

Evolución de traumatismos internos en dientes de perro tratados con factores de crecimiento procedentes de células mononucleadas de médula ósea

M. Ambrosio^a, F. Borrego^a, J.M. Navas^a, A. Blanco^a, M.D. Carmona^a, J.G. Monterde^a, A.M. Galisteo^{a*}

^a Departamento de Anatomía y Anatomía patológica Comparadas y Toxicología. Universidad de Córdoba. España.

* Autor de Correspondencia, E-mail: anl1magaa@uco.es, Teléf.: +34 957218142, Fax: 34957218682.

Recibido: 29-07-2020 Aceptado: 02-08-2021

Publicado: 17-09-2021

RESUMEN

Con este trabajo hemos pretendido conocer, la acción de los sueros de células madre, producidos por los cultivos de monocitos, procedentes de médula ósea, sobre premolares que habían sido lesionados previamente. Se utilizaron 100 µl de cada uno de los sueros VEGF, TGF-β1 y FGFb, respectivamente, obtenidos en los pases 4 y 7 de los cultivos de monocitos medulares. Hemos utilizado 4 perros, de los que se utilizaron los premolares del lado derecho, distribuyéndolos en 4 lotes. A los premolares se les realizó un tratamiento que consistió, en una destrucción y sangrado de la pulpa y, posteriormente, un tratamiento con sueros producidos en cultivos de monocitos (CMNs), aleatoriamente a cada premolar. Al grupo control solo se le practicó el traumatismo inicial. Se distribuyeron en 4 grupos de experimentación: Control; 1° con suero VEGF; 2° con suero FGFb; 3° con suero TGF-β1. Comparando con el grupo control, hemos encontrado que en el grupo 1°, la recuperación se ha llevado a cabo por una activación del lecho vascular, activando tanto a los odontoblastos como a los fibroblastos, con formación de fibras de colágeno. En el grupo 2°, los capilares son maduros, activándose los odontoblastos, pero las células que reaccionan en mayor grado son los fibroblastos, que aumentan sus organoides citoplasmáticos, favoreciendo la síntesis de fibra de colágeno. En el grupo 3°, los capilares no fueron tan abundantes como en el 1°, pero con una correcta recuperación, activando los odontoblastos y la formación de fibras de colágeno.

Palabras Claves: Factores de crecimiento, dientes, perro, médula ósea, histopatología.

Evolution of internal traumatism in dog teeth treated with growth factors from mononucleated bone marrow cells

ABSTRACT

This work aims to describe the action of stem cell sera, produced by the culture of monocytes from bone marrow, on previously lesioned premolars. 100 µl was taken of each of the sera, VEGF, TGF-β1 and FGFb, respectively, obtained in passages 4 and 7 of the bone marrow monocyte cultures. We used the right-hand premolars of 4 dogs. The teeth were divided into 4 lots. The premolars were treated first by destroying and bleeding their pulp, and subsequently with sera produced in monocyte cultures (MNCs), randomly on each premolar. The initial trauma was not executed on the control group. 4 experiment groups were set up: Control; group 1 with serum VEGF (vascular); group 2 with serum FGFb (cellular); group 3 with serum TGF-β1 (fibrillary). Comparing them with the control group, we found that, in group 1 recovery was achieved by an activation of the vascular bed, activating both the odontoblasts and the fibroblasts, with formation of collagen fibers. In group 2, the capillaries were mature, the odontoblasts activated, but the cells reacting to a greater extent were the fibroblasts, with an increase in their cytoplasmic organoids, favoring the synthesis of collagen fibers. In group 3, the capillaries were not as abundant as in group 1, but with an acceptable recovery, activating the odontoblasts and the formation of collagen fibers.

Keywords: Growing-factors, teeth, dog, bone marrow, histopathology.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la existencia de unas proteínas plasmáticas denominadas *Factores de Crecimiento* (GF) y el uso de las mismas, es realmente reciente. Se han llevado a cabo innumerables experimentos para optimizar la forma de concentrar estas proteínas partiendo de pequeñas

cantidades de sangre y buscando una técnica sencilla, económica y reproducible [1], pasando de buscar un precipitado plaquetario [2, 3], a obtener una suspensión plaquetaria en proteínas plasmáticas [4], hasta el conocimiento de las citoquinas, que están superando las expectativas de curación de las plaquetas. Estas

investigaciones se inician con Urist en 1965 [5], quien demostró cómo el hueso liofilizado e implantado en lugares ectópicos, inducía la formación de hueso.

Las citoquinas tienen vida corta actuando a nivel local en forma autocrina y paracrina, solo algunas citoquinas están normalmente presentes en la sangre que son capaces de actuar a distancia; por ejemplo: eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por Transforming Growth Factor), factor de células totipotenciales (SCF, por Stem Cell Factor) y factor estimulante de las colonias de monocitos (MSCF, por Monocyte Colony Stimulant Factor).

Cada citoquina es producida por una subpoblación celular en respuesta a diferentes estímulos, induciendo una característica constelación de efectos en cascada agonista, sinérgica o antagónica alterando funcionalmente la célula diana. Sus actividades son redundantes o sobrepuestas, es decir, varias citoquinas diferentes comparten o inducen los mismos cambios o acciones biológicas [6]. Las citoquinas se activan y producen, selectivamente, diversos tipos de factores activos, como lo son:

Factor de Crecimiento Transformador (TGF).

La primera vez que se identificó se trataba de un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivos celulares, la acción del TGF sobre estas células alteraba su fenotipo y las transformaba en células tumorales (Roberts *et al.* 1986). Resultó ser una mezcla de dos proteínas TGF- α y TGF- β , que poseen muchas acciones biológicas comunes, entre ellas están: aumentan la proliferación y la migración de las células epiteliales, y liberan iones calcio del hueso. El TGF es muy potente y tiene efecto angiogénico [7].

Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF).

Son una familia de polipéptidos cuya misión es la de controlar la proliferación, diferenciación y otras funciones celulares en aquellas células derivadas del mesodermo y neuroectodermo [8]. Existen dos tipos: FGF ácido y FGF

básico. Entre sus acciones biológicas están las siguientes: estimulación de la angiogénesis por un mecanismo directo, al estimular la mitosis y migración de las células endoteliales; y la estimulación y coordinación de la mitogénesis de múltiples tipos celulares como células de origen mesenquimatoso, como los fibroblastos, los osteoblastos, condrocitos, células musculares lisas y mioblastos esqueléticos durante el crecimiento animal, mantenimiento y reparación tisular [8].

Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF).

Se aisló originalmente a partir de cultivos celulares de hipófisis. Se trata de una proteína homodimérica cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud del 24% con PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas), pero se une a diferentes receptores que el PDGF, e induce distintos efectos biológicos. Es un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales. Aunque no se conoce con detalle su papel en la regeneración, su importancia queda manifestada por su acción angiogénica *in vivo* [9]. En unos estudios realizados, se demuestra que el VEGF es un factor implicado tanto en el mantenimiento de la fisiología periodontal como en la progresión de periimplantitis, aunque todavía se requieren más estudios para aclarar su papel en estos procesos.

El objetivo del presente trabajo es determinar la eficacia clínica de los sueros producidos por las células mesenquimales derivadas de la médula ósea (CMNs).

De todas las sustancias conocidas por factores de crecimiento o activadoras de zonas dañadas, se destacan en la actualidad aquellas que inciden en aumento de las actividades vitales celulares (metabolismo y divisiones), en la neovascularización y, finalmente, si se tratan de tejidos conectivos, el aumento de la actividad de las fibrosis. Hemos detectado factores responsables de estas tres funciones en diferentes tipos celulares aislados, destacándose las células mononucleadas derivadas de médula ósea (CMNs).

Los sueros más usados corresponden a los obtenidos en cultivos de células mesenquimales como son:

- VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor (Factor derivado del endotelio Vascular).
- FGFb: Fibroblast Growth Factor (Factor de crecimiento de fibroblastos).
- TGF- β 1: Transform Growth Factor (Factor de crecimiento transformante β 1).

Los factores de crecimiento cuantificados en el sobrenadante de las CMNs en cultivo, recogidos tras 4 días del cultivo fue el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y tras 7 días de cultivo fueron los factores de crecimiento de fibroblastos-tipo 2 (FGFb) y el transformante- β 1 (TGF- β 1). Nos planteamos, después de alterar la raíz del diente, conocer de forma independiente, la acción de cada uno de dichos factores y en su totalidad, y realizar los correspondientes estudios comparativos. Para ello, nos hemos propuesto como objetivo conocer la acción individualizada de cada uno de los sueros, que se producen en el cultivo de las CMNs, sobre los tejidos de la dentina y pulpa dentinaria. Y también la acción beneficiosa de estos sueros sobre los tejidos mesenquimatosos, que configuran la pulpa dentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

Como material se utilizaron los dientes premolares con raíces de 2 vértices, tanto superiores como inferiores, del lado derecho de 4 perros Beagle jóvenes (8 meses de edad), así como un perro de las mismas características que los anteriores para la extracción de los fémures y tibias para los cultivos de CMNs (los 4 premolares derechos con raíces de dos vértices de cada perro se dividieron en cuatro grupos). Este estudio con perros fue autorizado el 18 de diciembre de 2017 por el Servicio de Sanidad Animal de la Dirección General de Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, siendo asignado el número

03/007/2017/085, dentro del proyecto de experimentación animal denominado “Estudio de desarrollo de periimplantitis en animales de experimentación”, cumpliendo con lo requerido en el art. 41.1 del RD 53/2013 de 1 de febrero y la Decisión 2012/707/UE, sobre la regulación y transmisión de información referente al uso de los animales.

A excepción de los premolares del grupo control, a los cuales no se les realizó ningún tipo de tratamiento serológico, al resto de dientes se les realizó un tratamiento que consistió en una destrucción y sangrado de la pulpa, y posteriormente, un tratamiento con sueros producidos en cultivos de monocitos (CMNs). Dependiendo del suero aplicado, se producen diferentes grupos de experimentación en los sucesivos pases de cultivo (4 y 7 días).

- *Grupo control (GC):* Premolares sin ningún tipo de tratamiento tras el traumatismo.
- *Grupo 1:* Tras el traumatismo y sangrado fueron tratados con 100 μ l de suero VEGF.
- *Grupo 2:* Tras el traumatismo y sangrado fueron tratados con 100 μ l de suero FGFb.
- *Grupo 3:* Tras el traumatismo y sangrado fueron tratados con 100 μ l de suero TGF- β 1.

Diseño Experimental.

Este trabajo lo hemos desarrollamos en un modelo canino que, tras la destrucción y posterior sangrado de la pulpa dentaria, se les realizaron los tratamientos con los tres sueros procedentes de diferentes pases de cultivo de monocitos (CMNs), obtenidos en el perro sano. Dejando un premolar como control, al que se le produce la lesión como en los anteriores, pero sin recibir tratamiento serológico. La cirugía realizada a los premolares, con previa sedación con hidrocloreuro de ketamina (20 mg/kg p.v. – 0,20 ml/kg p.v. de Imalgene-1000®; Boehringer Ingelheim Animal Health España, S.A.U, Barcelona), consistió en llegar a la cavidad radicular a través de la corona; una vez en la raíz, se realizó el sangrado y, posteriormente, se trataron a los tejidos

radiculares con los correspondientes sueros de los cultivos de las células mesenquimales, excepto en el premolar control. Finalmente, se procedió al cierre de la oquedad que se realizó para acceder a la pulpa tras aplicar una pasta triantibiótica. En cada perro se realizó esta intervención sobre cuatro premolares de raíz doble de cada arcada dentaria del lado derecho. Aplicando un suero diferente en cada premolar, haciendo una distribución aleatoria en cada uno de los animales, salvo en uno de los premolares que se utilizó como control.

Sueros y su procedencia.

Las CMNs fueron aisladas a partir de la Médula ósea contenida en la epífisis de los fémures y tibias del perro donante sano.

El procedimiento se inició con el sacrificio del animal por sedación con tiopental sódico (25 mg/kg p.v. – 0,25 ml de Tiobarbital® 0,5 g/kg p.v.; B. Braun VetCare SA, Barcelona) y posterior exanguinación. Una vez extraídos el fémur y la tibia, se realizaron varios lavados de la cavidad medular con suero salino heparinizado y antibiótico (0,1mg/ml estreptomicina, 100UI/ml penicilina) para obtener la médula ósea.

De la suspensión obtenida se eliminaron los restos de tejido no medular por centrifugación y se filtró con membranas de filtración de tamaño de poro 70 μm y 40 μm (de BD Biosciences). Los componentes de la suspensión medular fueron separados por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque de Lymphoprep™ (Oslo, Norway) de densidad 1,077 g/cm³.

A la fracción de células mononucleadas obtenida se le determinó la viabilidad con Azul Tripán (Lonza, Verviers, Belgium) y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer. Las células fueron resuspendidas a una concentración de 5×10^6 CMNs/ml de solución de suero fetal bovino (FBS) y DMSO al 10% para su congelación en un equipo CRYOMED Mod.8027 (Forma Scientific) y criopreservación a -196°C de temperatura en nitrógeno líquido.

Los monocitos cultivados se caracterizaron morfológicamente mediante Microscopía Óptica (MO), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Dicha caracterización se realizó en los pases de cultivo en los cuales habían sido observadas las poblaciones celulares más homogéneas.

Estas poblaciones fueron: los pases 2 y 5 de cultivo de monocitos. que tras el procesamiento fueron criopreservadas (figura 1).

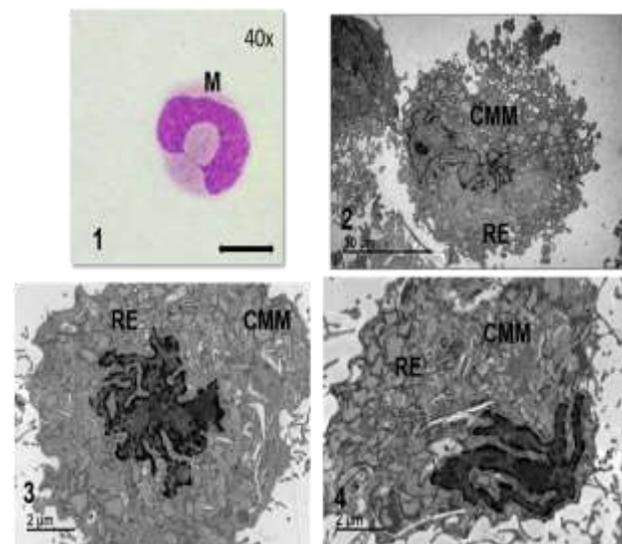


Fig. 1. 1) MO: detalle de monocito. Giemsa. Barra 100 μm ; 2) MET: célula monocitaria cultivada de cuarto pase. Barra 10 μm ; 3) MET: célula monocitaria cultivada de quinto pase. Barra 2 μm ; 4) MET: célula monocitaria cultivada de séptimo pase. Barra 2 μm .

(*M*: monocito; *CMM*: célula madre monocítica; *RE*: retículo endoplasmático).

En todos los casos, tras el proceso de descongelación, se realizaron frotis de las distintas poblaciones para confirmar el buen estado de conservación celular mediante un estudio de viabilidad con Azul Tripán en el cual fueron descartadas aquellas alícuotas con una viabilidad $\leq 80\%$. Para la realización de dicho frotis se colocó una gota de cada población celular sobre un portaobjeto, se extendió en una fina capa con la ayuda de un cubreobjetos y se procedió a fijar las células sobre el cristal con metanol frío y a deshidratarlas para contrastar sus núcleos con el colorante.

Cuantificación de Factores expresados por las MSCs el día 4 y el día 7 de cultivo.

Los factores de crecimiento cuantificados en el sobrenadante de los monocitos en cultivo, recogidos tras 4 días (pase 2) y tras 7 días (pase 5) de cultivo, fueron el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos-tipo 2 (FGF-2) y del factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1). La concentración de factores en el medio se cuantificó mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) expresando el resultado como $\mu\text{g/ml}$ de factor por cada 1×10^4 MSCs.

Se renovó el medio del cultivo para poder expresar la concentración de cada factor obtenida como “Secreción de factor procedente de 1×10^4 MSCs a lo largo de 24 horas de cultivo”. 24 horas después, se realiza la recogida de sobrenadantes correspondientes al día 4 y al día 7 de cultivo para la determinación de los factores solubles expresados por los monocitos.

Todos los sobrenadantes se centrifugaron para eliminar cualquier partícula contenida en la suspensión y que pudiera interferir en los resultados de cuantificación de los factores. Posteriormente se distribuyeron en forma de alícuotas en volúmenes de $300 \mu\text{l}$ /eppendorf y criopreservados a -80°C de temperatura. Las células adheridas al fondo de cada pocillo, una vez se recolectó el sobrenadante, fueron tripsinizadas, lavadas en PBS y determinada su viabilidad y recuento celular para conocer el número de MSCs en cada uno de los pocillos por volumen de sobrenadante recolectado. Concluidos los cultivos, se volvieron a llevar a cabo los distintos protocolos de cuantificación para cada uno de los factores solubles expresados por las células durante el cultivo utilizando la técnica de ELISA con kits comerciales.

Tratamiento serológico.

Los tratamientos consistieron en inocular $100 \mu\text{l}$ de cada suero en cada uno de los premolares de dos raíces,

obteniéndose las muestras de los dientes tras dos semanas luego de la inoculación. Para la MET, tras la extracción de los premolares, se obtuvo una muestra de la pulpa de la raíz del diente, y para la MO y MEB se descalcificó el resto del diente para su procesamiento histológico.

Microscopía Óptica y Electrónica.

Para la evaluación estructural, las muestras, previa descalcificación, se procesaron de manera rutinaria para secciones de parafina mediante fijación en formaldehído al 10%, deshidratación en series graduadas de etanol, inmersión en xilol e inclusión en parafina. Cada décima sección ($4 \mu\text{m}$ de grosor) de cada bloque se tiñó con hematoxilina y eosina y se utilizó para el estudio morfológico.

Para el estudio ultraestructural, se fijaron principalmente pequeñas muestras de pulpa seleccionadas al azar en una solución de glutaldehído al 2% en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,4) durante una noche a 4°C y luego se refijaron en tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) durante 30 min. Después de la deshidratación en serie de gradiente ascendente de etanol se incluyeron en Araldita, se cortaron secciones semifinas y ultrafinas con un ultramicrotomo LKB.

Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina, mientras que las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones ultrafinas fueron vistas y fotografiadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol 1400 y de Barrido Jeol 7800.

Los estudios morfométricos se realizaron en el Microscopio Electrónico, utilizando una superficie constante de $10.000 \mu\text{m}^2$, que corresponde a un cuadrado de rejilla que tienen $100 \mu\text{m}$ de lado.

La observación de las distintas secciones se realizó en el Microscopio Electrónico de Transmisión JeolJem 1400 (Jeol, Japón) de alta resolución (SCAI-UCO, Córdoba) con la adquisición de 20 imágenes en modo *.TIFF* por muestra mediante el software de microanálisis Inca energy 200tem

y Aztec de adquisición de imágenes acoplado al propio equipo.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa Statgraphic® (Centurion XVI®). Se aplicó la prueba F de Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar si había diferencias significativas. Posteriormente, se hizo la prueba de Scheffe de comparación múltiple. Los resultados se expresaron en

media con su respectiva desviación standard y se consideró para ser significativa la diferencia de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Grupo control.

En los estudios realizados en este grupo control, no existen cuadros lesionales de importancia, solo los debido a los tratamientos traumáticos (figura 2).

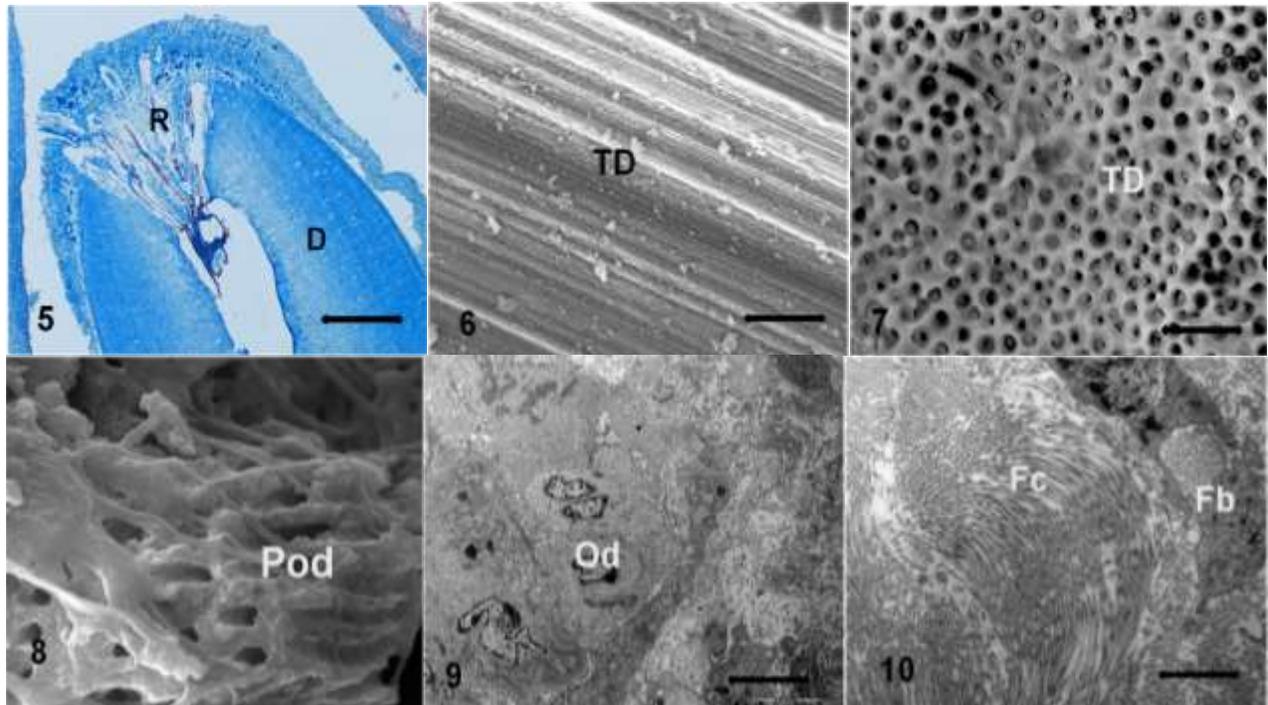


Fig. 2. 5) MO: detalle de diente aparentemente normal, (Grupo control). H-E. Barra 100 μm ; 6) MEB: detalle de túbulos dentinarios longitudinales, (Grupo control). Barra 50 μm ; 7) MEB: túbulos dentinarios transversales aparentemente normales, (Grupo control). Barra 50 μm ; 8) MEB: detalle de prolongaciones de odontoblastos, (Grupo control). Barra 50 μm ; 9) MET: detalle de odontoblastos, (Grupo control). Barra 10 μm ; 10) MET: matriz conectiva de la pulpa dentaria, (Grupo control). Barra 10 μm .

(*R: raíz, D: dentina, TD: túbulos dentinarios, Od: odontoblastos, Fc: Fibras de colágeno, Pod: prolongación de odontoblasto, Fb: fibroblastos*)

Con el Microscopio Óptico, se aprecia un tejido pulpar aparentemente normal, solo se puede apreciar un aumento de los procesos hiperémicos fruto al traumatismo. Se identifican odontoblastos dispuestos en hileras adheridos a la superficie de la dentina.

En estos estudios, en el seno de la dentina se destacan paralelamente unos a otros, los túbulos dentinarios, en cuyo interior se aprecia la fibra de Tomes.

Con el Microscopio Electrónico de Barrido, se destaca en la superficie de la dentina, los túbulos dentinarios alargados y asociados entre sí. En tanto que, en la superficie pulpar, una vez retirados los odontoblastos, se destaca las secciones de los túbulos dentinarios, y en algunos de ellos se mantienen las fibras de Tomes. Con el Microscopio Electrónico de Trasmisión, las alteraciones que existen son leves y debidas a los traumatismos.

Los resultados morfométricos del grupo control corresponden a un tejido conectivo adulto y en $10.000 \mu\text{m}^2$ son de la presencia de 2 capilares de media, 9,17 de fibrocitos de media y 0,67 fibroblastos de media. (tabla 1, gráfico 1).

Grupo 1º, con factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Con el Microscopio Electrónico de Barrido, se destaca una dentina sin modificaciones, con túbulos dentinarios que longitudinalmente muestran los túbulos dentinarios paralelos unos a otros (figura 3, recuadro n°11) y en su

superficie interna se aprecian sus secciones transversales con presencia de fibras de Tomes (figura 4, recuadro n°17), (figura 5, recuadro n°23), (figura 6, recuadro n°30). Con el Microscopio Óptico, en este grupo de estudio, se destaca que tras el traumatismo y el tratamiento con el suero VEGF, la mayoría de los vasos se encuentran dilatados, hiperémicos y en gran número. Aparentemente no existen células inflamatorias, y las bandas conectivas son normales. Los odontoblastos se mantienen alineados en contacto con la dentina, (figura 3, recuadro n°12). En el seno de la dentina se aprecian los túbulos dentinarios (figura 4, recuadro n°18).

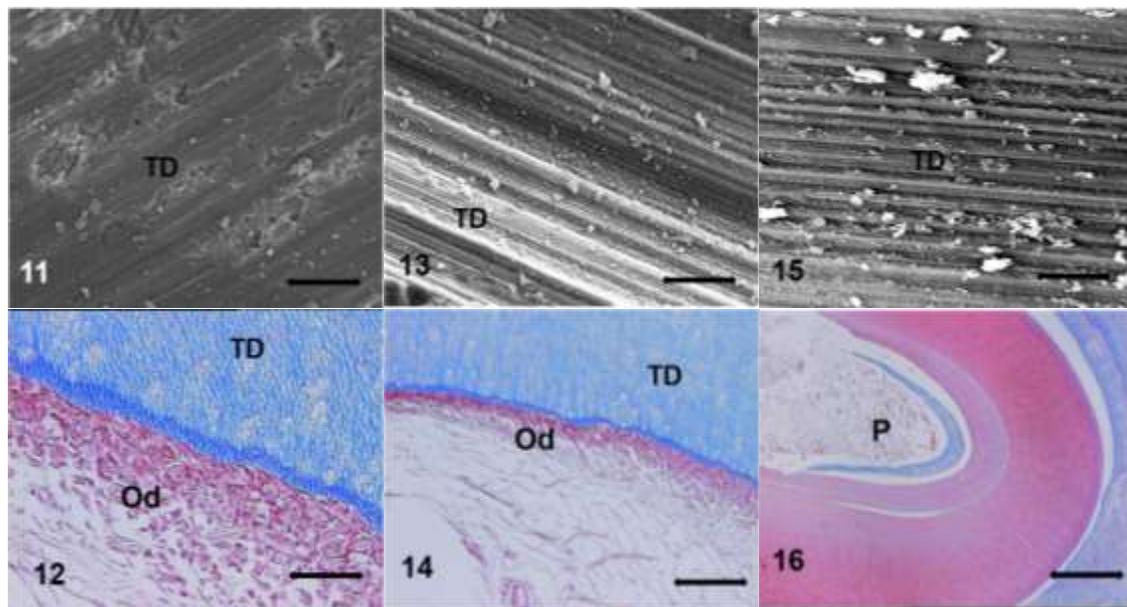


Fig. 3. 11) MEB: detalle de la superficie de túbulos dentinarios, (VEGF). Barra $50 \mu\text{m}$; 12) MO: se aprecia hileras de odontoblastos adheridos a la dentina, (VEGF). H-E. Barra $100 \mu\text{m}$; 13) MEB: detalle de la superficie de túbulos dentinarios, aparentemente normales, (TGF- β 1). Barra $50 \mu\text{m}$; 14) MO: se aprecia hileras de odontoblastos, aparentemente normales, adheridos a la dentina, (TGF- β 1). H-E. Barra $100 \mu\text{m}$. 15) MEB: túbulos dentinarios aparentemente normales, (FGFb). Barra $50 \mu\text{m}$. 16) MO: detalle de componentes dentarios, destacando la pulpa y la dentina, aparentemente normales, (FGFb). H-E. Barra $100 \mu\text{m}$.

(TD: túbulos dentinarios, Od: odontoblastos, P: pulpa).

Con el Microscopio Electrónico de Transmisión se destaca la gran cantidad de vasos sanguíneos que existen, y que corresponde a capilares organizados (figura 6, recuadro n°29), que llegan hasta diferenciar las células envolvente o pericitos, y otros con luces irregulares revestidos de células endoteliales que tienen gran cantidad de organoides

citoplasmáticos (figura 5, recuadro n°24), (figura 7, recuadro n°35 y n°36).

Los resultados morfométricos corresponden a un tejido conectivo cicatricial activo y en $10.000 \mu\text{m}^2$ son de la presencia de 6,17 capilares, con 2,83 de fibrocitos y 4 fibroblastos de media. (tabla 1, gráfico 1).

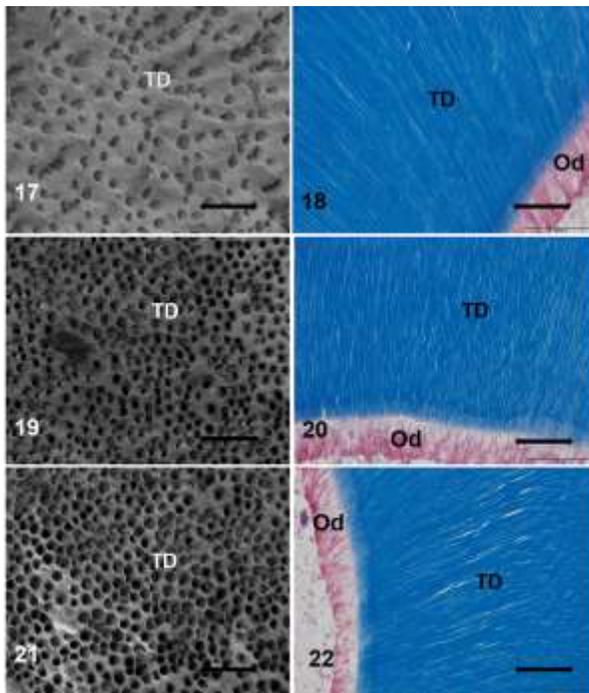


Fig. 4. 17) MEB: detalle de dentina, mostrando las secciones de los túbulos dentinarios, (VEGF). Barra 50 μm ; 18) MO: se aprecian los odontoblastos dispuestos en hilera, y los túbulos dentinarios en el seno de la dentina, (VEGF). H-E. Barra 100 μm ; 19) MEB: se destaca las secciones de los túbulos dentinarios, (TGF- β 1). Barra 50 μm ; 20) MO: se aprecia la relación de los odontoblastos con los túbulos dentinarios, (TGF- β 1). H-E. Barra 100 μm ; 21) MEB: se observan aparentemente normales las secciones de los túbulos dentinarios, (FGFb). Barra 50 μm ; 22) MO: se destacan la relación entre los odontoblastos y los túbulos dentinarios, (FGFb). H-E. Barra 100 μm .

(TD: túbulos dentinarios, Od: odontoblastos).

Grupo 2°, con factores de crecimiento de fibroblastos-tipo 2 (FGFb).

En este grupo tras realizarse un traumatismo en su pulpa y tratarse posteriormente con FGFb, con el Microscopio Óptico, en la cámara pulpar, apenas hemos encontrado modificaciones dignas de señalar (figura 3, recuadro n°16). Solo podemos señalar que existe una escasa densidad vascular, y están estructurados como vasos maduros con luces regulares, endotelio continuo que está rodeado por pericitos (figura 6, recuadro n°33).

Los fibroblastos son abundantes y están dispuestos por toda la cámara pulpar.

Tabla 1. Medias y desviación standard por 10.000 μm^2 del número de capilares (A); número de fibrocitos (C) y número de fibroblastos (D).

A	G. Control	G. VEGF	G. FGfb	G. TGF- β
a	2,00	5,00	3,00	2,00
b	2,00	6,00	4,00	4,00
c	1,00	7,00	5,00	4,00
d	2,00	8,00	3,00	5,00
e	3,00	7,00	5,00	6,00
f	2,00	4,00	6,00	3,00
Media	2,00	6,17	4,33	4,00
SD	0,63	1,47	1,21	1,41

B	G. Control	G. VEGF	G. FGfb	G. TGF- β
a	9,00	1,00	5,00	4,00
b	8,00	3,00	4,00	3,00
c	10,00	4,00	3,00	5,00
d	9,00	3,00	2,00	4,00
e	11,00	4,00	4,00	6,00
f	8,00	2,00	5,00	4,00
Media	9,17	2,83	3,83	4,33
SD	1,17	1,17	1,17	1,03

C	G. Control	G. VEGF	G. FGfb	G. TGF- β
a	1,00	3,00	7,00	5,00
b	0,00	4,00	6,00	4,00
c	1,00	4,00	6,00	6,00
d	1,00	3,00	8,00	5,00
e	0,00	5,00	7,00	6,00
f	1,00	5,00	8,00	4,00
Media	0,67	4,00	7,00	5,00
SD	0,52	0,89	0,89	0,89

Los odontoblastos se mantienen, y se disponen alineados adheridos a la dentina (figura 4, recuadro n°22), (figura 6, recuadro n°34). Los túbulos dentinarios atraviesan la dentina, disponiéndose paralelos unos a otros (figura 5, recuadro n°27). Con el Microscopio Electrónico de Barrido, la dentina tiene una morfología normal (figura 3, recuadro n°15), los túbulos dentinarios, tanto en disposición longitudinal como en las observaciones transversales, mostrando filamentos de los odontoblastos entrando en dichos túbulos (figura 4, recuadro n°21), (figura 5, recuadro n°28).

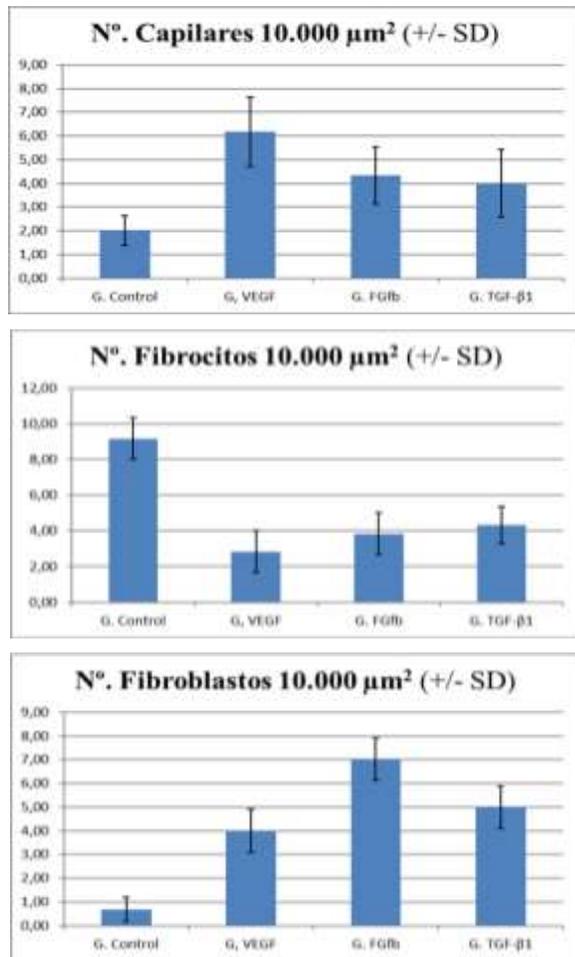


Gráfico 1. Representación gráfica por 10.000 μm² del número de capilares (A), fibrocitos (B) y fibroblastos (C).

Al Microscopio Electrónico de Trasmisión se aprecia abundantes fibroblastos que muestran numerosos organoides citoplasmáticos, fundamentalmente retículo endoplásmico rugoso (figura 7, recuadro n°39), cuyas cisternas tienen sus luces dilatadas y con contenido proteico en su interior. Y relacionado con el retículo y su membrana celular existen madejas de microfilamentos de tropocolágeno. Las fibras de colágeno muestran unas estriaciones normales solo en zonas periféricas, las fibras de colágeno presentan unos engrosamientos atípicos (figura 7, recuadro n°40). Los resultados morfométricos corresponden a un tejido conectivo cicatricial y en 10.000 μm² son de la presencia de 4,33 capilares, con 3,83 de fibrocitos de media y 7 fibroblastos de media (tabla 1, gráfico 1).

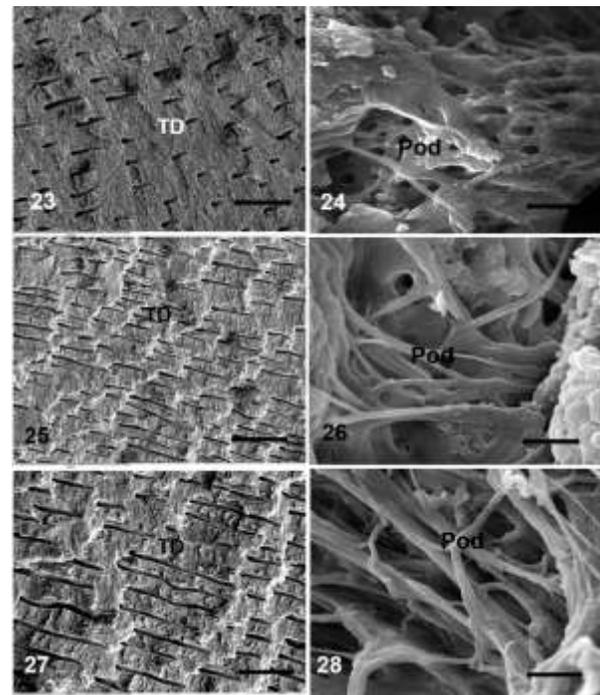


Fig. 5. 23) MEB: se aprecian los túbulos dentinarios en corte longitudinal, (VEGF). Barra 50 μm; 24) MEB: se destacan las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos, (VEGF). Barra 10 μm; 25) MEB: se aprecian las secciones longitudinales de los túbulos dentinarios, (TGF-β1). Barra 50 μm; 26) MEB: se aprecian las prolongaciones longitudinales de los odontoblastos, (TGF-β1). Barra 10 μm; 27) MEB: se destaca el paralelismo de los túbulos dentinarios, (FGFb). Barra 50 μm; 28) MEB: se observan con nitidez las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos, (FGFb). Barra 10 μm.

(TD: túbulos dentinarios, Pod: prolongación de odontoblasto).

Grupo 3º, con factores de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1).

En este grupo tras realizarse un traumatismo en su pulpa y tratarse posteriormente con TGF-β1, con el Microscopio Óptico, en la cámara pulpar, existe escasa reacción inflamatoria en la cámara pulpar, los capilares son escasos y maduros, de luces regulares y con todos los componentes propios de un capilar continuo. Los fibroblastos son abundantes y se relacionan con las hileras de odontoblastos (figura 3, recuadro n°14), la mayor parte de la dentina muestra los túbulos dentinarios paralelos unos a otros (figura 4, recuadro n°20). Y la mayor parte de cavidad está ocupada por fibras de colágeno.

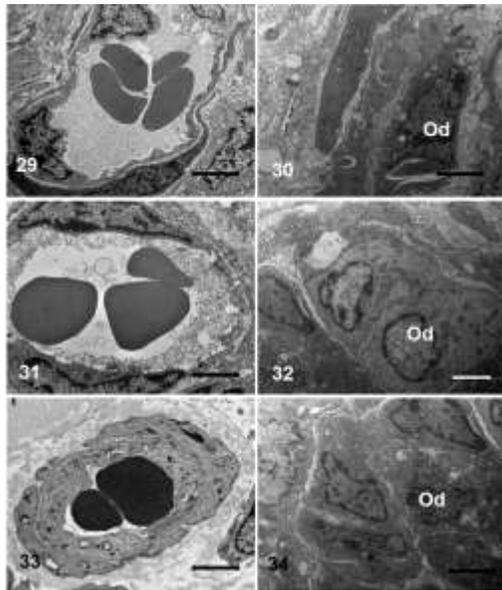


Fig. 6. 29) MET: se aprecian capilares sanguíneos aparentemente maduros, (VEGF). Barra 2 μ m. 30) MET: se destacan asociaciones de odontoblastos, (VEGF). Barra 10 μ m. 31) MET: se aprecian capilares con glóbulos rojos en su interior, (TGF- β 1). Barra 2 μ m. 32) MET: se aprecian odontoblastos asociados entre sí, (TGF- β 1). Barra 10 μ m. 33) MET: el capilar que se aprecia es normal y maduro, (FGFb). Barra 2 μ m. 34) MET: se observan odontoblastos en hileras, (FGFb). Barra 10 μ m.

(*Od: odontoblastos, C: capilar*).

En los estudios realizados con el Microscopio Electrónico de Barrido se diferencian los odontoblastos con prolongaciones citoplasmáticas en relación de los túbulos dentinarios (figura 5, recuadro n°26).

La superficie longitudinal de los túbulos dentinarios con el MEB, son aparentemente normales (figura 3, recuadro n°13), igual ocurre en su corte transversal (figura 4, recuadro n°19), (figura 5, recuadro n°25).

Con el Microscopio Electrónico de Transmisión, todos los componentes de los capilares se presentan aparentemente normales (figura 6, recuadro n°31), y en relación de los fibroblastos, tienen tendencia a transformarse en fibrocitos con escasos organoides citoplasmáticos.

De los elementos que se destacan son las fibras de colágeno, que se disponen irregularmente por toda la cámara pulpar. La mayoría de ellas muestran una estriación nítida, solo algunas de ellas muestran irregularidades con engrosamientos puntuales de las mismas, que muestran las estriaciones más gruesas (figura 6, recuadro n°32), (figura 7, recuadro n°37 y n°38).

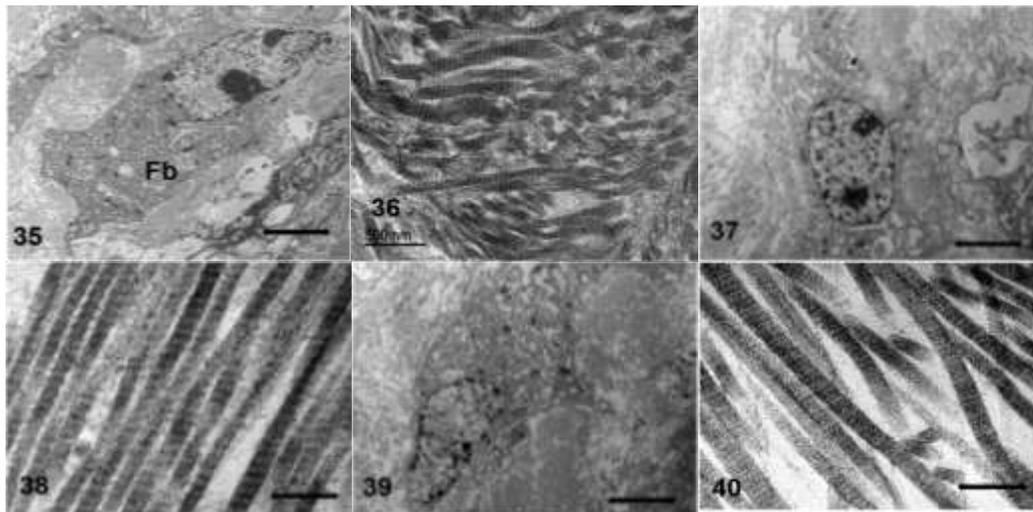


Fig. 7. 35) MET: se aprecia fibroblastos activos, con abundante retículo endoplásmico, (VEGF). Barra 2 μ m; 36) MET: se destacan abundantes fibras de colágeno en vías de formación, (VEGF). Barra 5 μ m; 37) MET: se destaca un fibroblasto, con retículo endoplásmico, (TGF- β 1) Barra 2 μ m; 38) MET: se observa abundantes fibras de colágeno maduras, con las correspondientes estrías, (TGF- β 1). Barra 5 μ m; 39) MET: se observa un fibroblasto con abundantísimo retículo endoplásmico, (FGFb). Barra 2 μ m; 40) MET: las fibras de colágeno son maduras, con las correspondientes estrías, (FGFb). Barra 5 μ m.

(*Fc: Fibras de colágeno, Fb: fibroblastos*).

Los resultados morfológicos corresponden a un tejido conectivo cicatricial fibroso y en 10.000 μm^2 son de la presencia de 4 capilares, de los cuales con 4,33 de fibrocitos de media y 5 fibroblastos de media. (tabla 1, gráfico 1)

DISCUSIÓN

Son diversos los sueros con factores de crecimiento y estimulación, utilizados, desde la experiencia realizada por Kim *et al.* [10], que por primera vez usó hueso liofilizado más PRP, en recuperaciones dentales.

Para conocer la actuación de forma independiente como en conjunto, de las diferentes citoquinas producidas por células mesenquimales cultivadas, en tejidos conectivos, en sus diferentes componentes, resulta de gran interés el uso de la cámara pulpar de dientes, y sobre todo de premolares, como hiciera Kim *et al.* [10] para conocer la acción de los factores de crecimiento de las plaquetas. En la cámara pulpar podemos estudiar la angiogénesis y evolución de los vasos sanguíneos, también el comportamiento de células fundamentales del tejido conectivo como son fibroblastos, y también en el caso de los dientes los odontoblastos, célula productora del material fibrilar de la dentina, y finalmente la síntesis y evolución de las fibras de colágeno, destacándose la progresiva implantación de las moléculas de tropocolágeno para formar las fibras de colágeno [11]. Lynch *et al.* [1] utilizaron PDGF-BB+IGF-I en un gel de metilcelulosa en perros Beagle y observaron que, a los 7 días el porcentaje de hueso que rellenaba el espacio peri-implantario y el porcentaje de superficie del implante en contacto con nuevo hueso eran significativos frente a los controles. A los 21 días, el porcentaje de hueso que rellenaba el espacio peri-implantario seguía siendo significativo, pero no el porcentaje de superficie del implante en contacto con el hueso.

En nuestra experiencia hemos podido estudiar, la acción de cada factor inductor (VEGF, FGFb y TGF- β 1) y también su acción conjunta, y conocer las posibles sinergias y acciones contradictorias de estos tres factores de sueros de células mesenquimales.

El Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) utilizado, se aisló originalmente a partir de cultivos celulares mesenquimales. Como se conocía, hemos podido comprobar que se comporta como un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales, aunque no se conoce con detalle su papel en la regeneración, su importancia queda manifestada por su acción angiogénica *in vivo* [9]. Las mitosis que hemos encontrado, en una primera fase, recaen sobre células inespecíficas, pero enseguida se relacionan entre sí, por uniones entre células, y se inicia la formación de nuevos vasos de distintas formas, pero predominando en esta primera fase las formaciones de capilares.

Coincidiendo con estudios anteriormente realizados, hemos demostrado que el VEGF es un factor implicado no solo en la formación de nuevos vasos (Ferrara, 2009), sino que también se implica tanto en su mantenimiento como en su fisiología.

En relación con el mantenimiento vascular, éste, no solo persiste, sino que evoluciona hasta formar capilares maduros. Se acentúa rápidamente al pasar los capilares, de tener un revestimiento irregular y trayectos sinusoides, al estructurarse con luces regulares y sus componentes como capilares maduros, con revestimiento de células endoteliales planas, y envueltas de pericitos.

La función de estos nuevos vasos se hace evidente, al repartirse de forma ordenada por toda la cámara pulpar, desatancándose abundantes vasos, vascularizando los odontoblastos, y el resto de tejido conectivo de la cámara pulpar.

Debido al mantenimiento de la actividad de los odontoblastos, con el Microscopio Óptico y Electrónico de Barrido, hemos comprobado que la dentina mantiene su morfología. Igual ocurre en el territorio que se considera cicatricial, formado por fibroblastos, en el que estas células muestran mitosis, se encuentran en un número notable, y aumenta su actividad de síntesis de proteínas formadoras de tropocolágeno, al desarrollar en su citoplasma abundantes cisternas de retículo rugoso.

De la actividad de los fibroblastos, son abundantes las fibras de colágenos existentes, con la característica de que presenta unas estriaciones aparentemente normales [11]. El factor de crecimiento transformador (FGFb), la primera vez que se identificó, se trataba de un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivo celular, la acción del TGF sobre estas células, e incluso alteraba su fenotipo y las transformaba en células tumorales. Resultó ser una mezcla de dos proteínas TGF- α y TGF- β , poseen muchas acciones biológicas comunes, entre ellas: aumentan la proliferación y la migración de las células conectivas y epiteliales, fenómenos que se acentúan porque liberan iones calcio del hueso.

El FGFb es muy potente y tiene efecto angiogénico debido a que favorecen las mitosis, pero lo que es más importante, es que actúan sobre células conectivas y epiteliales, favoreciendo el aumento en su número a través de las mitosis y sobre todo convierte a las células en elemento activo, al favorecer la formación de los organoides citoplasmáticos, sobre todo retículo rugoso, que forman las proteínas que les corresponden sintetizar a cada tipo de células.

De los tres factores de crecimiento se destaca TGF- β 1, como Factor de crecimiento transformante formado por las células madre mesenquimales (MSC), que pueden diferenciarse y apoyar la continuación en el desarrollo radicular, factores de crecimiento (GF), para la inducción de la proliferación celular y la diferenciación, y un andamio adecuado que brinde soporte y promueva la migración, crecimiento y la diferenciación celular. Lo mismo que el plasma rico en plaquetas (PRP) han sido reportados como andamios de elección en la regeneración endodóntica, se dice que estimulan la formación de tejido, la organización y la adherencia celular, mejorando el tiempo de tratamiento y de evolución.

CONCLUSIONES

Hemos comprobado que la acción beneficiosa de los sueros empleados, de forma independiente, sobre los tejidos

alterados de la pulpa dentaria, mejora el lecho vascular, activan los fibroblastos y favorecen la formación de fibras de colágeno.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha realizado por los grupos de investigación PAIDI BIO-218 "Histología e histomorfometría" y PAIDI AGR-101 "Anatomía y Embriología" de la Universidad de Córdoba en el Plan de Investigación de Andalucía. Los autores también agradecen al Servicio de Asesoramiento Científico Microscopía Electrónica SCAI, Universidad de Córdoba, por su colaboración en este estudio. Así mismo, agradecen al Servicio Centralizado de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba. No hay conflicto de intereses para declarar.

PARTICIPACIÓN DE LOS AUTORES

Miguel Ambrosio: Diseño experimental, obtención de muestras y redacción.

Francisco Borrego: Diseño experimental, obtención de muestras y redacción.

José Miguel Navas: Redacción del manuscrito.

Alfonso Blanco: Obtención de imágenes de ME (MET y MEB).

María Dolores Carmona: Obtención de sueros de GFs.

José García-Monterde: Obtención de imágenes de MO.

Alfonso Martínez Galisteo: Diseño experimental, redacción y revisión.

REFERENCIAS

- [1] Lynch S.E., de Castilla G.R., Williams R.C., Kiritsy C.P., Howell T.H., Reddy M.S., Antoniades H.N. (1991) "The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing" *J. Periodontol*, 62(7):458-467.
- [2] Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmele S.R., Strauss J.E., Georgeff K.R. (1998) "Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts"

- Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*
85(6):638-646.
- [3] Marx R.E. (2004) "Platelet-rich plasma: evidence to support its use" *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62(4):489-496.
- [4] Beca T., Hernández G., Morantes S., Bascones A. (2007) "Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica" *Av. Periodoncia* 19(1):39-52.
- [5] Urist M.R. (1965) "Bone: formation by autoinduction". *Science* 150(3698):893-899.
- [6] Werner S., Grose R. (2003) "Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines" *Physiol. Rev.* 83(3):835-870.
- [7] Roberts A.B., Sporn M.B., Assoian R.K., Smith J.M., Roche N.S., Wakefield L.M., Heine U.I., Liotta L.A., Falanga V., Kehrl J.H., Fauci A.S. (1986) "Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(12):4167-4171.
- [8] Gospodarowicz D., Neufeld G., Schweigerer L. (1986) "Fibroblast growth factor" *Mol. Cell. Endocrinol.* 46(3):187-204.
- [9] Ferrara N. (2009) "Vascular Endothelial Growth Factor" *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29(3):789-791.
- [10] Kim S.G., Kim W.-K., Park J.-C., Kim H.-J. (2002) "A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma" *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60(9):1018-1025.
- [11] Munksgaard E.C., Rhodes M., Mayne R., Butler W.T. (1978) "Collagen Synthesis and Secretion by Rat Incisor Odontoblasts in Organ Culture" *Eur. J. Biochem.* 82(2):609-617.