

Contenido orgánico de extractos parcialmente purificados de pulpa dental humana y bovina

Organic content of human and bovine dental pulp partially purified extracts

Conteúdo orgânico de extratos parcialmente purificado de polpa dentária humana e bovina

► María Mercedes Salas^{1a}, María Luisa de la Casa^{2b}, María Elena López^{3a}

¹ Bioquímica

² Doctora en Odontología

³ Doctora en Bioquímica

^a Cátedra de Química Biológica, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.

^b Cátedra de Endodoncia, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.

Resumen

La pulpa dental contiene tejido conectivo rico en proteínas, mayormente colágeno. El objetivo de este trabajo fue describir un método de purificación de componentes orgánicos pulpares humanos y bovinos, vital y necrótico para validar el modelo experimental bovino. Se prepararon extractos con 50 mg de fracción media de pulpas unirradicales, 20 humanas o 1 bovina, en 500 µL de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, floruro de fenil metil sulfonilo 1mM e hidrocloreuro de benzamidina 5 mM frío. Se homogeneizó y centrifugó a 10000 rpm. Los sobrenadantes fueron parcialmente purificados con sulfato de protamina 1%, los sedimentos resuspendidos y dializados 2 horas con recambio en acetato de sodio 500 mM pH 6. Se determinaron proteínas, hidroxiprolina e hidratos de carbono, y se calculó el rendimiento según el contenido de hidroxiprolina. Se aplicó electroforesis en geles de poliacrilamida. Se encontró mayor contenido orgánico en tejido humano que en bovino, y en vital que en necrótico. Por hidroxiprolina/proteínas y rendimiento, el extracto bovino contendría mayor proporción de colágeno. En pulpas humanas se obtuvieron bandas a 78 y 80 kDa, y en bovinas a 74 y 76 kDa. No hubo diferencias entre tejido vital y necrótico. Las evidencias cuali y cuantitativas expresadas validarían al modelo bovino en investigaciones endodónticas.

Palabras clave: pulpa dental humana * pulpa dental bovina * proteínas * hidroxiprolina * hidratos de carbono

Summary

The dental pulp contains connective tissue and is rich in proteins, mainly collagen. The aim of this study was to describe a purification method for organic compounds of human and bovine pulp tissues, either vital as necrotic, in order to validate the experimental bovine model. Extracts of 50 mg of the

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

middle fraction of one root pulp teeth, 20 humans or 1 bovine, in 500 μ L of cold 50 mM Tris - HCl pH 7.4, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride and 5 mM benzamidine hydrochloride were prepared. Extracts were homogenized and centrifuged at 10000 rpm. Supernatants were partially purified with 1% protamine sulphate, sediments re-suspended and dialyzed during 2 hours with a spare in 500 mM sodium acetate pH 6. Proteins, hydroxiprolin and carbohydrates were determined, and the yield of the process was calculated according to the hydroxiprolin content. Poliacrylamide gel electrophoresis was applied. A greater organic content was found in human than in bovine tissue, and in vital rather than in the necrotic one. Hydroxiprolin/proteins and yield evidenced that bovine extract would contain a larger proportion of collagen. Bands at 78 and 80 kDa in human pulp and at 74 and 76 kDa in the bovine tissue were observed. There was no difference between vital and necrotic tissues. The qualitative and quantitative evidences expressed in this work would validate the bovine research endodontic model.

Key words: dental human pulp * dental bovine pulp * proteins * hydroxiprolin * carbohydrates

Resumo

A polpa dentária contém tecido conectivo rico em proteínas, na sua maioria colágeno. O objetivo deste trabalho foi descrever um método de purificação de componentes orgânicos da polpa dos humanos e bovinos, vitais e necróticos para validar o modelo experimental bovino. Foram preparados extratos com 50 mg de fração média de polpas unirradiculares, 20 humanas ou 1 bovina em 500 μ L de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, fenil-metil-sulfonyl fluoreto 1 mM e hidrocloreto de benzamidina 5 mM frio. Foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram parcialmente purificados com sulfatos de protamina 1%, os sedimentos ressuspensos e dialisados 2 horas com recâmbio em acetato de sódio 500 mM pH 6. Foram determinadas proteínas, hidroxiprolina e hidratos de carbono e se calculou o rendimento conforme o conteúdo de hidroxiprolina. Foi aplicada eletroforese em géis de poliacrilamida. Maior conteúdo orgânico foi encontrado em tecido humano que em bovino e em vital que em necrótico. Por hidroxiprolina/proteínas e rendimento, o extrato bovino conteria maior proporção de colágeno. Em polpas humanas foram obtidas faixas a 78 e 80 kDa e em bovinas a 74 e 76 kDa. Não houve diferenças entre tecido vital e necrótico. As evidências qualitativas e quantitativas expressas validariam o modelo bovino em pesquisas endodônticas.

Palavras chave: polpa dentária humana * polpa dentária bovina * proteínas * hidroxiprolina * hidratos de carbono

Introducción

La preparación del conducto radicular implica la eliminación de restos orgánicos pulpares retenidos después de la instrumentación. Tejidos conectivos de otros orígenes, tales como bovino y porcino, son empleados para estudios endodónticos por la dificultad que representa el escaso tamaño de las pulpas humanas (1-4).

Van Amerogen *et al* (5) hallaron en pulpa de dientes humanos diferentes proporciones de colágeno medido por el contenido de hidroxiprolina. Encontraron, respecto del total de proteínas, 21% de colágeno en la región coronaria, 30,3% en la media, 27,5% en la apical y mayor contenido de proteínas no colágenas en las zonas coronaria (44,6%), media (43,7%) y apical (46%). También intentaron extraer colágeno con solución salina neutra y con ácido acético 0,5 M, pero obtuvieron bajo rendimiento. Previa digestión parcial con pepsina, encontraron 42,6% de colágeno tipo III del colágeno total en pulpas humanas, aunque advirtieron que la composición de las pulpas dentales de origen animal podría ser diferente. Por otro lado, en observaciones histológicas en pulpa de dientes bovinos de 1 año de edad, otros autores (6) encontraron bajo contenido de colágeno (16,8%)

y altas concentraciones de glicoproteínas y mucopolisacáridos ácidos (5,9%) respecto de la materia orgánica. Se aisló mayor proporción de colágeno tipo I y tipo III en pulpa y dentina bovina de dientes embrionarios jóvenes y maduros, encontrándose que el de tipo III es constante en cada estadio en un 45% respecto del total (7). Con la madurez del diente erupcionado, el tipo III aumenta en pulpa y el tipo I en dentina. Otros investigadores (8) encontraron en tejido pulpar bovino joven, mayor proporción de colágeno tipo III respecto del tipo I y evidenciaron su disminución con la madurez del desarrollo tisular. Yamauchi *et al* (9) encontraron 41% de colágeno tipo III en pulpa bovina, proporción semejante a la hallada en pulpas humanas (5), además de 56% de colágeno tipo I y 2% del tipo V.

Entre las proteínas, el colágeno es la más estudiada en el tejido pulpar por su función, y actualmente se emplea en ingeniería tisular para regeneración endodóntica como proteína inductora de células pulpares en cultivos de células madre (10). También se estudiaron por expresión genética, proteínas defensinas, a fin de diferenciar pulpas dentales sanas e inflamadas (11).

En cuanto al contenido en hidratos de carbono, se estudiaron los glicosaminoglicanos en pulpas bovina y por-

cina (6) aunque poco se ha mencionado en pulpa humana (12). En otro estudio en bovinos (13) se evidenciaron, por SDS PAGE, bandas entre 100 y 120 kDa, las que corresponden al colágeno tipo I. Además, por *Western Blotting* detectaron una banda de aproximadamente 46 kDa correspondiente al versican, glucoproteína que se ubica en la periferia de la pulpa uniendo a los odontoblastos. Otros autores (14) identificaron la fosforina, fosfoproteína de 156 kDa, sintetizada por los odontoblastos e involucrada en el proceso de mineralización de la matriz colágena de dentina bovina.

Si bien las pulpas de origen animal se emplean frecuentemente en investigación endodóntica, no existe en la literatura una descripción comparativa sobre los componentes bioquímicos de las mismas y los de la pulpa humana. Así, el objetivo de este trabajo fue describir un método de purificación de los componentes orgánicos pulpares y comparar entre aquéllos de origen humano y bovino, tanto vital como necrótico, a fin de contribuir con la validación del tejido bovino como modelo experimental.

Materiales y Métodos

TOMA DE MUESTRA

Se trabajó con la fracción media de 120 pulpas humanas (60 vitales y 60 necróticas) y 6 pulpas bovinas (3 vitales y 3 necrosadas). Las primeras procedían de dientes unirradiculares de pacientes de 17 a 33 años con indicación de tratamiento endodóntico que concurrieron al Servicio Odontológico de la Cátedra de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la UNT, previo consentimiento informado de cada paciente. Las 60 pulpas humanas vitales fueron extraídas por diagnóstico de inflamación pulpar, y las 60 pulpas necróticas se obtuvieron a causa de necrosis pulpar. Las pulpas vitales bovinas se aislaron de dientes sin desgaste de la mandíbula inferior de animales de 2 a 4 años recién sacrificados, de las cuales se necrosaron 3 y las restantes fueron tratadas como pulpas vitales. Para obtener el tejido necrosado bovino se adaptó el método propuesto por Gordon *et al.* (1); se colocaron fracciones medias de pulpas en recipientes cubiertos a 25 °C durante 72 h. En la pulpectomía de dientes humanos se empleó tiranervios; en dientes bovinos se usó pinza de algodón previa extracción de la corona y seccionamiento longitudinal de la raíz en dirección vestibulo-lingual. Ambos procedimientos fueron realizados por un mismo odontólogo.

Se usó la fracción media de las pulpas a fin de evitar variación en el contenido orgánico de porciones diferentes (5). Se prepararon extractos de aproximadamente 50 mg con 40 pulpas humanas (20 vitales y 20 necróticas) obtenidas *in vivo* de pacientes en tratamiento y 2 pulpas bovinas (1 vital y 1 necrótica) obtenidas *ex vivo* de animales.

Los tejidos obtenidos fueron colocados a 0 °C y luego conservados a -15 °C hasta la preparación de los extractos.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

En cada extracto se empleó la fracción media (5) (aproximadamente 1/3) de 20 pulpas humanas o (aproximadamente 1/5) de 1 pulpa bovina hasta alcanzar 50 mg. Las pulpas fueron colocadas en 500 µL de *buffer* de extracción, compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (7) en presencia de fluoruro de fenil metil sulfonilo 1mM e hidrocloreuro de benzamidina 5 mM como inhibidores de proteasas. Se maceraron los tejidos con homogeneizador de teflón a 0 °C durante 15 min. Posteriormente, se los centrifugó 15 min a 4 °C y a 10000 rpm. Se recogieron los sobrenadantes o extractos crudos (I), de volumen aproximado 300 µL, que fueron parcialmente purificados por precipitación con sulfato de protamina 1% a 0 °C durante 10 min. Los sedimentos fueron resuspendidos, dializados en *buffer* acetato de sodio 500 mM pH 6 durante 2 horas con agitación suave y recambio del *buffer* cada 30 min (II), y posteriormente ultrafiltrados a través de membranas Millipore de 0,22 µm. Se obtuvieron fracciones ultrafiltradas (III) y las retenidas en el filtro que fueron resuspendidas en el mismo volumen III con *buffer* acetato de sodio 500 mM pH 6 (IV). La preparación de los extractos se repitió por triplicado.

Se confeccionaron tablas de purificación en base al contenido de hidroxiprolina y de proteínas totales. Se presenta por primera vez en la literatura la relación de colágeno (a través del contenido en hidroxiprolina) (3) respecto del total de proteínas y su rendimiento y grado de purificación. Las tablas incluyen el cálculo referido al volumen total de cada etapa.

DETERMINACIONES QUÍMICAS

Se adaptaron técnicas colorimétricas para ser utilizadas como micrométodos. Se determinaron proteínas totales según el método de Lowry *et al.* (15) (20 µL de muestra y 180 µL de agua destilada en 400 µL de hidróxido de sodio 0,5 N reaccionan con 2 mL de reactivo formador del complejo coloreado que contiene carbonato de sodio 2%, sulfato cúprico pentahidratado 1% y tartrato de sodio 2,7% en proporciones 100/1/1; se incubó 10 min a temperatura ambiente y se agregan 200 µL de reactivo de Folin diluido 1/1 para leer la absorbancia a 750 nm entre 30 y 60 min); hidroxiprolina con la técnica de Jamall *et al.* (16) (20 µL de muestra se humedecen con 580 µL de propanol 50% durante 30 min, se agregan 100 µL de cloramina T y 500 µL de reactivo de Erlich recién preparado; se incubó 1,5 horas a 50 °C, y se lee la absorbancia a 550 nm) y se determinan hidratos de carbono totales por el método del Fenol sulfúrico (17) (20 µL de muestra en 780 µL de agua destilada, 40 µL de fenol y

2 mL de ácido sulfúrico concentrado agregado a presión; se incuban a 100 °C durante 30 min, se enfría y se lee la absorbancia a 490 nm).

Se realizaron electroforesis (Mini Protean II) en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS PAGE) 12%. Para ello se aplicó el método de Laemmli (18) empleando *buffer* Tris-Glicina pH 8,3 y aplicando 30 mA/gel durante aproximadamente 50 min. Para el revelado de las bandas proteicas se empleó Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1%. Se sembraron además estándares proteicos (BIO-RAD) que incluyeron miosina (200,0 kDa), β -galactosidasa (116,2 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), sero albúmina (66,2 kDa), ovo albúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (31,0 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa).

Resultados

La Figura 1 muestra la diferencia de tamaños de dientes (a) y pulpas (b) humanos y bovinos, vitales y de reciente extracción. El peso de las pulpas humanas osciló entre 2 y 6 mg, mientras que las pulpas de dientes bovinos pesaron entre 150 y 250 mg. En la Tabla I se registran los promedios y error estándar de los valores obtenidos de proteínas totales, hidroxiprolina e hidratos de carbono totales en los extractos crudos (I). La pulpa humana al estado vital mostró mayor concentración de los tres componentes orgánicos determinados, respecto del bovino. También las pulpas humanas vitales presentaron mayor contenido de proteínas, hidroxiprolina y azúcares totales que las necróticas, mientras que en los extractos bovinos se observaron diferencias en contenido entre pulpas vitales y necróticas sólo para hidroxiprolina.

La cuantificación del proceso de purificación de los componentes de tejido pulpar se resume en las Tablas II (humano) y III (bovino) para cada extracto de mejor rendimiento. Se partió de cantidades más altas de proteínas

e hidroxiprolina en los extractos humanos respecto de los bovinos. Las etapas de precipitación (II) y posterior ultrafiltrado (III) favorecieron la eliminación de proteínas no abundantes en hidroxiprolina y el rendimiento del proceso respecto del retenido y resuspendido (IV). La relación hidroxiprolina/proteínas totales fue mayor en pulpas vitales respecto de necróticas para los extractos del ultrafiltrado (III) tanto humano como bovino.

En la Figura 2 se presentan los resultados por SDS PAGE de las etapas del proceso de purificación. Se evidencia, en general, mayor presencia de proteínas en el ultrafiltrado (III) que en el retenido y resuspendido (IV), confirmando el mejor rendimiento de esa etapa en la purificación de proteínas. Además, los extractos humanos presentan mayor número de bandas de proteínas que aquéllos bovinos, así como los extractos vitales respecto de los necróticos para ambos tipos de tejidos, confirmando los resultados anteriores.

Comparando particularmente los extractos crudos de pulpas humanas y bovinas por SDS PAGE (Figura 3) se evidenció la presencia de bandas coincidentes a 6 kDa, 25 kDa, 31 kDa, 40 kDa, 66 kDa, 93 kDa, 95 kDa, 180 kDa, 200 kDa y >200 kDa. Sin embargo, se observó una zona con diferentes bandas de proteínas para extractos humanos y bovinos entre 70 kDa y 80 kDa. Esto es, en pulpas humanas se obtuvieron bandas aproximadamente a 78 kDa y 80 kDa, y en bovinas a 74 kDa y 76 kDa. No se detectaron diferencias entre los tejidos vital y necrótico.

Discusión y Conclusiones

La pulpa dental humana está constituida por tejido conectivo especializado. El principal componente proteico de la pulpa y la dentina madura es el colágeno, glicoproteína rica en hidroxiprolina y en menor proporción, en hidroxilisina e hidratos de carbono. El tamaño

Tabla I. Valores promedio y error estándar de los parámetros químico-orgánicos evaluados en extractos crudos de pulpa dental humana y bovina, vital y necrótica

Extracto	Proteínas totales ($x \pm DE$)			Hidroxiprolina ($x \pm DE$)			Azúcares totales ($x \pm DE$)		
	mg/dL	mg/mL extracto	mg/mg tejido	mg/dL	mg/mL extracto	$\mu\text{g/mg}$ tejido	mg/dL	mg/mL extracto	mg/mg tejido
Humana vital	670,4 $\pm 0,11$	1,67 $\pm 0,15$	0,033 $\pm 0,001$	0,70 $\pm 0,05$	0,0017 $\pm 0,0005$	0,035 \pm 0,0021	45,03 $\pm 0,011$	0,1126 $\pm 0,035$	0,0022 $\pm 0,0003$
Humana necrótica	380,5 $\pm 0,33$	0,90 $\pm 0,09$	0,025 $\pm 0,005$	0,60 $\pm 0,08$	0,0015 $\pm 0,0001$	0,021 \pm 0,0015	40,07 $\pm 0,021$	0,1010 $\pm 0,028$	0,0012 $\pm 0,0005$
Bovina vital	390,2 $\pm 0,41$	0,97 $\pm 0,13$	0,023 $\pm 0,002$	0,48 $\pm 0,11$	0,0012 $\pm 0,0008$	0,023 \pm 0,0016	9,04 $\pm 0,009$	0,0226 $\pm 0,061$	0,0005 $\pm 0,0001$
Bovina necrótica	395,1 $\pm 0,86$	0,99 $\pm 0,10$	0,024 $\pm 0,001$	0,51 $\pm 0,09$	0,0012 $\pm 0,0003$	0,028 \pm 0,0022	7,01 $\pm 0,007$	0,0189 $\pm 0,039$	0,0005 $\pm 0,0001$

Tabla II. Valores promedio de los parámetros químico-orgánicos analizados durante el proceso de purificación parcial de proteína rica en hidroxiprolina de extractos de pulpa humana. a) Vital, b) Necrótica

a)				
<i>Extracto</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Volumen (mL)	0,200	0,200	0,100	0,100
Proteínas totales (µg/mg tej/vol)	0,470	0,374	0,071	0,009
Hidroxiprolina (µg/mg tej/vol)	0,053	0,023	0,016	0,002
Hidroxiprolina/Proteínas	0,113	0,061	0,225	0,222
Purificación	1,000	0,540	1,991	1,965
Rendimiento	100,0	43,4	30,2	3,8
I: Extracto crudo, II: Precipitación con sulfato de protamina, III: Ultrafiltrado, IV: Retenido y resuspendido				
b)				
<i>Extracto</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Volumen (mL)	0,250	0,200	0,100	0,100
Proteínas totales (µg/mg tej/vol)	0,414	0,285	0,116	0,015
Hidroxiprolina (µg/mg tej/vol)	0,028	0,022	0,017	0,001
Hidroxiprolina/Proteínas	0,068	0,077	0,146	0,067
Purificación	1,000	1,140	2,150	0,980
Rendimiento	100,0	78,6	60,7	3,6
I: Extracto crudo, II: Precipitación con sulfato de protamina, III: Ultrafiltrado, IV: Retenido y resuspendido				

de la pulpa y en consecuencia, el volumen de la cámara pulpar disminuyen con la edad del diente debido a la disminución del contenido proteico y al desarrollo de la dentina.

En este trabajo se presenta un estudio comparativo del contenido orgánico de pulpas de dientes jóvenes de

origen humano y bovino. Si bien la pulpa humana tiene menor tamaño, expresando su contenido en mg/mg de tejido, al estado vital presenta mayor concentración de los tres componentes orgánicos determinados respecto del bovino. Dado que las pulpas bovinas presentan dimensiones mucho mayores que las pulpas humanas,

Tabla III. Valores promedio de los parámetros químico-orgánicos analizados durante el proceso de purificación parcial de proteína rica en hidroxiprolina de extractos de pulpa bovina. a) Vital, b) Necrótica

a)				
<i>Extracto</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Volumen (mL)	0,250	0,200	0,050	0,050
Proteínas totales (µg/mg tej/vol)	0,124	0,078	0,009	0,002
Hidroxiprolina (µg/mg tej/vol)	0,021	0,019	0,012	0,001
Hidroxiprolina/Proteínas	0,169	0,243	1,333	0,500
Purificación	1,000	1,440	7,890	2,960
Rendimiento	100,0	90,50	57,10	4,80
I: Extracto crudo, II: Precipitación con sulfato de protamina, III: Ultrafiltrado, IV: Retenido y resuspendido				
b)				
<i>Extracto</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Volumen (mL)	0,200	0,150	0,050	0,050
Proteínas totales (µg/mg tej/vol)	0,068	0,063	0,007	0,003
Hidroxiprolina (µg/mg tej/vol)	0,012	0,008	0,005	0,002
Hidroxiprolina/Proteínas	0,176	0,127	0,714	0,667
Purificación	1,000	0,720	4,060	3,790
Rendimiento	100,0	66,70	41,70	16,70
I: Extracto crudo, II: Precipitación con sulfato de protamina, III: Ultrafiltrado, IV: Retenido y resuspendido				

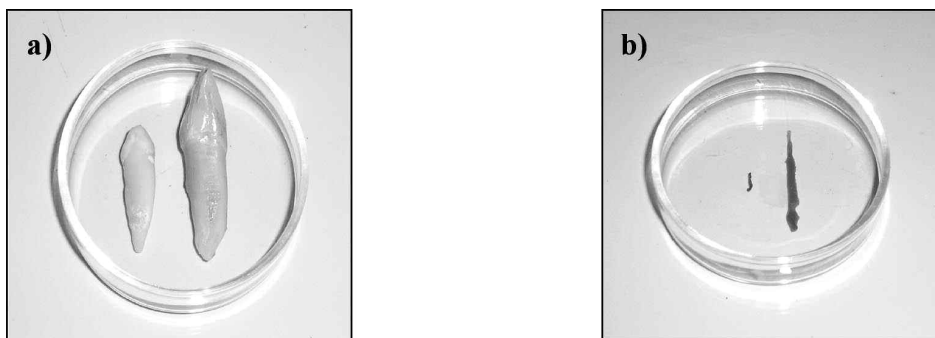
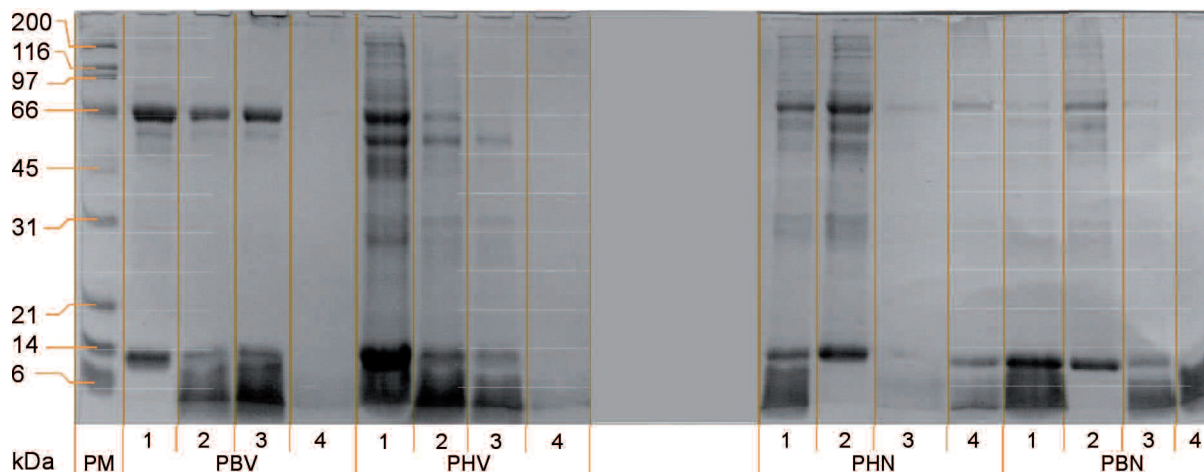
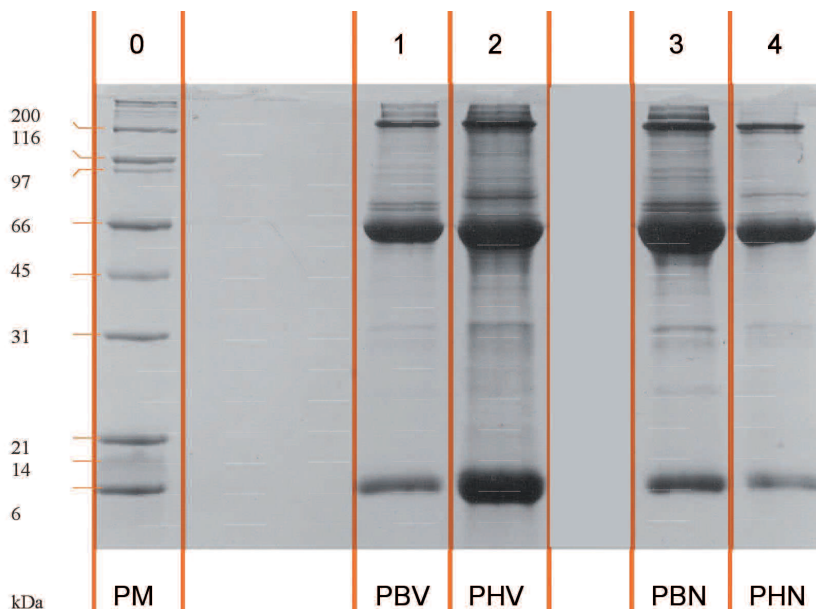


Figura 1. a) Dientes humano (izquierda) y bovino (derecha), b) Pulpas de dientes humano (izquierda) y bovino (derecha)



I, II, III, IV: Etapas del proceso de purificación parcial. PM: Marcadores de peso molecular; PBV: pulpa bovina vital; PHV: pulpa humana vital; PHN: pulpa humana necrótica; PBN: pulpa bovina necrótica

Figura 2. SDS PAGE de las etapas de purificación de proteínas de pulpas de dientes humanos y bovinos, vitales y necróticos



PM: Marcadores de peso molecular; PBV: pulpa bovina vital; PHV: pulpa humana vital; PBN: pulpa bovina necrótica; PHN: pulpa humana necrótica

Figura 3. SDS PAGE de extractos crudos de proteínas de pulpas de dientes humanos y bovinos, vitales y necróticos

frecuentemente son empleadas en investigaciones odontológicas (19–21) sin que exista una clara validación cuali-cuantitativa del modelo animal. Además, muchas investigaciones *in vitro* en tejido pulpar bovino pueden ser difícilmente extrapoladas a la situación clínica donde sucederían procesos de necrosis tisular.

En este trabajo se puso a punto un micrométodo de extracción de componentes orgánicos de los tejidos vitales y necróticos de ambos orígenes. La pulpa humana resultó ser más concentrada en proteínas totales, hidroxiprolina e hidratos de carbono totales que la pulpa bovina. El método utilizado para determinar la concentración de proteínas totales (15) detecta proteínas hidrosolubles y no colágeno maduro. Por ello se emplearon pulpas de dientes jóvenes que contienen mayor proporción de colágeno inmaduro, el cual es mayormente soluble (5). Al completar su desarrollo, aumenta el número de enlaces cruzados en el procolágeno y el colágeno maduro forma gradualmente el tejido fibroso insoluble.

También la relación de colágeno respecto de otras proteínas fue mayor en pulpas vitales que en neuróticas, para los tejidos de ambos orígenes. Este mayor contenido orgánico demostraría que la integridad estructural de las proteínas tisulares habría sido afectada por el proceso de necrosis. Esta diferencia fue mayor en pulpas humanas que en bovinas, posiblemente debido a que en las primeras el proceso de necrosis parcial fue natural y en las pulpas bovinas se indujo la necrosis. Las diferencias bioquímicas y biofísicas entre la necrosis natural e inducida podría haber afectado la comparación entre los tejidos humano y bovino.

Dado que la relación hidroxiprolina/proteínas totales y el grado de purificación respecto de otras proteínas acompañantes son más altos en los extractos bovinos que en los humanos, el colágeno habría sido mejor separado de los otros componentes proteicos. Ello indicaría que en la composición de la pulpa bovina habría mayor proporción de colágeno respecto de otras proteínas que en la pulpa humana, aunque este cociente en tejido bovino resultó de valores numéricos pequeños.

La pulpa humana podría contener mayor variación de proteínas, además de colágeno, que el tejido bovino. Las diferencias observadas podrían deberse a diferencias en la madurez del colágeno de los dientes de edad equivalente empleados. Un estudio previo comparó el contenido de hidroxiprolina en diferentes tipos de colágeno de pulpa bovina y mostró mayor proporción del aminoácido (41,4%) en el colágeno tipo III respecto de los tipos I y V (7).

El mayor contenido de azúcares totales en la pulpa humana respecto de la bovina indicaría una actividad metabólica más intensa en la pulpa humana. Los hidratos de carbono de la matriz extracelular tienen a su cargo el mantenimiento de la función del tejido, la formación y organización del colágeno y la proliferación celular (12). Se ha informado en la literatura un 16,7% de

azúcares totales respecto del total de materia orgánica en la pulpa dental humana (22) y un 5,93% en la pulpa dental bovina (6) mediante un método de determinación (23) diferente. La necrosis en el tejido humano habría alterado también el contenido en hidratos de carbono.

En este trabajo se puso a punto un método de purificación parcial de la proteína rica en hidroxiprolina no descrito hasta ahora, siendo el proceso de mejor rendimiento (entre 30% y 60%) aquél que consistió en tratar al tejido pulpar con el *buffer* de extracción, precipitarlo con sulfato de protamina y ultrafiltrarlo por membrana de 0,22 μm (III). Por SDS PAGE se mostró un perfil proteico similar entre pulpas humanas y bovinas, el cual incluiría a las proteínas no colágenas y a diferentes fracciones hidrolizadas del colágeno soluble. También se evidenció la desnaturalización de proteínas en el tejido necrótico respecto del vital. Bandas reveladas entre 70 kDa y 80 kDa podrían diferenciar los tejidos según su origen. Esta evidencia cualitativa y aquellas cuantitativas expresadas en este estudio podrían ser de utilidad a fin de validar al modelo bovino en investigaciones relacionadas a la Endodoncia. Estudios posteriores por *Western Blotting* con anticuerpos monoclonales permitirían identificar las proteínas durante el proceso de purificación parcial, caracterizar el tipo de colágeno presente y determinar el grado de afección en diferentes estadios de la necrosis.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente subsidiado por CIUNT (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Universidad Nacional de Tucumán) y FOUNT (Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Tucumán).

CORRESPONDENCIA

DRA. MARÍA ELENA LÓPEZ

Cátedra Química Biológica – Facultad de Odontología – UNT.

Avenida Benjamín Aráoz 800

(4000) SAN MIGUEL DE TUCUMÁN–Argentina

Fax N°: 54-381-4227589

Phone N°: 54-381-4107317

E-mail: mariaelopez@odontologia.unt.edu.ar

Referencias bibliográficas

1. Gordon T, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *J Endodon* 1981; 7: 466-9.
2. Spanó JC, Barbin EL, Santos TC, Guimaraes LF, Pécora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J* 2001; 12: 154-79.
3. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endodon* 1988; 14: 125-7.

4. De la Casa ML, López ME, Raiden G. Acción solvente de soluciones de irrigación endodóntica. *Endodoncia* 2006; 24: 214-8.
5. Van Amerogen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1983; 28: 339-45.
6. Orłowski W. Analysis of collagen, glycoproteins and acid mucopolysaccharides in the bovine and porcine dental pulp. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 255-8.
7. Lechner J, Kalnitsky G. The presence of large amounts of type III collagen in bovine dental pulp and its significance with regard to the mechanism of dentinogenesis. *Arch Oral Biol* 1981; 26: 265-73.
8. Matsui T, Myokei Y, Hashimoto Y, Iijima K, Hayakawa T. Marked change in collagen susceptibility to pepsin digestion during development of bovine dental pulps. *J Oral Biol* 1983; 25: 1116-20.
9. Yamauchi M, Tsuzaki M, Mechanic GL. Bovine dental pulp collagens: Characterization of types III and V collagen. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 195-200.
10. Gebhardt M, Murray P, Namerow K, Kuttler S, García Godoy F. Cell survival within pulp and periodontal constructs. *J Endod* 2009; 35: 63-6.
11. Paris S, Wolgin M, Kielbassa AM, Pries A, Zakrzewicz A. Gene expression of human beta-defensins in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod* 2009; 35: 520-3.
12. Mangkornkarn Ch, Steiner J. *In vivo* and *in vitro* glycosaminoglycans from human dental pulp. *J Endod* 1992; 18: 327-31.
13. Yamauchi S, Cheng H, Neame P, Catterson B, Yamauchi M. Identification, partial characterization and distribution of versican and link protein in bovine dental pulp. *J Dent Res* 1997; 76: 1730-6.
14. Huq N, Cross K, Talbo G, Riley P, Loganathan A, Crossley M, *et al.* N-terminal sequence analysis of bovine dentin phosphophoryn after conversion of phosphoseryl to s-propylcysteinylyl residues. *J Dent Res* 2000; 79: 1914-9.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
16. Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanograms levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 1981; 112: 70-5.
17. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Determination of sugars and related substances. *Analyt Chem* 1956; 28: 350-6.
18. Laemmli V. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
19. Kishi J, Hayakawa T. Purification and characterization of bovine dental pulp collagenase inhibitor. Department of Biochemistry, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464. *J Biochem* 1984; 96: 395-404.
20. Beltz RE., Torabinejad M, Poursmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, Sodium Hypochlorite, EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod* 2003; 29(5): 334-7.
21. Al-Jadaa A, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J* 2009; 42: 59-65.
22. Mendez JD, Zarzoza E. Rapid determination of dry weight in human dental pulp by a colorimetric reaction. *J Endod* 1999; 25: 596-8.
23. Hewitt BR. Spectrophotometric determination of total carbohydrate. *Nature* 1958; 186: 246-7.

Aceptado para su publicación el 11 de marzo de 2011