.L.P.

AGUASCALIENTES, AGS., NOVIEMBRE, 2011



Centro de Ciencias Básicas

M. en C. RICARDO OLIVA RODRÍGUEZ  
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Oliva:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FACTORES DE CRECIMIENTO ENCAPSULADOS EN UN SISTEMA DE LIBERACIÓN PROLONGADA SOBRE LA EXPRESIÓN DE DSP y DPP EN CÉLULAS PULPARES DE RATA”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E  
Aguascalientes, Ags., 12 de octubre de 2011  
“SE LUMEN PROFERRE”  
LA DECANO

  
M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ  


c.c.p.- Archivo  
MCGD,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

M. en C. Martha Cristina González Díaz

Decana del Centro de Ciencias Básicas

Presente.

Por medio de este conducto hacemos constar que el M. en C. Ricardo Oliva Rodríguez ha cumplido con todos los requisitos de escritura y revisión de tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencia Biológicas con la tesis: **Evaluación del efecto de factores de crecimiento encapsulados en un sistema de liberación prolongada sobre la expresión de DSP y DPP en células pulpares de rata.**

Después de revisar y corregir su escrito hacemos constar que el M. en C. Ricardo Oliva Rodríguez, incorporó todas las recomendaciones realizadas por el comité tutorial y brindamos nuestro voto aprobatorio para que proceda a los trámites correspondientes para la impresión de tesis y la obtención de grado.

ATENTAMENTE

“SE LUMEN PROFERRE”

Aguascalientes, Ags., 5 de octubre de 2011.

Vo.Bo. Ma. Consolación Martínez Saldaña  
Co-Tutora de Tesis  
Vo.Bo. Alma Lilián Guerrero Barrera  
Co-Tutora de Tesis  
VoBo. Dr. Héctor E. Flores Reyes  
Asesor de Tesis

Three handwritten signatures are present, each written over a horizontal line. The top signature is the most prominent and appears to be 'MCS'. The middle signature is smaller and less legible. The bottom signature is also smaller and less legible.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera por su apoyo, enseñanzas, paciencia y por mostrarme como debe guiarse a un estudiante de doctorado con integridad absoluta.

A la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña por permitirme avanzar en este proceso haciéndome sentir en todo momento su apoyo irrestricto y la enorme calidad humana que la caracteriza.

Al Dr. Héctor Flores Reyes y al Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén por su apoyo y amistad.

Al Dr. Francisco Gutiérrez Cantú y al Dr. Jairo Mariel Cárdenas por brindarme su apoyo desinteresadamente a lo largo de estos años.

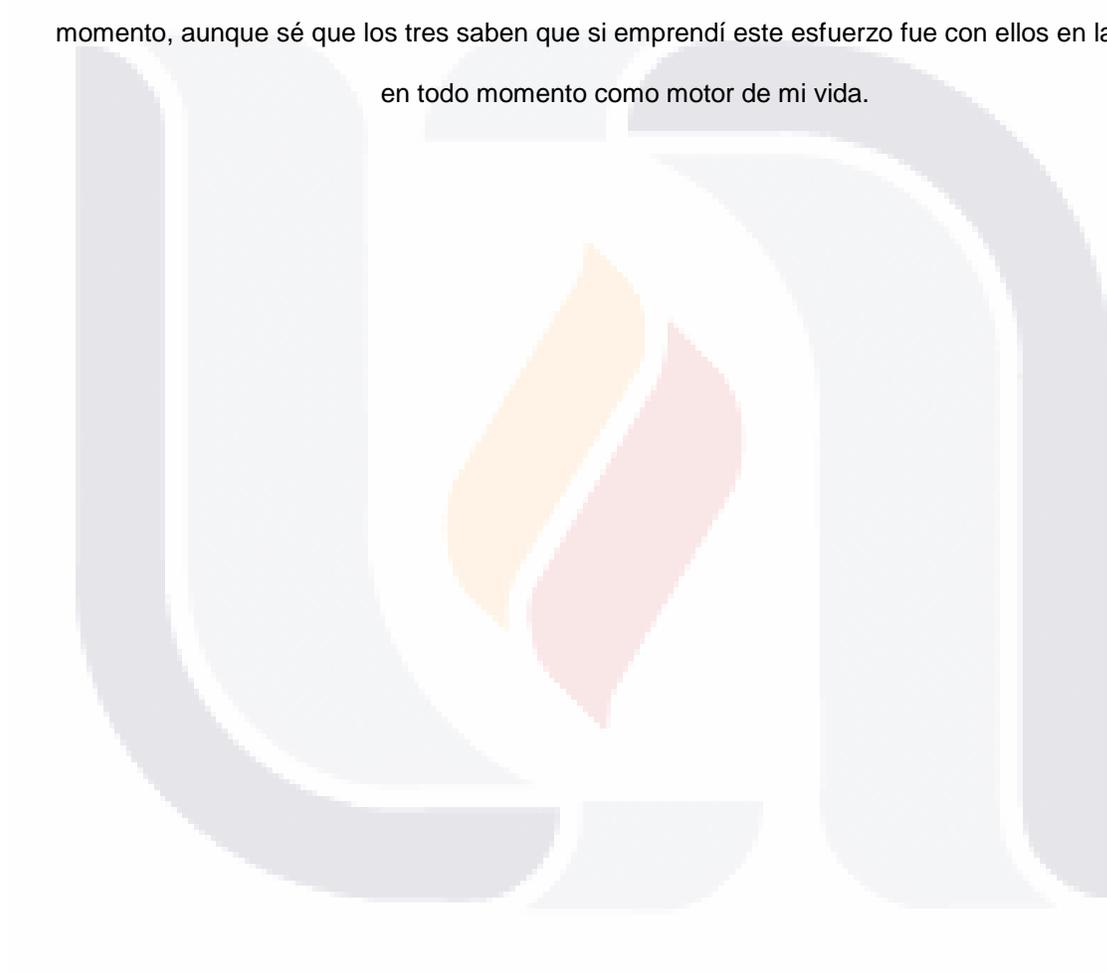
Al Dr. Javier Avelar por los sábados y días festivos que dejó de lado por ayudarnos; al Dr. Francisco Jaramillo por sus enseñanzas; a los M.E. Bernardino Cerda Cristerna, Isabel Martín Pérez, la Bióloga Keila N. Alvarado Estrada, la A.Q.B. Laura Nayeli Palacios Arenas, el Dr. Juan de la Cruz Rodríguez y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a que este trabajo pudiera realizarse.

A la U.A.S.L.P. representada por el Sr. Rector Lic. Mario García Valdez, por su apoyo financiero a través de PROMEP.

Al Dr. Mario Arévalo Mendoza, ex Director de la Facultad de Estomatología así como al Dr. Luis Armando Leal Tobías actual director de la Facultad de quienes recibí apoyo absoluto para poder cumplir el objetivo de convertirme en Doctor en Ciencias Biológicas.

## DEDICATORIA

A mi esposa Tere y a mis hijos Ricardo y Ana Sofía por compartir conmigo este esfuerzo, por soportar mis constantes ausencias y tolerar el estrés acumulado, además de las privaciones de todo tipo, materiales, de convivencia y de calidad de la misma a las que los orillé en algún momento, aunque sé que los tres saben que si emprendí este esfuerzo fue con ellos en la mente en todo momento como motor de mi vida.



## RESUMEN

La pulpa dental puede exponerse debido a factores como la caries, los traumatismos dentales o las manipulaciones llevadas a cabo por el odontólogo; la exposición pulpar se trata con un procedimiento conocido como recubrimiento pulpar directo en el que se pone en contacto íntimo con la herida pulpar alguno de una serie de materiales que van desde el hidróxido de calcio hasta sistemas adhesivos mostrando respuestas reparativas variadas.

La regeneración pulpar puede ser optimizada si se proporcionan factores de crecimiento tales como la proteína osteogénica 1 (OP-1; por su nombre en inglés "Osteogenic Protein") también conocida como BMP-7 (del inglés: "Bone Morphogenetic Protein-7") de forma aislada o asociada a otros morfógenos tales como el factor de crecimiento transformante beta uno: TGF- $\beta$ 1 (del inglés: "Transforming Growth Factor -  $\beta$ 1"). Sin embargo, el uso de estos factores debe de garantizar su liberación gradual y activa durante todo el período de regeneración. Por lo anterior, el presente trabajo propone la elaboración de un sistema de liberación controlada de OP-1 y TGF-B1 a base de micropartículas de alginato de sodio como material de recubrimiento pulpar directo con el fin de proveer un reservorio finito de biomoléculas que puedan liberarse de manera controlada tanto espacial como temporalmente en contacto con el tejido pulpar expuesto en molares de rata. Para seguir el proceso de regeneración pulpar inducido por este biopolímero se emplearon como marcadores de la actividad de odontoblastos o células parecidas a odontoblastos la fosfoproteína de dentina, (DPP; por su nombre en inglés, "Dentin Phosphoprotein") y la sialoproteína de dentina, (DSP; por su nombre en inglés, "Dentin Sialoprotein"), valorando su expresión temporal y espacial en la estructura del tejido reparador mediante la técnica inmunohistoquímica y la técnica de hibridación in situ. Además, se llevó a cabo la técnica histoquímica y en base a ella se realizó una valoración de la calidad del tejido formado analizando su morfología a través de microscopía óptica.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Odontogénesis.....	1
1.2 Complejo pulpo-dentinario.....	8
1.2.1 Zona odontoblástica.....	8
1.2.2 Zona subodontoblástica.....	8
1.2.3 Zona rica en células o de Höhl.....	9
1.2.4.Zona central.....	9
1.2.5 Células de la pulpa.....	10
1.2.5.1 Odontoblasto.....	10
1.2.5.2 Prolongaciones odontoblásticas.....	10
1.2.5.3 Fibroblastos.....	10
1.2.5.4. Células mesenquimáticas indiferenciadas.....	11
1.2.5.5 Otras células.....	11
1.3 Matriz extracelular.....	11
1.3.1 Fibras de la pulpa.....	13
1.3.1.1 Fibras colágenas.....	13
1.3.1.2 Fibras elásticas.....	13
1.3.2 Sustancia fundamental amorfa.....	13
1.4 Dentinogénesis.....	14
1.4.1 Estructura general de la dentina.....	16
1.4.1.1 Dentinogénesis primaria.....	18
1.4.1.2 Dentinogénesis secundaria.....	18
1.4.1.3 Dentinogénesis terciaria.....	18
1.5 Daño pulpar.....	19
1.5.1 Caries dental.....	20
1.5.2 Fracturas dentales.....	21
1.5.3 Tractos anómalos.....	21
1.5.4 Procedimientos restauradores.....	21
1.6 Proceso reparativo pulpar.....	22
1.6.1. Recubrimiento pulpar directo.....	24
1.7 Técnicas convencionales de RPD.....	25
1.7.1 Hidróxido de calcio.....	25
1.7.2 Materiales adhesivos.....	27
1.8 Técnicas experimentales.....	28
1.8.1 Terapia con factores de crecimiento.....	28

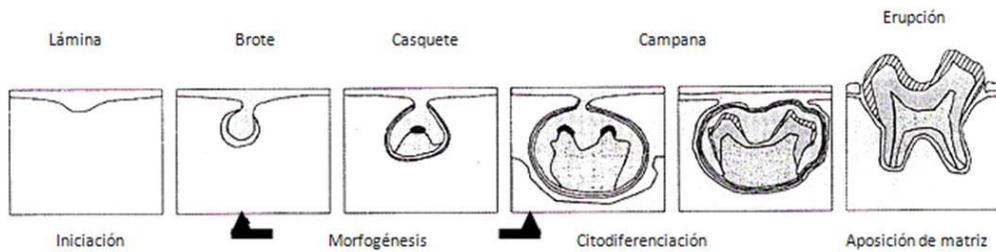
1.8.1.1 Proteína osteogénica uno (OP-1).....	29
1.8.1.2 Factor de crecimiento transformante uno (TGF-β1).....	30
1.9 Polímeros biodegradables.....	31
1.9.1 Microencapsulación.....	33
1.9.2 Alginato de sodio.....	33
2. JUSTIFICACIÓN.....	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVOS.....	35
6. METODOLOGÍA.....	36
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
7.1 Diseño del sistema polimérico biodegradable.....	37
7.1.1 Caracterización del sistema polimérico.....	38
7.1.2 Validación del método de detección por HPLC-UV.....	38
7.1.3 Prueba de liberación.....	39
7.2 Recubrimiento pulpar directo.....	39
7.3 Obtención y preparación de muestras para técnicas Histológica e Inmunohistoquímica.....	41
7.4 Técnica Histológica.....	41
7.5 Técnica inmunohistoquímica.....	42
7.5.1 Extracción y purificación de DSP.....	42
7.5.2 Preparación de anticuerpos específicos anti-DSP.....	42
7.5.3 Desarrollo de la técnica Inmunohistoquímica.....	43
7.6 Hibridación In Situ para Fosfoproteína de Dentina (DPP).....	44
7.6.1 Preparación de oligonucleótidos.....	44
7.6.2 Desarrollo de la técnica de Hibridación In Situ para DPP.....	44
8. RESULTADOS.....	45
8.1 Diseño y caracterización del sistema polimérico biodegradable.....	45
8.1.1 Validación del método de detección por HPLC-UV.....	46
8.1.2 Caracterización de la prueba de liberación.....	49
8.2 Técnica Histológica.....	50
8.2.1 Resultados del análisis histológico.....	51
8.3 Técnica Inmunohistoquímica.....	57
8.3.1 Extracción y purificación de DSP y elaboración de anticuerpos específicos.....	57
8.3.2 Técnica inmunohistoquímica. Resultados del análisis.....	58
8.4 Hibridación In Situ para DPP.....	63
9. DISCUSIÓN.....	68
9.1 Diseño y caracterización de los biopolímeros.....	68

9.2 Prueba de liberación de los morfógenos.....	69
9.3 Extracción y purificación de DSP y preparación de anticuerpos.....	72
9.4 Expresión de DSP y DPP.....	73
10. CONCLUSIONES.....	76
11. ANEXO.....	77
12. GLOSARIO.....	87
13. BIBLIOGRAFÍA.....	88



# 1. INTRODUCCIÓN

Los principios que guían el desarrollo del diente son compartidos por órganos tan diversos como el riñón, corazón, glándulas mamarias y los folículos pilosos, entre otros. Aunque los dientes son órganos encontrados solo en vertebrados, su desarrollo involucra vías genéticas presentes en invertebrados que muestran la existencia de una “caja de herramientas moleculares” para la organogénesis, conservada a través de la evolución en la cual ciertas moléculas reguladoras maestras juegan un rol crítico para todas las interacciones tisulares durante el desarrollo (Thesleff y cols. 1995). El desarrollo del diente humano, conocido como odontogénesis involucra una serie de procesos biológicos complejos y fundamentales, que incluyen eventos secuenciales de iniciación, morfogénesis, citodiferenciación y aposición de matriz (Hargreaves, 2002), como se resume en la Fig.1.

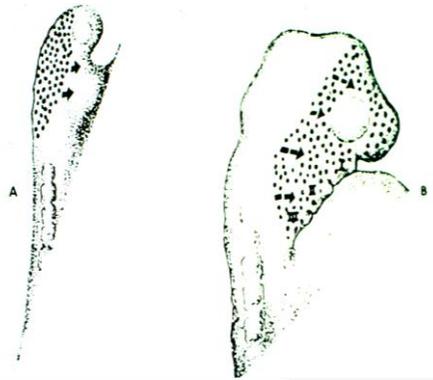


**Fig. 1 Etapas del desarrollo dental (Tomado de Hargreaves K.M.; Goodis H.E; (2002), Seltzer and Bender’s Dental Pulp; Quintessence; 2002).**

## 1.1 Odontogénesis

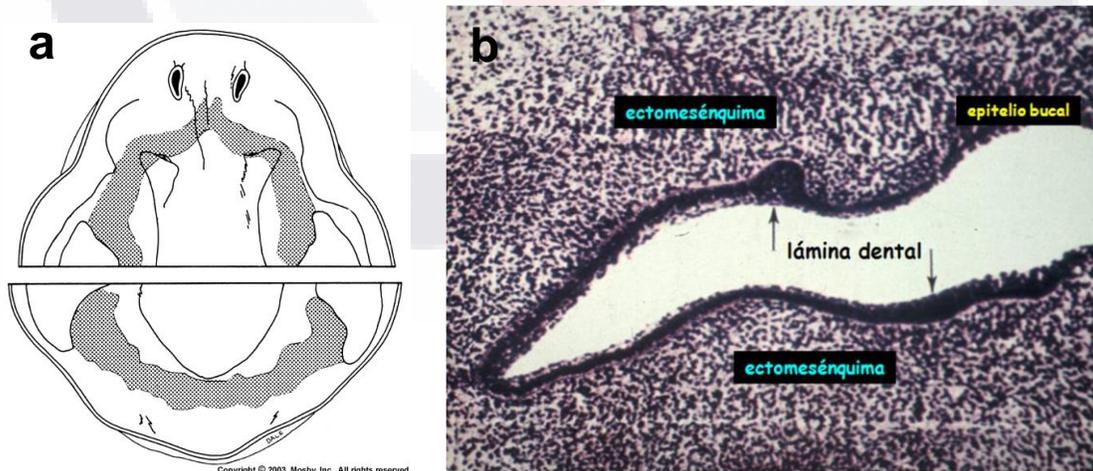
La odontogénesis comienza durante la quinta semana de desarrollo embrionario. La inician las células ectomesenquimatosas derivadas del neuroectodermo de la cresta neural craneal (Garant, 2003). Las células laterales de la cresta neural son inducidas por el ectodermo no neural, probablemente mediante las proteínas morfogénicas óseas 4 y 7 (BMP-4 y BMP-7). Como resultado de esta inducción, las células expresan genes y se desprenden de la capa epitelial para migrar como células pluripotenciales con fenotipo mesenquimatoso. Las células ectomesenquimatosas, migran en oleadas específicas a los procesos maxilar y mandibular de la

cara en desarrollo, donde inician una interacción con las células propias de los tejidos del estomodeo o boca primitiva (Fig. 2).



**Fig. 2 Ilustración esquemática de la migración de las células ectomesenquimatosas. Las flechas indican el sentido de la migración. (Tomado de Ten Cate A.R. Histología Oral, CV Mosby, 2ª Ed.)**

La cavidad oral primitiva del embrión esta revestida por el ectodermo, en forma de epitelio escamoso estratificado, separado del mesénquima por una membrana basal. La formación del órgano dentario inicia entre la quinta y sexta semana del desarrollo prenatal, con la aparición de una banda epitelial engrosada a lo largo de los futuros rebordes alveolares (Fig. 3a) y una condensación de células ectomesenquimatosas por debajo de la banda epitelial (Fig.3b).



**Fig. 3. Localización e histología de la lámina dental. a) Lámina dental (zona sombreada). b) Epitelio engrosado de lámina dental señalado con la flecha. (Tinción H y E). (Tomado de Ten Cate A.R. Histología Oral, CV Mosby, 2ª Ed.)**

A continuación, el epitelio prolifera e invade el tejido mesenquimatoso. Todo ello conduce a la formación de una lámina epitelial en forma de herradura en cada uno de los maxilares en desarrollo denominada banda epitelial primaria. El borde de esta banda se divide en dos procesos, el más externo forma la lámina vestibular, donde se desarrollará el surco vestibular. El proceso interno se denomina lámina dentaria y constituye el primordio de la porción ectodérmica del diente, separada del tejido ectomesenquimatoso tan solo por una membrana basal (Fig. 4).



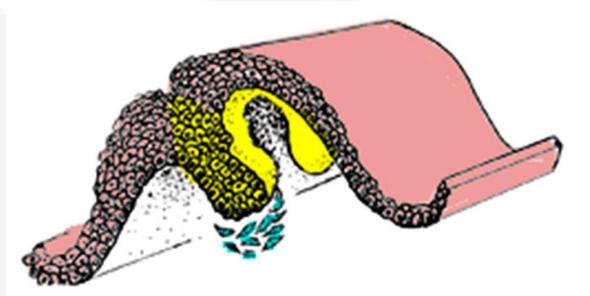
**Fig. 4. Localización de la lámina vestibular y la lámina dental.**  
<http://www.usal.es/~histologia/aplicacion/espanol/practica/odontolo/odontolo.htm>

Las interacciones recíprocas entre epitelio y mesénquima, conducen a la morfogénesis del diente y participan en la inducción de las denticiones primaria y secundaria (Linde y Goldberg, 1993)

Los sucesos reguladores que actúan durante los acontecimientos temporales relacionados con el desarrollo del diente, son idénticos a los que tienen lugar en otros sistemas ectodérmicos (por ejemplo, morfogénesis de las glándulas salivales). Además de inducir la morfogénesis del diente, las interacciones entre epitelio y mesénquima desempeñan un papel en la dirección de la morfogénesis dental específica (número de raíces, anatomía de la corona, etcétera) así como en la determinación de la estructura final de la unión dentogingival.

En la actualidad, se sabe que la mayor parte de las interacciones entre epitelio y mesénquima, incluyendo las que ocurren durante el desarrollo del diente muestran reciprocidad, y por esta razón suelen definirse como interacciones tisulares que ocasionan la diferenciación de una de las poblaciones celulares incluidas, o de ambas. La señalización es recíproca; entendiendo que un intercambio de información ocurre en ambas direcciones desde el epitelio dentario al mesénquima y desde el mesénquima al epitelio dentario, aunque dicho intercambio de información permite poner en perspectiva la presencia de la membrana basal como un importante elemento en el intercambio de moléculas señal y factores de crecimiento y diferenciación.

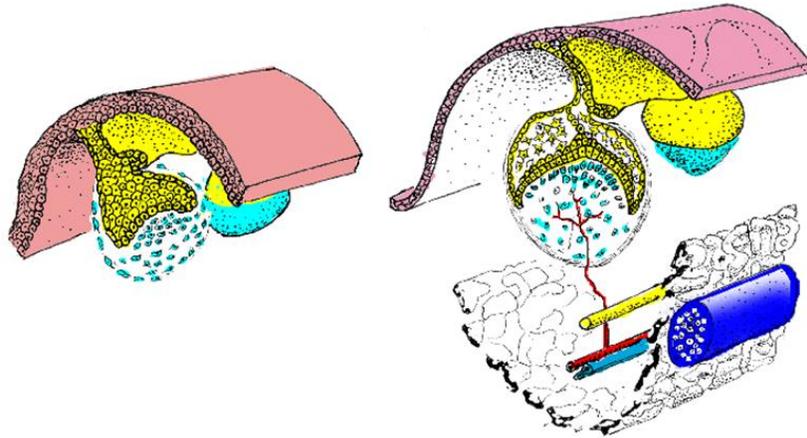
El proceso de formación de la lámina dental inicia en la región distal y se continúa en la línea media. En embriones humanos de 15 a 20 mm, la lámina dental muestra signos de crecimiento diferencial adicional, reflejando la determinación de dominios para los dientes incisivos, caninos y molares. Así, el crecimiento continúa en sitios específicos de la lámina dental, junto con la condensación del ectomesénquima y da origen a los brotes dentales individuales que representan la segunda etapa del desarrollo dental; la etapa de brote. Se forman diez brotes por arcada, representando los futuros dientes deciduos (Fig. 5).



**Fig. 5. Etapa de brote dental.**

<http://www.usal.es/~histologia/aplicacion/espanol/practica/odontolo/odontolo.htm>

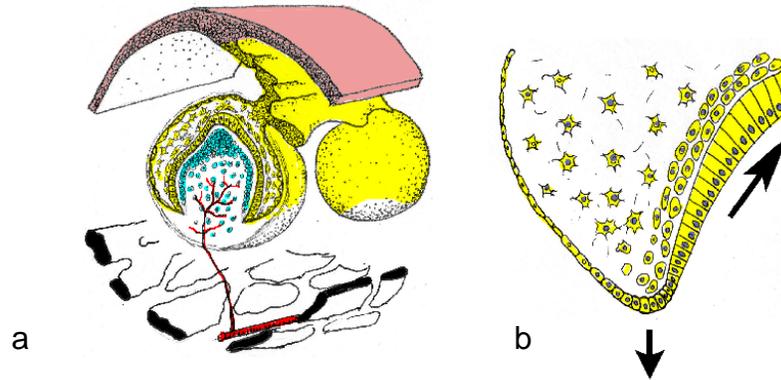
Mientras el epitelio prolifera invaginándose hacia el ectomesénquima subyacente, hay un incremento en la actividad proliferativa dentro de las células del ectomesénquima, generando una densidad celular inmediatamente adyacente a la invaginación epitelial. En esta fase, conocida como etapa de casquete, es posible identificar todos los elementos que formarán al diente y a sus tejidos de soporte. La invaginación epitelial, cubre a manera de casquete una esfera de ectomesénquima condensado. El casquete, da origen al órgano del esmalte, estructura que tiene a cargo la formación del esmalte dental. La agrupación de células ectomesenquimatosas condensadas se denomina papila dental. A partir de las células de la papila, se formará la dentina y la pulpa; el ectomesénquima condensado que limita a la papila y encapsula el órgano del esmalte se conoce como folículo dental y este formará a los tejidos de soporte del diente. Los tres elementos que se observan en esta etapa: órgano del esmalte, papila y folículo dental, integran el germen dental (Fig. 6).



**Fig. 6. Germen dental en etapa de casquete.**

<http://www.usal.es/~histologia/aplicacion/espanol/practica/odontolo/odontolo.htm>

El crecimiento continuo del germen dental conduce a la siguiente fase del desarrollo, conocida como etapa de campana temprana, que debe su nombre a una profundización de la superficie interna del casquete epitelial (fig. 7a). En esta etapa, se consolidan los cambios importantes que iniciaron en la etapa de casquete en la histología del órgano del esmalte. Las células en el centro del órgano del esmalte, sintetizan y secretan mucopolisacáridos ácidos hacia el compartimiento extracelular, estos compuestos hidrofílicos atraen líquido ocasionando que las células en su interior se separen y adquieran prolongaciones citoplásmicas, formando un cito-retículo conocido como retículo estrellado (Baume, 1980). Al mismo tiempo, las células en la periferia del órgano del esmalte adquieren forma cuboidal y forman el epitelio dentario externo, mientras que las células adyacentes a la papila dental forman una capa de células cilíndricas bajas denominada epitelio dentario interno. Entre el epitelio interno y el retículo estrellado, las células epiteliales se diferencian en una capa de células planas originando lo que se conoce como estrato intermedio. Aunque las células de esta capa son histológica e histoquímicamente distintas de las células del epitelio dentario interno, se les considera como una unidad funcional responsable de la formación de esmalte (Jontell y cols. 1987), (Fig. 7b).



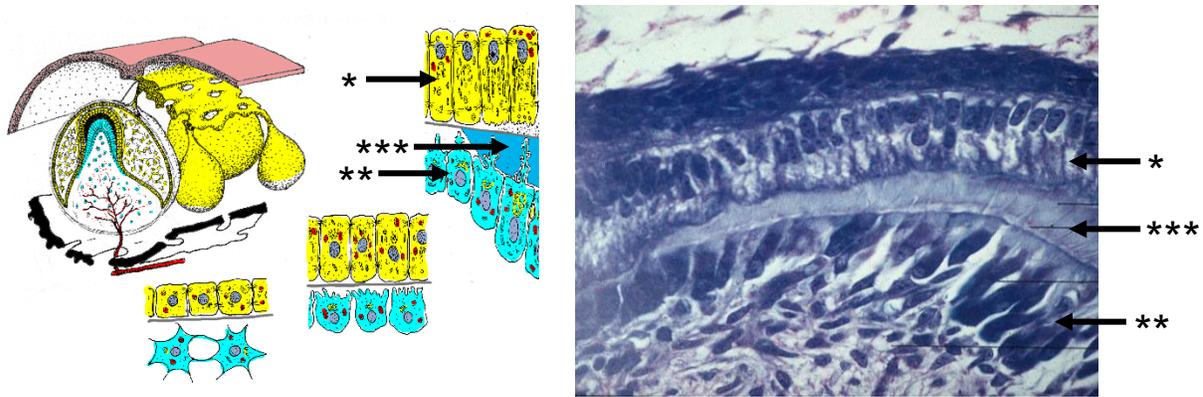
**Fig. 7. Germen dental. a) Germen en etapa de campana temprana, b) elementos histológicos del germen en etapa de campana temprana.**

<http://www.usal.es/~histologia/aplicacion/espanol/practica/odontolo/odontolo.htm>

En la región terminal del órgano del esmalte, los epitelios dentarios interno y externo se unen para formar el asa cervical (Baume, 1980).

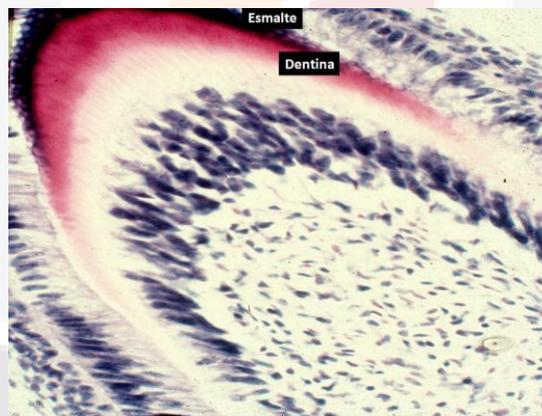
Cada grupo específico de células del órgano del esmalte asume funciones especiales. La interacción molecular entre el órgano del esmalte y la papila dental, induce los eventos que conducen a la diferenciación celular en la etapa de campana tardía. En esta etapa, la lámina dental que conecta al órgano dentario con el epitelio oral se desintegra gradualmente. Las células del epitelio interno a nivel de las futuras cúspides dejan de dividirse y toman una forma columnar. Las células más periféricas de la papila dental se alargan y se organizan a lo largo de la membrana basal en la interfase epitelio-mesénquima para dar origen a los odontoblastos, células responsables de la síntesis y secreción de matriz.

Una vez que los odontoblastos depositan la primera capa de matriz de predentina, las células del epitelio dentario interno reciben la señal para diferenciarse en ameloblastos, células productoras de esmalte (Fig. 8).



**Fig. 8. Diferenciación de ameloblastos y odontoblastos. Diferenciación de ameloblastos (\*), diferenciación de odontoblastos (\*\*) y primer depósito de matriz dentinaria (\*\*\*).**  
<http://www.usal.es/~histologia/aplicacion/espanol/practica/odontolo/odontolo.htm>  
 (Ten Cate A.R. Histología Oral, Color Image Collection)

Durante la síntesis del esmalte, los ameloblastos migran hacia la superficie externa de la corona y al concluir su formación, desaparecen por apoptosis, mientras que los odontoblastos, tapizan la superficie interna de la dentina y permanecen metabólicamente activos a través de la vida del diente (Fig. 9).



**Fig. 9. Aposición de esmalte y dentina en germen en etapa de campana tardía.**  
 (Ten Cate A.R. Histología Oral, Color Image Collection)

En resumen, el desarrollo del órgano dentario desde la etapa de lámina hasta la de campana tardía culmina en la formación de la corona del diente, mientras que las células epiteliales del asa cervical, proliferan apicalmente e inducen la diferenciación de odontoblastos a partir de la papila, así como de cementoblastos a partir del mesénquima del folículo, permitiendo el depósito de

dentina y cemento dando lugar a la formación de la raíz. Por último la fase final de la odontogénesis se cierra con el proceso de erupción (Hargreaves, 2002).

## **1.2 Complejo pulpo-dentinario**

La pulpa dental es un tejido conectivo laxo especializado, situado dentro de la cavidad limitada por la dentina mineralizada. La pulpa dental comparte muchas propiedades con otros tejidos conectivos del cuerpo, pero su localización peculiar determina que presente características especiales. Es evidente que la composición bioquímica y la estructura de la pulpa y la dentina son diferentes. Sin embargo, los dos tejidos coexisten en una íntima relación embriológica y funcional, razón por la cual la dentina y la pulpa son usualmente consideradas como un complejo funcional indisoluble, llamado complejo pulpo-dentinario (Linde y Goldberg, 1993).

Estructuralmente la pulpa está conformada por: células y matriz extracelular, que incluye fibras y sustancia fundamental amorfa. En humanos y otros mamíferos, estos componentes están organizados en cuatro zonas histológicas claramente demarcadas, las cuales se describen a continuación:

### **1.2.1 Zona odontoblástica.**

Forma el estrato celular más externo de la pulpa, se ubica inmediatamente por debajo de la pre-dentina. Como las prolongaciones odontoblásticas están incluidas en los túbulos dentinarios, la capa odontoblástica se compone sobre todo por los cuerpos celulares de los odontoblastos. Entre los odontoblastos se hallan capilares y fibras nerviosas. Los odontoblastos forman una capa simple de células cuya morfología varía en las distintas regiones de la pulpa, células cilíndricas altas en la porción coronaria, cúbicas en la porción radicular media y plana cerca del foramen apical. En esta zona, se han identificado células dendríticas que expresan antígenos del complejo principal de histocompatibilidad clase II (Jontell y cols. 1987).

### **1.2.2 Zona subodontoblástica.**

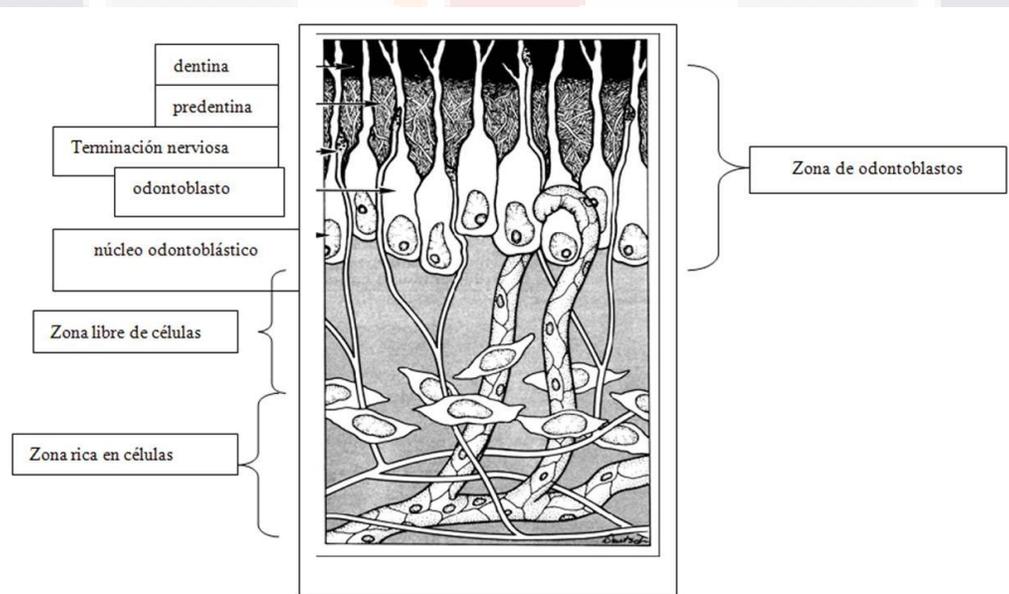
Es conocida como zona basal de Weil o "libre de células". Por debajo de la capa odontoblástica de la pulpa coronaria se encuentra una capa delgada de 40  $\mu\text{m}$  de ancho, relativamente pobre en células. Este estrato es atravesado por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos.

### 1.2.3 Zona rica en células o de Höhl.

Subyacente a la zona de Weil, se ubica un estrato que contiene una proporción elevada de fibroblastos si se compara con la región central de la pulpa. Es mucho más evidente en la pulpa coronaria que en la radicular. Aparte de fibroblastos, la zona rica en células puede contener una variada cantidad de macrófagos y linfocitos (Baume, 1980). Evidencia obtenida en molares de rata (Gotjamanos, 1970), sugiere que la zona rica en células se forma como resultado de la migración de células de la parte central de la pulpa hacia la periferia. La división celular dentro de esta zona es rara en la pulpa normal, la muerte de los odontoblastos produce aumento de la actividad mitótica debido a que los odontoblastos dañados de forma irreversible, son reemplazados por células que migran desde la zona de Weil hacia la capa odontoblástica. Probablemente esta actividad mitótica es el primer paso en la regeneración de la capa odontoblástica.

### 1.2.4 Zona central.

Constituye el tejido pulpar propiamente dicho y se denomina estroma pulpar. Contiene los vasos sanguíneos de mayor calibre y nervios. Las células del tejido conectivo de esta zona son fibroblastos o células pulpares. En la fig. 10 se esquematizan las distintas zonas antes mencionadas.



**Fig.10 Diagrama de la pulpa periférica y sus principales elementos (Tomado de Ingle J.I.; Bakland L.K. Endodontics; 5th Edition B.C. Decker; London 2002).**

## **1.2.5 Células de la pulpa**

### **1.2.5.1 Odontoblasto.**

Son los responsables de la dentinogénesis, tanto en el diente en desarrollo como en el diente maduro, esta es la célula característica del complejo pulpodentinario. Morfológicamente se caracteriza por presentar largas prolongaciones citoplásmicas del cuerpo celular orientadas hacia la dentina.

El odontoblasto secreta una matriz extracelular compuesta por fibras colágenas y proteoglicanos capaz de mineralizarse. Ultraestructuralmente muestra un amplio desarrollo del retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, gránulos de secreción y numerosas mitocondrias; El núcleo contiene uno o más nucléolos prominentes característicos de las células secretoras de proteínas (Cohen y Burns, 2000). Aparentemente, el odontoblasto sintetiza solo colágena tipo I y un trímero tipo I con tres cadenas  $\alpha$  que es considerado como poco común (Linde, 1973).

### **1.2.5.2 Prolongaciones odontoblásticas**

El citoplasma de la prolongación o proceso odontoblástico carece de los principales organelos que se encuentran en el cuerpo celular. En el odontoblasto normal, presenta microtúbulos y microfilamentos, pocas mitocondrias y ribosomas citosólicos. Cuando la formación de matriz peritubular ocurre, organelos como retículo endoplásmico y las mitocondrias pueden encontrarse en la prolongación odontoblástica (Garant, 2003).

La extensión del proceso odontoblástico ha sido un tema sujeto a controversia durante un buen tiempo. Evidencia experimental obtenida en dientes normales de adultos jóvenes, sugieren que el proceso odontoblástico se extiende solo un tercio de la distancia entre la predentina y el esmalte (Byers y Sugaya, 1995).

### **1.2.5.3 Fibroblastos.**

Se distribuyen por toda la pulpa, y son particularmente abundantes en la zona rica en células. Estas células secretan macromoléculas de la sustancia fundamental y colágena para la formación y renovación de fibras.

#### **1.2.5.4 Células mesenquimáticas indiferenciadas**

La capacidad de regeneración del tejido de la pulpa y la dentina, se basa en el hecho de que la pulpa contiene una población relativamente grande de células ectomesenquimatosas indiferenciadas. Estas células son numerosas en la zona rica en células y en el estroma pulpar. Aunque en ambos casos, aparentemente su número no sobrepasa al de los fibroblastos.

Las células ectomesenquimatosas como ya se describió, derivan de la cresta neural craneal, que emigraron hacia la papila dental en formación durante la odontogénesis (Tziafas y cols. 2000) (Mitsiadis y cols. 2003).

La estructura de estas células corresponde a la de una célula poco diferenciada. La gran población de células indiferenciadas en la pulpa es señal de la capacidad de reparación del tejido maduro. Cuando se requiere y bajo los estímulos adecuados, estas células pueden experimentar diferenciación terminal para convertirse en células parecidas a odontoblasto y sustituir a las células formadoras de dentina que se pierden debido a diversas causas.

#### **1.2.5.5 Otras células.**

Otras células de importancia clínica en la pulpa dental son los macrófagos. Están presentes en la pulpa normal y su número aumenta en asociación con el daño tisular. Con el uso de técnicas inmunohistoquímicas se han identificado en la pulpa dental, células presentadoras de antígeno del tipo de las células dendríticas (Jontell y cols. 1998). Estas células dendríticas activan a los linfocitos T mediante la presentación de antígenos y la secreción de factores solubles como interleucina-1 y otras citocinas (Trowbridge, 1990). En el tejido pulpar normal, ocasionalmente pueden ser localizados algunos leucocitos polimorfonucleares. Durante la inflamación del tejido pulpar, suelen observarse abundantes células cebadas.

### **1.3 Matriz extracelular**

Los fibroblastos pulpares producen una matriz extracelular compleja, que es sustancialmente diferente de la dentinaria y la de otros tejidos conectivos blandos. La matriz extracelular está conformada por componentes fibrilares rodeados de una matriz fundamental amorfa. La naturaleza química del componente fibrilar son proteínas, mientras que la composición de la matriz

fundamental amorfa incluye diversos tipos de glicoproteínas y mucopolisacáridos ácidos denominados glucosaminoglucanos (Tabla 1).

<b>COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR DE PULPA</b>		Tomado de Goldberg M.; Smith A.J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering, <i>Crit. Rev. Oral Biol. Med.</i> 15:1; 13-27; 2004.
<b>TABLA 1</b>		
<b>COLÁGENAS</b>		
	Tipo I	56 %
	Tipo III	41 %
	Tipo V	2 %
	Tipo VI	0.5 %
<b>PROTEÍNAS NO COLÁGENAS</b>		
<b>Proteínas de matriz fosforiladas (SIBLING's)*</b> * del inglés: <b>Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoproteins</b>		
DSPP	del inglés: Dentin Sialo Phosphoprotein	Ausente
DSP	del inglés: Dentin Sialo Protein	Presente (en baja cantidad)
DPP	del inglés: Dentin Phosphoprotein	Presente (en baja cantidad)
DMP-1	del inglés: Dentin Matrix Protein-1	Ausente
BSP	del inglés Bone Sialo Protein	Presente
OPN	Osteopontina	Presente
MEPE	del inglés: Matrix Extracellular Phosphorylated protein	Ausente
<b>Proteínas de matriz no fosforiladas:</b>		
	Fibronectina	Presente
	Osteonectina	En gérmenes dentales
	Proteoglicanos (PGs)	Versican
	condroitin sulfato -4 y -6	60 %
	dermatan sulfato	34 %
	Queratan sulfato	2 %
	Ácido hialurónico	
<b>Factores de crecimiento</b>		
BMPs	Del inglés Bone Morphogenetic Protein	Presentes
	Receptores tipo IA y II para Factor de Crecimiento Transformante $\beta$ , Activina y BMPs	Presentes
<b>Mineral Metaloproteínasas</b>		
	MMP-1	Colagenasa
	MMP-2 y 9	Gelatinasas
	MMP-3	Estromelisin-1
	TIMPs	Presentes
<b>Proteínas derivadas de suero:</b>		
	Fibronectina	Presente
<b>Fosfolípidos</b>		
	Fosfolípidos de membrana	Presentes
	Fosfolípidos de matriz extracelular	Presentes

En la pulpa, los espacios intercelulares grandes contienen fibras colágenas de tipo I y III (56 y 41%, respectivamente), en contraste con la colágena tipo I predominante en la dentina. Las de tipo V y VI se encuentran también pero en menores cantidades.

### **1.3.1 Fibras de la pulpa.**

Hay en la pulpa dos tipos de proteínas estructurales que se organizan en fibras: colágena y elastina. Sin embargo, las fibras de elastina están confinadas a las paredes de las arteriolas y no forman parte de la matriz intercelular.

#### **1.3.1.1 Fibras Colágenas**

La colágena es la proteína principal de la pulpa. De las moléculas de colágena presentes, los tipos I y III son los más abundantes. (Magloire y Joffre, 1982). La colágena tipo I es predominante y puede contribuir al establecimiento de la arquitectura de la pulpa. Forma las fibras colágenas del tejido conectivo que están distribuidas en cantidad y densidad variables a través del tejido conectivo pulpar. La pulpa presenta una proporción alta de colágena tipo III, que forma la estructura de fibras reticulares.

Este tipo de colágena constituye 42.6% de la colágena total, lo que puede proveer a la pulpa cierto grado de elasticidad (Hillmann y Geurtsen, 1997).

Las fibras reticulares se distribuyen principalmente en las zonas de Weil y de Höhl. La síntesis de colágena en la pulpa se incrementa durante el proceso reparativo, Por ejemplo, en el proceso de formación de un puente dentinario, posterior a la aplicación de materiales de recubrimiento sobre la pulpa expuesta, se observa un incremento en la formación de colágena. Se ha postulado que la formación de colágena brinda soporte a los precursores de odontoblastos neoformados antes de la formación de la capa odontoblástica regular (Kitasako y cols. 2000).

#### **1.3.1.2 Fibras Elásticas**

En la estructura pulpar, las fibras elásticas forman parte de la pared de vasos sanguíneos grandes.

### **1.3.2 Sustancia fundamental amorfa**

Existen diferencias entre los componentes no colágenos de la matriz extracelular de la pulpa y la dentina. En la sustancia fundamental amorfa de la pulpa, la glicoproteína fibronectina es

abundante, los glicosaminoglicanos (GAG's): condroitín sulfato 4 y 6, dermatán sulfato, y el queratan sulfato están asociados con núcleos proteicos en forma de proteoglicanos (PG's). Otros tipos de PG's, son la decorina, el bi-glicano y el versicano. Los tipos de PG's en la pulpa, difieren sustancialmente de los que presenta la dentina. El ácido hialurónico, es un GAG que constituye el 2% de los encontrados en la matriz pulpar y su presencia aunada a los tipos de PG's determina el grado de viscosidad de la matriz intercelular amorfa en el tejido pulpar. También existen diferencias grandes en los lípidos encontrados en la pulpa y la dentina (Goldberg y Septier, 2002).

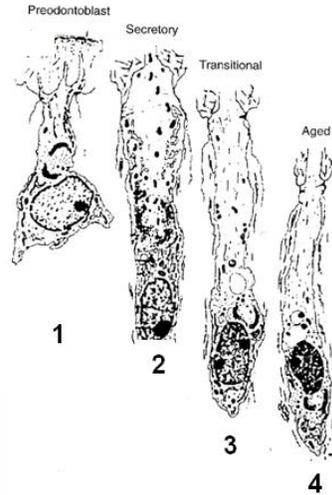
Para entender la actividad secretora de las células pulpares y su control, resulta primordial el conocer su origen embriológico y los factores de crecimiento y citocinas involucrados. Las células pulpares expresan las BMP's, y receptores tipo IA y II (Gu y cols. 1996).

La falta de mineralización del tejido pulpar, puede explicarse por la ausencia de moléculas específicas que han sido identificadas en la dentina. Estudios inmunohistoquímicos y de hibridación in situ, sugieren que proteínas tipo DSP, DPP, DMP-1, osteocalcina y osteonectina son expresadas por los odontoblastos y por lo tanto, no se presentan en el estroma pulpar. La osteonectina, que se encuentra ampliamente distribuida en la papila de los gérmenes dentarios, se encuentra solo en los odontoblastos, y no en la pulpa de dientes adultos. Las proteínas osteopontina y la BSP están presentes tanto en pulpa como en dentina. Las diferencias sustanciales en composición entre ambos tejidos, podrían explicar porqué la pulpa es incapaz de mineralizarse bajo condiciones fisiológicas.

#### **1.4 Dentinogénesis**

El odontoblasto se reconoce como una célula altamente diferenciada de forma columnar alta, con una estructura de célula secretora polarizada. Presenta un proceso citoplásmico único, que puede variar a lo largo de su ciclo vital tanto en tamaño como en contenido de organelos, para adaptar su actividad funcional (Couve, 1986).

El ciclo vital del odontoblasto abarca cuatro estadios ultra estructurales distintos: pre-odontoblasto, fase secretoria, fase transicional, y fase de envejecimiento, los cuales se ilustran en la figura 11.



**Fig.11. Ciclo vital del odontoblasto. 1. Preodontoblasto, 2. fase secretoria, 3. fase transicional y 4. fase de envejecimiento.**

El fenotipo del odontoblasto es definido por su morfología y por la secreción polarizada de un grupo específico de moléculas que conduce al depósito de una matriz mineralizable con una estructura tubular regular donde descansa la prolongación odontoblástica.

Existen dos niveles de secreción para el odontoblasto activo o en fase secretoria: A nivel proximal, secreta colágena y proteoglicanos para formar la predentina, y a nivel distal justo antes del frente de mineralización secreta los componentes no colágenos, incluyendo fosfoproteína, proteína con contenido de  $\gamma$ -carboxiglutamato y proteoglicanos (Linde, 1984). En el proceso de dentinogénesis, el manto dentinario es el componente de la dentina más externo que se forma, producto de la actividad de células subodontoblásticas que producen pequeños haces de fibras colágenas (fibras de von Korff), que mediante el depósito de vesículas de matriz, dan lugar a la formación de calcosferitos que al coalescer, precipitan y mineralizan la matriz extracelular asociándose a colágena y iones presentes.

El manto dentinario es ligeramente menos mineralizado que el resto de la dentina circumpulpar, tiene un espesor de alrededor de 150  $\mu\text{m}$  y representa aproximadamente el 4% de la dentina (Herr y cols. 1986).

### 1.4.1 Estructura general de la dentina

La dentina es un tejido mineralizado más duro que el hueso. Su formación requiere la presencia de células especializadas capaces de sintetizar y secretar una matriz extracelular orgánica (30%) capaz de servir como aceptor de iones minerales o que se depositan en forma de cristales de apatita (70%). También requiere un alto aporte vascular y de fosfatasa alcalina, para liberar los iones fosfato de los sustratos orgánicos. Los componentes moleculares de la matriz extracelular de la dentina y predentina, se muestran en la Tabla 2.

Las proteínas de tipo colágena, principalmente de tipo I son un componente estructural clave en la formación del tejido dentinario, y representan 90% de la matriz extracelular. Dentro de las proteínas no colágenas que representan el 10% de la matriz extracelular; se incluye a dos proteínas, originalmente clasificadas como específicas de dentina: la fosfoproteína de la dentina, DPP y la sialoproteína de la dentina, DSP (Goldberg y Smith, 2004).

Después de la colágena tipo I, la DPP es la más abundante de las proteínas de matriz y representa casi 50% de la matriz extracelular dentinaria. Es una macromolécula poli-iónica rica en fosfoserina y ácido aspártico con una alta afinidad por colágena tipo I y calcio, por lo cual se considera clave en la iniciación de la mineralización dentinaria aunque también se sabe que puede afectar la forma y tamaño de los cristales de apatita.

La DSP forma 5 a 8% de la matriz dentinaria y tiene una relativa concentración de ácido siálico y carbohidratos. Es una proteína que se asemeja a la osteopontina y a la sialoproteína de hueso.

Por mucho tiempo se creyó que DSP y DPP eran dos proteínas independientes codificadas por genes individuales; pero actualmente, la evidencia experimental indica que ambas proteínas son producto de la división de una proteína precursora mayor. Así, el gene que codifica para DPP y DSP se denomina gene de la sialofosfoproteína de dentina, DSPP (por su nombre en inglés: "Dentin Sialophosphoprotein").

La molécula codificada por DSPP, fue considerada una molécula expresada exclusivamente por odontoblastos y por lo tanto, un marcador fenotípico específico. Se acepta, que DSPP codifica una proteína que interviene en el depósito de cristales minerales entre las fibras colágenas en la matriz de la dentina. Actualmente, se sabe que la expresión de esta proteína no es exclusiva del

odontoblasto, sino que también la expresan los osteoblastos en una proporción de 1:400 (Mac Dougall y cols. 1997).

Tabla 2		COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR DE DENTINA	Tomado de Goldberg y Smith, 2004
<b>COLÁGENAS</b>			
	Tipo I y su trímero		98 %
	Tipo III		1-2 %
	Tipo V		1 %
<b>PROTEÍNAS NO COLÁGENAS</b>			
<b>Proteínas de matriz fosforiladas (SIBLING's)*</b>			
<b>* del inglés: Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoproteins</b>			
	DSPP		del inglés: Dentin Sialo Phosphoprotein
	DSP		del inglés: Dentin Sialo Protein
	DPP		del inglés: Dentin Phosphoprotein
	DMP-1		del inglés: Dentin Matrix Protein-1
	BSP		del inglés Bone Sialo Protein
	OPN		Osteopontina
	MEPE		del inglés: Matrix Extracellular Phosphorylated protein
<b>PROTEÍNAS DE MATRIZ NO FOSFORILADAS:</b>			
	Proteína de matriz GLA		
	Osteocalcina		
	Osteonectina		
	Proteoglicanos (PGs)		
	condroitin sulfato/dermatan sulfato decorina biglicano		CS-4 81%, CS-6 14%, CS/DS 2%
	Lumican		
	Fibromodulina		
	Osteoadherina		
	Amelogenina 5-7 kDa		
	Factores de crecimiento		
	TGF-β		del inglés: transforming growth factor
	ILGF-1		del inglés: insulin like growth factor
	FGF-2		del inglés: fibroblast growth factor-2
	VEGF		del inglés: vascular endotelial growth factor
	PDGF		platelet derived growth factor
<b>METALOPROTEÍNASAS</b>			
	MMP-1		Colagenasa
	MMP-2 y 9		Gelatinasas
	MMP-3		Estromelisin-1
	MMP-20		Enamelisina
	MT1-MMP		Metaloproteínasa de matriz tipo 1
	Fosfatasa alcalina		
<b>PROTEÍNAS DERIVADAS DE SUERO:</b>			
	αHS2-glicoproteína		
	Albúmina		
	Lipoproteínas		
<b>FOSFOLÍPIDOS</b>			

	Fosfolípidos de membrana	66 %
	Fosfolípidos asociados a mineral extracelular	33 %

**1.4.1.1 Dentinogénesis primaria**

Una vez que se completa la formación del manto dentinario, la matriz orgánica de la dentina y su mineralización, se produce dentina primaria exclusivamente por los odontoblastos y conforme la depositan, se mueven en dirección hacia el centro de la pulpa dejando una prolongación odontoblástica encerrada en el interior de un túbulo dentinario en la matriz.

Estructuralmente la dentina primaria está constituida por dentina peritubular e intertubular. La dentina peritubular forma la pared del túbulo dentinario y presenta mayor contenido mineral que la dentina intertubular. Se sabe que el ritmo de producción de dentina primaria es rápido, y se asocia a mecanismos de control determinados por factores de crecimiento, de transcripción y hormonas (Smith y Lesot, 2001).

**1.4.1.2 Dentinogénesis secundaria.**

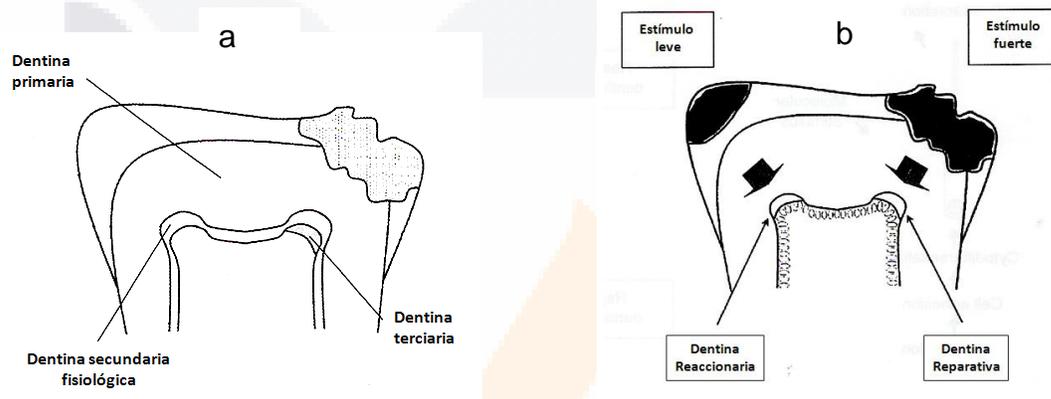
La dentina secundaria se produce por la aposición lenta de matriz dentinaria después de que se completó la formación de la corona y la raíz del diente y sucede a lo largo de toda la vida.

Los túbulos de la matriz de dentina secundaria se continúan con los túbulos de la dentina primaria, lo que sugiere que el mismo odontoblasto se encarga de la secreción de los dos tipos de dentina, aunque la aposición de dentina secundaria es mucho más lenta debido a una regulación hacia abajo (down regulation) de la actividad secretoria de la célula.

**1.4.1.3 Dentinogénesis terciaria**

La dentinogénesis terciaria abarca un amplio espectro de respuestas, que van desde la secreción de una matriz tubular regular muy parecida a la dentina primaria y secundaria, hasta la secreción de una matriz muy displásica que puede incluso ser atubular. La dentina terciaria se ha subclasificado como dentina reactiva o reaccionaria por un lado y reparativa por el otro, con la finalidad de distinguir las diferentes secuencias de los eventos biológicos que estimulan o inician la respuesta (Smith, 1995). La dentina reaccionaria se define como aquella matriz de dentina terciaria secretada por células odontoblásticas pos-mitóticas que sobreviven a un estímulo leve adecuado.

Por otro lado, La dentina reparativa se define como la dentina terciaria secretada por una nueva generación de células parecidas a odontoblastos en respuesta a un estímulo adecuado, después de la muerte del odontoblasto pos-mitótico original, responsable de la secreción de dentina primaria y secundaria. La respuesta habla de un estímulo más intenso y representa una secuencia de procesos biológicos mucho más complejos. En la Fig. 12 se ilustra el proceso de dentinogénesis terciaria, así como la relación de la dentina reaccionaria y reparativa con la intensidad del estímulo.



**Fig. 12. Dentinogénesis terciaria. a) Tipos de dentina, b) tipos de dentina terciaria en relación a la intensidad de un estímulo. (Tomado de Smith A.J. Reactionary Dentinogenesis; *Int. J. Dev. Biol.* 39: 273; 1995).**

### 1.5 Daño pulpar

Las causas potenciales de daño pulpar que pueden inducir inflamación, distrofia e incluso necrosis son muy variadas, aunque se considera que el principal factor etiológico es la invasión de bacterias y sus productos al tejido pulpar. Las bacterias pueden invadir la pulpa como consecuencia de la formación de caries o fracturas dentales, o por vía de tractos anómalos, con falta de continuidad en la estructura dental debida a anomalías del desarrollo y por la implementación de procedimientos restauradores dentales.

Kakehashi, demostró que la pulpa dental tiene *per se*, una alta potencialidad reparadora en un medio libre de bacterias, a pesar de recibir daños de moderados a severos (Kakehashi, 1965).

### **1.5.1 Caries dental**

La caries es una enfermedad microbiana que afecta los tejidos dentales calcificados que puede extenderse a la pulpa dental. Para que la caries se desarrolle, bacterias específicas se establecen sobre la superficie dental. Sin duda, la invasión a partir de una lesión cariosa es la causa más común de inflamación pulpar.

La naturaleza del proceso carioso se determina por muchos factores, de modo que se puede hablar de forma individual de cada lesión cariosa. La respuesta de la pulpa puede variar dependiendo de si la caries progresa rápidamente (caries aguda) o lentamente (caries crónica) o si la caries es completamente inactiva (caries detenida). La caries tiende a ser un proceso intermitente, con períodos de rápida actividad alternando con períodos de inactividad casi total.

Los productos del metabolismo bacteriano, que incluyen ácidos orgánicos y enzimas proteolíticas, destruyen los componentes del esmalte y la dentina. Está demostrado que la exposición de la pulpa a productos bacterianos que penetren la unión amelodentinaria puede desencadenar una respuesta inflamatoria.

El complejo pulpo-dentinario reacciona al avance de las toxinas y productos del metabolismo bacteriano, tratando de reducir la permeabilidad de la dentina, donde la célula odontoblástica deposita cristales de apatita dentro de los túbulos dentinarios conduciendo a una obliteración o esclerosis de los mismos. Adicionalmente, la dentina terciaria de tipo reaccionario puede ser depositada por el odontoblasto dentro de la cámara pulpar (Kim y Trowbridge, 1998).

Si el proceso carioso continúa, ocurren cambios degenerativos en el odontoblasto antes de que los cambios inflamatorios en la pulpa se hagan evidentes. Lo anterior puede conducir a la muerte del odontoblasto y su reemplazo por células odontoprogenitoras a partir de la zona rica en células subyacente de la pulpa dental. La diferenciación de células mesenquimatosas en células parecidas a odontoblasto, puede conducir a la producción de dentina reparativa, que dependiendo de la severidad de la lesión cariosa, puede ser irregular con inclusiones celulares, o si es menos agresiva puede semejar dentina tubular normal (Ricketts, 2001).

En general, las reacciones básicas que tienden a proteger a la pulpa de la caries incluyen, un decremento en la permeabilidad de la dentina, la formación de nueva dentina (dentina terciaria) y procesos inflamatorios e inmunológicos establecidos a lo largo y ancho del tejido pulpar.

### **1.5.2 Fracturas dentales**

La afectación pulpar que puede llegar hasta la necrosis luego de fracturas coronales completas es debida a invasión bacteriana, posterior al traumatismo.

Las fracturas incompletas ocurren más frecuentemente en dientes posteriores, particularmente en aquellos con restauraciones profundas. Pequeñas fisuras en la dentina, pueden producir una fractura incompleta a través de un proceso típicamente lento. Así, mientras la fisura gradualmente se ensancha, las bacterias pueden alcanzar la pulpa a través de los túbulos dentinarios, o bien dicha fisura puede incluso extenderse hasta la cámara pulpar, exponiendo así a la pulpa. Eventualmente la fractura se torna detectable clínicamente o una porción de diente se rompe a lo largo de la línea de fractura y así, la infección de la pulpa dependerá de factores como: la extensión de la fractura y los tejidos involucrados; abarcando solo esmalte, o bien esmalte y dentina y en ocasiones también cemento.

### **1.5.3 Tractos anómalos**

La infección puede ocurrir a través de tractos producidos como consecuencia de defectos de desarrollo, como pueden ser conductillos accesorios o canales producidos por la invaginación de la estructura dental en las etapas embrionarias; de manera tal que dichas soluciones de continuidad proveen la vía de entrada para bacterias cariogénicas e incluso, el sitio de asiento de una lesión cariosa que puede cursar de manera indetectable hasta que la pulpa se expone y produce síntomas. En términos generales, las complicaciones que estos tractos anómalos involucran en buena medida son debidas a la presencia de microorganismos, en cuyo caso todas las características del proceso carioso aplican por igual.

### **1.5.4 Procedimientos restauradores**

Los procedimientos restauradores pueden dañar a la pulpa de diferentes maneras. La causa más común de daño es la microfiltración. Si una restauración no provee un sellado hermético, las

bacterias pueden penetrar la interfase entre el material restaurador y las paredes de la cavidad. Así, los productos bacterianos pueden difundir hacia la pulpa a través de los túbulos dentinarios y causar inflamación que podrá ir desde un cuadro crónico hasta la formación de microabscesos o bien la necrosis total del tejido pulpar (Hargreaves y Goodis, 2002).

Si el objetivo de la odontología restauradora es preservar la viabilidad y función de la pulpa, entonces deben evaluarse muy cuidadosamente los efectos potenciales dañinos del tallado de cavidades, el acondicionamiento de dichas cavidades y su restauración (Murray y cols. 2002).

Como resultado del análisis de las variables restauradoras que intervienen en el daño pulpar en procedimientos de preparación de cavidades se logró determinar algunos de los factores importantes a considerar, dentro de los que se encuentran: 1.- grosor dentinario remanente, 2.- profundidad de la cavidad, 3.- extensión de la misma y 4.- tipo de material restaurador.

La información a la fecha, permite entender que el éxito de los tratamientos odontológicos involucra variables que llevan a la búsqueda de técnicas de restauración más inocuas, el uso de materiales más biológicos y a considerar a los microorganismos como el factor condicionante principal (About y cols. 2001).

### **1.6 Proceso reparativo pulpar**

Por mucho tiempo el proceso reparativo pulpar ha sido considerado como el resultado de la actividad de células parecidas a odontoblasto, también llamadas “neo-odontoblastos” u “odontoblastos de segunda generación”. Evidencia experimental muestra que al principio de la construcción del puente reparador, osteoblastos de reciente diferenciación contribuyen a la formación de osteodentina. En un estadio posterior, después de una fase terminal de polarización, los precursores osteoblástico-odontoblástico se convierten en células parecidas a odontoblasto, expresando moléculas que son compartidas por el hueso y la dentina. La identificación actual del fenotipo terminal de las células involucradas en la formación de dentina reparativa es difícil, debido a que los tipos celulares no se pueden distinguir con facilidad y solo difieren por el nivel de expresión de algunas moléculas de matriz extracelular (Rutherford y cols. 1994).

Se han sugerido diferentes células progenitoras que pueden dar origen a las células parecidas a odontoblasto, entre ellas están las células subodontoblásticas de la capa de Höhl, fibroblastos,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

células indiferenciadas mesenquimáticas del estroma pulpar y pericitos. No es claro si alguna de las poblaciones celulares progenitoras residentes en el adulto, representan una población definida de células troncales (Gronthos y cols. 2000; Gronthos y cols. 2002; Young y cols. 2002).

La desdiferenciación y la transdiferenciación de ciertas células maduras, conduce a la reevaluación del concepto de células troncales en el proceso reparativo.

Cierta plasticidad fenotípica permitiría a algunas células, ya diferenciadas, desdiferenciarse y posteriormente rediferenciarse en células parecidas a odontoblastos. Así, las llamadas “células troncales pulpares” podrían ser células indiferenciadas multipotenciales o intermedias. Lo anterior no excluye la posibilidad de que células endoteliales, pericitos, y fibroblastos pulpares también pudieran contribuir a la población de células que son reclutadas, como evento previo a la proliferación celular. Cuando un número suficiente de células se obtiene para cubrir toda la superficie a ser reparada, las células inician su diferenciación terminal, evento que concluye el proceso.

Es posible incluso que el término “célula parecida a odontoblasto” se haya usado para describir a cualquier célula capaz de depositar una matriz mineralizada después de daño pulpar.

El fenotipo de los odontoblastos primarios puede ser definido por la morfología de la célula y la matriz que secreta, así como por el patrón de expresión genética, que conduce a la síntesis y secreción de proteínas de matriz dentinaria características. Pocas células parecidas a odontoblasto podrían cumplir con todos los criterios descritos, aunque se reconoce que son células con capacidades reparadoras y que pueden desplegar rasgos no fisiológicos o poco convencionales de comportamiento.

El espectro de apariencia de la matriz observado durante la reparación pulpar puede ir desde una fibrodentina atubular hasta una dentina reparativa tubular relativamente regular. Una respuesta con fibrodentina puede preceder frecuentemente a la secreción de una dentina más tubular sobre su superficie, lo que lleva a cuestionar la especificidad dentinogénica de la célula formadora. La interpretación de muchos cambios tisulares puede ser difícil por la ausencia de datos sobre la expresión genética de las células responsables de la secreción de matriz, y la naturaleza de los componentes de matriz secretada. Y es por eso que se han hecho intentos en algunos trabajos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

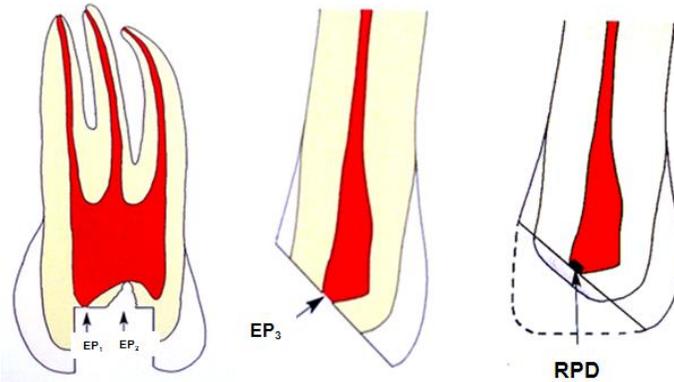
para caracterizar el fenotipo celular durante dentinogénesis reparativa experimental in vivo (D'Souza y cols. 1995), y experimentos in vitro podrían proveer un modelo más simple para fines de interpretación.

Muchas moléculas de matriz extracelular han sido ya identificadas. Algunas son asociadas con el proceso de mineralización o la iniciación de la formación de cristales o el crecimiento de los mismos, mientras que otras actúan como inhibidores.

Estudios recientes demuestran los complejos efectos biológicos de algunos componentes de matriz extracelular. Estos son promotores o inhibidores de mineralización, pero también juegan un papel importante en la diferenciación celular. Por ejemplo, esa situación dual se ha reportado para la DPP, también nombrada fosforina, una molécula que desencadena la mineralización dentinaria y regula la expresión genética y diferenciación de una línea celular osteoblástica de ratón, una línea celular fibroblástica de ratón, y células troncales mesenquimáticas humanas por la vía de señalización de cinasa integrina/proteína activada mitogénica (MAPK) (Jadlowiec y cols. 2004). De modo que adicionalmente a su papel en la nucleación mineral, DPP juega un rol en la diferenciación celular y en otras funciones de señalización.

### **1.6.1 Recubrimiento pulpar directo (RPD)**

Como se ha mostrado, las potenciales causas de daño pulpar son muchas y muy variadas pero la posibilidad de que por razones bacterianas, traumáticas o mecánicas se exponga el tejido pulpar al medio oral condiciona la necesidad de instaurar un procedimiento clínico conocido como recubrimiento pulpar directo, como se ilustra en la Fig. 13. Dicho tratamiento abarca el retiro de caries hasta el punto de mostrar tejido pulpar, así como el recubrimiento de la herida con un material que permita la reparación del tejido pulpar.



**Fig. 13. Causas posibles para decidir un recubrimiento pulpar directo (RPD); EP<sub>1</sub>= exposición mecánica, EP<sub>2</sub>= exposición por caries, EP<sub>3</sub>= exposición traumática.**

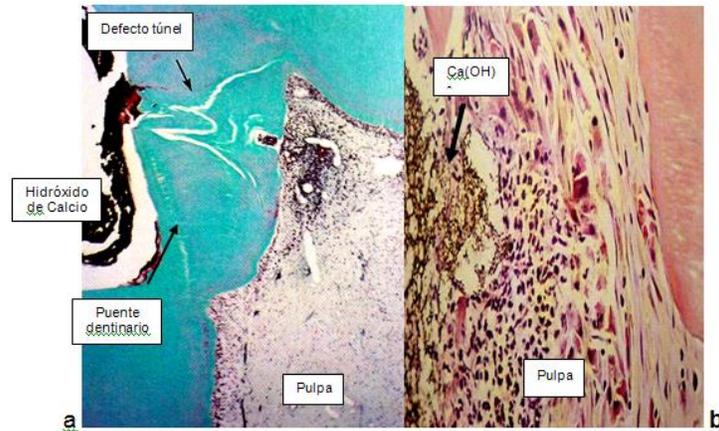
## 1.7 Técnicas convencionales de recubrimiento pulpar directo

### 1.7.1 Hidróxido de calcio.

El recubrimiento de la herida pulpar a lo largo del tiempo se ha hecho con distintos materiales aunque se reconoce al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  como el estándar de oro para tal fin. Su efectividad para promover la formación de un puente dentinario sobre sitios de exposición pulpar pequeños se cree que está relacionada con una combinación de actividad antimicrobiana, atribuida a su pH de aproximadamente 12.4, y su capacidad de estimular la formación de dentina terciaria, atribuida a la liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Mjör y Ferrari, 2002).

Aunque se ha reportado más recientemente que las soluciones de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  pueden solubilizar factores de crecimiento, incluyendo  $\text{TGF-}\beta$  a partir de la dentina, permitiendo su disponibilidad para las células reparadoras lo que podría ser el mecanismo responsable del éxito de los recubrimientos pulpares con hidróxido de calcio para conseguir la formación de puentes dentinarios (Smith, 1995).

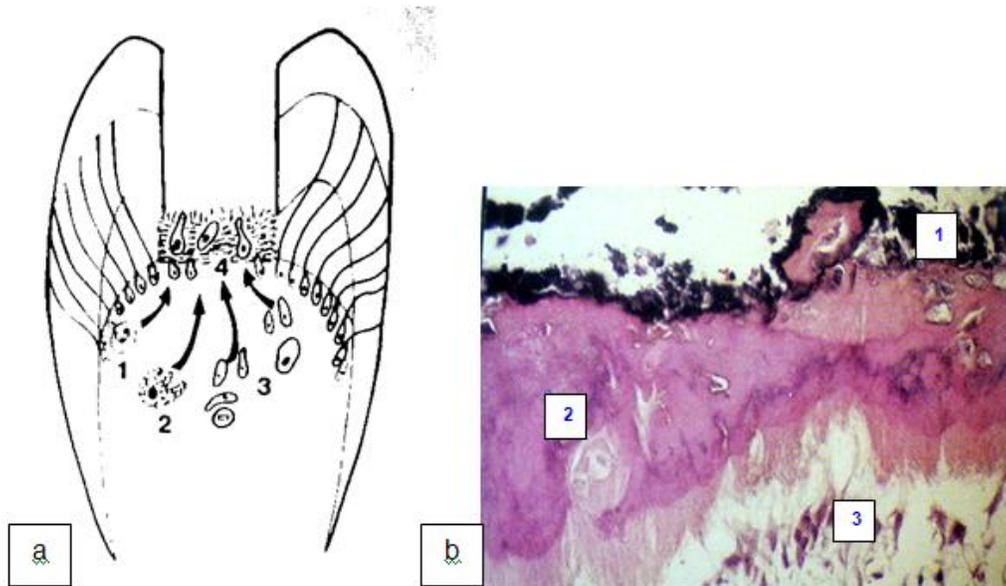
Y quizá una de sus mayores ventajas es su bajo costo y amplia disponibilidad. Aunque también se reconocen ciertas desventajas como lo son: alta solubilidad, baja resistencia a la compresión, creación de puentes dentinarios defectuosos (efecto túnel) (Cox y cols., 1996) (fig. 14a), dispersión de partículas en la pulpa subyacente que se han relacionado con calcificaciones ectópicas (fig. 14b)



**Fig. 14. Desventajas del Hidróxido de Calcio en recubrimiento pulpar directo. a)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en recubrimiento pulpar directo en mono mostrando puente dentinario con defecto de túnel: solución de continuidad señalada con la flecha, b) Partículas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dispersas en pulpa.**

Como agente de recubrimiento, el pH tan alcalino de la preparación induce una quemadura de amplitud limitada a la superficie de la exposición pulpar. Por debajo del tejido afectado, en unos días y cuando el proceso inflamatorio comienza a resolverse, células reparadoras son reclutadas en el estroma pulpar. Entonces una primera división celular ocurre en la parte central de la pulpa. Las dos células hijas migran hacia la zona dañada, donde ocurre una segunda división (Fitzgerald y cols., 1990).

El odontoblasto completamente diferenciado no participa en estos eventos, y existe evidencia de que células troncales residentes adultas que comparten propiedades con células troncales de médula ósea inician el proceso (Gronthos y cols., 2002). El segundo evento es la proliferación celular. Cuando un número suficiente de células se obtiene para cubrir toda la superficie a ser reparada, estas inician su diferenciación final, lo que representa el tercer evento del proceso. En la fig.15 se esquematiza la secuencia de eventos descrita en a, y un puente dentinario en b.



**Fig. 15.** Formación del puente dentinario tras recubrimiento directo con  $\text{Ca(OH)}_2$ . a) Eventos involucrados en la respuesta pulpar al RPD con  $\text{Ca(OH)}_2$ : 1. Infiltrado de neutrófilos, 2. presencia de macrófagos, 3. reclutamiento y proliferación de células indiferenciadas. 4 diferenciación en odontoblastos de segunda generación, b) Corte histológico con H y E que muestra en 1, el  $\text{Ca(OH)}_2$ , en 2, el puente dentinario y en 3, los odontoblastos de 2° generación.

### 1.7.2 Materiales adhesivos

El uso de materiales adhesivos para la terapia de recubrimiento pulpar directo es conocido como técnica de grabado total, desde su advenimiento se comenzó a determinar que la biocompatibilidad de los distintos sistemas adhesivos se correlaciona con monómeros libres sin polimerizar (De Souza Costa y cols., 1999),

De manera que sus componentes químicos tales como Bis-gma, Udma, Teg-dma y Hema son citotóxicos en contacto con fibroblastos (Hebling, 1999). Es hasta que distintos trabajos tales como el de Pameijer y Stanley en el cual realizan un estudio histopatológico en monos con 147 exposiciones pulpares sometidas a grabado directo y recubierto con tres sistemas adhesivos y con  $\text{CaOH}_2$  tanto convencional como fotocurable en períodos de 5, 25 y 75 días evaluando: respuesta inflamatoria, formación de puentes dentinarios, preservación de vitalidad, presencia de chips de

dentina así como evidencia de filtración bacteriana logran demostrar una franca inferioridad de la técnica de grabado total comparativamente con la de uso de  $\text{CaOH}_2$  (Pameijer y Stanley, 1998).

## **1.8 Técnicas experimentales**

Para reparar la lesión pulpar induciendo cambios más cercanos a los procesos naturales, se han empleado tres estrategias principales: a) terapia con factores de crecimiento, b) terapia con células troncales, c) terapia génica. A la fecha, los intentos para regenerar tejido duro dental perdido con las mencionadas modalidades de enfoque han brindado muy diversos resultados (Edwards y Mason, 2006).

### **1.8.1 Terapia con factores de crecimiento**

En la actualidad la información acerca de las etapas tempranas de formación dentinaria en gérmenes dentarios embrionarios se trata de extrapolar a lo que ocurre en dientes maduros. Y a pesar de que pueden compartir algunas características, la arquitectura tisular y el ambiente celular en los gérmenes dentarios y dientes maduros son diferentes. Después de un daño a un diente maduro, las células mesenquimáticas indiferenciadas pulpares pueden ser reclutadas durante el proceso de reparación y diferenciarse en odontoblastos de segunda generación, neo-odontoblastos, o células parecidas a odontoblastos. La caracterización de los procesos de señalización que generan la inducción de la diferenciación de los odontoblastos es fundamental para poder comprender la dentinogénesis fisiológica así como la reparación tisular.

El papel clave que juegan los factores de crecimiento en la diferenciación odontoblástica fisiológica, y la recapitulación de tales eventos durante la reparación, han sido revisados intensivamente (Smith y Lesot, 2001).

Se ha puesto un especial énfasis en algunos factores de crecimiento, particularmente los de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta ( $\text{TGF-}\beta$ ), incluyendo varios miembros de la familia de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP-2, BMP-7), y el factor de crecimiento parecido a insulina-1 (IGF-1) los que parecen estar directamente involucrados en la señalización de la citodiferenciación tanto del odontoblasto, como de las células parecidas a odontoblasto a partir de células madre pulpares (Helder y cols., 1998).

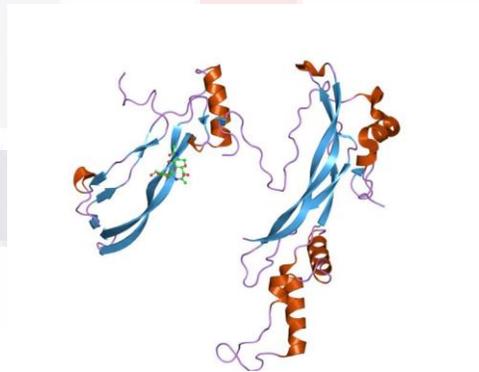
Cualquiera que sea el agente biológico que estimula la formación de dentina reparativa, ya sea una molécula de matriz extracelular, un factor de crecimiento o los tipos celulares implicados en el proceso, se requiere del reclutamiento, proliferación y diferenciación celulares (Goldberg, 2006).

### 1.8.1.1 Proteína Osteogénica 1 (OP-1)

Al inicio de los años 1990, se demostró en monos que el recubrimiento indirecto con BMP-7, también conocida como proteína osteogénica 1 (OP-1), era capaz de estimular la formación de dentina reparativa, y empleada como agente de recubrimiento directo promovía la formación de osteodentina reparativa en el conducto radicular (Rutherford y cols., 1993).

La OP-1 fue aislada originalmente a partir de hueso, basada en su capacidad para inducir neoformación ósea in vivo. Estudios en modelos primates no humanos han demostrado que OP-1 es efectiva en restaurar defectos óseos en segmentos considerables (Cook y cols., 1995). Existe evidencia de que OP-1 se sintetiza en el riñón y está presente en la circulación, lo que la coloca como una proteína con potenciales efectos terapéuticos para el tratamiento y manejo de la osteoporosis y enfermedades metabólicas óseas relacionadas.

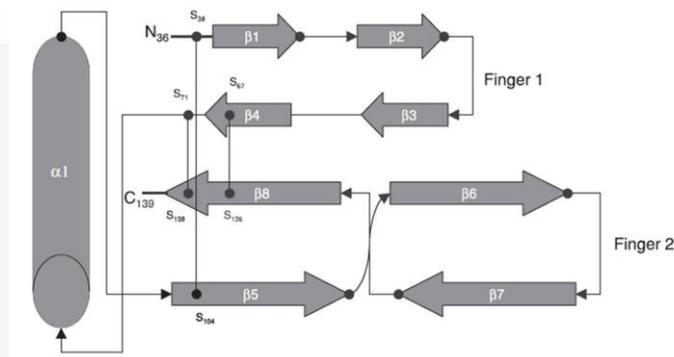
El conocimiento de la estructura tridimensional de OP-1 (fig. 16) es esencial para comprender su modo de acción y brindar una base para desarrollar terapias con moléculas bioactivas.



**Fig. 16. OP-1 acomplejada con su antagonista noggin.**  
<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/1m4u600.png>

OP-1 y TGF  $\beta$ 1 son dos de más de treinta proteínas homólogas pertenecientes a la superfamilia de TGF-  $\beta$ . Los miembros de esta superfamilia tienen diversas actividades biológicas y juegan papeles críticos en la migración, proliferación, y diferenciación de células mesenquimáticas durante la

embriogénesis, y en la reparación y regeneración de tejidos durante la vida post-fetal. Esas proteínas son sintetizadas como precursores grandes que sufren un procesamiento para generar dímeros activos maduros conformados por monómeros ligados por puentes disulfuro (Fig. 17). Cada monómero contiene un dominio terminal con 20-92 % de identidad secuencial entre los miembros de la superfamilia; razón por la que OP-1 se ha propuesto como un prototipo estructural de la porción conservada de los miembros de la superfamilia (Griffith y cols., 1996).



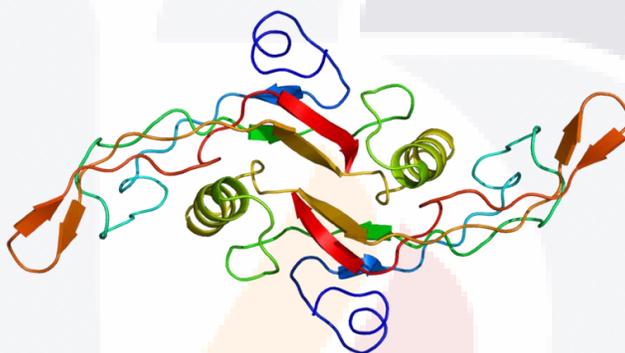
**Fig. 17. Representación esquemática de OP1.  
(Tomado de Granjeiro, 2005)**

La OP-1 o BMP-7 recombinante humana es una cadena polipeptídica, monomérica, no glicosilada que contiene 139 aminoácidos y tiene una masa molecular de 15,68 kDa. En el pasado los investigadores la han colocado en contacto con el tejido pulpar de diversos modelos animales como: monos, perros, y ratas, debido a las consideraciones éticas que obligan a dejar de lado la experimentación en dientes humanos maduros que no sean premolares destinados a extracción por fines ortodóncicos y dado que estos generalmente no cumplen los requerimientos de un diente en condiciones clínicas como las que se deben dar para la instauración del procedimiento de RPD.

### 1.8.1.2 Factor de crecimiento Transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ ).

TGF- $\beta 1$  es el prototipo de la superfamilia del TGF, una familia conservada evolutivamente de citocinas diméricas estructuralmente relacionadas, representada en organismos tan diversos como los mamíferos e invertebrados. Sus miembros comparten un grupo de residuos conservados de cisteína que forman una estructura tipo nudo unida por puentes disulfuro intramoleculares (fig.18).

Además, todos tienen la misma estructura precursora con una secuencia señal hidrofóbica, un prodominio, y un dominio maduro c-terminal. La superfamilia incluye TGF's, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento y de diferenciación, activinas, inhibinas, y hormona anti Mülleriana. Todos sus miembros desempeñan un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular y funciones fundamentales durante la embriogénesis. La familia de TGF- $\beta$  contiene tres isoformas estrechamente relacionadas TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ -2-, y  $\beta$ -3 que surgió por la duplicación de un ancestro común. El TGF- $\beta$ 1 es la más abundante isoforma con las plaquetas y huesos como las fuentes más importantes de TGF- $\beta$ 1 (X. Nie et al. 2006)



**Fig.18. Representación tridimensional del TGF- $\beta$ 1 (Protein TGFB1 PDB 1kla.png)**

### 1.9 Polímeros biodegradables

Con la finalidad de generar un aporte continuo de distintos fármacos en diversas situaciones tanto experimentales como clínicas se han diseñado diferentes biomateriales para actuar como matriz contenedora de moléculas bioactivas, buscando ofrecer un micro-ambiente tridimensional, biológico y físico-químico, así como una estructura acarreadora de proteínas, células e incluso genes.

Algunas de las modalidades de polímeros biodegradables son cerámicos como hidroxiapatita y fosfato tricalcico- $\beta$ . Polímeros naturales como colágena, glucosaminoglicanos, quitín y quitosan, así como alginato de sodio. Polimeros sintéticos como ácido poliláctico,, ácido poliglicólico y sus copolímeros ácido-poli-láctico-glicólico (PLGA).

Un polímero debiera ser efectivo para transportar nutrientes, oxígeno y sustancias activas y degradarse de manera gradual siendo reemplazado por el tejido en regeneración manteniendo la

característica del tejido final. Debe ser biocompatible, no citotóxico y tener propiedades físicas favorables para la agregación de la molécula bioactiva y fuerza mecánica suficiente para soportar los rigores del funcionamiento por períodos variables de tiempo.

Ofrecen un micro-medio ambiente tridimensional, biológico y físico-químico, sirven como transportador para proteínas o células, permiten que las sustancias activas inicien su acción gradualmente y declinen del mismo modo; permiten el contacto de las células con las biomoléculas evitando la saturación y de manera primordial mantienen la concentración de las biomoléculas por periodos de tiempo prolongados a niveles terapéuticos. (Nakashima, 2005)

Los polímeros biodegradables son de origen natural o sintético y estos se degradan in vivo, ya sea por medio de enzimas o hidrolíticamente, generando productos biocompatibles o toxicológicamente seguros que son eliminados por vías metabólicas.

Algunos de los polímeros han sido utilizados como suturas reabsorbibles, sistemas de liberación prolongada de medicamentos y aparatos de fijación ortopédica. (Pathiraja y Raju, 2003)

Diversos trabajos han explorado la colocación de la molécula bioactiva OP-1 directamente en contacto con el tejido, aunque es difícil el aporte de factor de crecimiento a lo largo del tiempo que tarda el proceso de reparación, por lo que se ha intentado liberarlo lenta y controladamente a partir de su unión con un material que actúe como acarreador como ha sido por ejemplo, el uso de una matriz de colágena insoluble (Andelin y cols., 2003). Sin embargo, al uso de este tipo de material a nivel dental se asocian complicaciones, en el sentido de que una vez que se inicia el proceso de formación de dentina, esta continúa hasta que todas las partículas de colágena son mineralizadas, de modo que si se aplica una cantidad grande de matriz o si esta se extiende, se podrá formar tejido duro en áreas donde no se pretende que se forme, lo cual lo limita como una matriz viable en aplicaciones de recubrimiento pulpar directo. Por el otro lado, en un trabajo experimental realizado en ratas (Andelin, 2003), el recubrimiento directo con MTA produjo significativamente más sialofosfoproteína de la dentina (DSPP), un marcador de diferenciación odontoblástica, comparado con BMP-7 recombinante; y una posible explicación sugerida para esos resultados es que el proveer un bolo único de una proteína morfogenética con una vida media corta in vivo, no permite

la liberación sostenida de niveles fisiológicos de la proteína requeridos para la regeneración completa de tejido duro (Edwards y Mason, 2006).

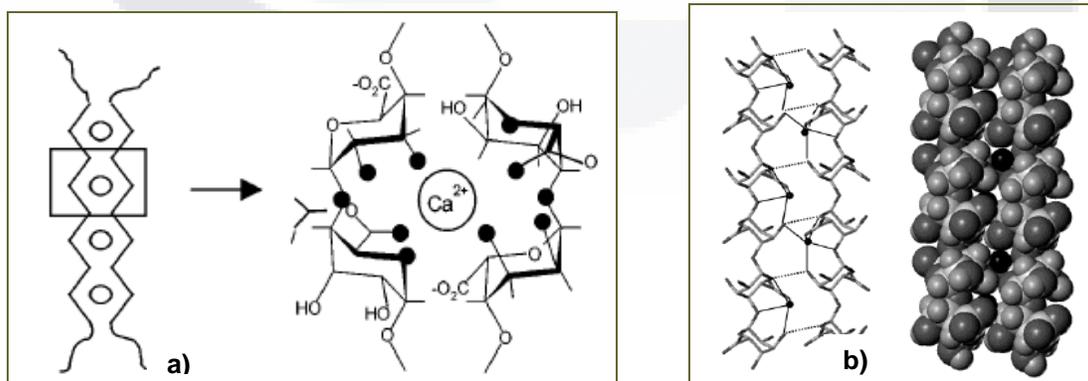
### 1.9.1 Microencapsulación

La microencapsulación es el proceso de recubrimiento de sustancias (proteínas, carbohidratos, fármacos, factores de crecimiento) con materiales de distinta naturaleza para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. Siendo por definición menores a 1 mm y mayores a 1  $\mu\text{m}$  y según la forma en que se distribuye el encapsulado en su interior se pueden obtener microesferas, microcápsulas o micropartículas. (Wang, 2006).

La cinética de liberación de sustancia activa a partir de microesferas puede variar entre una liberación trifásica cuando la sustancia activa se distribuye heterogéneamente mediante: liberación de la sustancia activa en la superficie, por difusión a través de matriz y poros, por erosión, y una liberación bifásica con solamente las dos últimas fases si la sustancia activa se distribuye homogéneamente (Ramos, 2001)

### 1.9.2 Alginato de sodio

Es un polímero natural con bajo potencial inmunogénico. La formación de la matriz está dada por entrecruzamiento iónico entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y las unidades estructurales del alginato, ácido gulurónico y ácido manurámico (Fig. 19 a); generando una estructura conocida como cartón de huevo (Fig. 19 b).



**Fig. 19. a) Entrecruzamiento iónico entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y las unidades estructurales del alginato; b) Estructura resultante típica (forma de cartón de huevo).**

Algunas de las ventajas de la gelificación iónica con alginato de sodio son que genera un ambiente acuoso relativamente inerte dentro de la matriz con un proceso de encapsulación que se efectúa a temperatura ambiente sin involucrar solventes orgánicos tóxicos. Y adicionalmente se permite la disolución y biodegradación del sistema bajo condiciones fisiológicas normales en términos de pH, temperatura, etc. y de manera importante representa un proceso de bajo costo. (Rodríguez, 2002).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Como se ha descrito anteriormente, los procesos realizados por el odontoblasto postmitótico durante la formación del tejido dentinario, los factores de crecimiento y transcripcionales involucrados, así como las vías de señalización y la síntesis de componentes de matriz extracelular, no son del todo equiparables a los procesos desarrollados en el adulto por las células parecidas a odontoblasto durante el proceso de reparación dentinaria. Por lo cual, el presente proyecto pretende contribuir con el entendimiento de este proceso en un modelo animal adulto. El procedimiento conocido como recubrimiento pulpar directo (RPD), permite la reparación del tejido pulpar expuesto como resultado de caries, traumatismos o procedimientos restauradores. El RPD utiliza diversos productos comercialmente disponibles con características distintas que les confieren ventajas y desventajas en términos de la calidad del tejido reparador formado.

Los materiales que se utilizan convencionalmente en el RPD promueven respuestas reparativas con distintos tipos de deficiencias, lo cual puede depender de la aplicación de un bolo único que pierde su efecto en el corto plazo.

Un sistema de liberación prolongada de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 aplicado a RPD podría promover la formación de un tejido reparativo con una morfología y estructura más homogénea, sólida y de mayor calidad.

En el presente trabajo se propone la elaboración de un sistema de liberación continua de OP-1 y de TGF- $\beta$ 1 microencapsuladas en un biopolímero de alginato de sodio para ser usado en recubrimiento pulpar directo en molares de rata.

Para seguir el proceso de regeneración pulpar inducido por este biopolímero se emplearon como marcadores de la actividad de odontoblastos o células parecidas a odontoblastos la fosfoproteína

de la dentina (DPP) y la sialoproteína de la dentina (DSP). Se valoró su expresión temporal y espacial en la estructura del tejido reparativo mediante la técnica de inmunohistoquímica para DSP y de hibridación in situ para DPP. Además, se realizó una valoración de la calidad del tejido formado analizando su morfología a través de microscopía óptica, empleando para lo anterior la técnica histológica.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Puede la combinación de OP-1 y TGF $\beta$ -1 en asociación con un biopolímero en forma de microsferas de alginato de sodio aplicado en recubrimiento pulpar directo (RPD) en molares de rata, mejorar la calidad del tejido reparador, en relación a la organización tisular, expresión y distribución temporal y espacial de DPP y DSP producto de la actividad de las células reparadoras, de manera comparativa con la aplicación aislada de ambas moléculas bioactivas?

### **4. HIPÓTESIS**

La aplicación de un biopolímero asociado a OP-1 y TGF- $\beta$ 1 en RPD en molares de rata permite una respuesta reparadora uniforme y de mejor calidad en términos de expresión de DPP y DSP, así como de organización del tejido formado, comparado con el conseguido en respuesta a la aplicación de ambos morfógenos de forma aislada.

### **5. OBJETIVOS**

#### **General**

Evaluar el efecto de TGF- $\beta$ 1 y OP-1 encapsulados en un sistema de liberación prolongada sobre la expresión de DSP y DPP en células pulpares de rata.

#### **Específicos**

- Diseñar y caracterizar un biopolímero asociado a OP-1 y TGF- $\beta$ 1 para ser aplicado en RPD en molares de rata.
- Evaluar el efecto del biopolímero sobre las células involucradas en la expresión espacial y temporal de DPP y DSP.

- Evaluar con técnica histológica la calidad y organización del tejido reparador.

## 6. METODOLOGÍA

### Tipo de estudio:

Estudio de tipo experimental que contempló:

- Diseño y caracterización de un biopolímero asociado a OP-1 y/o TGF- $\beta$ 1 para ser aplicado en RPD en ratas.
- Inmunolocalización de DSP, e Hibridación In Situ de DPP en la estructura del tejido reparador formado en los distintos períodos de prueba.
- Descripción de la morfología de dicho tejido reparador.

### Población y muestra.

Se utilizaron 48 ratas Wistar macho, con un peso aproximado de  $300 \pm 25$  gramos. En dichos animales se usaron los dos primeros molares superiores para llevar a cabo el procedimiento de recubrimiento pulpar directo. Se obtuvo el consentimiento del comité de ética en investigación de la Facultad de Estomatología de la U.A.S.L.P. para el uso de dichos animales (Anexo 1).

### Criterios de Inclusión:

\* Primeros molares maxilares sanos que no mostraran anomalías de desarrollo, caries o cálculo excesivo.

### Criterios de Exclusión:

\* Molares que mostraran anomalías de desarrollo, caries o cálculos excesivos.

\* Ratas con edades menores o mayores a 2 meses.

### Criterios de Eliminación:

\* Molares que mostraran excesiva hemorragia durante la exposición pulpar.

\* Molares que perdieran el material de obturación o que mostraran signos de infección.

\* Los especímenes que fallecieran.

## **Variables**

Variables dependientes: -DPP

-DSP

Variables Independientes: -OP-1

-TGF- $\beta$ 1

-Alginato de sodio

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

La metodología relativa a las micropartículas conteniendo a OP-1 y TGF- $\beta$ 1 se dividió en dos fases. En la primera fase se desarrolló la formación de micropartículas de alginato de sodio con el método de gelificación iónica. En la segunda fase se desarrolló la caracterización de las micropartículas.

### **7.1 Diseño del sistema polimérico biodegradable**

La estandarización del método de gelificación iónica se llevó a cabo inicialmente con la microencapsulación de albúmina sérica bovina y posteriormente se elaboraron los biopolímeros a ser utilizados en el RPD encapsulando los morfógenos propuestos: OP-1 y TGF- $\beta$ 1.

El diseño del sistema de liberación controlada incluyó la preparación de 10 ml de alginato de sodio al 2% (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis MO, USA) más 10  $\mu$ g de cada factor de crecimiento (Prospectany Technogene Ltd., Israel.) resultando en los siguientes grupos: Grupo 1, OP-1 (10 $\mu$ g) + Alginato de Sodio 2% (10mL). Grupo 2, OP-1 (10 $\mu$ g) + TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g) + Alginato de Sodio 2% (10mL) y Grupo 3, TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g) + Alginato de Sodio 2% (10mL). Posteriormente, 10 ml de alginato de sodio conteniendo los morfógenos fueron goteados a través de una aguja calibre 30 sobre 100 ml of Ca<sub>2</sub>Cl 0.1M (Productos Químicos de Monterrey, México), mantenidos en movimiento por sonicación (Microson XL, Misonix Inc., Farmingdale NY, USA). Una vez que las micropartículas fueron generadas, se enjuagaron con agua desionizada y etanol sobre papel filtro de grado 610 (Ahlstrom, Mt. Holly Springs, PA, USA) y fueron sometidas a secado a temperatura

ambiente por 8 horas, mantenidas por 10 horas a 4°C, y finalmente liofilizadas por 8 horas (Freeze Dry System, Freezone 6, Labconco, Kansas, MO, USA).

### **7.1.1 Caracterización del sistema polimérico**

La caracterización del sistema involucró la observación de las micropartículas a través de un microscopio óptico (Motic B5, DMB series, Motic Instruments, Northbrook, IL, USA) antes del proceso de liofilización, con la ayuda del software Images Advance 3.0, (Motic Instruments, Northbrook, IL, USA). Las micropartículas fueron colocadas sobre un portaobjetos y fotografiadas con una magnificación de 4X. El diámetro se obtuvo midiendo 100 muestras de micropartículas de cada grupo con ayuda del software Image J 1.37, (Image processing and analysis in Java), y utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para determinar las posibles diferencias estadísticas en el tamaño de las micropartículas entre los tres grupos (con un nivel de significancia de 0.05). Los tres grupos de biopolímeros fueron observados luego de la liofilización a través de un microscopio electrónico de barrido (Philips XL30, Heerlen, Netherlands) para evaluar la morfología tanto interna como externa.

### **7.1.2 Validación del método de detección por HPLC-UV**

El sistema cromatográfico incluyó una bomba binaria para HPLC, Waters 1525, acoplada a un detector de absorbancia dual Waters 2487 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Los compuestos fueron separados mediante una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18; 2.1 x 75 mm x 3.5  $\mu\text{m}$  (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Para el desarrollo del método de cuantificación de las proteínas, y su estandarización, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA, J.T.Baker, México). La fase móvil incluyó acetonitrilo y ácido trifluoracético. Las condiciones cromatográficas finales incluyeron una separación isocrática de ambos morfógenos en una columna C-18 de fase reversa. Los compuestos fueron separados usando una mezcla de acetonitrilo y ácido trifluoracético (40:60) como fase móvil para TGF- $\beta$ 1, mientras que se requirió acetonitrilo 100% para eluir a OP-1, utilizando un flujo de 1 ml/min en ambos casos. La detección ultravioleta se logró con una longitud de onda dual fijada a 254/280 nm para identificar y cuantificar TGF- $\beta$ 1 y 260 nm para OP-1.

La respuesta cromatográfica para TGF- $\beta$ 1 fue caracterizada usando una curva de calibración descrita en términos de la ecuación  $Y=3.04e+001 X=8.50e+001$ , utilizando un rango de concentraciones de  $1 \times 10^{-7}$  hasta 10  $\mu\text{g/ml}$  en el cual la curva de calibración fue lineal.

Para OP-1, se usó un método de cálculo con factor de respuesta a un punto fijo, en este caso con una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  con 6 repeticiones. El factor de respuesta encontrado tuvo un valor de  $1.9 \times 10^5$ , con un coeficiente de variación menor a 20%. La respuesta cromatográfica fue caracterizada en términos de la ecuación  $Y= 5.46e+004 X$ .

### **7.1.3 Prueba de liberación.**

Como parte de la caracterización, se desarrolló una prueba de liberación de los morfógenos a partir de los tres grupos de biopolímeros como sigue: 50 mg de micropartículas de cada biopolímero fueron agregadas a 4 ml de solución buffer de fosfatos (PBS 10%, pH 8.4) a 37°C (Thelco Lab Incubator, Thermo Electron Co. USA). La liberación de los morfógenos se determinó a intervalos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 y 168 horas. En cada intervalo, se centrifugaron las muestras por 2.5 minutos a 2500 rpm (IEC Centra CL2 Centrifuge, Thermo Electron Co. USA), y luego los sobrenadantes fueron recolectados y filtrados (Whatman 0.45  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schuell). Después de cada recolección se agregó solución fresca de PBS a cada muestra. Se utilizó cromatografía líquida de alto desempeño acoplada a detección ultravioleta (HPLC-UV) para cuantificar la liberación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 a partir de cada biopolímero.

### **7.2 Recubrimiento pulpar directo**

Se utilizaron 96 primeros molares maxilares de 48 ratas Wistar macho con un peso aproximado de  $300 \pm 25$  g. Las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (10 mg/kg) (Hu y cols.1998; Andelin, 2003). Los dientes fueron aleatoriamente distribuidos a cada uno de los grupos tal y como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3. Grupos de estudio y controles propuestos en la metodología.**

1	2	3	4	5	6	7	8
OP-1	OP-1 + Biopolímero	OP-1 + TGF-β1 + Biopolímero	TGF- β1 + Biopolímero	TGF- β1	CONTROL (+) Cavidad s/Exp	CONTROL (-) Cavidad c/Exp	CONTROL (+) Ca(OH) <sub>2</sub>

Cada grupo estuvo integrado por 6 ratas. La cavidad oral de la rata fue desinfectada con un hisopo embebido en digluconato de clorhexidina 0.2%, (Oral-B ®) y la superficie mesial del molar fue limpiada con una cureta de Gracey n° 2 y desinfectada con Peróxido de Hidrógeno al 3%.

Se preparó una cavidad de 0.5 mm<sup>2</sup> de amplitud con una profundidad de 0.5 mm aproximadamente utilizando una fresa de carburo de tungsteno de 1/4 activada en pieza de mano de alta velocidad por un máximo de 2 segundos, seguido de una corta irrigación con agua destilada, para evitar el daño pulpar por calentamiento.

Después de la preparación cavitaria, la exposición pulpar se realizó por medio de perforación mecánica del piso de la cavidad con un explorador de conductos DG-16 (Hu-Friedy ®) estéril.

Este método evita el extenso daño pulpar causado por la exposición durante el corte con fresa, y la impacción de virutas de dentina que pueden acarrear focos de mineralización ectópicos. (Decup y cols., 2000). Se tuvo cuidado de lograr una apertura uniforme a una profundidad que permitiera producir una mínima cantidad de hemorragia. Se buscó conseguir la hemostasia por medio de presión con torunda de algodón estéril; una vez lograda, se aplicó el agente de recubrimiento pulpar correspondiente a cada uno de los grupos, con excepción del grupo 7 (control negativo), y la apertura fue sellada con cemento de ionómero de vidrio, (Vitrebond, 3M, Espe, St. Paul MN, USA).

Las puntas de las cúspides de los dientes antagonistas fueron rebajadas para minimizar las fuerzas oclusales sobre la restauración. Se administró analgésico para reducir el dolor postoperatorio (ácido tolfenámico, 2.5 mg/kg vía intramuscular) y dieta blanda para minimizar la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fuerza masticatoria por las primeras 72 horas y se mantuvieron a la espera de los períodos de prueba a los 14 y 28 días para ser sacrificadas y preparar la siguiente fase del trabajo (Goldberg, 2004).

### **7.3 Obtención y preparación de muestras para técnicas Histológica e**

#### **Inmunohistoquímica**

Debido a que el pico máximo de reparación pulpar en ratas se observa a los 5 o 6 días post-trauma y el de formación de dentina reparativa desde los días 7 a 35, dependiendo de la severidad de la lesión (Taylor y Byers, 1990). Tres ratas de cada grupo fueron sacrificadas a los 14 y tres a los 28 días después de la cirugía mediante una sobredosis de xilazina.

#### **7.4 Técnica Histológica**

Las mandíbulas fueron removidas, y los maxilares se disecaron en bloque. Se fijaron por inmersión en formalina neutra al 10% por  $\pm$  72 horas.

El proceso de descalcificación se llevó a cabo con EDTA 10% por  $\pm$  6 semanas, y posteriormente fueron sometidos al proceso de inclusión en parafina iniciando con la deshidratación en soluciones crecientes de alcohol hasta llegar al alcohol absoluto; posteriormente se sometieron a aclaración por medio de xilol. Una vez aclarado el tejido se sumergió en parafina líquida para la impregnación en toda la muestra. Posteriormente se sacó el tejido de la parafina líquida y se hizo el proceso de inclusión en bloques, Posteriormente se procedió a efectuar los cortes en microtomo dejando un espesor de 5  $\mu$ m.

Una vez que se consiguieron los cortes se recuperaron un promedio de 10 a 12 portaobjetos procedentes de cada molar de cada grupo y de cada tiempo, con tres cortes en cada uno procurando incluir en la medida de lo posible la zona de la exposición pulpar y las áreas adyacentes y posteriormente se sometieron a tinción con Hematoxilina y Eosina para ser observados al microscopio óptico.

Para cumplir con el objetivo de evaluar la calidad y organización del tejido reparador formado como consecuencia del RPD en los molares de rata se hizo uso de una modificación del método de Hu, (1998) utilizando los siguientes criterios de evaluación histológicos:

#### EVALUACIÓN DE TEJIDO DURO

- Grado 1 Reparación incompleta solo con formación de tejido fibroso.
- Grado 2 Reparación incompleta con tejido mineralizado adyacente al sitio.
- Grado 3 Barrera de tejido fibroso adyacente al sitio de exposición
- Grado 4 Formación completa de puente dentinario con mineralización parcial
- Grado 5 Formación completa de puente dentinario con mineralización total.

### **7.5 Técnica inmunohistoquímica.**

#### **7.5.1 Extracción y purificación de DSP.**

Se llevó a cabo un método de extracción y purificación de sialoproteína dentinaria (DSP), para posteriormente efectuar la preparación de anticuerpos policlonales anti-DSP en conejo.

Se decapitaron 60 ratas Wistar de 11 días y las cabezas se introdujeron en N líquido. (D'Souza, 1995) Posteriormente se extrajeron los incisivos y se mantuvieron en congelación. Se efectuó la extracción de proteínas por el método de congelación-descongelación (Guerrero Barrera, 1999).

Se precipitaron las proteínas con el método de metanol-cloroformo-agua (Wessel y Flüge, 1984), hasta obtener el extracto total de las proteínas dentales. Se llevó a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% para separar las proteínas de matriz extracelular a partir del extracto total de proteínas dentales. La Sialoproteína de Dentina (DSP) fue reconocida con un anticuerpo anti-DSPP de ratón facilitado amablemente por el Dr. Larry Fisher del "National Institute of Dental and Craniofacial Research" de los E.E.U.U. a través de la técnica de Western blot.

Luego fue cortada del gel de poliacrilamida y analizada por electroforesis desnaturalizante. La pureza de esta proteína fue corroborada por Western blot.

#### **7.5.2 Preparación de anticuerpos específicos anti-DSP.**

Se prepararon anticuerpos anti sialoproteína dentinaria (DSP) utilizando DSP de ratas de once días. Se separaron 250 µg de DSP por electroforesis en gel de poliacrilamida, 10% SDS-PAGE en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un gel preparativo, luego la banda de DSP (53 kDa) fue cortada y colocada en un tubo eppendorf para ser macerada cuidadosamente utilizando el émbolo de una jeringa de insulina, después de esto los pequeños fragmentos de gel fueron lavados cinco veces con agua destilada y finalmente fueron mezclados con 500 µl de adyuvante completo de Freund. Se prepararon los anticuerpos policlonales usando el protocolo de Harold y Lane con algunas modificaciones (Harold y Lane, 1998). Brevemente, la mezcla preparada antes fue inyectada subcutáneamente a una coneja Nueva Zelanda de 2.5 kg. Antes de la primera inyección, se recolectaron 5 ml de sangre en un tubo conteniendo EDTA líquido a 15% (Tubos Kendall para recolección sanguínea) y se obtuvo el suero pre-inmune por centrifugación a 10000g por 5 min. Una segunda inoculación fue hecha una semana después con 250 µg de DSP mezclada con adyuvante incompleto de Freund. Una tercera y una cuarta inyección fueron hechas con el polipéptido DSP (250 µg) usando hidróxido de aluminio y magnesio como adyuvante. Finalmente, la coneja fue sacrificada y se obtuvo su sangre por punción cardíaca. Entonces, la sangre se mezcló con EDTA 15% en tubos Kendall. El suero inmune se obtuvo por centrifugación a 10000g por 5 min. Este suero inmune se adsorbió primero con suero pre-inmune, y luego con un extracto total de *Escherichia coli*. Brevemente, Se separaron 50 µg de suero pre-inmune por carril a través de 10% SDS-PAGE. Luego, este gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Después de esto, el suero inmune fue incubado por 1 h a temperatura ambiente con esta membrana. Finalmente se recuperó el suero inmune y luego se adsorbió con un extracto total de *E coli*, tal como se describió para el suero pre-inmune. El extracto total de *Escherichia coli* fue utilizado debido a que los conejos presentan a esta bacteria como comensal. Este procedimiento fue llevado a cabo a fin de evitar todas las inmunoglobulinas no específicas presentes en el suero inmune. El suero adsorbido se tituló por Western blot, utilizando DSP pura. Las imágenes de los geles y los Western blots fueron obtenidas con el analizador de imagen Chemi Doc (BioRad), con el software Quantity One (Bio-Rad, California, USA).

### **7.5.3 Desarrollo de la técnica Inmunohistoquímica**

Las secciones se desparafinizaron y las peroxidasas no específicas fueron bloqueadas por 15 min con peróxido de hidrógeno en agua destilada 10%. Las proteínas no específicas se bloquearon con

albúmina sérica bovina 1% por 45 min en cámara húmeda; posteriormente se sometieron a lavados con PBS-Tween.

Las secciones fueron incubadas por 60 min con los anticuerpos primarios anti DSP-UAA de conejo 1:100 y con anti-DSP 1:25 (M-300, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), y posteriormente enjuagadas en solución buffer de fosfatos. Luego se agregó un 2° anticuerpo biotinilado para posteriormente agregar el conjugado estreptavidina- HRP. Las proteínas localizadas por los anticuerpos fueron entonces reveladas con diamino-benzidina la cual forma un precipitado naranja pardo. Las secciones fueron contrateñidas ligeramente con hematoxilina y eosina y montadas con entellan para ser evaluadas al microscopio y así verificar la cantidad de inmunotinción para DSP, ser comparada con los controles y cuantificada con el sistema de análisis de imagen de inmunoreacción.

## 7.6 Hibridación In Situ para Fosfoproteína de Dentina (DPP)

### 7.6.1 Preparación de oligonucleótidos

Se obtuvo una sonda de cDNA correspondiente a DSPP de ratón a través del National Institute of Cranio Facial Research de los EEUU con la finalidad de llevar a cabo la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) y poder así verificar la expresión de DPP en el tejido. Con base en la información de Ogbureke y Fisher, (2004) se sintetizaron los dos oligonucleótidos de fosfoproteína de dentina (DPP) que se describen a continuación:

Oligonucleótido: DPP-1 marcado con fluoresceína Secuencia ( 5´- 3´):

GATGATCCCAATAGCAGTGA OD-260nm: 17.5; 521 µg; 85742 picomoles.

Oligonucleótido: DPP-2 marcado con fluoresceína Secuencia (3´-5´):

TCCCATTGTTACCATTGCCA OD- 260nm: 13.7; 463 µg; 77032 picomoles.

Ambos oligonucleótidos fueron provistos por Alpha DNA de Montreal, Quebec, Canadá.

### 7.6.2 Desarrollo de la técnica de Hibridación In Situ para DPP.

Las secciones de tejido para hibridación con espesor de 5 µm procedentes de cada grupo y cada tiempo fueron desparafinizadas en xileno y alcohol. Después de lavarlas en agua destilada por 5 min se colocaron en buffer de hibridación por toda la noche en una cámara húmeda.

Y posteriormente cada muestra se cubrió con una gota (50 $\mu$ L) de Tris 1M como proteasa y se incubaron a 37°C por 30 min con un cubreobjetos encima, para que una vez transcurrido dicho tiempo se enjuagaran en H<sub>2</sub>O destilada para retirarles el cubreobjetos y ser colocadas en PBS 1x durante 3 min con recambios constantes para luego pasar a H<sub>2</sub>O destilada y posteriormente ser colocadas en citrato de sodio 1mM a 94°C por 10 min en baño maría. Luego se colocaron sobre cada muestra 25  $\mu$ l de solución de hibridación consistente en: dextran sulfato 10%, NaCl 10mM, SDS 0.01%, formamida 30%, polivinilpirrolidona 0.2%, Tris 50mM, Tritón X-100 0.1%, EDTA disódico 5mM, junto con las sondas fluoresceinadas a una concentración final de 1.5  $\mu$ M para ser incubadas a 60°C en cámara húmeda por 15 min.

Una vez retiradas de la cámara húmeda, se pasaron a H<sub>2</sub>O destilada para retirar los cubreobjetos, y luego a buffer de hibridación consistente en: SDS 0.01%, Formamida 20%, NaCl 900 mM y Tris 20 mM, pH 8.0 a temperatura de hibridación por 10 min, después inmersión en agua bidestilada, posteriormente se contra tiñeron con hematoxilina por 30 seg y se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y xileno para después ser montadas con entellan y cubreobjetos y ser secadas al aire, cubiertas para evitar contacto con la luz y después ser almacenadas a 4°C. Para cada grupo se evaluó la señal de hibridación a través de microscopía confocal (Leica, DMI 4000B), utilizando el software LAS AF. Para la evaluación de la señal de hibridación se utilizaron los criterios de Lefmann, (Lefmann y cols., 2006).

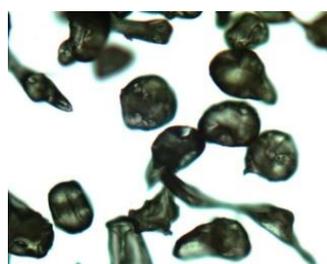
## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Diseño y caracterización del sistema polimérico biodegradable**

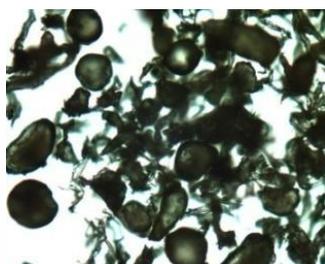
Fue posible diseñar un sistema de liberación controlada de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 mediante la técnica de gelificación iónica por goteo materializando el primero de los objetivos específicos al lograr elaborar tres distintos biopolímeros en los cuales se logró encapsular en micropartículas de alginato de sodio a los morfógenos propuestos, en el primer biopolímero se agregó OP-1, en el segundo la combinación de OP-1 con TGF- $\beta$ 1, y en el tercero de ellos se agregó solamente TGF- $\beta$ 1.

Las características morfológicas de las micropartículas generadas en cada grupo, denotaron una estructura irregular, semiesférica, levemente piriforme y con superficie externa lisa en la vista al

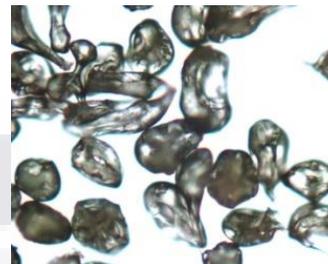
MO, Fig. 20 a, b y c, y en algunos casos con ciertas indentaciones como puede corroborarse en la vista al MEB en la Fig. 20 d; mientras que la morfología interna se observó con una matriz sólida en su gran mayoría, Fig.20 e y f. El tamaño de las micropartículas en promedio antes de la liofilización en el MO estuvo en el rango de 129.20 a 431.06  $\mu\text{m}$ , mientras que después de la liofilización, en el MEB se obtuvo un rango de 120 a 220  $\mu\text{m}$ .



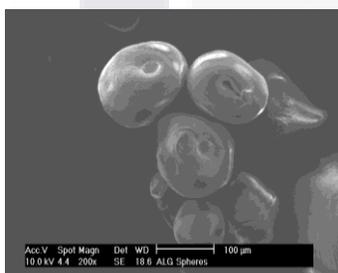
a) Biopolímero 1 (40x)



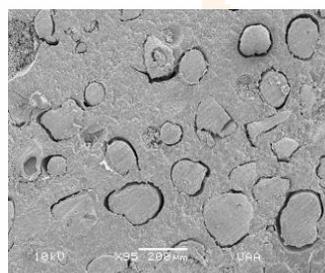
b) Biopolímero 2 (40x)



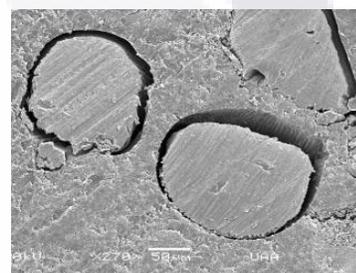
c) Biopolímero 3 (40x)



d) Morfología externa



e) Morfología interna



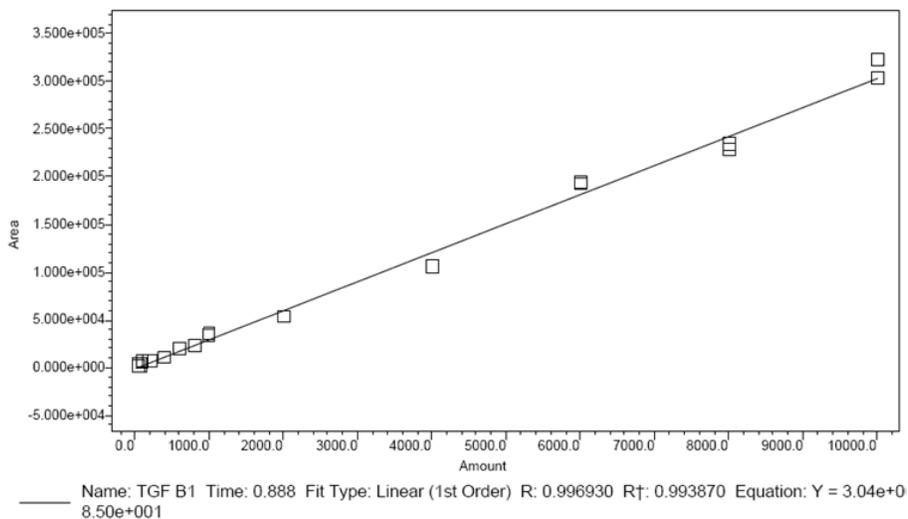
f) Morfología interna

**Fig. 20. Características morfológicas de las micropartículas de alginato de sodio conteniendo los morfógenos, a), b) y c) Microscopía óptica. d), e) y f) Microscopía electrónica de barrido.**

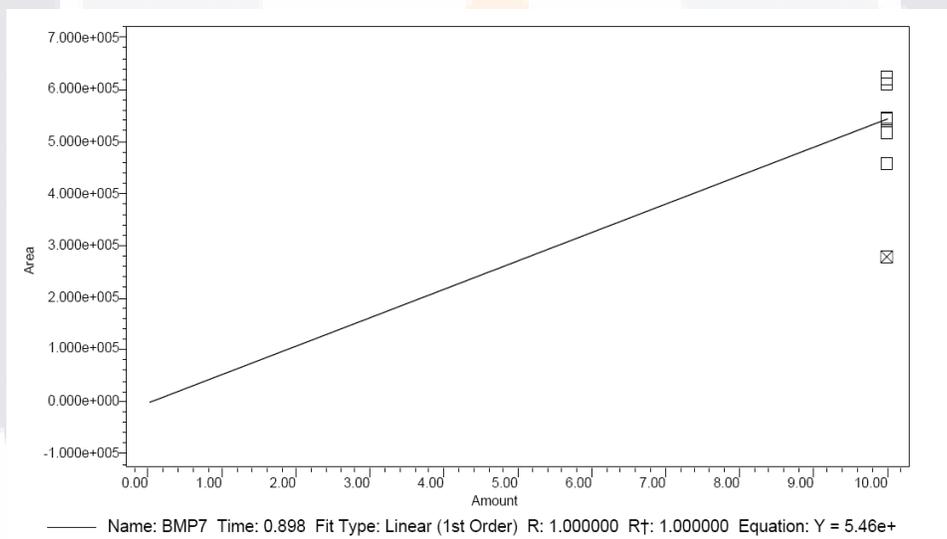
### 8.1.1 Validación del método de detección por HPLC-UV

Se llevó a cabo la validación de un método analítico para bajas concentraciones de TGF- $\beta$ 1 y OP-1 a través de HPLC-UV, estableciendo las condiciones para la detección de ambas proteínas utilizando a la albúmina sérica bovina (ASB) como estándar.

Las Fig. 21 y 22 muestran las curvas de calibración para ambos morfógenos.



**Fig. 21. Curva de calibración para TGF-β1, método isocrático, 254 y 280 nm.**



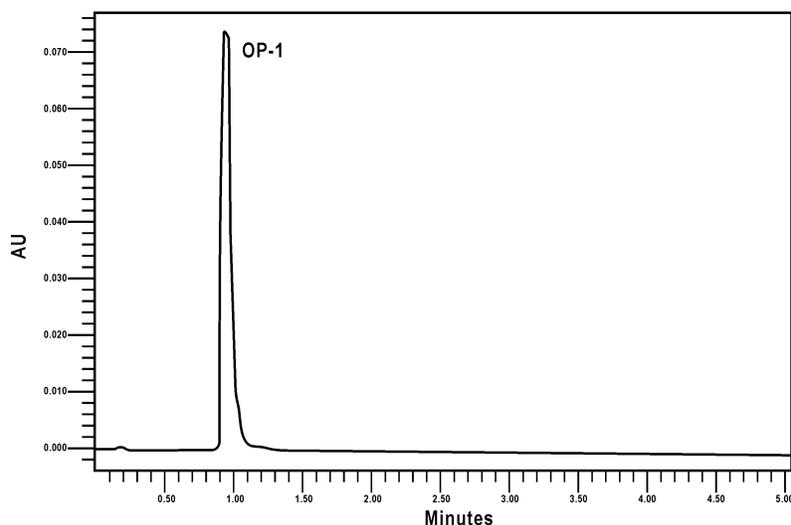
**Fig. 22. OP-1, método de cálculo con factor de respuesta a un punto fijo; método isocrático, 260 nm.**

Las condiciones para HPLC-UV que se establecieron para cada una de las proteínas se muestran en la tabla 4.

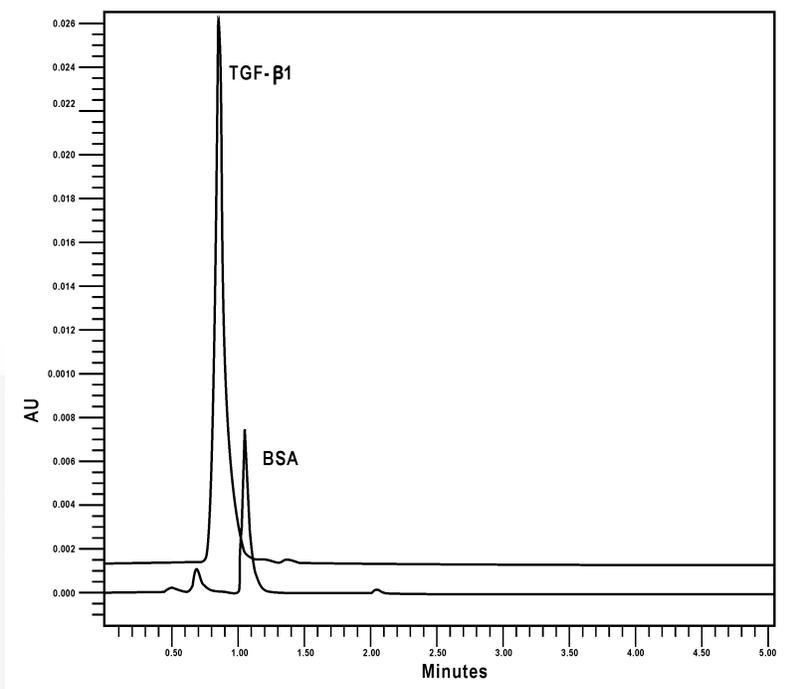
**Tabla 4. Condiciones para HPLC-UV establecidas para ASB, OP-1 y TGF- $\beta$ 1.**

CONDICIONES	PROTEINA		
	ASB (estándar)	OP-1	TGF- $\beta$ 1
Fase móvil	ASB (estándar)	OP-1	TGF- $\beta$ 1
Acetonitrilo	40 %	100 %	40 %
Ac. trifluoracético	60 %		60 %
Absorbancia	280 nm	260 nm	280/254 nm

En la Fig. 23 se muestra un cromatograma del método por HPLC-UV para la detección de OP-1; mientras que en la Fig. 24 se muestra la separación de TGF- $\beta$ 1 y albúmina sérica bovina (ASB) con sus respectivas condiciones.



**Fig. 23. Cromatograma típico del método para la cuantificación de OP-1, Columna: 2.1 x 75 mm x 3.5  $\mu$ m; Fase estacionaria: Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>; Fase Móvil: acetonitrilo 100%; flujo: 1 mL/min; detección: fluorescencia 260 nm; temperatura: ambiente.**



**Fig. 24. Cromatograma típico del método para la cuantificación de TGF-β1 y BSA, Columna: 2.1 x 75 mm x 3.5 μm; Fase estacionaria: Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>; Fase Móvil: acetonitrilo 40%, ac. trifluoroacético 60%; flujo: 1 ml/min; detección: fluorescencia 254/280 nm; temperatura: ambiente.**

### 8.1.2 Caracterización de la prueba de liberación

Los resultados del análisis por HPLC-UV del acumulado de la liberación de los morfógenos a partir de los tres biopolímeros en los intervalos propuestos desde 1 hasta 168 horas se muestran en las figs. 25 y 26.

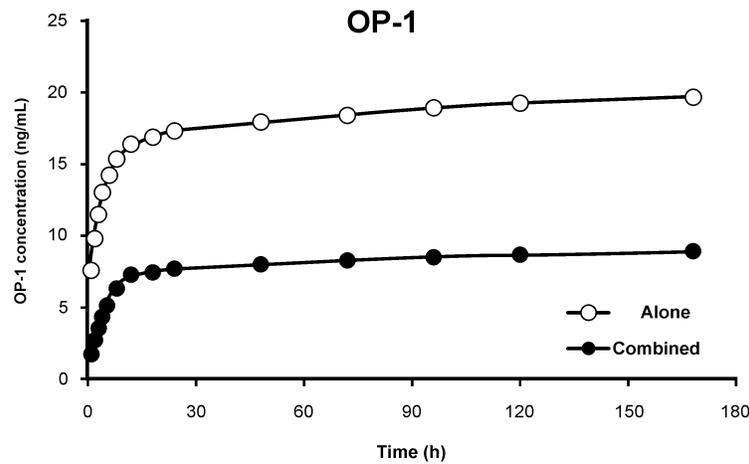


Fig. 25. Cromatograma que muestra el acumulado de la liberación de OP-1 a partir de los biopolímeros de los grupos 1 (Sola) y 2 (Combinado)

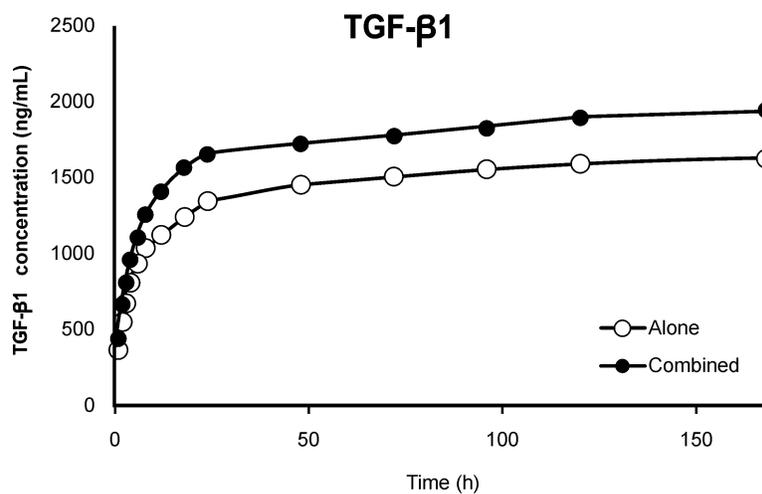


Fig. 26. Cromatograma que muestra el acumulado de la liberación de TGF-β1 a partir de los polímeros de los grupos 3 (Sala) y 2 (Combinada)

## 8.2 Técnica Histológica

Se destinaron cinco portaobjetos con tres muestras adheridas a cada uno, procedentes de cada uno de los seis molares de cada grupo y de cada tiempo y tras ser sometidos a tinción con hematoxilina y eosina de Harris, fueron observados al microscopio óptico (Motic B5, DMB series), a

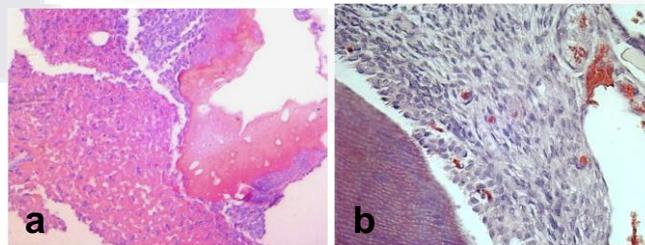
distintas magnificaciones para posteriormente realizar la captura de imágenes con la ayuda del software Images Advance 3.0 (Motic Instruments, Northbrook, IL, USA); y así llevar a cabo la evaluación de las condiciones histológicas en el tejido pulpar en la zona de la exposición pulpar y sus áreas adyacentes.

### 8.2.1 Resultados del análisis histológico

#### Grupo 1 (OP-1 sin encapsular)

Las muestras procedentes del grupo 1, a 14 días mostraron la presencia de puentes dentinarios caracterizados por una estructura conformada por material calcificado irregular con defectos de tipo túnel, y desde el punto de vista celular a nivel pulpar se notó moderado infiltrado inflamatorio con predominancia de neutrófilos, principalmente mayor condensación de células inflamatorias hacia las áreas periféricas y una matriz con acidofilia marcada; como puede notarse en la fig. 27a. Catalogándose mayoritariamente con grado 2 de la clasificación de Hu, al mostrar reparación incompleta con tejido mineralizado adyacente al sitio de la exposición pulpar.

En las muestras del grupo 1, consistentemente con el período de 14 días, en el de 28 días se logró observar reparación incompleta con tejido mineralizado defectuoso, con más apariencia de fibrodentina. A 28 días se logró ver más organizado el tejido pulpar adyacente al área del daño, mostrando fibroblastos jóvenes, una matriz escasa y un aumento en la capilaridad en las áreas periféricas, aunque sin mostrar infiltrado celular inflamatorio (fig. 27 b).

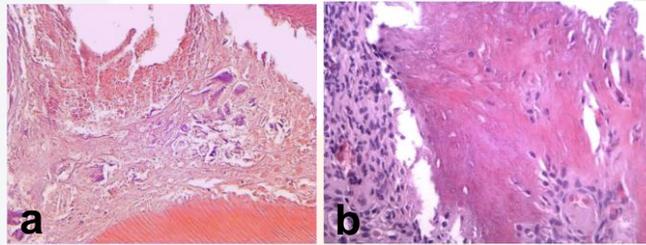


**Fig. 27** Fotomicrografía que muestra cortes de molar de rata con exposición pulpar y recubrimiento pulpar directo con OP-1 sin biopolímero; Grupo 1. a) Pulpa adyacente a la exposición, 14 días; b) Período de 28 días, 400x; Hematoxilina y Eosina.

**Grupo 2 (Biopolímero + OP-1)**

En las muestras del primer período se observaron puentes dentinarios irregulares con inclusiones celulares, la mayoría en grado 3, caracterizados por barrera de tejido fibroso adyacente al sitio de exposición, mientras que el tejido pulpar mostró infiltrado inflamatorio crónico caracterizado por linfocitos, además de una angiogénesis reactiva periférica (fig. 28 a).

En las muestras del segundo período se notó una baja calidad en la estructura de los puentes dentinarios que se formaron, con un alto contenido fibrilar y una importante presencia de detritus del material de recubrimiento, impactados en la pulpa subyacente a la zona de la exposición (fig. 28 b).

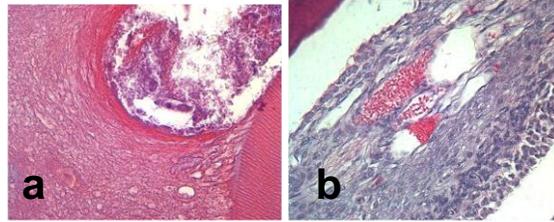


**Fig. 28 Fotomicrografía que muestra cortes de molar de rata del grupo 2 con exposición pulpar y recubrimiento pulpar directo con Biopolímero + OP-1; a) Período de 14 días; b) Período de 28 días, 400x; Hematoxilina y Eosina.**

**Grupo 3 (Biopolímero + OP-1 + TGF-β1)**

En las muestras del período de 14 días se logró observar puentes dentinarios que aunque mostraron ser delgados se evidenciaron con un material de mejor calidad, correspondiéndose con los grados 4 y 5, con formación completa de puente dentinario con mineralización total o con mineralización parcial; y a nivel pulpar se notó una eosinofilia granular (fig. 29 a).

En el período de los 28 días además de los puentes dentinarios con una mayor organización se observó a nivel pulpar ausencia de infiltrado celular inflamatorio, notándose un tejido con una alta celularidad conformada por fibroblastos jóvenes, así como una vascularización notable, en términos de presencia de capilares y vasos grandes, denotando un tejido sano (fig. 29 b).

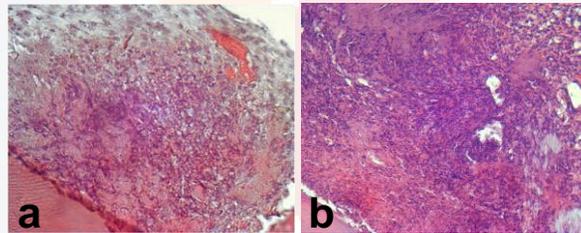


**Fig. 29** Fotomicrografía que muestra cortes de molar de rata con exposición pulpar y recubrimiento pulpar directo con Biopolímero + OP-1 + TGFβ1; Grupo 3. a) Pulpa adyacente a la exposición, 14 días; b) Período de 28 días, 400x; Hematoxilina y Eosina.

**Grupo 4 (Biopolímero + TGF-β1)**

El primer período denotó puentes de dentina irregular con un muy concentrado infiltrado celular inflamatorio por debajo del tejido reparativo formado, que se correspondió a un grado 1 ó 2 caracterizado por reparación incompleta con tejido mineralizado adyacente al sitio o solo con formación de tejido fibroso respectivamente. (fig. 30 a).

Mientras que en el segundo período fue notoria la presencia de un abundante infiltrado inflamatorio crónico localizado en la zona aledaña al puente dentinario con un marcado conglomerado eosinofílico (fig. 30 b).

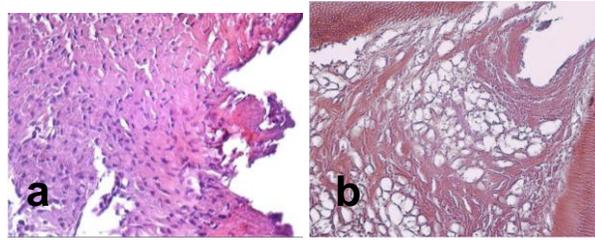


**Fig. 30** Fotomicrografía del grupo 4 que muestra cortes de molar de rata con exposición pulpar y recubrimiento pulpar directo con Biopolímero + TGFβ1. a) pulpa adyacente a la exposición, 14 días; b) Período de 28 días, 400x. Hematoxilina y Eosina.

**Grupo 5 (TGF-β1 sin encapsular)**

En las muestras del período de 14 días se notó la presencia de puentes de dentina irregular de grosor variable de aspecto rugoso, con un tejido pulpar de aspecto fibroso denso con fibroblastos maduros de aspecto irregular (fig 31 a).

En el período de 28 días fue posible observar puentes de dentina organizados en la zona superficial con espacios conformados por matriz amorfa (fig. 31 b).

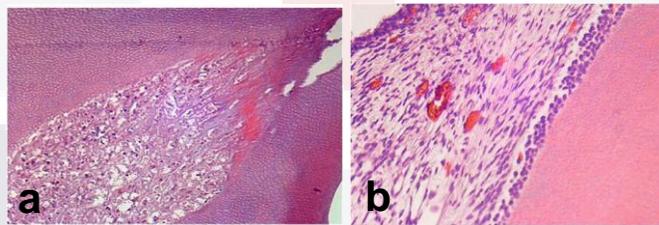


**Fig. 31. Fotomicrografías del Grupo 5 que muestra cortes de molar de rata con exposición pulpar y recubrimiento pulpar directo con TGFβ1 sin biopolímero; a) Pulpa adyacente a la exposición, 14 días; b) Período de 28 días, 400x; Hematoxilina y Eosina.**

**Grupo 6 Control Positivo (Cavidad sin exposición pulpar)**

Dado que no se expuso la pulpa una vez hecha la cavidad, solo se estimuló el proceso reparativo observándose una capa de dentina reaccionaria en la forma de un tejido calcificado de aspecto irregular con material eosinofílico, y una pulpa con vascularización reactiva por debajo de la zona de la cavidad con un infiltrado inflamatorio crónico difuso en las muestras del primer período (fig. 32 a)

En las muestras del 2° período se logró observar tejidos normales en términos de celularidad y vascularización, en donde se habría resuelto el proceso inflamatorio que se presentó inicialmente (fig. 32 b).

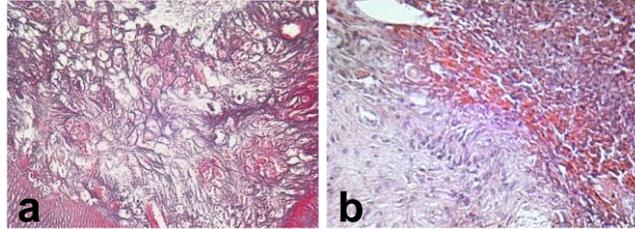


**Fig. 32. Fotomicrografías del Grupo 6: Control Positivo. a) Pulpa adyacente al fondo de la cavidad, 14 días; b) Período de 28 días, 400x; Hematoxilina y Eosina.**

**Grupo 7 Control Negativo (Cavidad con pulpa expuesta)**

En las muestras del período de 14 días se observó un conglomerado inflamatorio de moderado a severo predominantemente de tipo agudo en una pulpa con aspecto granular con zonas inmaduras principalmente hacia el centro por debajo del área expuesta, con material calcificado impactado en la zona más superficial (fig. 33a). En las muestras de 28 días se apreció mayor infiltrado

inflamatorio, la pulpa con un patrón fibrilar en la zona subyacente al tejido más expuesto y en este la presencia de tejido de granulación, muy seguramente granulomatoso, mostrando un cuadro típico de pulpitis crónica con tendencia a necrosis pulpar (fig. 33 b).

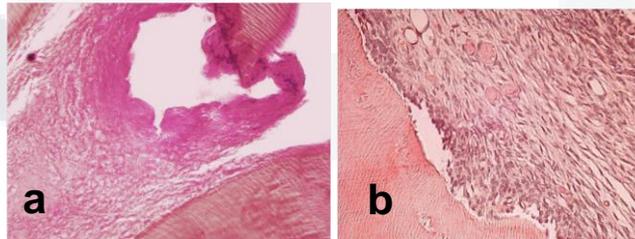


**Fig. 33. Fotomicrografías del Grupo 7 Control Negativo; Cavidad con exposición pulpar: a) Pulpa adyacente a la exposición, 14 días, 400x; b) Período de 28 días, 400x. Teñidas con Hematoxilina y Eosina.**

**Grupo 8 2° Control Positivo (Hidróxido de Calcio)**

En el período de 14 días se notó la presencia de puentes dentinarios, de naturaleza fibrosa predominantemente, correspondiéndose al grado 3, como barrera de tejido fibroso adyacente al sitio de exposición, mientras que la pulpa se notó con infiltrado inflamatorio de tipo crónico, predominantemente, localizado, aledaño a la zona de exposición (fig. 34 a).

En las muestras de 28 días se pudo apreciar una gran cantidad de detritus de aspecto calcificado, al parecer dentina impactada en la pulpa; misma que presentaba una vascularización muy acentuada. Los puentes formados se notaron muy irregulares, gruesos pero de aspecto granular (fig. 34b).



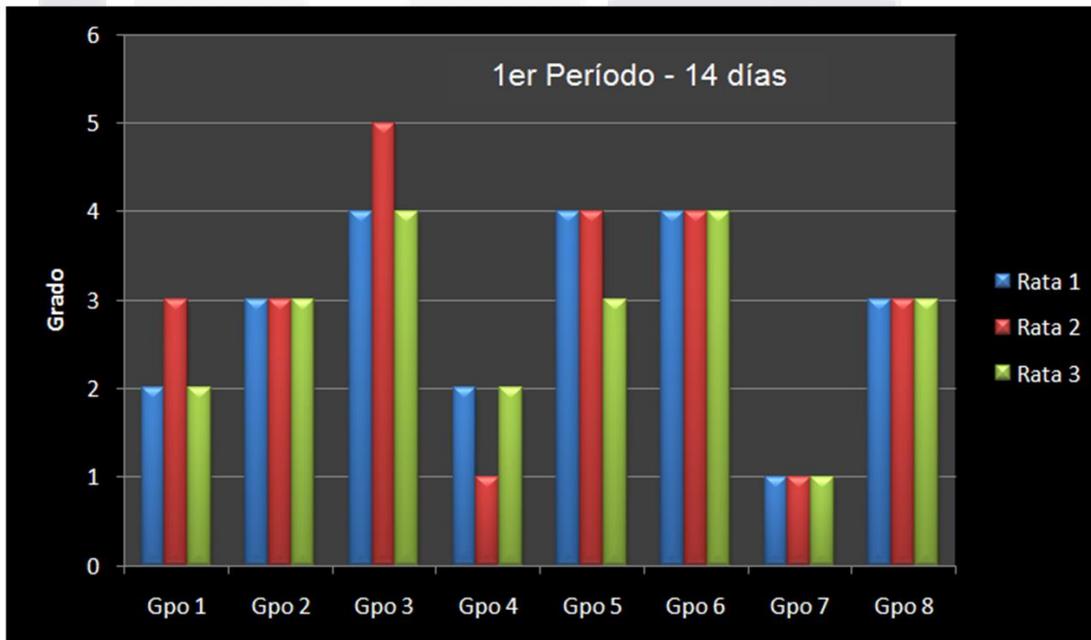
**Fig. 34. Fotomicrografía que muestra cortes de molar de rata con exposición pulpar y recubrimiento pulpar directo con Hidróxido de Calcio, Grupo 8; a) Pulpa adyacente a la exposición, 14 días; b) Período de 28 días, 400x. Hematoxilina y Eosina.**

En las gráficas 1 y 2 se ilustra el grado alcanzado en la evaluación de la formación de tejido duro por cada una de las muestras de los ocho grupos en los dos períodos, tanto a 14 como a 28 días

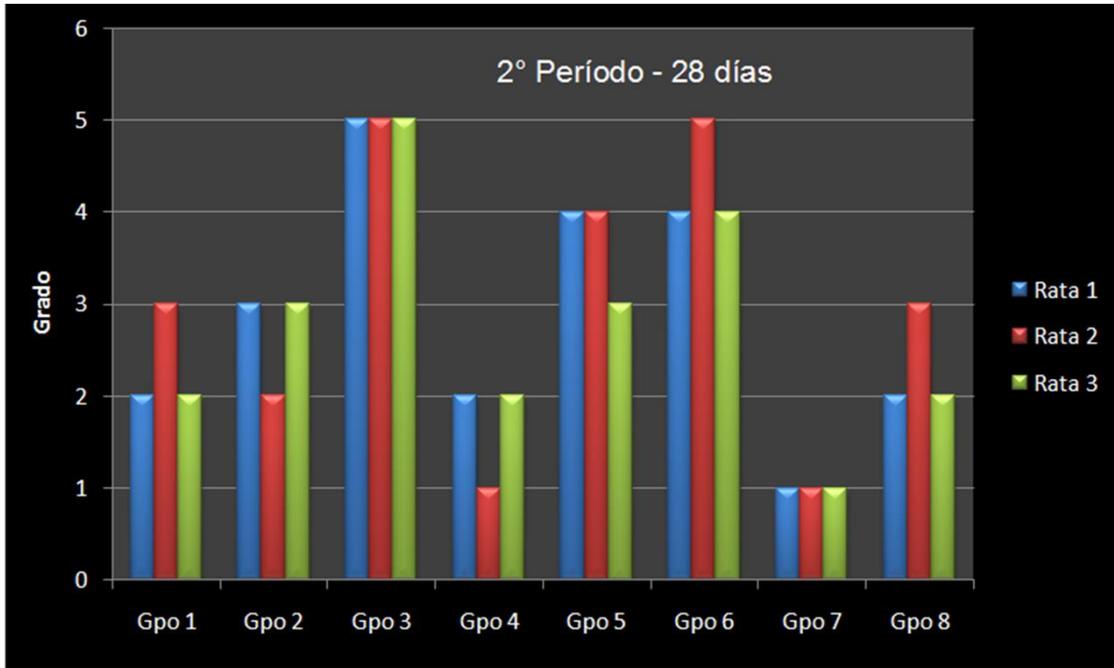
haciendo uso de los criterios de evaluación siguientes, siendo conducida la evaluación por parte de dos observadores independientes a doble ciego.

**EVALUACIÓN DE TEJIDO DURO**

- Grado 1 Reparación incompleta solo con formación de tejido fibroso.
- Grado 2 Reparación incompleta con tejido mineralizado adyacente al sitio.
- Grado 3 Barrera de tejido fibroso adyacente al sitio de exposición
- Grado 4 Formación completa de puente dentinario con mineralización parcial
- Grado 5 Formación completa de puente dentinario con mineralización total.



Gráfica 1. Se muestra el resultado de la evaluación de tejido duro correspondiente a los molares de las tres ratas de cada grupo sacrificadas a los 14 días

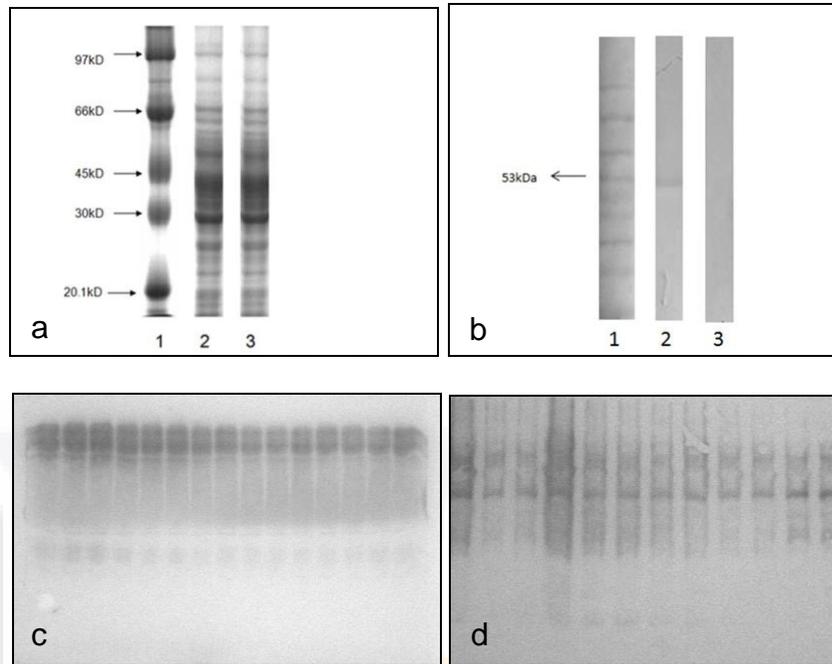


Gráfica 2. Se muestra el resultado de la evaluación de tejido duro correspondiente a los molares de las tres ratas de cada grupo sacrificadas a los 28 días

### 8.3 Técnica Inmunohistoquímica

#### 8.3.1 Extracción y purificación de DSP y elaboración de anticuerpos específicos.

Basados en la metodología propuesta en el presente trabajo se presenta en la figura 35 a) el resultado de la cromatografía en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% para el extracto total de proteínas dentales de rata. Se muestra también en b) el resultado del Western blot para la purificación de la proteína DSP reconocida con un anticuerpo anti DSPP de ratón. En c) se muestra el resultado de la purificación de anticuerpos por el método de adsorción con suero preinmune. En d) se observa el resultado de la purificación de anticuerpos por el método de adsorción con extracto total de *E. coli*.



**Fig. 35.** a) SDS-PAGE 10%. 1) MPM: marcadores de peso molecular; 2) y 3) Extracto total de proteínas dentales de rata. b) Western blot. 1) MPM; 2) Anticuerpo; 3) Control Negativo. c) y d) SDS PAGE 10% y Western blot, transferencia revelada con DAB de la adsorción del anticuerpo realizada con *E. coli*.

### 8.3.2 Técnica inmunohistoquímica. Resultados del análisis

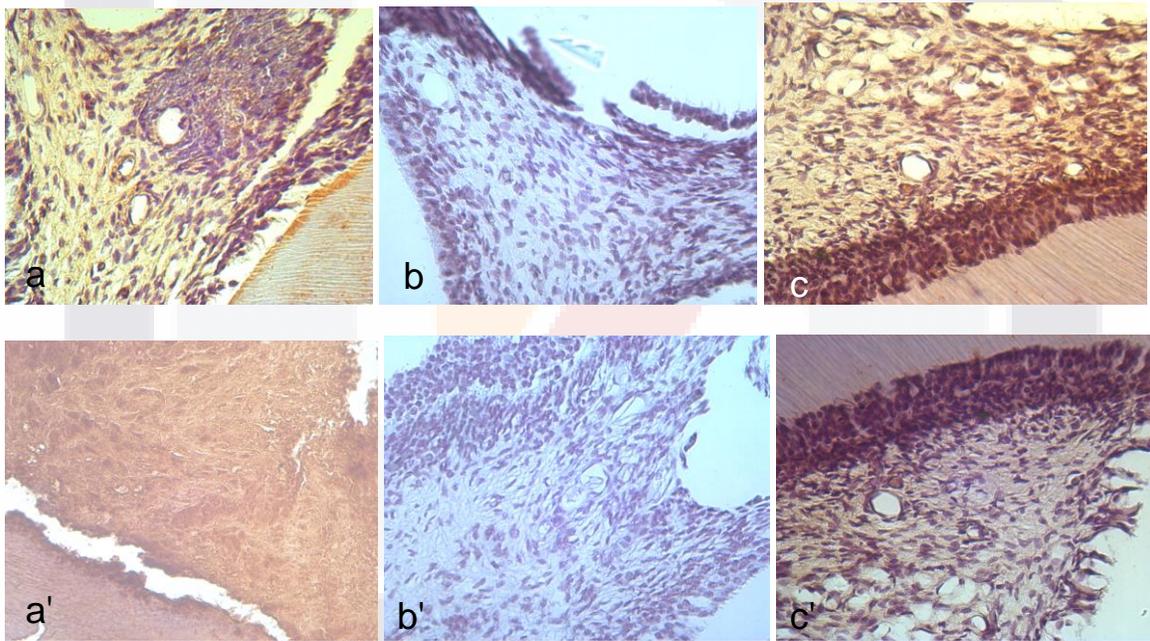
Se recuperaron un promedio de 10 a 12 portaobjetos con tres muestras cada uno procedentes de cada uno de los molares de cada grupo y de cada período y tras ser sometidos a la técnica inmunohistoquímica con dos diferentes anticuerpos anti-DSP, el preparado como parte del diseño experimental (UAA) y un anticuerpo anti-DSP comercial (M-300, Santa Cruz Biotechnology) fueron observados al microscopio óptico (Motic B5, DMB series), a distintas magnificaciones para posteriormente realizar la captura de imágenes con la ayuda del software Images Advance 3.0 (Motic Instruments, Northbrook, IL, USA); para ser evaluadas por dos observadores independientes a doble ciego, con base en los parámetros mostrados en la tabla 5.

**Tabla 5. Criterios de evaluación para la intensidad de inmunomarcaje de DSP**

Técnica Inmunohistoquímica	Valor	Significado
Intensidad de inmunotinción	1	Fuerte: >50%
	2	Moderado: 20-50%
	3	Débil: <20%
	4	Negativo: 0%

En base a las imágenes conseguidas se puede notar un marcaje positivo con ambos anticuerpos en el tejido pulpar en la zona próxima al área donde se efectuó la exposición pulpar, principalmente en la zona de odontoblastos o neo-odontoblastos y por debajo de la misma, es posible notar un reconocimiento muy acentuado en el caso del anti-DSP **UAA** que fue usado en una concentración de 1: 100, mientras que el anti-DSP **M-300** se utilizó con una concentración de 1:25, se logra notar un inmunomarcaje de este último sobre la estirpe odontoblástica, dado que el anti-DSP **UAA** genera un reconocimiento más extendido, muy probablemente sobre elementos celulares provenientes de la capa de Höhl.

En las fig. 8.11 a 8.18 se puede apreciar la inmuno-reactividad correspondiente a ambos anti-DSP y la imagen de los controles en los ocho grupos de estudio.



**Fig. 36** Inmunotinción en muestras del Grupo 1, recubrimiento pulpar directo con OP-1 sin biopolímero; (a) anti-DSP UAA, a 14 días y en (a') a 28 días; (b) y (b') controles, (c) anti-DSP M-300 en período de 14 días y en (c') en período de 28 días; todas a 400x.

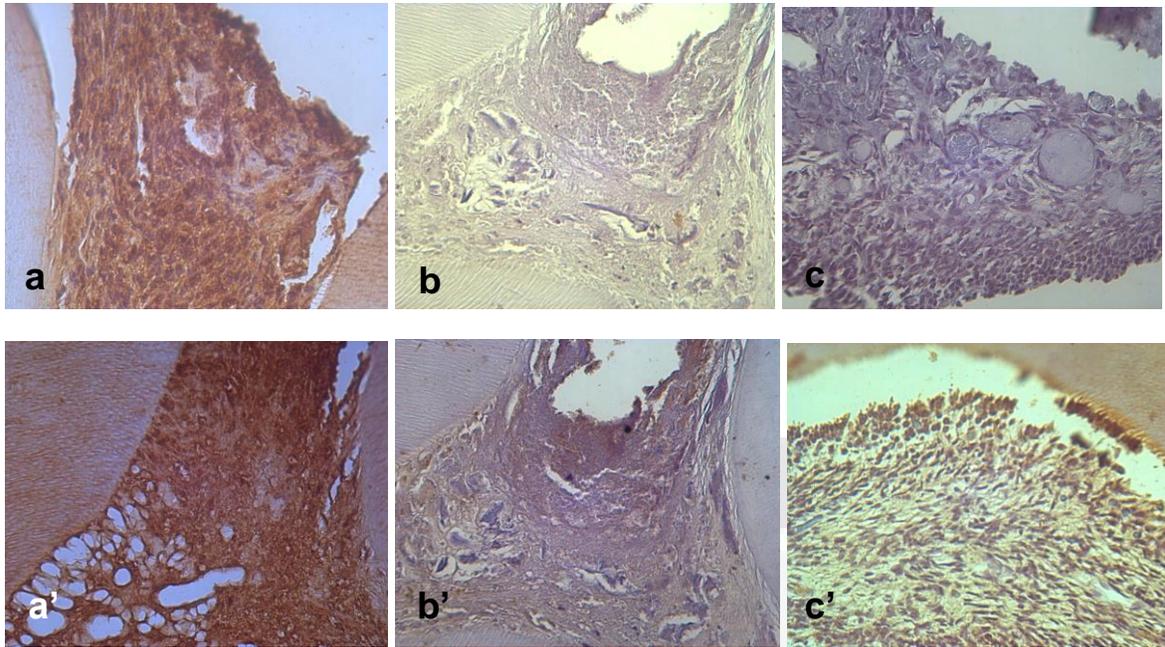


Fig. 37. Inmunotinción en muestras del grupo 2, recubrimiento pulpar directo con biopolímero + OP-1; (a) anti-DSP UAA, a 14 días y en (a') a 28 días; (b) y (b') controles, (c) anti-DSP M-300 en período de 14 días y en (c') en período de 28 días; todas a 400x.

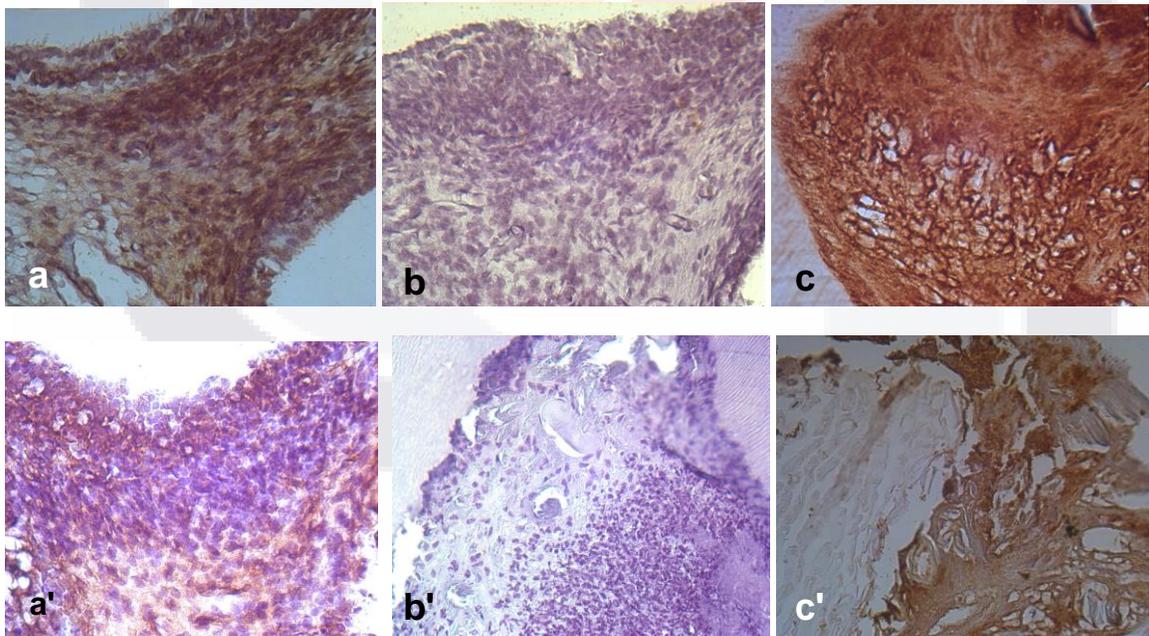
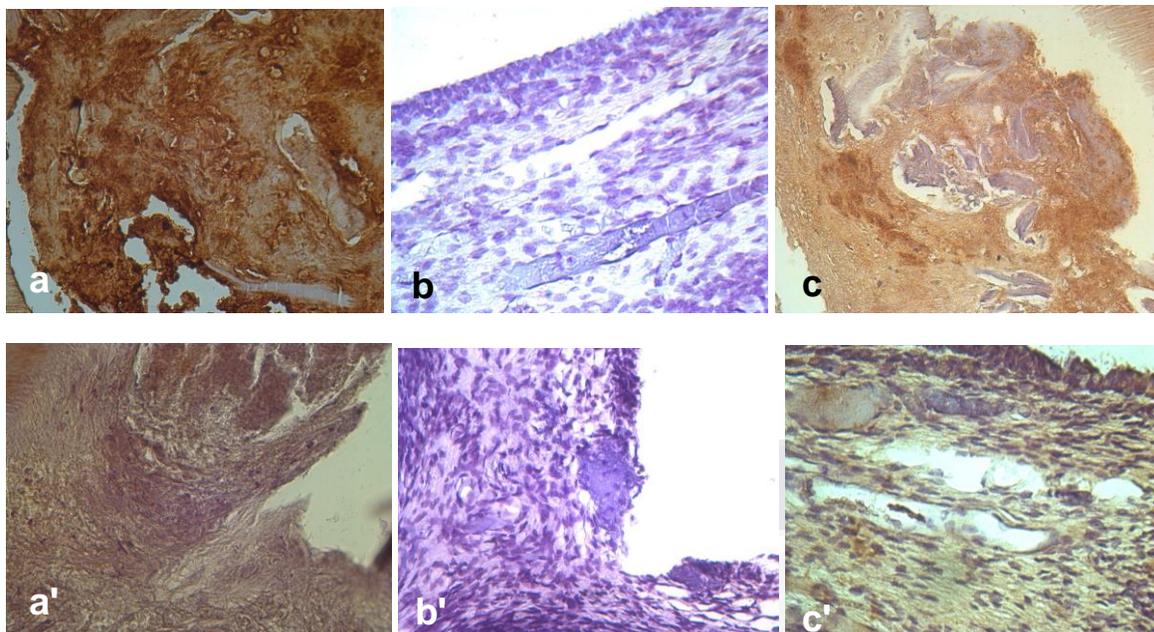
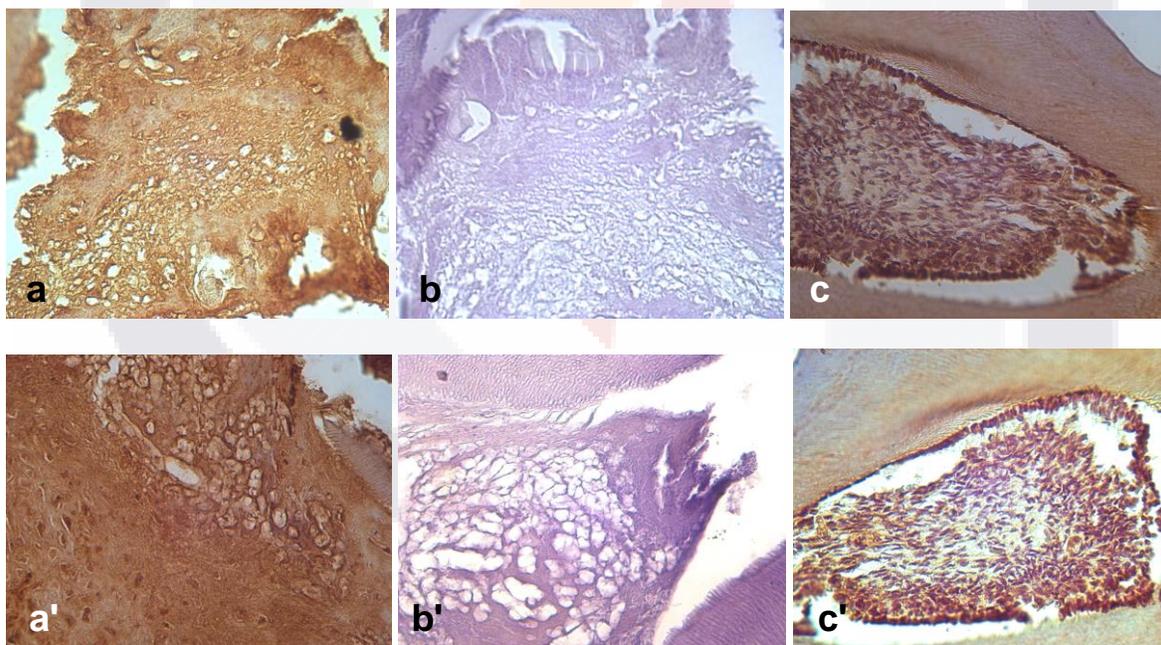


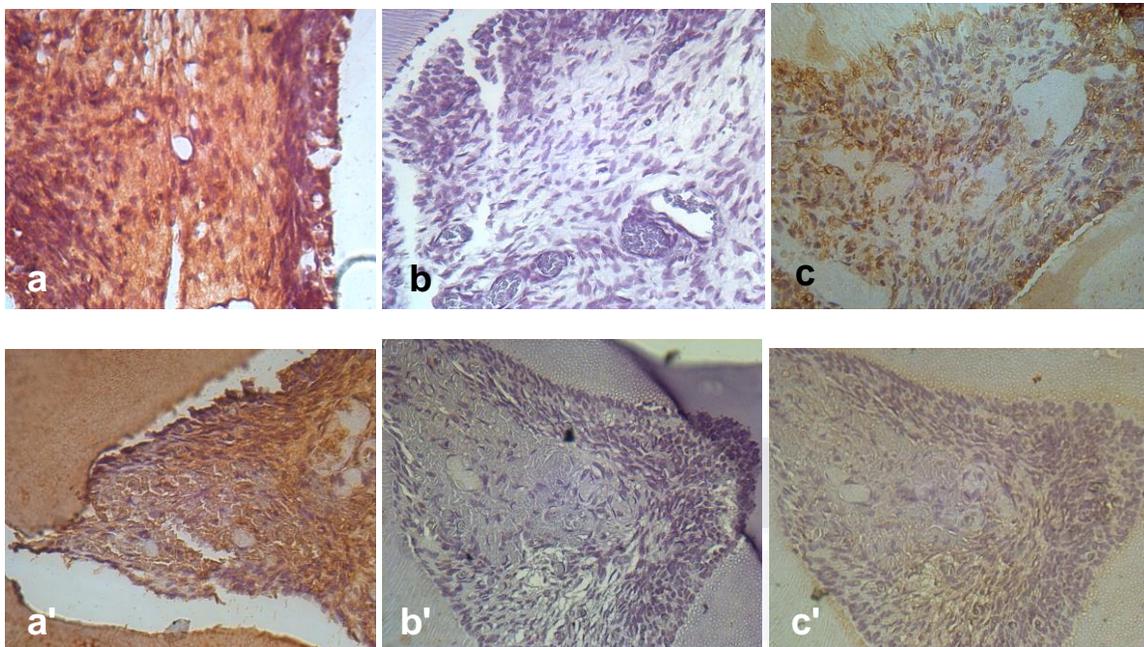
Fig. 38 Inmunotinción en muestras del Grupo 3, biopolímero + OP-1 + TGF- $\beta$ 1; (a) anti-DSP UAA, a 14 días y en (a') a 28 días; (b) y (b') controles, (c) anti-DSP M-300 en período de 14 días y en (c') en período de 28 días; todas a 400x.



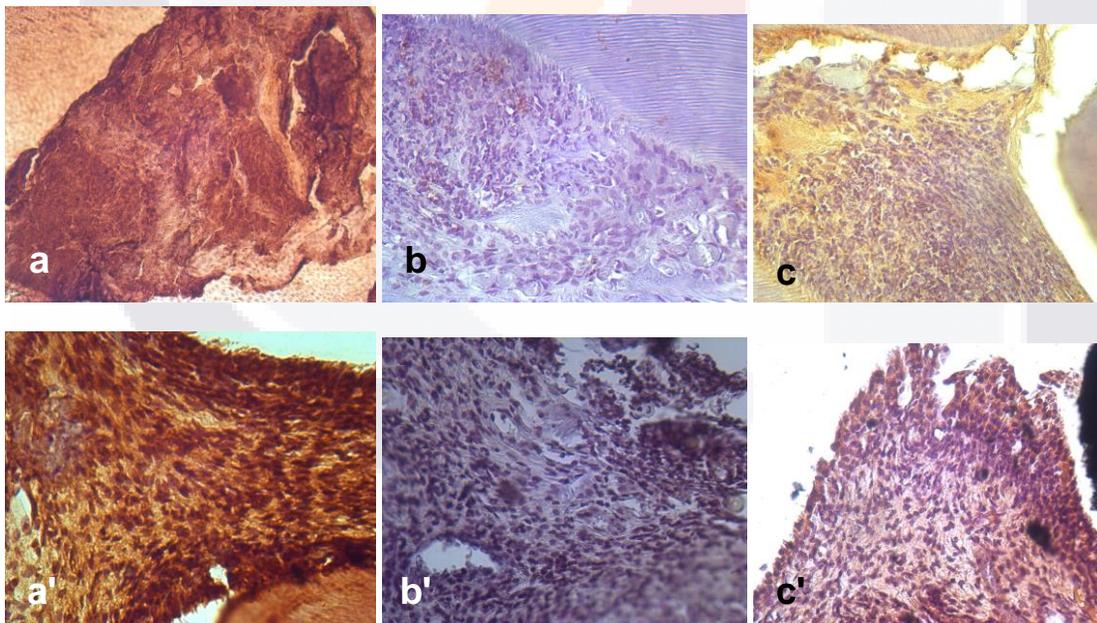
**Fig. 39.** Inmunotinción en muestras del grupo 4, biopolímero + TGF- $\beta$ 1; (a) anti-DSP UAA, a 14 días y en (a') a 28 días; (b) y (b') controles, (c) anti-DSP M-300 en período de 14 días y en (c') en período de 28 días; todas a 400x.



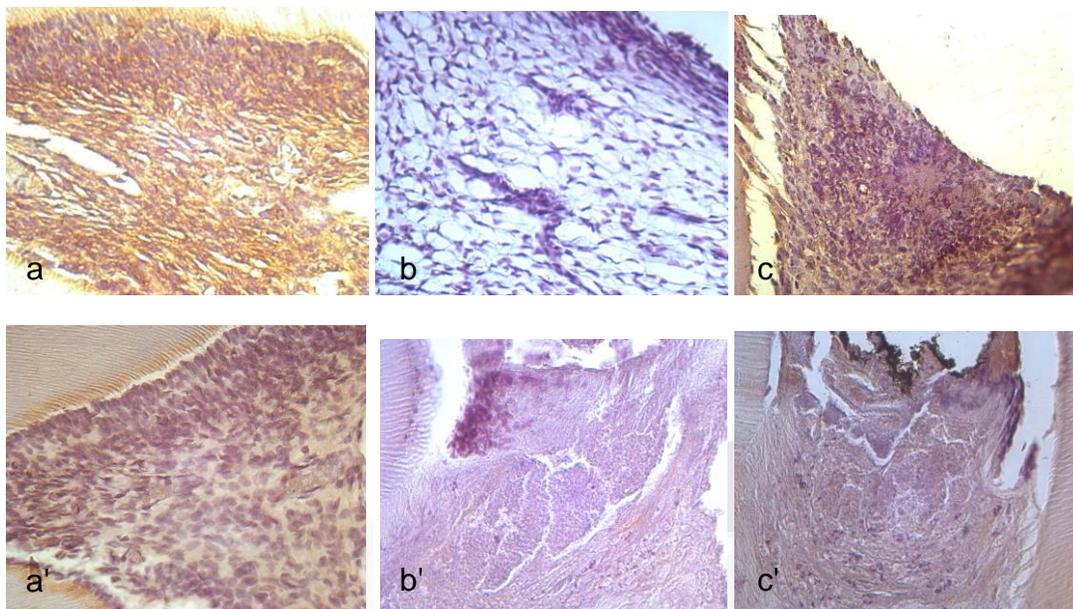
**Fig. 40.** Inmunotinción en muestras del Grupo 5, TGF- $\beta$ 1 sin biopolímero; (a) anti-DSP UAA, a 14 días y en (a') a 28 días; (b) y (b') controles, (c) anti-DSP M-300 en período de 14 días y en (c') en período de 28 días; todas a 400x.



**Fig.41.** Inmunotinción en muestras del Grupo 6, Control positivo, cavidad sin exposición pulpar; (a) anti-DSP UAA, a 14 días y en (a') a 28 días; (b) y (b') controles, (c) anti-DSP M-300 en período de 14 días y en (c') en período de 28 días; todas a 400x.



**Fig. 42.** Inmunotinción en muestras del grupo 7, Control negativo, cavidad con exposición pulpar; (a) anti-DSP UAA, a 14 días y en (a') a 28 días; (b) y (b') controles, (c) anti-DSP M-300 en período de 14 días y en (c') en período de 28 días; todas a 400x.



**Fig. 43.** Inmunotinción en muestras del grupo 8, Hidróxido de calcio como 2° control positivo, ; (a) anti-DSP UAA, a 14 días y en (a') a 28 días; (b) y (b') controles, (c) anti-DSP M-300 en período de 14 días y en (c') en período de 28 días; todas a 400x.

### Hibridación In Situ para DPP

En cuanto a la hibridación in situ fluorescente en el plazo de 14 días los grupos con morfógenos no encapsulados, mostraron una señal claramente visible tanto para OP-1 como para TGF- $\beta$ 1, mientras que el mejor resultado fue logrado por el grupo con una combinación de factores de crecimiento, asociados al biopolímero, con una señal de hibridación muy fuerte seguido por el grupo del biopolímero con OP-1 con señal claramente visible y el grupo del biopolímero con TGF- $\beta$ 1 con una señal ligeramente por encima de la fluorescencia basal. El grupo de hidróxido de calcio mostró una señal de hibridación claramente visible. En La tabla 6 se muestran los resultados obtenidos por cada grupo en términos de intensidad de la señal de hibridación en el plazo de 14 días y en las figura 42 a 47 se muestran ejemplos de la señal de hibridación para la DPP en los grupos de experimentación 1 a 5, y los grupos control en ambos períodos de prueba por medio de microscopía confocal.

El período de 28 días mostró una diferencia muy marcada con respecto al período de 14 días en función de una señal de hibridación muy fuerte para el grupo con la combinación de morfógenos y

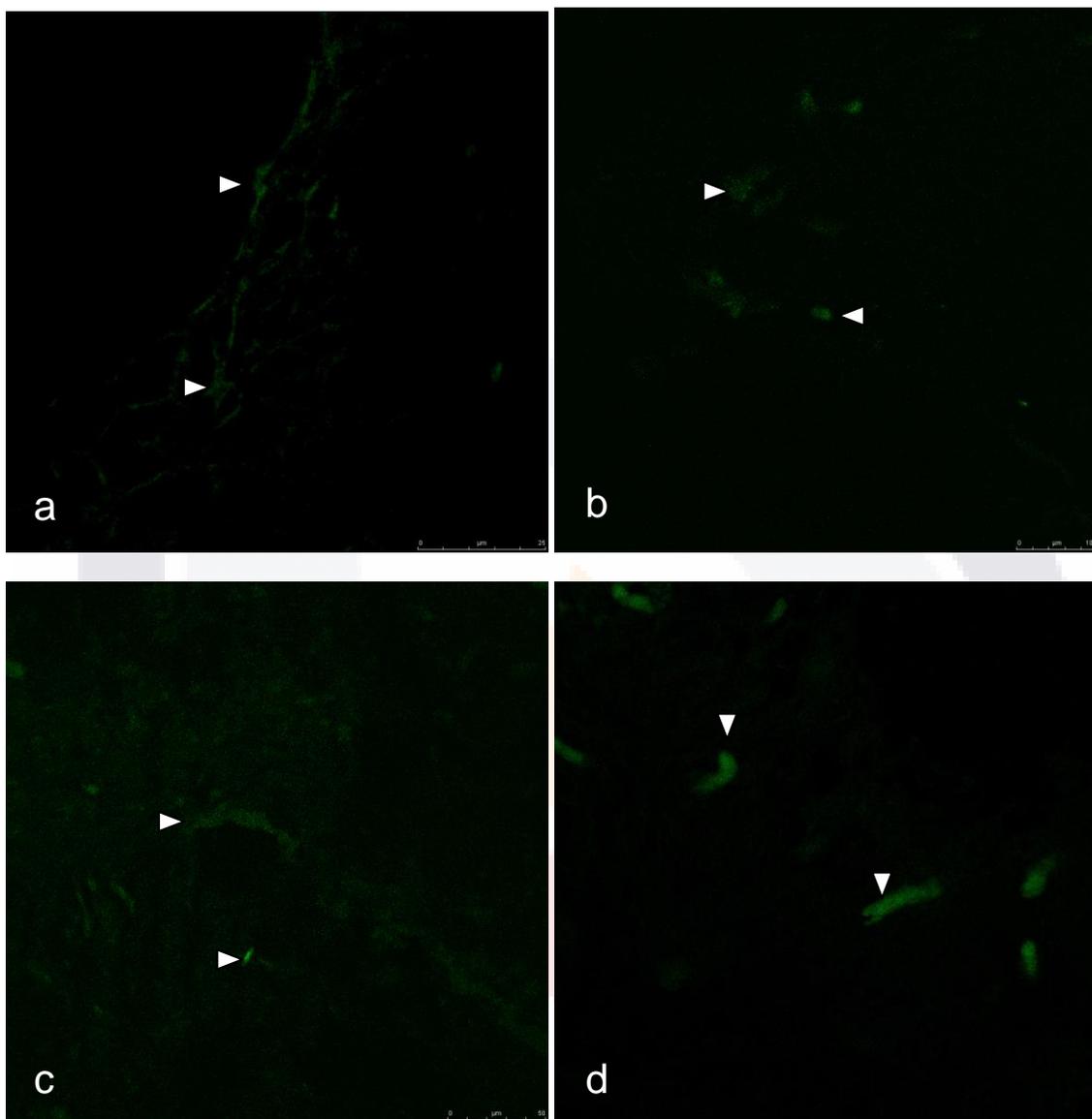
una señal fuerte para el grupo de biopolímero + OP-1 y biopolímero + TGF-β1, mientras que para el grupo con OP-1 sin encapsular, la señal era claramente visible y solo ligeramente por encima de la fluorescencia basal para el grupo de TGF-β1 sin encapsular, el grupo de hidróxido de calcio mostró señal de hibridación muy fuerte en contraste con el período de 14 días .

La tabla 6 muestra los resultados de los distintos grupos en el período de 28 días y en las figuras 44 a 47 se muestran ejemplos de la señal de hibridación de los grupos de prueba y el grupo de hidróxido de calcio en el período de prueba a 28 días..

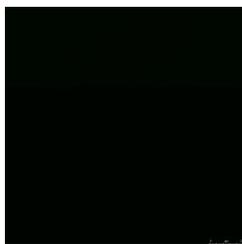
**Tabla 6. Se muestran los resultados relativos a la señal de hibridación de las sondas fluoresceinadas en los ocho grupos con sus dos distintos períodos, así como en sus controles según los criterios de Lefmann (Lefmann, 2006).**

Grupo / Período	Sonda - [1.5μM]	Resultado	Control
1/14 Días	DPP 1+2	+	n
1/28 Días	DPP 1+2	+	n
2/14 Días	DPP 1+2	+	n
2/28 Días	DPP 1+2	++	n
3/14 Días	DPP 1+2	+++	n
3/28 Días	DPP 1+2	+++	n
4/14 Días	DPP 1+2	(+)	n
4/28 Días	DPP 1+2	++	n
5/14 Días	DPP 1+2	n	n
5/28 Días	DPP 1+2	(+)	n
6/14 Días	DPP 1+2	+	n
6/28 Días	DPP 1+2	++	n
7/14 Días	DPP 1+2	(+)	n
7/28 Días	DPP 1+2	(+)	n
8/14 Días	DPP 1+2	+	n
8/28 Días	DPP 1+2	+++	n

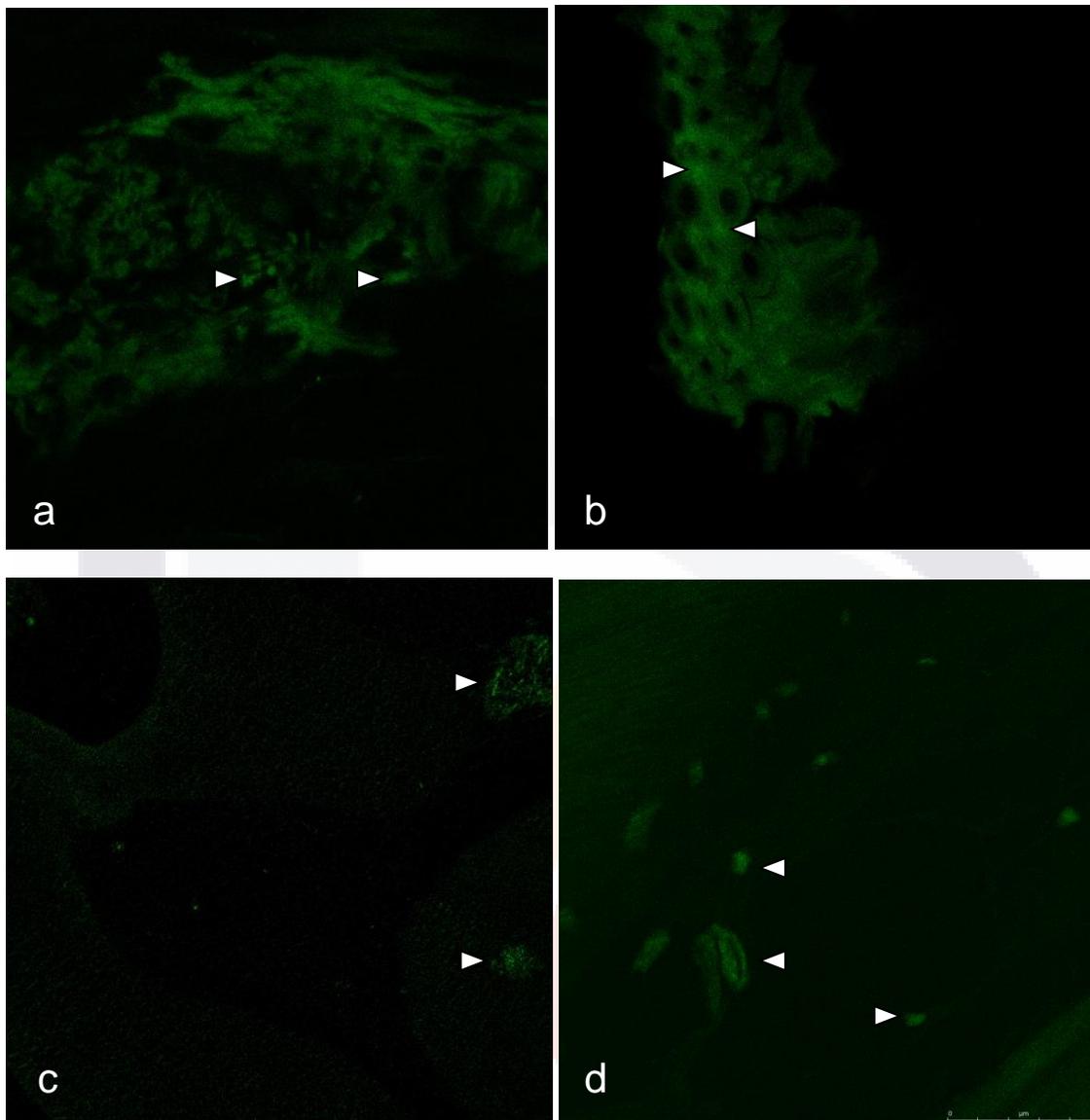
n = negativo. Intensidad de la señal de fluorescencia: (+), ligeramente por encima de la fluorescencia basal; +, claramente visible; ++, fuerte; +++, muy fuerte. Emisión: 519 nm



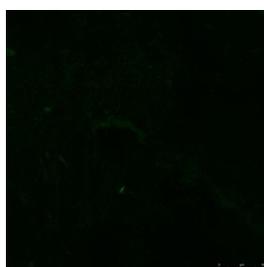
**Fig.44.. Microfotografías de Hibridación In Situ de DPP en cortes de pulpa dental de 1° molar de rata sometido a recubrimiento pulpar directo con OP-1 sin biopolímero, a) grupo 1, 14 días; b) grupo 1, 28 días; c) Grupo 2, recubrimiento con biopolímero + OP-1 a 14 días y d) grupo 2, 28 días. La marca (▷) indica la señal para DPP con fluoresceína. Todas x 400.**



**Control**



**Fig. 45. Microfotografías de Hibridación In Situ de DPP en cortes de pulpa dental de 1° molar de rata sometido a recubrimiento pulpar directo con biopolímero + OP-1 + TGF-β1, a) grupo 3, 14 días; b) grupo 3, 28 días; en c) Grupo 4, recubrimiento con biopolímero + TGF-β1 a 14 días y en d) grupo 4 a 28 días. La marca (▷) indica señal para DPP con fluoresceína; todas x 400.**



**Control**

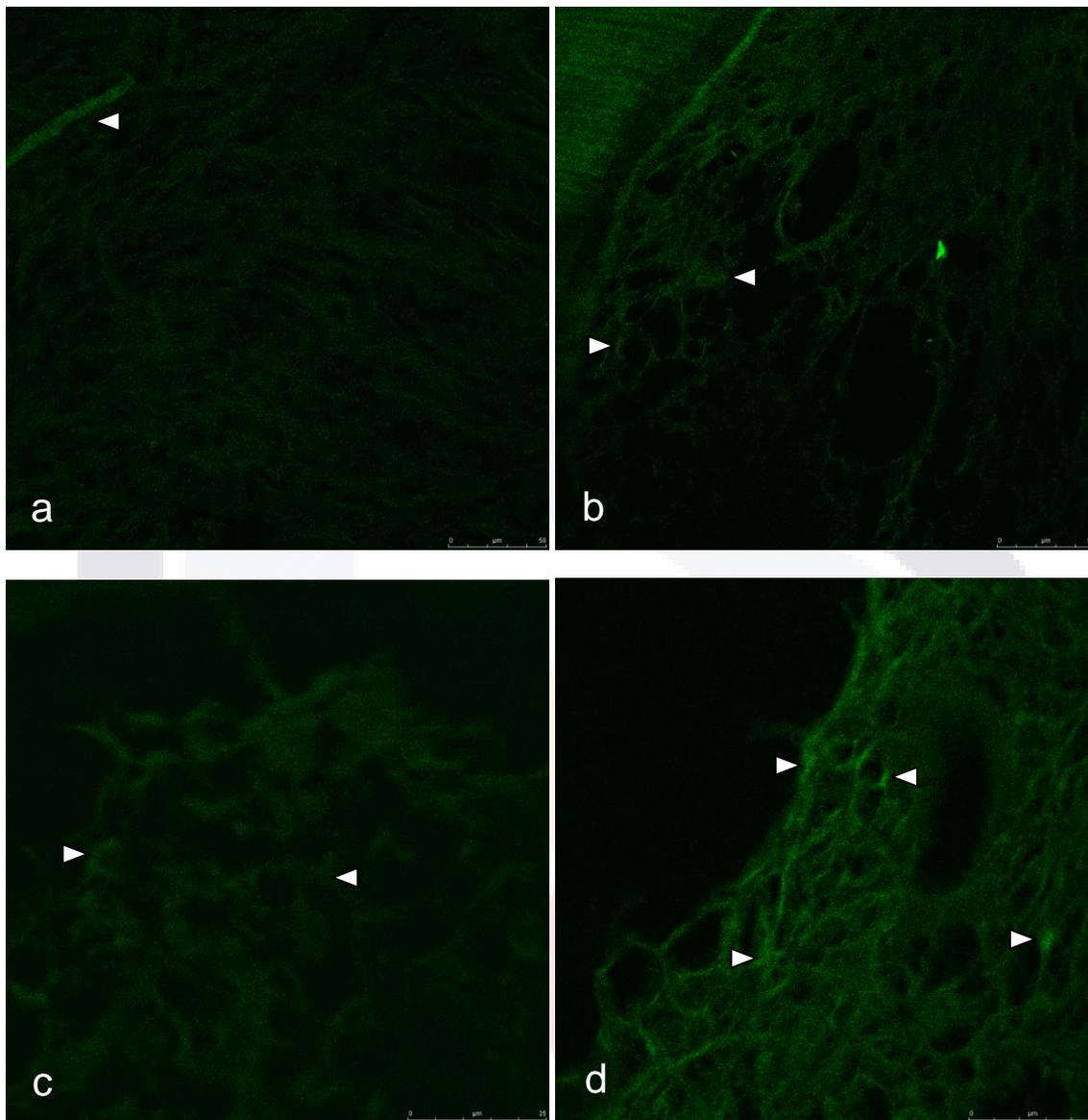
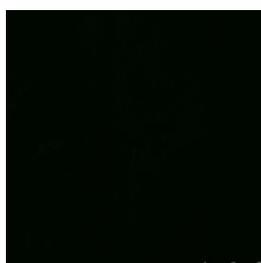


Fig. 46. Microfotografías de Hibridación In Situ de DPP en cortes de pulpa dental de 1° molar de rata sometido a recubrimiento pulpar directo con TGF- $\beta$ 1 sin biopolímero, Grupo 5, a) grupo 5, 14 días; b) grupo 5, 28 días; en c) Grupo 6, control positivo, cavidad sin exposición pulpar a 14 días y en d) grupo 6 a 28 días. La marca (  $\blacktriangleright$  ) indica la señal para DPP con fluoresceína; todas x 400.



Control

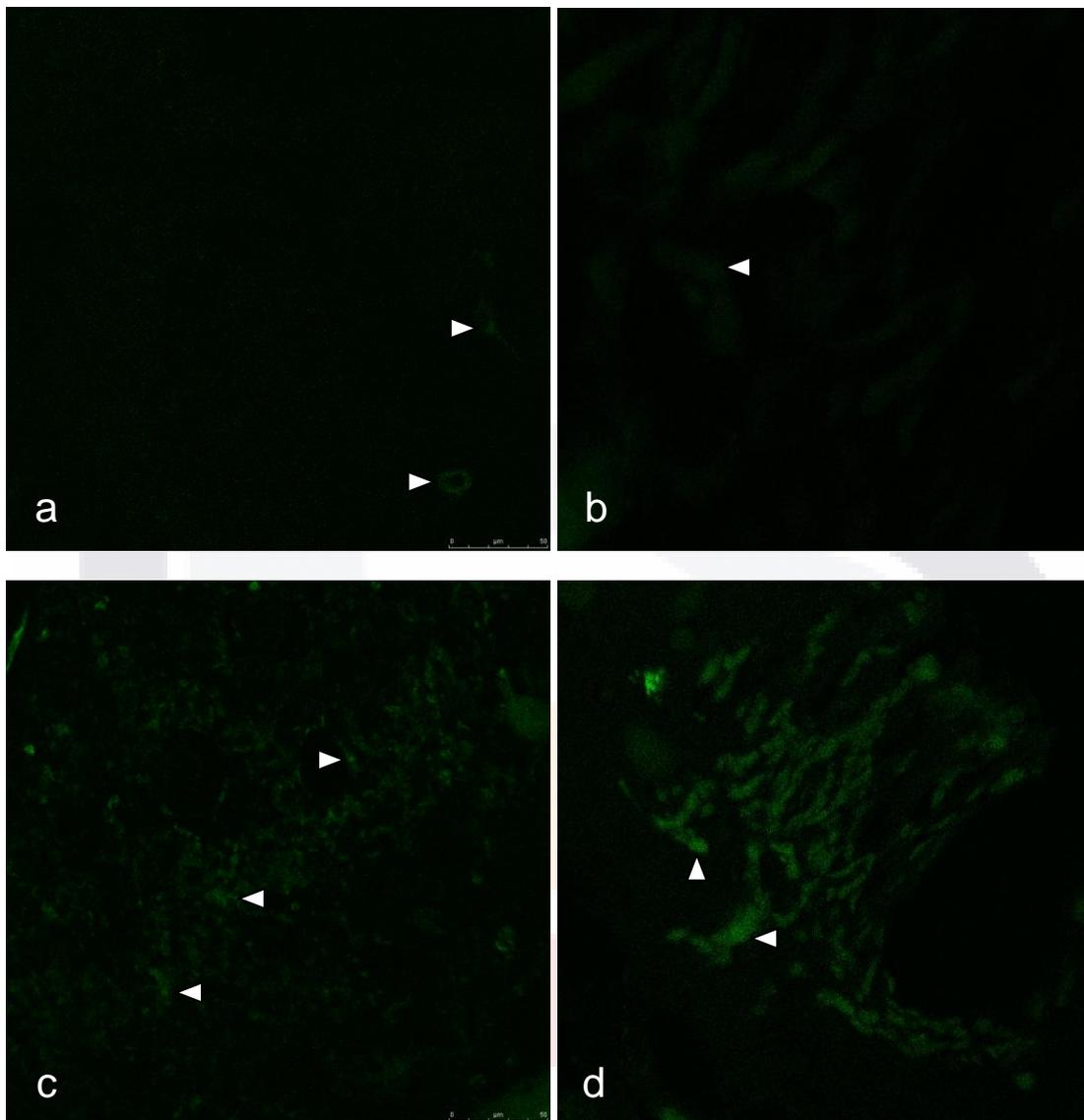
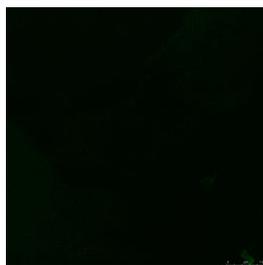


Fig. 47. Microfotografías de Hibridación In Situ de DPP en cortes de pulpa dental de 1° molar de rata sometido a exposición pulpar con cavidad abierta, Grupo 7, a) grupo 7, 14 días; b) grupo 7, 28 días; en c) Grupo 8, 2° control positivo, recubrimiento con hidróxido de calcio a 14 días y en d) grupo 8 a 28 días. La marca (▷) indica la señal para DPP con fluoresceína; todas x 400.



Control

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Diseño y caracterización de los biopolímeros

Existen diversos reportes acerca del uso de factores de crecimiento en forma individual, aplicándolos en diferentes modelos animales. En contraste, los estudios acerca del uso combinado de factores de crecimiento son escasos y aplicados de manera muy diferente. Algunos como TGF- $\beta$ 1 e IGF para la promoción de regeneración ósea (Lee y Shin, 2007), o VEGF y PDGF (Richardson, 2001) para conseguir un efecto angiogénico. Dado que OP-1 y TGF- $\beta$ 1 pueden tener un efecto sinérgico sobre la reparación pulpar, el uso combinado de ambos factores de crecimiento para la promoción de reparación tisular en pulpas dentales expuestas en modelos animales, es un campo abierto a la investigación. No existen reportes concernientes al uso dual de ambos factores de crecimiento aplicado a la reparación de tejido dental.

Se logró diseñar y caracterizar un sistema de liberación controlada, basado en micropartículas de alginato de sodio encapsuladas a través de la técnica de gelificación iónica. Esta técnica muestra ventajas sobre otras, debido a que permite la preservación estructural y funcional de los morfógenos durante sus diferentes etapas (Ciofani y cols., 2007). Las características morfológicas de las micropartículas generadas en cada grupo (OP-1, TGF- $\beta$ 1 y OP-1+TGF- $\beta$ 1), mostraron una estructura irregular, semiesférica y ligeramente piriforme con una superficie externa lisa como se aprecia en la imagen de microscopía óptica, en las Fig.1 a, b y c; y en algunos casos, con algunas indentaciones como se logra ver a través del MEB en la Fig.1 d. La morfología interna fue observada mayormente con una matriz sólida, como se ve en las Fig.1 e y f. El tamaño promedio de las micropartículas, en la microscopía óptica, antes de la liofilización, estuvo en el rango de 129.20 a 431.06  $\mu$ m, mientras que después de la liofilización, usando la microscopía electrónica de barrido, el rango fue de 120 a 220  $\mu$ m. No se obtuvieron diferencias estadísticas entre los grupos. Con base en la morfología interna y externa de las micropartículas así como en su tamaño, es posible decir que los biopolímeros preparados cumplen con los parámetros básicos y se consideraron susceptibles de ser usados en un modelo animal para la promoción de tejido reparador después de un recubrimiento pulpar directo.

## 9.2 Prueba de liberación de los morfógenos

Se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 en sobrenadantes provenientes de los biopolímeros de los tres grupos por medio de HPLC acoplada a detección UV. Con respecto al método de detección de los factores de crecimiento a través de HPLC este método muestra una mayor sensibilidad que la espectrofotometría UV-Vis, pero es similar a la de ELISA, y su ventaja sobre esta es que HPLC no necesita anticuerpos específicos (Whitham et al. 2007). Este método muestra una sensibilidad adecuada a las exigencias del diseño metodológico; esto es debido a la baja concentración de morfógenos encapsulados en los biopolímeros propuestos, que fueron agregados en el orden de microgramos. El límite más bajo de cuantificación, definido como la concentración más baja que el método es capaz de detectar fue de 2 ng/ml a partir de las muestras de la prueba de liberación, adicionalmente el método para HPLC-UV resultó adecuado para una caracterización dual de ambas proteínas, debido a que requirieron diferentes longitudes de onda para su caracterización.

La fase móvil se integró inicialmente con acetonitrilo y ácido tricloroacético. Sin embargo, se eligió finalmente al ácido trifluoroacético (Kimball y cols., 1984), (Sampath y cols., 1992) debido a que permite una elución más eficiente de ambas proteínas.

El perfil fármaco-cinético típico de liberación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 a partir de los polímeros biodegradables de las formulaciones individuales de los grupos 2 y 4 muestra dos diferentes etapas: la primera etapa consistió en un efecto explosivo inicial en las primeras 24 h; este efecto fue dependiente del acarreador, causado por difusión del agente bioactivo localizado cerca de la superficie del biopolímero. La segunda etapa, una liberación secundaria dependiente del acarreador es causada por la degradación gradual del biopolímero, hasta que la solubilización total del material se logra a los 168 h esto puede apreciarse en las fig. 25 y 26, correspondientes a la liberación acumulativa de ambos grupos. La cinética de liberación de los factores de crecimiento a partir de un sistema de liberación puede variar dependiendo de las características químicas del factor por sí mismo o del sistema de liberación. Esto pudo observarse en el perfil de liberación del grupo 3, donde la combinación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 mostró una liberación típica de TGF- $\beta$ 1, mientras que la cantidad de OP-1 liberada mostró una escala inferior, lo cual pudo ser debido a

interacciones entre ambas proteínas. El comportamiento mostrado por ambos morfógenos estuvo probablemente influenciado por los compuestos incluidos en la presentación comercial que cada uno tenía. Así, la solución de 0.1mg/ml de TGF- $\beta$ 1 contenía tris acetato 50mM, pH 7.5, EDTA 1mM y 20% de glicerol, mientras que la OP-1 liofilizada fue reconstituida en ácido acético 20mM, tal como lo indica el proveedor.

Puede inferirse a partir de la fig. 25, que la eficiencia de encapsulación de OP-1 cambia, dependiendo de si está aislada o en combinación. Cuando está combinada, su eficiencia de encapsulación disminuye hasta 45%, mientras que TGF- $\beta$ 1, al estar en combinación, mostró 20% más de eficiencia de encapsulación al compararse con TGF- $\beta$ 1 aislado, como en el biopolímero del grupo 4, (Fig. 26). El perfil de liberación mostró un patrón de primer orden, dependiente de concentración en ambos casos. Aunque la presencia de TGF- $\beta$ 1 durante la preparación por medio de la técnica de gelificación iónica por goteo, parecería interferir con la encapsulación de OP-1.

La cinética de liberación de factores de crecimiento a partir de un sistema de liberación puede variar dependiendo de la naturaleza del factor y el sistema de liberación (Groeneveld y Burger, 2000). Esto fue observado en el perfil de liberación del grupo 3, donde la combinación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 mostró una liberación típica de TGF- $\beta$ 1, mientras que la OP-1 liberada mostró una menor escala, lo que podría estar relacionado con la interacción entre TGF- $\beta$ 1 y OP-1. Un factor adicional en el comportamiento mostrado por los dos morfógenos combinados, son las interacciones de OP-1 con la matriz polimérica y los posibles contaminantes presentes en la fórmula comercial que cada morfógeno tenía (Andriola Silva, 2009). La capacidad de liberar correctamente una molécula que induzca un efecto biológico específico es fundamental para el éxito de la terapia con factores de crecimiento. Polímeros sintéticos y naturales son ampliamente utilizados en dispositivos de liberación controlada para un aporte de proteínas. Estos dispositivos son diseñados de manera que los factores bioactivos sean liberados en un manera controlada tanto espacial como temporalmente. La liberación de OP-1 a partir de los biopolímeros, solo o en combinación con TGF- $\beta$ 1 se mostró significativamente menor que la de TGF- $\beta$ 1 (Fig. 25 y 26). Esto podría estar relacionado con la química de ambos productos ya que se sabe que existen diferencias entre los prodominios N-terminal de la superfamilia de TGF (Gregory et al., 2005). El prodominio de TGF- $\beta$ 1

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contiene residuos de cisteína, mientras que el de OP-1 carece de ella. Como Andriola-Silva y cols. (2009) mostraron que las proteínas pueden unirse covalentemente a los polímeros mediante la reacción de los grupos funcionales laterales de la cadena del polímero con diferentes aminoácidos de los factores de crecimiento (por ejemplo, la lisina, cisteína, etc.), generando la afinidad de unión que define que tan fuertemente se une la proteína al sistema, y a otros componentes de la formulación, lo que parece haber ocurrido en este caso.

El proceso de microencapsulación también afecta a la liberación de estos factores de crecimiento. En este caso la técnica de gelificación iónica consiste en una mezcla inicial de la proteína con el alginato de sodio para formar una suspensión que luego se gotea sobre un baño de  $\text{CaCl}_2$ . Los iones de calcio se entrecruzan al instante con la gota de alginato para formar una microesfera de gel; sin embargo, la densidad de entrecruzamiento y la concentración de alginato no son uniformes en toda la microesfera, tal como ha sido mencionado por Kuo y Ma (2001), afectan la distribución, lo que se relaciona con la forma en que el factor de crecimiento se dispersa. Lo anterior puede influir en la cinética de liberación. La disparidad en la liberación de ambos factores de crecimiento podría ser también dependiente del pH, ya que el TGF- $\beta$ 1 listo para usarse muestra un pH cercano al neutro 7.4, en contraste con OP-1 liofilizado el cual se reconstituyó en ácido acético 20mM y tenía un pH inferior a 6. El alginato de sodio tiene la capacidad para formar un gel con estructura de malla en la presencia de cationes divalentes como  $\text{CaCl}_2$ . Las micropartículas de alginato de sodio se encogen en un pH ácido, mientras que a pH alcalino, el alginato se erosiona y libera el contenido de una manera más sostenida, como es señalado por Qurrat-ul-Ain et al. (2003).

La capacidad de proveer una molécula de forma que induzca un efecto biológico específico es fundamental para el éxito de la terapia con factores de crecimiento. Los polímeros naturales son ampliamente utilizados en dispositivos de liberación controlada para proveer proteínas. Estos dispositivos son diseñados de manera que los factores bioactivos sean liberados en una manera controlada espacial y temporalmente. Un punto de capital importancia al diseñar los sistemas de liberación controlada de morfógenos es la posibilidad de probar su efectividad mediante la detección de concentraciones bajas de los factores bioactivos liberados a partir del biopolímero por

medio de técnicas, con suficiente sensibilidad, tales como la validada en el presente trabajo a través de HPLC-UV.

### **9.3 Extracción y purificación de DSP y preparación de anticuerpos.**

El método utilizado para la purificación de la DSP, resulta ser un método económico, con alta reproducibilidad y eficiencia, que conlleva solo dos pasos, sin perder proteína, el cual se propuso inicialmente para purificar péptidos enriquecidos, y que mediante la técnica desarrollada muestra ser aplicable para la purificación de cualquier tipo de péptidos separados por electroforesis desnaturalizante.

Al contrastar el método aplicado aquí con otros métodos usuales para la purificación de proteínas, es posible resaltar que en comparación directa con la purificación por columnas de afinidad, por ejemplo, en esta se obtiene un rendimiento de 60% aproximadamente de la proteína total que se encuentra en el sistema, Y adicionalmente puede requerir concentraciones que fluctúan desde 1 hasta 50 mg, por lo que es obligado emplear una gran cantidad de tejido o células para obtener un resultado óptimo (Harris y Angal, 1990). Adicionalmente la proteína se obtiene diluida y con un agregado de sales generalmente muy alto. Dichas sales deben eliminarse por lo que el tratamiento a que es sometida la proteína purificada, sea diálisis, o algún otro método baja la eficiencia del proceso de purificación, por razón de degradación y pérdida por adsorción inespecífica en las membranas de diálisis o sistemas de filtración empleados para tal fin (Guerrero Barrera y cols., 1999). Mientras que el método de purificación llevado a cabo en el presente trabajo reduce el manejo de la proteína en un 90% y asegura el máximo rendimiento requiriendo solo una cantidad mínima de extracto total de proteínas que está en el orden de 200 µg. Y así, en tan solo dos pasos se garantiza la obtención de una proteína pura, susceptible de ser empleada de inmediato para la obtención de anticuerpos específicos, usando la poliacrilamida como un adyuvante más, lo que permite que la proteína purificada sea cortada nuevamente e inculada en un conejo hembra de 2.5 kg de peso, permitiendo obtener un anticuerpo con un gran poder de reconocimiento, tal y como se muestra en los resultados en donde se pone de manifiesto que el anticuerpo preparado que fue nombrado anti-DSP UAA aún siendo utilizado a una dilución de 1:100 muestra una

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

inmunotinción superior a la conseguida con el anticuerpo comercial (anti-DSP M-300) que se usó con una dilución de 1:25. Dichas características lo hacen susceptible de ser usado en análisis por Western blot, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia indirecta, teniendo la capacidad de reconocimiento de sialoproteína de dentina de ratón, rata y ser humano. Con un proceso simplificado y eficaz en términos de tiempo y uso de material y reactivos.

#### **9.4 Expresión de DSP y DPP.**

El desarrollo de sistemas de liberación controlada de proteínas implica un gran desafío, quizá el más importante es la inestabilidad de las propias proteínas. Las proteínas están expuestas a una variedad de tensiones durante toda la vida de un sistema de liberación controlada, incluyendo la formulación, el almacenamiento a largo plazo, y la liberación in vivo (Fu y cols.. 2000). A fin de proporcionar una prueba de bioactividad de los morfógenos encapsulados en este trabajo, los biopolímeros se aplicaron como material de recubrimiento pulpar directo en ratas Wistar macho. El efecto del sistema de liberación fue puesto a prueba durante la reparación de tejidos, en comparación con el hidróxido de calcio y ambos factores de crecimiento no encapsulados, utilizando como marcador de reparación de la dentina a la sialoproteína de dentina (DSP) mediante inmunohistoquímica y mediante hibridación fluorescente in situ a la fosfoproteína de dentina (DPP). Para la evaluación de la intensidad de la inmunotinción para DSP, se utilizó la prueba de X2 ( $p \leq 0,001$ ) y la prueba exacta de Fisher ( $p \leq 0,05$ ). Así, el tratamiento con OP-1 encapsulada mostró una inmunotinción para DSP aumentada después de 14 días y no mostró ninguna diferencia significativa con la inmunotinción observada para el tratamiento con hidróxido de calcio. El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 encapsulado no mostró diferencias estadísticamente significativas con hidróxido de calcio. Mientras que el tratamiento con la combinación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1, ambos encapsulados mostró una mayor inmunotinción para DSP, en comparación con el tratamiento con hidróxido de calcio. Con respecto a la liberación de OP-1 a partir de los biopolímeros, solo o en combinación con TGF- $\beta$ 1 esta fue significativamente menor que la de TGF- $\beta$ 1. La inmunohistoquímica mostró que su efecto biológico no se vio afectado. En conclusión, la combinación de ambos factores de crecimiento encapsulados mostró más inmunotinción para DSP

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en comparación con cada uno de ellos separado, encapsulado o no y también fue significativamente mayor que la inmunotinción conseguida con hidróxido de calcio. Hay varios informes de uso de factores de crecimiento individual en diferentes modelos animales pero los estudios sobre el uso combinado de factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  e IGF para la promoción de la regeneración ósea (Lee y Shin, 2007), o VEGF y PDGF (Richardson et al.2001) para un efecto angiogénico son pocos y se aplican de una manera diferente. Esta es la primera ocasión que la combinación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1, se pone a prueba en la reparación de la pulpa dental. El sistema de liberación sostenida probado aquí, como Ciofani y colaboradores propusieron (2007), parece conservar el efecto funcional de los morfógenos.

En el presente estudio, se examinó el efecto de la OP-1, TGF- $\beta$ 1 o su combinación liberado de biopolímeros de micropartículas de alginato de sodio sobre la inducción de dentina reparativa en contacto con una herida pulpar. Aunque hay informes sobre el uso de OP-1 (Six et al. 2002) (Goldberg 2006) y TGF- $\beta$ 1 (Hwang et al. 2008; Hu et al. 1998) de forma individual como material de recubrimiento pulpar, que la teoría de que pertenecen a la misma superfamilia de factores de crecimiento tanto puede tener un efecto sinérgico en la reparación de la pulpa, además de la ausencia de informes sobre el doble uso de ambos factores de crecimiento aplicados a la reparación del tejido dental en modelos animales. Teniendo en cuenta que la capacidad de proporcionar una molécula de forma que induzca un efecto biológico específico es esencial para el éxito de la terapia con factores de crecimiento, se decidió ofrecer un suministro sostenido de morfógenos a través de su encapsulado en micropartículas de alginato de sodio con el fin de liberar el factores bioactivos de manera espacial y temporalmente controlados, similar a la presentada por Dobie (2002) que prepararon hidrogeles de alginato y se aplica al cultivo rebanadas de dientes en humanos para evaluar los efectos sobre la dentinogénesis terciaria.

En el presente trabajo se buscó caracterizar los tejidos formados cerca de la zona de la exposición mediante el análisis de la expresión de la DSP y DPP, ambas proteínas no colágenas de la matriz extracelular que son aceptados como marcadores de la dentina recién formada, los odontoblastos, y las células parecidas a odontoblastos (D'Souza et al. 1995). Los tejidos calcificados formados mostraron señales intensas de DSP y DPP, pero con la diferencia de que se observa una mayor

presencia de DSP en el período de 14 días en comparación con el período de 28 días y la DPP con una mayor presencia sobre todo en el período de 28 días, que coincide con los resultados de Suzuki (2009) que destacan diferentes roles para dichas proteínas en la mineralización de la dentina, con DSP regulando el inicio de la mineralización, y DPP involucrada en la maduración de la dentina mineralizada.

Varios estudios han explorado la colocación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 como materiales de recubrimiento sobre la pulpa de forma individual. En un estudio experimental en ratas Andelin (2003), mostró que el recubrimiento directo con MTA (agregado de trióxido mineral) produjo significativamente más DSP en la dentina, en comparación con rhOP-1 y una posible explicación de estos resultados sugiere que el suministro de un bolo único de una proteína morfogenética con una vida media corta in vivo, no permite la liberación sostenida de los niveles fisiológicos de la proteína necesaria para la regeneración completa del tejido duro. Esto se puede superar mediante el uso de un sistema de liberación sostenida en la forma de un biopolímero como los propuestos en este trabajo a fin de generar una liberación sostenida y controlada de los factores de crecimiento.

## **10. CONCLUSIONES**

Con base en los resultados del presente estudio, es posible concluir que se diseñó y caracterizó un biopolímero asociado a OP-1, TGF- $\beta$ 1 y a la combinación de ambos para ser aplicado en recubrimiento pulpar directo en molares de rata y se evaluó el efecto del biopolímero sobre las células involucradas en la expresión espacial y temporal de DPP y DSP.

Los resultados muestran que el uso de un biopolímero basado en micropartículas de alginato de sodio asociada a la combinación de OP-1 y TGF- $\beta$ 1 como material de recubrimiento pulpar en un modelo animal, ha permitido la generación de las mejores características en el tejido de reparación en términos de expresión de DSP y DPP como marcadores de la actividad de las células de reparación pulpares en comparación con el uso de hidróxido de calcio y los factores de crecimiento de forma individual asociados o no con el biopolímero.

11. ANEXOS



## Design of a controlled release system of OP-1 and TGF- $\beta$ 1 based in microparticles of sodium alginate and release characterization by HPLC-UV

Ricardo Oliva-Rodríguez · José Pérez-Urizar · Estela Dibildox-Alvarado ·  
 Ma. Consolación Martínez-Saldaña · Francisco Javier Avelar-González ·  
 Héctor Flores-Reyes · Amaury de Jesús Pozos-Guillén · Alma Lilián Guerrero-Barrera

Received: 1 May 2011 / Accepted: 19 September 2011 / Editor: T. Okamoto  
 © The Society for In Vitro Biology 2011

**Abstract** A new system for sustained release of growth factors, such as osteogenic protein 1 (OP-1) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), intended to repair and promote dental tissue regeneration in rats was designed and characterized in this work. The release system was made with microparticles of sodium alginate, produced by ionic gelling dripping technique. The release profiles of OP-1 and TGF- $\beta$ 1 from biopolymer matrix were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), and with this purpose, an HPLC-UV method was developed. About 80% of each growth factor was released in the first 24 h, reaching almost 100% in 168 h. The system was tested during the tissue repair in rat molars in comparison with calcium hydroxide and both growth factors not encapsulated. The dentin sialoprotein (DSP) was used as a repair marker. It was detected by immunohistochemistry, after 14- and 28-d post-treatment.  $\chi^2$  test ( $p \leq 0.001$ ) and Fisher exact test ( $p \leq 0.05$ ) were applied for assessment of the amount of immunostaining. The treatment with encapsulated OP-1

showed an increased DSP immunostaining after 14 d and did not find any significant difference with the immunostaining observed for calcium hydroxide treatment. Treatment with TGF- $\beta$ 1 did not show significant difference with calcium hydroxide. Treatment with both factors OP-1 and TGF- $\beta$ 1 showed higher DSP immunostaining in comparison with calcium hydroxide treatment. In conclusion, the combination of both growth factors encapsulated showed more DSP immunostaining in comparison with each one separated, either encapsulated or not.

**Keywords** TGF- $\beta$ 1 · OP-1 · Sodium alginate · Ionic gelling · Controlled release system · DSP

Growth factors are secreted by cells and they have effects over several cell types, inducing a range of functions such as cell division, extracellular matrix components synthesis, and tissue differentiation (Massagué 1996; Lieberman et al. 2002).

Osteogenic protein 1 (OP-1), also known as bone morphogenetic protein 7 (BMP-7), and the transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) are two proteins belonging to TGF- $\beta$  superfamily (Linkhart et al. 1996; Rosier et al. 1998; Massagué and Wotton 2000) that show individually important effects in repair and tissue promotion (Nakashima 1990; Rutherford et al. 1993; Griffith et al. 1996; Hu et al. 1998). OP-1 and TGF- $\beta$ 1 signalize through different receptors, but both act together during dental and bone morphogenesis (Ripamonti et al. 2001). Growth factor effect over a damaged area will depend on an appropriate dose applied during sufficient time. Complete hard tissue regeneration would not happen with a single morphogenetic protein dose, because of the short life and the amount of protein required in vivo

R. Oliva-Rodríguez · M. C. Martínez-Saldaña ·  
 F. J. Avelar-González · A. L. Guerrero-Barrera (✉)  
 Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Edificio 203. Centro de  
 Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes,  
 Av. Universidad 940, Aguascalientes,  
 20131 Aguascalientes, Mexico  
 e-mail: alguerre@correo.uaa.mx

R. Oliva-Rodríguez · H. Flores-Reyes · A. de Jesús Pozos-Guillén  
 Facultad de Estomatología,  
 Universidad Autónoma de San Luis Potosí,  
 San Luis Potosí, Mexico

J. Pérez-Urizar · E. Dibildox-Alvarado  
 Facultad de Ciencias Químicas,  
 Universidad Autónoma de San Luis Potosí,  
 San Luis Potosí, Mexico

(Yancopoulos et al. 2000). In vitro studies have shown that femtomolar BMP concentrations initiate cell chemotaxis of monocytes and aged osteoblasts (Postlethwaite et al. 1994). BMP nanograms have shown mitogenic and osteogenic effects in cell culture (Mayer et al. 1996). Milligrams of BMP in vivo, promotes macroscopic bone production, as well as human recombinant BMP (rhBMP) used at microgram concentration (Yasko et al. 1992). Depending on the animal species and the implantation site, there could be an ideal growth factor dose (Cook et al. 1994; Groeneveld and Burger 2000). To promote enough time contact with growth factors, sustained and controlled release systems through biodegradable polymeric compounds are proposed. Different bio-absorbable polymers, either synthetic or natural, have been developed (Sheridan et al. 2000). Sodium alginate (SA),  $(C_6H_7NaO_6)_n$ , a natural polymer polysaccharide isolated from sea algae (Braccini and Pérez 2001), is a family based on  $\beta$ -D-manuronate and  $\alpha$ -L-guluronate (G), whose mechanical and physical properties are strongly related with the length and proportion of polyguluronate block in alginate gel chains (Godbey and Atala 2002). Alginate conformation is obtained by ionic gelling that occurs by an ionic interaction between the calcium ions and the carboxylate anions of G-G blocks, as calcium ions diffuse from the external source into the droplet (Tønnesen and Karlsen 2002; Gu et al. 2004; Wang et al. 2006).

The main advantage of alginate microparticles is that the gelling process occurs under very mild conditions, at room temperature without cross-linking agents, thus allowing the preservation of the biological activity of the entrapped morphogenic agents (Das and Senapati 2008; Power et al. 2011). Cross-linked SA with calcium already has been implanted in both animals and humans, and its biodegradation has been clearly shown. It is also widely used as a hemostatic agent (Matthew et al. 1995; Iannuccelli et al. 1996; Ishikawa et al. 1999; Wu et al. 2002). Combined growth factors for different applications have been used, but there are no reports about a combination of OP-1 and TGF- $\beta$ 1, added to a polymer based in microparticles of SA. A sustained release system of OP-1 and TGF- $\beta$ 1 growth factors, in the form of a biopolymer based in SA microparticles may promote a homogeneous repair tissue formation with more solid and higher-quality morphology and structure.

In order to quantify the sustained release system, high-performance liquid chromatography (HPLC) was used. HPLC is a separative analytical method based on differential migration of components of a mixture, by interaction between a stationary phase and a mobile phase running through it. The separation is performed in a column, in which is located the stationary phase, commonly, bonded phases based on silica and alkyl radicals (mainly C8 and C18), and flowing through it a high-pressure liquid mobile

phase, typically methanol tampons or acetonitrile. The eluted are identified when they leave the column by methods such as UV absorption, refractive index, or fluorescence. Measurements allows quantification in nanograms of supernatants obtained; showing greater sensitivity than that achieved with the method of UV-vis spectrophotometry and in comparison with ELISA the use of specific antibodies is not necessary, and the sensitivity is similar (Whitham et al. 2007).

Therefore, the aims of the present work were to design and characterize biopolymers that include OP-1 and TGF- $\beta$ 1, single or combined, and to develop liquid chromatographic analytical methods to determine low concentrations of both morphogens from the controlled release system. This system was tested during the tissue repair in male Wistar rat molars in comparison with calcium hydroxide and both growth factors unencapsulated, using as marker of tissue repair the dentin sialoprotein (DSP) determined by immunohistochemistry. The results obtained showed that the sustained release system proposed induced better tissue repair than calcium hydroxide or every growth factor unencapsulated. The best results were observed when OP-1 and TGF- $\beta$ 1 were encapsulated together.

Ethics approval from the ethics board of the Faculty of Dentistry, University of San Luis Potosi was obtained in order to handle all the animals involved in the study under the legal framework in Mexico.

The system design included the preparation of 10 ml of 2% SA (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis MO, USA) plus 10  $\mu$ g of each growth factor (Prospec-Tany Technogene Ltd., Israel). Thus, 0.1 mg/ml TGF- $\beta$ 1 solution contained Tris-acetate 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM and 20% of glycerol, and lyophilized OP-1 was reconstituted in 20 mM acetic acid, as indicated by supplier.

The following groups were performed: group 1, OP-1 (10  $\mu$ g)+2% SA (10 ml); group 2, OP-1 (10  $\mu$ g)+TGF- $\beta$ 1 (10  $\mu$ g)+2% SA (10 ml); and group 3, TGF- $\beta$ 1 (10  $\mu$ g)+2% SA (10 ml). After that, 10 ml of SA containing morphogens were dripped through a 30-gauge needle on 100 ml of Ca<sub>2</sub>Cl 0.1 M. Microparticles were rinsed with deionized water and ethanol on 610 grade filter paper (Ahlstrom, PA, USA) and dried at room temperature for 8 h, cooled by 10 h at 4°C, and lyophilized for 8 h (Freeze Dry System, Labconco, MO, USA).

Microparticles were observed prior to lyophilization procedure, with an optical microscope using Images Advance 3.0 Software (Motic B5 DMB series, IL, USA). Diameter was obtained measuring 100 microparticle samples of each group (Image J 1.37, Image processing and analysis in Java), and using Kruskal-Wallis test to determine statistical differences in microparticle sizes between the three groups ( $p=0.05$ ). The three biopolymers were also observed after lyophilization procedure through a

scanning electron microscope (Philips XL30, Netherlands) for external and internal morphology evaluation.

Compounds were individually determined by HPLC. Aliquots of 1 ml of supernatants were filtered through a 0.45- $\mu$ m membrane and then 10  $\mu$ l were injected to the chromatograph. The chromatographic system included a Waters 1525 binary pump, coupled to a Waters 2487 dual absorbance detector (Waters Corp., Milford, MA, USA). A Zorbax Eclipse XDB-C18, 2.1 $\times$ 75 mm $\times$ 3.5  $\mu$ m analytical column (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used to separate morphogens from other components of the drug-releasing system. Elution was done with acetonitrile and trifluoroacetic acid mixture (40:60, v/v) as a mobile phase for TGF- $\beta$ 1, while 100% acetonitrile was required to elute OP-1, using a 1 ml/min flow rate in both cases. UV absorption at fixed wavelength of 280 nm was used to identify and quantify TGF- $\beta$ 1, while 260 nm was used for OP-1. Calibration curves were prepared in PBS and injected in the range from 0.01 to 10  $\mu$ g/ml for both, TGF- $\beta$ 1 and OP-1, in order to quantify the compounds.

Morphogens release test was done from the three biopolymers. Fifty milligrams of microparticles were added to a 4 ml of 10% PBS at 37°C (Thelco Lab, Thermo Electron Co., USA). Morphogens release was done at intervals of 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, and 168 h. At each interval, centrifugation was performed for 2.5 min at 2,500 rpm (IEC Centra CL2 Centrifuge, USA); then supernatant collection and filtration was performed (Whatman 0.45  $\mu$ m). After each collection a fresh release solution was added. HPLC-UV was used to quantify protein release from each biopolymer in triplicate.

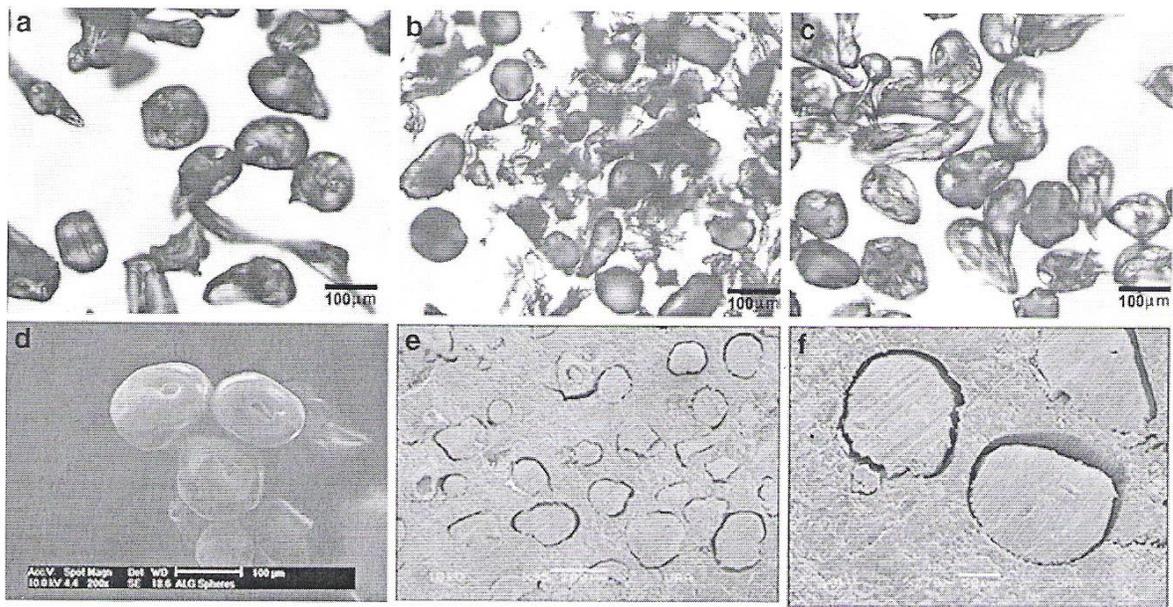
The histological effect of this delivery system was evaluated by the expression of one marker of the activity of reparative pulp cells, involved in the beginning and modulation of the dentin mineralization process: the dentin sialoprotein determined by immunohistochemistry. Thus, the effect of the three biopolymers based in SA microparticles, as controlled release system of OP-1, TGF- $\beta$ 1, or its combination, were evaluated during the tissue repair in male Wistar rat molars subjected to direct pulp capping in comparison with calcium hydroxide and both growth factors not encapsulated, and their respective controls at 14 and 28 d after treatment; using a polyclonal anti-DSP antibody developed in our laboratory. The detailed experimental procedure is described as follows.

Ninety-six maxillary first molars of 48 male Wistar rats weighing 300 $\pm$ 25 g were used; the teeth were randomly distributed to eight groups, each with six rats. The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (10 mg/kg, intraperitoneal). A cavity in the mesial aspect of the molar was prepared using a 1/4 tungsten carbide bur at high speed for up to 2 s, followed by irrigation with saline solution; the pulp exposure was performed by mechanical drilling with a

sterile DG-16 probe (Hu-Friedly, Chicago, IL). Hemostasis was done by pressure with a cotton pellet; then was applied the pulp capping agent for each of the following groups: group 1: OP-1, unencapsulated; group 2: biopolymer with OP-1; group 3: biopolymer with combined OP-1 and TGF- $\beta$ 1; group 4: biopolymer with TGF- $\beta$ 1; group 5: TGF- $\beta$ 1, unencapsulated; group 6: positive control (cavity without pulp exposure); group 7: negative control (cavity with pulp exposure left open), and group 8: calcium hydroxide. Finally, opening was sealed with glass ionomer cement (Vitrebond, 3M Espe, St. Paul, MN, USA). Analgesic (tolfenamic acid, 2.5 mg/kg; intramuscular) and soft diet was given. Three rats from each group were sacrificed at 14 d and three at 28 d using an overdose of xylazine. The jaws were dissected in block, fixed in 10% neutral formalin for 72 h and decalcified with EDTA 10%, and then were embedded in paraffin. Finally, sections were obtained with a thickness of 5  $\mu$ m. An average of 10–12 slides, each with 3–4 sections, were obtained and subjected to immunohistochemistry. Observations were done with an optical microscope and images were taken with Images Advance 3.0 Software (Motic B5 DMB series, IL, USA). The amount of immunostaining for DSP was compared by two investigators in a blind manner, using a scale of 1 to 4: (1) strong, (2) moderate, (3) weak, and (4) no staining (Andelin et al. 2003).  $\chi^2$  test ( $p \leq 0.001$ ) and Fisher exact test ( $p \leq 0.05$ ) were then applied for assessment of the amount of immunostaining in each group ( $n=30$  sections per group).

In order to obtain the specific anti-DSP antibody, it was carried out an extraction and purification method of DSP from incisors of 11-d-old rats, the total extract of the tooth proteins was made by freeze-thawing (Guerrero-Barrera et al. 1999), and proteins were precipitated by Wessel and Flügge (1984). The DSP was recognized through Western blot technique with a mouse anti-DSPP, kindly donated by Dr. Larry Fisher of NIDCR, USA. Specific polyclonal rabbit anti-DSP was obtained according to Gutiérrez-Cantú et al. (2011); the antibody specificity was tested by Western blot.

The observation in optical microscopy of SA microparticles showed an irregular, semispherical, slightly pyri-form structure, with a smooth outer surface, as it is shown in optical microscopy (Fig. 1a, b, and c); and in some cases, with some indentations as it is shown in scanning electron microscopy (Fig. 1d). To observe the internal morphology of the microparticles, they were embedded in epoxy resin and then cut with a diamond disk (Flexible Diamond Discs, KG Sorensen) and then ionized to see a solid matrix mostly, Fig. 1e and f. Average microparticle size, in optical microscopy, before lyophilization, was in a range of 129.20 to 431.06  $\mu$ m; while after lyophilization, using scanning electron microscopy, in a range of 120 to 220  $\mu$ m. No significant statistically differences between groups were



**Figure 1.** Morphologic characteristics of the microparticles of sodium alginate containing the morphogens. *a* Biopolymer 1 containing OP-1, light microscope,  $\times 40$ . *b* Biopolymer 2 containing OP-1+TGF- $\beta$ 1, light microscope,  $\times 40$ . *c* Biopolymer 3 containing TGF- $\beta$ 1,

light microscope,  $\times 40$ . *d* External surface of microparticles, scanning electron microscope,  $\times 200$ . *e* Internal surface of microparticles, scanning electron microscope,  $\times 95$ . *f* Internal surface of microparticles, scanning electron microscope,  $\times 270$ .

obtained. The regular appearance of the solid internal matrix might suggest a homogeneous distribution of the growth factors inside the microparticle structure which is appropriate to be used in an animal model.

As explained before, HPLC shows greater sensitivity than UV-vis spectrophotometry but similar to ELISA, and its advantage is that this technique does not need specific antibodies (Whitham et al. 2007). The lowest concentration detected here was 2 ng/ml for both OP-1 and TGF- $\beta$ 1 growth factors. Mobile phase was integrated by acetonitrile and trifluoroacetic acid (Sampath et al. 1992).

Looking at the typical chromatogram of each morphogen, in Fig. 2*a* for OP-1 and 2 Fig. 2*b*, for TGF- $\beta$ 1, it is possible to see that both show similar retention time, very close to 60 s, with inherent differences in terms of absorbance.

The pharmacokinetic release profiles of OP-1 and TGF- $\beta$ 1 from SA microparticles in the three formulations are shown in Fig. 3, corresponding to the release profiles of both morphogens alone or in combination. Each point represents an average from three samples; standard deviations were minimal and are not represented.

Both profiles show two different stages: the first stage consisted of an initial burst effect in the first 24 h, usually an effect inherent to almost any polymer (Andriola Silva, 2009). This effect is supposed to be caused by diffusion of the bioactive agent located closer to the surface. The second stage is caused by gradual degradation of the polymer, and

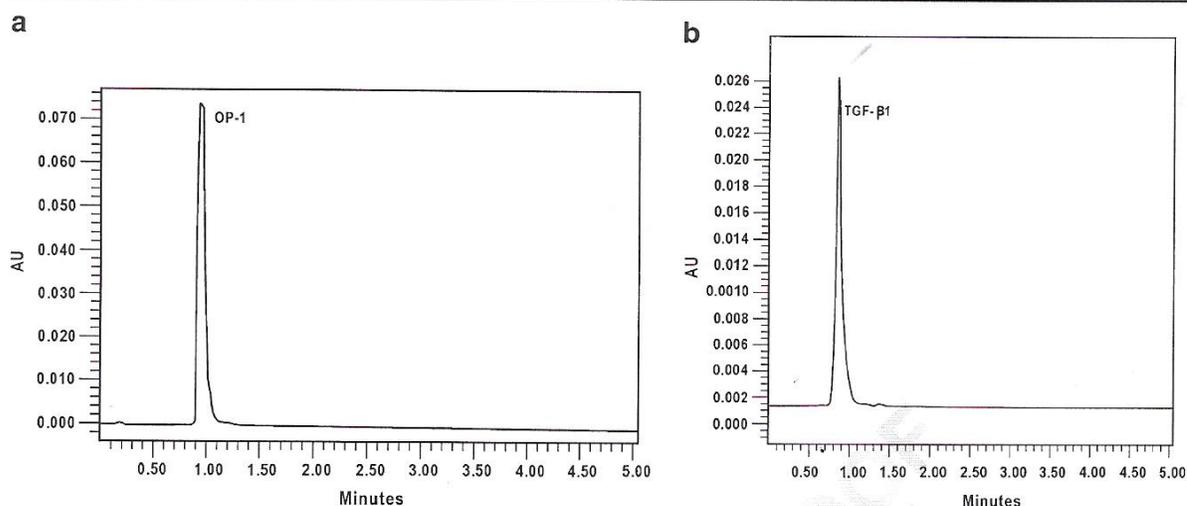
diffusion of morphogens through matrix and pores, until an almost total material solubilization, due to erosion, is achieved at 168 h, our maximum test time.

The release profiles showed a first-order pattern that is dependent on concentration in both cases, with OP-1 and with TGF- $\beta$ 1 showing two slopes, the first in the interval of 0 to 8 h, and a second for the interval of 12 to 168 h (Fig. 3).

The kinetics of release of growth factors from a delivery system may vary depending on the nature of the factor and the delivery system (Groeneveld and Burger 2000). This was observed in the release profile of group 2, where the OP-1 and TGF- $\beta$ 1 combination showed a typical release for TGF- $\beta$ 1, while the OP-1 released showed a lower scale; which could be related with interactions between TGF- $\beta$ 1 and OP-1. An additional factor in the behavior showed by both combined morphogens are the interactions of OP-1 with the polymeric matrix and the possible contaminants present in the commercial form that each morphogen had (Andriola Silva, 2009).

The ability to deliver appropriately a molecule that will induce a specific biological effect is critical to the success of growth factor therapy. Synthetic and naturally derived polymers are widely used in controlled release devices for protein delivery. These devices are designed so that bioactive factors are released in a spatially and temporally controlled manner.

The OP-1 release from biopolymers, alone or in combination with TGF- $\beta$ -1, was significantly lower than

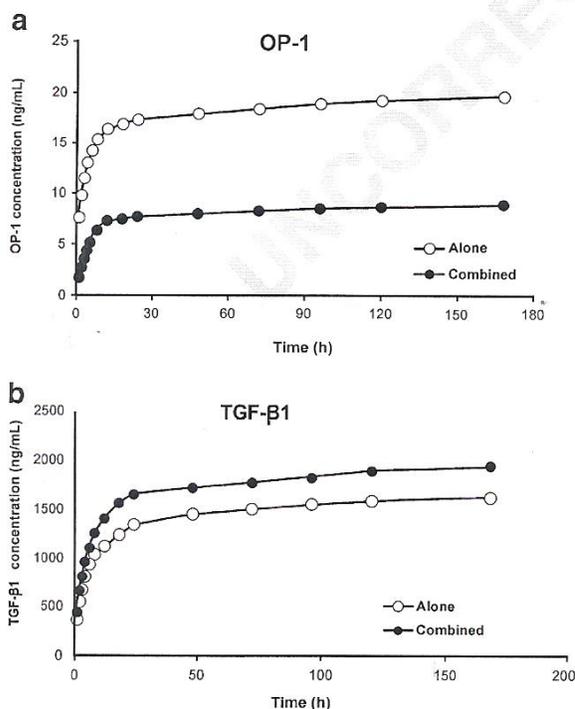


**Figure 2.** HPLC chromatograms of OP-1 and TGF- $\beta$ 1. *a* HPLC chromatogram of OP-1. Column, 2.1 $\times$ 75 mm $\times$ 3.5  $\mu$ m; stationary phase, Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>; mobile phase, acetonitrile 100%; flow rate, 1 mL/min; detection, fluorescence 260 nm; temperature,

ambient. *b* HPLC chromatogram of TGF- $\beta$ 1. Column, 2.1 $\times$ 75 mm $\times$ 3.5  $\mu$ m; stationary phase, Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>; mobile phase, acetonitrile/trifluoroacetic acid 40:60; flow rate, 1 mL/min; detection, fluorescence 280 nm; temperature, ambient.

TGF- $\beta$ 1 (Fig. 3*a*). These could be related with the chemical differences reported between the N-terminal prodomains of TGF $\beta$  superfamily (Gregory et al. 2005). The TGF $\beta$  prodomain contain cysteine residues, whereas OP-1 prodo-

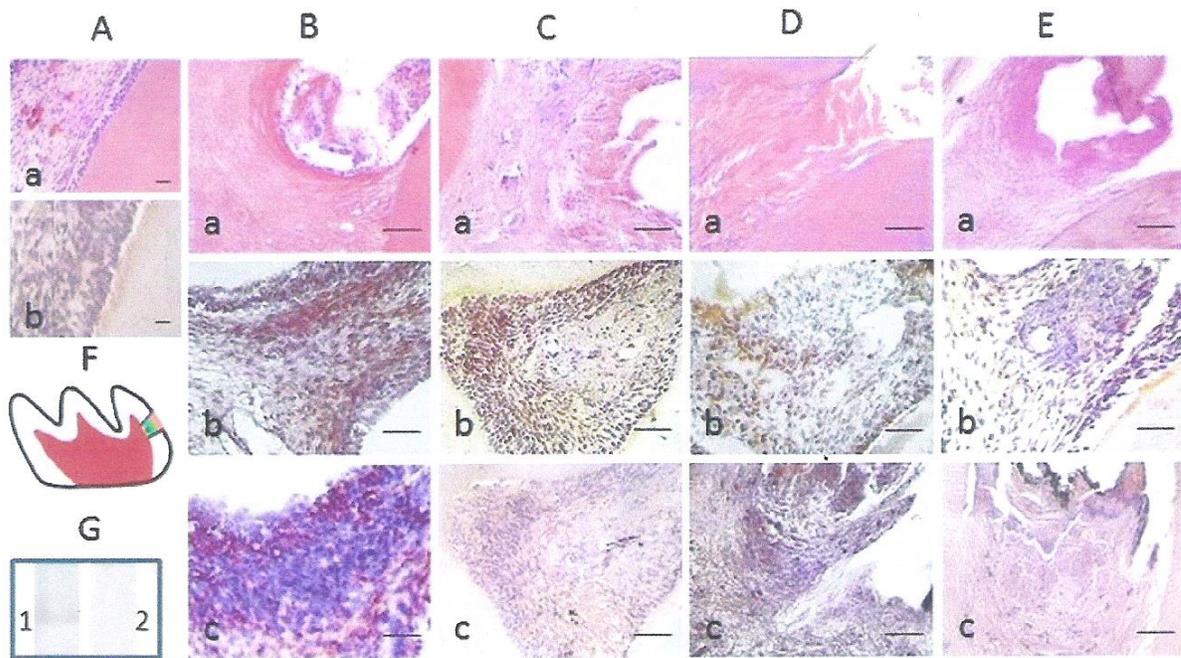
main is cysteines devoid. As Andriola-Silva et al. (2009) showed, proteins can be covalently attached to polymers by reacting the different side chain functionalities of polymers with the amino acids of the growth factors (e.g., lysine, cysteine), generating the binding affinity that defines how tightly the growth factor binds the system, and other components of the formulation, as it seems in this case.



**Figure 3.** Graphic that shows cumulative release of OP-1 (*a*) and TGF- $\beta$ 1 (*b*). From biopolymers 1 (*alone*) and 2 (*combined*).

Microencapsulation procedure also affects the releasing of these growth factors. Here, involves an initial mixture of protein with SA to form a suspension that is then dripped into a CaCl<sub>2</sub> bath. Calcium ions crosslink instantly with the alginate droplet to form a gel bead. However, the cross-linking density and alginate concentration are not uniform throughout the bead as mentioned by Kuo and Ma (2001), affecting the distribution that relates to the way the growth factor is dispersed, which will influence the release kinetics. The disparity in the release of both growth factors could be also pH dependent, since TGF- $\beta$ 1 ready to use shows a near neutral pH 7.4, in contrast lyophilized OP-1 was reconstituted in 20 mM acetic acid and had a pH lower than 6. SA has the ability to form a gel/meshwork in the presence of divalent cations as CaCl<sub>2</sub>. Alginate micro-particles shrink at acidic pH, whereas at alkaline pH, alginate erodes and releases the contents in a more sustained manner, as pointed by Qurrat-ul-Ain et al. (2003).

The development of controlled release systems for proteins involves a major challenge, the instability of the proteins themselves. The proteins are exposed to a variety of stresses over the entire life of a controlled release system, including formulation, long-term storage, and release in vivo (Fu et al. 2000). In order to provide a bioactivity test



**Figure 4.** Effect of growth factors encapsulated in sodium alginate microparticles on DSP expression in rat dental pulp cells. Immunostaining  $\times 400$ . *A* Control, normal morphology of pulp–dentine complex; *B* SA microparticles OP-1 and TGF- $\beta$ 1; *C* SA microparticles with OP-1; *D* Biopolymer with TGF- $\beta$ 1. *E* Calcium hydroxide. *a* H–E immunostaining. *b* DSP distribution by immunolabeling, 14-d test period. *c* DSP distribution by immunolabeling, 28-d

test period. The *inset* shows in *F* the area of pulp exposure in the mesial aspect of rat molar, *Asterisk* shows the implanted material. *G* Specific recognition of total protein extract of 11-d-old rat with the polyclonal anti-DSP antibody (reported here) specificity tested by Western Blot; 1 anti-DSP; 2 negative control. *Bar* represents 100  $\mu$ m. DSP immunolabeling is *yellow-brown mark*.

of morphogens encapsulated and further released in this work, the biopolymers were applied as direct pulp capping material in male Wistar rats ( $300 \pm 25$  g). The effect of the released system was tested during tissue repair in male Wistar rat molars, in comparison with calcium hydroxide and both growth factors not encapsulated, using as repair marker the dentin sialoprotein by immunohistochemistry (Fig. 4). For assessment of intensity of immunostaining,  $X^2$  test ( $p \leq 0.001$ ) and Fisher exact test ( $p \leq 0.05$ ) were applied. Thus, the treatment with encapsulated OP-1 showed an increased DSP immunostaining after 14 d (Fig. 4C, b) and did not show any significant difference with the immunostaining observed for calcium hydroxide treatment (Fig. 4E, b). Treatment with TGF- $\beta$ 1 encapsulated (Fig. 4D, b) did not show statistically significant difference with calcium hydroxide (Fig. 4E, b). Treatment with both factors encapsulated OP-1 and TGF- $\beta$ 1, showed higher DPS immunostaining (Fig. 4B, b) in comparison with calcium hydroxide treatment (Fig. 4E, b). Despite of the OP-1 release from biopolymers, alone or in combination with TGF- $\beta$ -1, it was significantly lower than TGF- $\beta$ -1 (Fig. 3A). The immunostaining showed that its biological effect was not affected. In conclusion, the combination of both growth

factors encapsulated showed more DPS immunostaining in comparison with each one separated, either encapsulated or not, and also was significantly higher than calcium hydroxide immunostaining (Fig. 4).

There are several reports using growth factors individually in different animal models. In contrast, studies about the combined use of growth factors such as TGF- $\beta$  and IGF promoting bone regeneration (Lee and Shin 2007), or VEGF and PDGF (Richardson et al. 2001) for an angiogenic effect are few and are applied in a different way. This is the first time that OP-1 and TGF- $\beta$ 1 combined are tested in dental pulp repair. The sustained release system tested here, as Ciofani et al. (2007), seems to preserve the functional effect of both morphogens.

**Acknowledgments** Ricardo Oliva Rodríguez was supported by CONACYT scholarship no. 204793. This work was supported by PROMEP UASLP-200.

We thank Biol. Keila Neri Alvarado Estrada, L. A. Q. B. Laura Nayeli Palacios, and MSc. Isabel Martín Pérez for their technical assistance in the laboratory. MSc. Silvia Martín Pérez for her assistance in the management of experimental animals. We also thank Deborah Escobar Kubilos DDS for her assistance in editing the manuscript.

## References

- Andelin W. E.; Shabahang S.; Wright K.; Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J. Endodont.* 29: 646–650; 2003.
- Andriola-Silva A. K.; Richard C.; Bessodes M.; Scherman D.; Merten O. Growth factors delivery approaches in hydrogels. *Biomacromolecules.* 10: 9–18; 2009.
- Braccini I.; Pérez S. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules.* 2: 1089–1096; 2001.
- Ciofani G.; Raffa V.; Menciassi A.; Micera S.; Dario P. A drug delivery system based on alginate microspheres: Mass-transport test and in vitro validation. *Biomed. Microdevices.* 9: 395–403; 2007.
- Cook S. D.; Baffes G. C.; Wolfe M. W.; Sampath T. K.; Rueger D. C. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin. Ortho. Rel. Res.* 301: 302–312; 1994.
- Das M. K.; Senapati P. C. Furosemide-loaded alginate microspheres prepared by ionic cross-linking technique: morphology and release characteristics. *Indian J. Pharm. Sci.* 70: 77–84; 2008.
- Fu K.; Klibanov A. M.; Langer R. Protein stability in controlled-release Systems. *Nat. Biotech.* 18: 24–25; 2000.
- Godbey W. T.; Atala A. In vitro systems for tissue engineering. *Ann. NY. Acad. Sci.* 961: 10–26; 2002.
- Gregory K. E.; Ono R. N.; Charbonneau N. L.; Kuo C. L.; Keene D. R.; Bächinger H. P.; Sakai L. Y. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 280: 27970–27980; 2005.
- Griffith D. L.; Keck P. C.; Sampath T. K.; Rueger D. C.; Carlson W. D. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 878–883; 1996.
- Groeneveld E. H. J.; Burger E. H. Bone morphogenetic proteins in human Bone regeneration. *Euro. J. Endocrinol.* 142: 9–21; 2000.
- Gu F.; Amsden B.; Neufeld R. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *J. Control. Release.* 96: 463–472; 2004.
- Guerrero-Barrera A. L.; De la Garza M.; Mondragon R.; Garcia-Cuellar C.; Segura-Nieto M. Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins. *Microbiology.* 145: 3235–3244; 1999.
- Gutiérrez-Cantú F. J.; Feria-Velasco A.; Palacios-Arenas L. N.; Alvarado-Estrada K. N.; Avelar-González F. J.; Flores-Reyes H.; Mariel-Cárdenas J.; Guerrero-Barrera A. L. Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 47: 355–360; 2011.
- Hu C. C.; Zhang C.; Qian Q.; Tatum N. B. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J. Endod.* 24: 744–751; 1998.
- Iannuccelli V.; Coppi G.; Bondi M.; Pinelli M.; Mingione A.; Cameroni R. Biodegradable intraoperative system for bone infection treatment 0.2. In vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 143: 187–194; 1996.
- Ishikawa K.; Ueyama Y.; Mano T.; Koyama T.; Suzuki K.; Matsumura T. Self-setting barrier membrane for guided tissue regeneration method: initial evaluation of alginate membrane made with sodium alginate and calcium chloride aqueous solutions. *J. Biomed. Mater. Res.* 47: 111–115; 1999.
- Kuo C. K.; Ma P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22: 511–521; 2001.
- Lee S.-H.; Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 339–359; 2007.
- Lieberman J. R.; Daluiski A.; Einhorn T. A. The role of growth factors in the repair of bone, biology and clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* 84: 1032–1044; 2002.
- Linkhart T. A.; Mohan S.; Baylink D. J. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGFβ and BMP. *Bone.* 19: 1S–12S; 1996.
- Massagué J. TGF-beta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell.* 85: 947–950; 1996.
- Massagué J.; Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19: 1745–1754; 2000.
- Matthew I. R.; Browne R. M.; Frame J. W.; Millar B. G. Subperiosteal behavior of alginate and cellulose wound dressing materials. *Biomaterials.* 6: 275–278; 1995.
- Mayer H.; Scutt A. M.; Ankenbauer T. Subtle differences in the mitogenic effects of recombinant human bone morphogenetic proteins -2 to -7 on DNA synthesis on primary bone-forming cells a ND identification of bmp-2/4 receptor. *Calcif. Tissue Int.* 58: 249–255; 1996.
- Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch. Oral Biol.* 35: 493–497; 1990.
- Postlethwaite A. E.; Raghov R.; Stricklin G.; Ballou L.; Sampath T. K. Osteogenic protein-1, a bone morphogenic protein member of the TGF-beta superfamily, shares chemotactic but not fibrogenic properties with TGF-beta. *J. Cell Physiol.* 161: 562–570; 1994.
- Power B.; Liu X.; Germaine K. J.; Ryan D.; Brazil D.; Dowling D. N. Alginate beads as a storage, delivery and containment system for genetically modified PCB degrader and PCB biosensor derivatives of *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Appl. Microbiol.* 110: 1351–1358; 2011.
- Qurrat-ul-Ain; Sharma S.; Khuller G. K.; Garg S. K. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 931–938; 2003.
- Richardson T. P.; Peters M. C.; Ennett A. B.; Mooney D. J. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat. Biotechnol.* 19: 1029–1034; 2001.
- Ripamonti U.; Ramoshebi L. N.; Matsaba T.; Tasker J.; Crooks J.; Teare J. Bone Induction by BMPs/OPs and Related Family Members in Primates. The Critical Role of Delivery Systems. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83: S116–S127; 2001.
- Rosier R. N.; O'Keefe R. J.; Hicks D. G. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 355(Suppl): S294–S300; 1998.
- Rutherford R. B.; Wahle J.; Tucker M.; Rueger D.; Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch. Oral Biol.* 38: 571–576; 1993.
- Sampath T. K.; Maliakal J. C.; Hauschka P. V. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J. Biol. Chem.* 267: 20352–20362; 1992.
- Sheridan M. H.; Shea L. D.; Peters M. C.; Mooney D. J. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J. Cont. Release.* 64: 91–102; 2000.
- Tønnesen H. H.; Karlsen J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28: 621; 2002.
- Wang W.; Liu X.; Xie Y.; Zhang H.; Yu W.; Xiong Y.; Xie W.; Ma X. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *J. Mater. Chem.* 16: 3252–3267; 2006.
- Wessel M. D.; Flüggé U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141–143; 1984.

- Whitham M.; Laing S. J.; Jackson A.; Maasen N.; Walsh N. P. Effect of exercise with and without a thermal clamp on the plasma heat shock protein 72 response. *J. Appl. Physiol.* 103: 1251–1256; 2007.
- Wu S. F.; Suzuki Y.; Tanihara M.; Ohnishi K.; Endo K.; Nishimura Y. Repair of facial nerve with alginate sponge without suturing: an experimental study in cats. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 36: 135–140; 2002.
- Yancopoulos G. D.; Davis S.; Gale N. W.; Rudge J. S.; Wiegand S. J.; Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 407: 242–248; 2000.
- Yasko A. W.; Lane J. M.; Fellingner E. J.; Rosen V.; Wozney J. M.; Wang E. A. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J. Bone Joint Surg. Am.* 74: 659–670; 1992.

UNCORRECTED PROOF



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA  
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Av. Manuel Nava # 2, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.  
Tels. 826-23-57 y 58, Fax: 813-97-43



Facultad de  
Estomatología

San Luis Potosí, S.L.P. 18 noviembre 2008

M.C. RICARDO OLIVA RODRÍGUEZ  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES  
PRESENTE

Estimado M.C. Ricardo Oliva Rodríguez

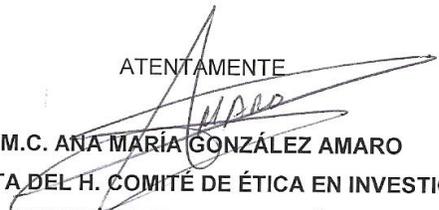
Por este conducto me dirijo a Usted en referencia a su trabajo de investigación titulado *“Evaluación del efecto de factores de crecimiento encapsulados en un sistema de liberación prolongada sobre la expresión de DSP y DPP en células pulpares de rata”* asignado con la clave:

**CEIFE-024-08**

Dicho trabajo fue evaluado en los aspectos del marco ético-legal y bioseguridad por los miembros del H. Comité de Ética en Investigación: Dra. Nuria Patiño Marín, Dr. Miguel Ángel Santos Díaz, Dr. Miguel Ángel Noyola Frías, Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén y M.C. Ana María González Amaro. De dicha evaluación y de forma colegiada, el Comité ha dictaminado que su protocolo de investigación es **APROBADO POR UNANIMIDAD** pudiendo llevarlo a cabo en los tiempos que Usted considere necesarios para la ejecución del mismo.

Le solicitamos nos haga llegar los informes correspondientes del avance de su proyecto de investigación, así como un informe final para nuestro archivo, recordándole además que este proyecto podrá ser monitoreado por este Comité.

ATENTAMENTE

  
M.C. ANA MARÍA GONZÁLEZ AMARO  
PRESIDENTA DEL H. COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA, UASLP

## 12. GLOSARIO

OP-1	Proteína osteogénica 1
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1
DSP	Sialoproteína dentinaria
DPP	Fosfoproteína dentinaria
DSPP	Sialofosfoproteína dentinaria
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
rH	Recombinante humano

### 13. BIBLIOGRAFIA

About I.; Murray P.E.; Franquin J.C.; Remusat M.; Smith A.J. Pulpal inflammation responses following non-carious class V restorations, *Oper. Dent.* 26:336-342; 2001.

Andelin W.E.; Shabahang S.; Wright K.; Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J. Endodont.* 29:646-650; 2003.

Andriola-Silva A.K.; Richard C.; Bessodes M.; Scherman D.; Merten O. Growth factors delivery approaches in hydrogels. *Biomacromolecules.* 10:9-18; 2009.

Baume I.J. The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic taxonomic, histologic-biochemical, and clinical survey. Monog. *Oral Sci.*; 8:1-220; 1980.

Byers M.R.; Sugaya A. Odontoblasts processes in dentin revealed by fluorescent Di-I, *J. Histochem. Cytochem.* 43: 159-168; 1995.

Ciofani G.; Raffa V.; Menciassi A.; Micera S.; Dario P. A drug delivery system based on alginate microspheres: Mass-transport test and in vitro validation, *Biomed. Microdevices.* 9:395-403; 2007.

Cohen S.; Burns R. Pathways of the pulp. 7° Ed. Mosby. Missouri. 2000.

Couve E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch. Oral Biol.* 31: 643-651; 1986.

Cox C.F.; Subay R.K; Ostro E.; Suzuki S.; Suzuki S.H. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper. Dent.* 21:4-11; 1996.

Cook S.D.; Wolfe M.W.; Salkeld S.L.; Rueger D.C. Effect of human recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J. Bone Joint Surg. Am.* 77: 734-750; 1995.

Decup F.; Six N.; Palmier B. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin. Oral Invest.* 4:110-119; 2000.

D'Souza R.N.; Bachean T.; Baumgardner K.R.; Butler W.T.; Linz M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J. Dent. Res.* 74:702-709; 1995.

De Souza Costa C. A. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp, *J. Endodon.* 25:10, Oct.1999.

Dobie K.; Smith G.; Sloan A.J.; Smith A.J. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect.Tissue Res.* 43:387-90; 2002.

Edwards P.C.; Mason J.M. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (2) dentin-pulp and periodontal regeneration. *Head and Face Medicine*; 2:16; 2006.

Fitzgerald M.; Ciego D.J.; Heys D.R. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch. Oral Biol.* 35: 707-715; 1990.

Fu K.; Klibanov A. M.; Langer R. Protein stability in controlled-release systems. *Nat. Biotech.*18: 24-25. DOI :10.1038/7187; 2000.

Garant P. R. Oral cells and Tissues, Quintessence Books; 2003.

Gotjamanos T. Mitotic activity in the subodontoblastic cell-rich layer of adult rat molar pulps, *Arch.Oral Biol.*15:905; 1970.

Goldberg M.; Septier D. Phospholipids in amelogenesis and Dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13: 276-290; 2002.

Goldberg M.; Smith A.J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 15:1; 13-27; 2004.

Goldberg M. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry; *Dent. Clin. N. Am.* 50: 277-298; 2006.

Granjeiro J.M.; Oliveira R.C.; Bustos-Valenzuela J.C.; Sogayar M.C.; Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz. J. of Med. and Biol. Res.* 38:1463-1473; 2005.

Gregory K.E.; Ono R.N.; Charbonneau N.L.; Kuo C.L.; Keene D.R.; Bächinger H.P.; Sakai L.Y. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 280: 27970–27980; 2005.

Griffith D.L.; Keck P.C.; Sampath T.K.; Rueger D.C.; Carlson W.D. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor B superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*93: 878-883; 1996.

Groeneveld E. H. J.; Burger E. H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Euro. J. Endocrinol.*142: 9-21; 2000.

Gronthos S.; Mankani M.; Brahimi J. Postnatal dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97:13625-13630; 2000.

Gronthos S.; Brahim J.; Li W.; Fisher L.W.; Cherman N.; Boyde A. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81:531-535; 2002.

Gu K.; Smoke R.H.; Rutherford R.B. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 41:919-923; 1996.

Guerrero-Barrera A.L.; De la Garza M.; Mondragón R.; García-Cuellar C.; Segura-Nieto M. Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins. *Microbiology.* 145: 3235–3244; 1999.

Harris E.L.V.; Angal S. Protein purification applications: a practical approach. IRL Press at Oxford University Press; 1990.

Hargreaves K.M.; Goodis H.E; (2002), Seltzer and Bender’s Dental Pulp; Quintessence; 2002.

Harold E.; Lane D. Antibodies, a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 61-67; 1998.

Hebling J. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed pulp, *J. Endodon.* 25:10;1999.

Helder M.N.; Kart H.; Bervoels T.J.M.; Vukicevic S.; Burger E.H.; D’Souza R.N.; Wöltgens J.H.M; Karsenty G.; Bronckers A.L.J.J. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. *J. Dent. Res.* 77:4:545- 554; 1998.

Herr P.; Holz J.; Baume L.J. Mantle dentin in man: A quantitative microradiographic study. *J Biol. Bucal.* 14:139-146; 1986.

Hillmann G.; Geurtsen W. Light- microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. *Cell Tissue Res.* 289:145-154; 1997.

Hu C.C.; Zhang Chuhua.; Quian Q.; Tatum N.B. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors; *J. of Endodon.* 24:11; 744-751; 1998.

Hwang Y.-C.; Hwang I.N.; O. W.-M.; Park J.-C.; Lee D.-S.; Son H.-H. Influence of TGF- $\beta$ 1 on the expression of BSP, DSP, TGF- $\beta$ 1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis, *J. Mol. Hist.* 39: 153-160; 2008.

Jadlowiec J.; Koch H.; Zhang X. Phosphoryn regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/ MAPK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279:53; 323-30; 2004.

Jontell M.; Gunraj M.; Bergentholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp, *J.Dent.Res.* 66:1149; 1987.

Jontell M.; Okiji T.; Dahlgren U.; Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9:179-200; 1998.

Takehashi S. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path;* 20:340; 1965.

Kim S.; Trowbridge H.O. Pulpal reaction to caries and dental procedures, in Cohen S.; Burns R. Pathways of the pulp. 7th ed. pp. 532- 534, Missouri, Mosby; 1998.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Kimball E.S.; Bohn W.H.; Cockley K.D.; Warren T.C.; Sherwin S.A. Distinct High-Performance Liquid Chromatography Pattern of Transforming Growth Factor Activity in Urine of Cancer Patients as Compared with That of Normal Individuals. *Cancer Research*. 44, 3613-3619, 1984.

Kitasako Y.; Shibata S.; Arakawa M.; Cox C.F.; Tagami J. A Light and transmission microscopic study of mechanically exposed monkey pulps: Dynamics of fiber elements during early dentin bridge formation, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 89:224-230; 2000.

Kuo C.K.; Ma P.X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22:511-521; 2001.

Lee S-H.; Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:339-359; 2007.

Lefmann M.; Schweickert B.; Buchholz P.; Göbel U.B.; Ulrichs T.; Seiler P.; Theegarten D.; Moter A. Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3760-7; 2006.

Linde A.; Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4:679-728; 1993.

Linde A. Glycosaminoglycans of the odontoblast-predentin layer in dentinogenically active porcine teeth. *Calcif. Tissue Res.* 12:281; 1973.

Linde A. Noncollagenous proteins and proteoglycans in dentinogenesis. *Dentin and Dentinogenesis*, CRC Press; 1984.

Mac Dougall M.; Simmons D.; Luan X. Dentin Phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleaved products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4; *J. Biol. Chem.* 272: 835-842; 1997.

Magloire H.; Joffre A. Distribution of type III collagen in the pulp parenchyma of the human tooth, *Histochem.* 74:319; 1982.

Mitsiadis T.A.; Romeas A.; Lendahl U.; Sharpe P.T; Farges J.C. Notch 2 protein distribution in human teeth under normal and pathological conditions, *Exp. Cell Res.* 282:101-109; 2003.

Mjör I.A.; Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. *Quintessence Int.* 33:35-63; 2002.

Murray P.E.; Smith T.W.; Hafez A.; Cox C.F. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13:6: 509-520; 2002.

Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch. Oral Biol.* 35:493-497; 1990.

Ogbureke K.U.E. & Fisher L.W. SIBLINGs and MMP expression in salivary glands. *J. Dent. Res.* 83(9): 2004.

Pathiraja A.G.; Raju A. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering; *European Cells and Materials.* 5:1-16; 2003.

Pameijer C. H.; Stanley H. R. The Disastrous effects of the “ total Etch” technique in vital pulp capping in primates. *Am. J. Dent.* 11:545-554; 1998.

Qurrat-ul-Ain; Sharma S.; Khuller G.K.; Garg S.K. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:931-8; 2003.

Ramos D.; Gómez M.; Fernández D. Método de obtención de microesferas biodegradables. *Rev Cubana Farm.* 1:70-7; 2001.

Richardson T. P.; Peters M.C.; Ennett A.B.; Mooney D.J. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat. Biotechnol.* 19:1029-1034; 2001.

Ricketts D. Management of the deep carious lesion and the vital pulp dentine complex. *British Dental Journal.* 191:11; 606-609; 2001.

Rodríguez-Llimós A.C.; Bregni C.; De los Santos-Carvallido C. Alginate microspheres for dermatopharmaceutical use. *Ars Pharmaceutica.* 44: 215-224; 2003.

Rutherford R. B.; Wahle J.; Tucker M.; Rueger D.; Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch. Oral Biol.* 38:571-6; 1993.

Rutherford R.B.; Spangberg L.; Tucker M. The time-course of the induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch. Oral Biol.* 39:833-8; 1994.

Sampath T.K.; Maliakal J. C.; Hauschka P. V. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J. Biol. Chem.* 267:20352-62; 1992.

Six N.; Lasfargues J.-J.; Goldberg M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch. Oral Biol.* 47: 177-187; 2002.

Smith A J., Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis-embryonic events as a template for dental tissue repair. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12:425-437; 2001.

Smith A.J. Reactionary Dentinogenesis; *Int. J. Dev. Biol.* 39: 273; 1995.

Suzuki S.; Sreenath T.; Haruyama N.; Honeycutt C.; Terse A.; Cho A.; Kohler T.; Müller R.; Goldberg M.; Kulkarni A.B. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 28: 221-9; 2009.

Taylor P.E.; Byers M.R. An immunocytochemical study of the morphological reaction of nerves containing CGRP to microabscess formation and healing in rat molars. *Arch. Oral Biol.* 35:629-38; 1990.

Thesleff I.; Vaahtokari A.; Kettunen P.; Aberg T. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development; *Connect. Tissue Res.* 32: 9-15; 1995.

Trowbridge H.O. Immunological aspects of chronic inflammation. *J. Endodon.* 16:54; 1990.

Tziafas D.; Smith A.J.; Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy; *J Dent Res.* 28:77-92; 2000.

Wang W.; Liu X.; Xie Y.; Zhang H.; Yu W.; Xiong Y.; Xie W.; Ma X. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *J. Mater. Chem.* 16:3252-3267; 2006.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Wessel M. D.; Flügge U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143; 1984.

Whitham M.; Laing S. J.; Jackson A.; Maasen N.; Walsh N. P. Effect of exercise with and without a thermal clamp on the plasma heat shock protein 72 response. *J. Appl. Physiol.* 103: 1251-1256; 2007.

Xin Nie, Weidong Tian; Yongjie Zhang; Xizhe Chen; Rui Dong; Ming Jiang; Famin Chen; Yan Jin. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. *Cell Biology International* 30:295-300; 2006.

Young C.S.; Terada S.; Vacanti J.P.; Honda M.; Bartlett J.D.; Yelick P.C. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds; *J. Dent. Res.* 81;695-700; 2002.