

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE GRADUADOS

DISTRIBUCION INMUNOHISTOQUIMICA
DE GLICOSAMINOGLICANOS EN
DENTINA DE RATA

Alumna: ANA VERONICA ORTEGA PINTO
Tutor: Dr. Prof. JOSE LUIS ARIAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
ODONTOLOGICAS CON MENCIÓN EN PATOLOGIA ORAL

5960

SANTIAGO - CHILE



1996

A mi esposo e hijos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Arias, Profesor Titular de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, por haberme dado la oportunidad de desarrollar el presente trabajo de investigación y por su valiosa tutoría.

A la T.M. María Soledad Fernandez, Magister en Morfología, por su constante apoyo, valiosa información y su gran calidad humana.

Al Dr. Alejandro Oyarzún, docente e investigador de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por sus consejos, ideas y ayuda.

Al Dr. Alfredo Esguep, Profesor Titular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por sus valiosos comentarios y apoyo.

Al Dr. Cristian Mery, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por sus consejos.

A la Dra. María Angélica Montenegro, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por su apoyo e interés.

A todas las personas que de una u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo.

Al proyecto Fondecyt 1931136 por el financiamiento parcial de esta tesis.

INDICE

1 . - INTRODUCCION. 1

2 . - MARCO TEORICO 2

3 . - MATERIAL Y METODO 8

4 . - RESULTADOS 11

5 . - DISCUSION 27

6 . - CONCLUSIONES 32

7 . - RESUMEN 33

8 . - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. 34

INTRODUCCION.

Los glicosaminoglicanos son cadenas de disacáridos que al unirse a proteínas forman los proteoglicanos. Estas moléculas de proteoglicanos se distribuyen en los tejidos conectivos y se sintetizan en sitios de calcificación, tales como: cáscaras de huevo, cartílagos, huesos, dentina, etc. por lo que se les ha propuesto un rol central en la mineralización.

La dentina, el tejido mineralizado que constituye la mayor parte del diente es sintetizada y secretada constantemente por los odontoblastos, proceso que persiste mientras se mantiene la vitalidad de las piezas dentarias, este evento de síntesis de matriz extracelular y de calcificación presenta mecanismos bioquímicos que no comprendemos completamente.

A nivel dentario esto tiene una gran relevancia, ya que el conocimiento de los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos en una serie de patologías ha permitido cambiar la concepción de los tejidos dentarios. Es así que hoy se piensa en remineralización como alternativa a una destrucción menor del esmalte o de tratamientos biológicos de la pulpa .

A esto sólo se ha podido llegar a través del conocimiento profundo de estas estructuras y a la explosiva generación de conocimientos que se ha producido en los últimos años tanto en biología como en bioquímica. Esto nos ha permitido abordar tejidos como la dentina en los que buscamos componentes de la matriz extracelular en un intento de describir, en una primera etapa su presencia y distribución en condiciones normales para más adelante abordar el estudio en condiciones patológicas. Lo anterior conllevará paulatinamente a mirar con otra perspectiva las alternativas terapéuticas de estas condiciones.

2. MARCO TEORICO.

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos formados por unidades repetidas de disacáridos. Estos GAGs se unen por enlaces covalentes a troteínas formando los proteoglicanos (PG) (1). Los glicosaminoglicanos son polianiones, es decir moléculas con cargas eléctricas negativas. Esta característica los hace ser altamente hidrofílicos y les permite atraer agua y cationes (2).

El rol de los proteoglicanos en la mineralización biológica ha sido tema de gran controversia, y su estudio se ha dirigido fundamentalmente a cartílago (3), existiendo escasos reportes respecto a la dentina.

La mineralización en organismos vivos se define como el depósito de Componentes químicos inorgánicos bajo condiciones normales o patológicas. En mamíferos la mineralización es sinónimo de calcificación ya que la mayoría de los minerales inorgánicos depositados son compuestos de calcio (2). Esta calcificación biológica depende de la interacción de células y de la matriz extracelular que será calcificada.

En estudios en cartílago de crecimiento se ha observado que en la zona donde se iniciará la mineralización hay una síntesis de nueva matriz incluyendo proteoglicanos, colágeno y proteínas no colágenas (2). En esta misma zona se comienza a observar vesículas de la matriz, las que se desprenden de la membrana plasmática de los condrocitos. En estas vesículas se observa el primer signo de formación mineral en forma de cristales de hidroxapatita (3). Estas vesículas de la matriz también se han observado asociadas a osteoblastos y odontoblastos, pero sólo en los inicios de la mineralización en la calcificación de novo (4).

Posteriormente a este desarrollo inicial, los primeros cristales sirven de núcleo de cristalización en torno a los cuales se produce aposición de más minerales, y ya no se observa vesículas de la matriz. Se cree que en la calcificación posterior participan concentraciones críticas de calcio, fosfato y macromoléculas como colágeno (excepto en esmalte) y proteínas polianiónicas no colágenas (NCPs) (2,4) tales como: osteonectina (5), proteínas ricas en gamacarboxiglutamato (proteínas Gla) (6), fosfoproteína (8,9) y proteoglicanos (PGs) (10,14).

Se ha postulado que las proteínas no colágenas polianiónicas como fosfoproteína altamente fosforilada (PP-H) y proteoglicanos proveen sitios de nucleación los que inician la formación mineral en dentina y

hueso (10).

Linde y Lussi (10) proponen que las NCPs de hueso, dentina y conchas de molusco actúan como inductores de mineralización al estar inmovilizadas en un soporte estable y como inhibidores de mineralización cuando están libres en solución. Al probar su hipótesis observan mediante microscopía electrónica de barrido que la capacidad inductora de mineralización de NCPs de dentina inmovilizadas *in vitro* es mayor para la fosfoproteína altamente fosforilada, siguiéndole los PGs y por último las proteínas Gla (12). Al implantar, subcutáneamente en roedores, PGs y PP-H adosados a un soporte estable observan que la capacidad de inducir minerales de fosfato de calcio es mayor para los proteoglicanos (11). Lussi y Linde concluyen con estas experiencias que las macromoléculas como proteoglicanos y fosfoproteína altamente fosforilada pueden ser responsables de inducción mineral durante la calcificación de tejidos (11).

Shepard y Mitchell (12) observaron conglomerados de PGs, en forma de roseta, en los mismos lugares y en igual disposición que los focos de minerales encontrados antes de la desmineralización utilizando cartílago de crecimiento de ratas. Sin embargo, se ha reportado disminución de PGs en tejidos en fase de mineralización tanto en cartílago (14) como en dentina (14,15).

A nivel dentinario las células encargadas de sintetizar esta matriz calcificada son los odontoblastos, células de origen ectomesenquimático que sintetizan una matriz muy similar a la del tejido óseo (16).

La primera dentina mineralizada formada periféricamente es la dentina del manto en cuya formación parecen participar vesículas de la matriz (4). Posteriormente se sintetiza la dentina circumpulpar, que forma gran parte de la dentina adulta, en ella no se observa vesículas de la matriz y su patrón de mineralización es a través de calcosferitas. En éstas el nuevo mineral formado se propaga radialmente desde un centro de crecimiento formando estructuras minerales globulares que coalescen con calcosferitas vecinas. Por lo tanto la interfase dentina-predentina se caracteriza generalmente por calcosferitas, con un límite ondulado, pero también puede ser más lineal (4).

Tanto en la dentina del manto como en la dentina circumpulpar puede observarse 70% de materia inorgánica en forma de hidroxapatita, 12% de agua y 18% de materia orgánica (17). La materia orgánica está constituida

por un alto contenido de colágeno tipo I y algo de colágeno tipo I trimer **(18)** y V (19), proteínas no colágenas como fosfoproteína, proteínas con ácido gamacarboxiglutámico o proteínas GLA y proteoglicanos (20,21,22).

Con técnicas bioquímicas se han identificado los GAGs presentes en dentina, siendo el condroitín 4 sulfato (C-4-S) el que se encuentra en mayor proporción en dentina humana (23), lo mismo se ha demostrado en perros (14) y ratas (24). Los GAGs que siguen en concentraciones decrecientes son: condroitín 6 sulfato (C-6-S), hialuronato, dermatán sulfato y queratán sulfato (20). Recientemente, Brandford demostró la presencia de heparán sulfato en pequeñas cantidades (25).

La distribución de estas moléculas en las distintas zonas de la matriz dentinaria sólo recientemente ha comenzado a aclararse gracias a los trabajos de Takagi y colaboradores (26).

En la dentina existen varias zonas distinguibles a microscopía electrónica de transmisión, estas son:

Dentina intertubular: es la zona más abundante y como su nombre lo indica se ubica entre túbulos dentinarios, presenta fibras colágenas tipo I perpendiculares al túbulo dentinario y cristales de hidroxiapatita en y entorno a las fibras (17).

Dentina peritubular: es aquella dentina que rodea cada túbulo o conductillo, en ella el grado de calcificación es mayor que en la dentina intertubular y casi no se observan fibras colágenas (27).

Túbulo dentinario: normalmente no se encuentra mineralizado (28), en él se aloja o se alojó durante la dentinogénesis la prolongación odontoblástica cuya longitud a lo largo del túbulo es discutida (29,30,31). También se encuentran en su interior terminaciones nerviosas **(32)**, colágeno tipo I (33) y fluido dentinario (34).

Lámina limitans: es una estructura controvertida que sólo se observa en dentina desmineralizada como una banda delgada por dentro del túbulo que rodea la prolongación odontoblástica (35).

Predentina: se localiza entre la dentina calcificada y los odontoblastos que la secretan, se observa durante toda la vida fisiológica de la pieza dentaria. Esta matriz no se ha calcificado y difiere de la dentina mineralizada tanto en componentes inorgánicos como orgánicos (15).

Frente de mineralización: es la zona donde se comienza a ver cristales de hidroxiapatita dentro y alrededor de las fibras colágenas, corresponde al límite entre predentina y dentina (4).

En estas zonas de la dentina normal se ha estudiado la distribución de glicosaminoglicanos por diversas técnicas histoquímicas, empleando colorantes catiónicos con alta afinidad por grupos aniónicos (COOH y SO₄²⁻), los que son abundantes en los GAGs (15).

Es así que, utilizando azul de cuprolina (36), se han observado pequeños conglomerados en forma de bastón o barra en dentina y predentina, los que se disponían en torno a las fibras colágenas. Con verde de malaquita se ha encontrado una malla de gránulos y filamentos en predentina, en los espacios entre las fibras colágenas y pequeños gránulos asociados con éstas siguiendo las estriaciones de estas fibras (37). Empleando triclorohexamina rutenio (38), ácido tánico (39) y glutaraldehído con cetilpiridinio (40) se han descrito hallazgos similares.

Con microscopía electrónica de transmisión, Ortega y Oyarzún (41), utilizando anaranjado de acridina observaron gránulos de diferentes tamaños en el túbulo dentinario. Los más pequeños formaban una fina red entre la prolongación odontoblástica y la dentina peritubular. Los de mayor tamaño se encontraban relacionados con la membrana plasmática del proceso odontoblástico. En la dentina intertubular se observó gránulos en menor cantidad los que se ubicaban alrededor de las fibras colágenas, siguiendo sus estriaciones.

Los PGs, presentan según las evidencias de autoradiografía, la existencia de dos grupos en la predentina. Uno secretado junto al frente de mineralización y otro secretado a la predentina próximo al cuerpo del odontoblasto (42). Se desconoce hasta ahora qué proteoglicanos componen cada grupo.

Como se dijo, los colorantes catiónicos se unen a grupos aniónicos que en dentina no sólo se presentan en los PGs, sino también en otras proteínas no colágenas como: fosfoproteínas y proteínas Gla (4).

Takagi y colaboradores (26) mediante reacciones inmunohistoquímicas localizaron en incisivos de rata adulta PGs de condroitín-4-sulfato (C4-5), queratán sulfato (KS), dermatán sulfato (DS), condroitín no sulfatado (CO-S) y condroitín-6-sulfato (C-6-S) en predentina, y en menor cantidad C-4-S y DS en el interior de los túbulos dentinarios. Estos au-

tores postulan que los GAGs encontrados en el túbulo, posiblemente en el espacio periodontoblástico, podrían participar en la inhibición de la mineralización a este nivel.

Por otra parte, Ten Cate (19), postula una inhibición de la mineralización intratubular por macromoléculas orgánicas tales como transferrina. Aun cuando Takagi y Ten Cate han estudiado la presencia de estas sustancias en túbulos normales no han demostrado su ausencia en túbulos esclerosados.

Durante la dentinogénesis, que comienza con la formación de la dentina del manto y termina junto con la vida fisiológica de la pieza dentaria, se produce en la dentina una serie de cambios tanto en su composición bioquímica como en su morfología (43).

Morfológicamente ocurren procesos como la obliteración de los túbulos dentinarios con material calcificado, fenómeno denominado esclerosis dentinaria o dentina transparente por su apariencia a ojo desnudo (44). Esta esclerosis se observa en la dentina radicular humana progresivamente con la edad (45), fenómeno que se emplea en áreas como la odontología forense para determinación de la edad. La dentina transparente se presenta también a nivel coronario asociada a atrición (46), en la dentina cervical expuesta por recesión gingival (47), en molares de rata en las zonas cuspíneas libres de esmalte (48), etc.

El siguiente trabajo se realizó para conocer en condiciones de normalidad la distribución de los GAGs en dentina de rata y su posible relación con variaciones morfológicas durante la dentinogénesis, para a futuro estudiar estos fenómenos en condiciones patológicas.

PROBLEMA

¿Cuál es la expresión y localización de los GAGs de C6-S, C4-S, DS y KS en dentina en distintas etapas del desarrollo?

HIPOTESIS

La expresión y localización de GAGs varía espacial y temporalmente en relación con los cambios morfológicos que ocurren durante la dentinogénesis del diente.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la distribución de los GAGs de C6-S, C4-S, DS y KS en distintas etapas de la dentinogénesis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Establecer la distribución de estos GAGs en las distintas zonas de la dentina (Predentina proximal y distal, dentina intertubular y túbulos dentinarios).

Relacionar la distribución de estos GAGs con los cambios morfológicos que ocurren durante la dentinogénesis.

Comparar la presencia de estos GAGs en dentina coronaria y radicular de molares adultos y senecentes.

3. MATERIAL Y METODO

Para el estudio propuesto se procesó 12 gérmenes dentarios de molares superiores de rata Sprague-Dawley de 3 a 7 días de edad, 12 molares de ratas de 4 semanas de edad y 12 molares de ratas de 130 semanas de la misma especie. Los animales fueron decapitados y se obtuvieron los segmentos de maxilar con los tres molares o gérmenes dentarios en un solo bloque.

El material obtenido se fijó en Karnovsky (4% paraformaldehído y 0,5% glutaraldehído en 0,1 M buffer cacodilato pH 7,4) por 12 hrs a 4°C. Lavado en buffer cacodilato pH 7,4 a 4°C. Desmineralizado en etilen diaminotetraacético (EDTA) 10% pH 7,4 por 3 semanas a 4°C. La desmineralización se controló radiográficamente. Lavado en buffer cacodilato. Cubiertas con un medio de seminclusión para cortes de tejido congelado (Compuesto Tissue-Tek O.C.T. Miles, Inc. Elkhart, IN) y congeladas con aire líquido. El corte de las muestras se realizó en crióstato en sentido mesiodistal (sagital) y fueron colectadas en portaobjetos cubiertos con gelatina, secados al aire por 15 min a temperatura ambiente y almacenados a -70°C.

Anticuerpos utilizados:

3-B-3: Es una IgM de ratón que reconoce el C6-S (disacárido terminal insaturado) después de la digestión con condroitinasa ABC o AC-II (Seikagatu Kogyo, Tokyo). (49). Se usó una concentración de 1:100.

2-B-6: Esta IgG de ratón se une a disacáridos insaturados producidos por digestión con condroitinasa de dermatán sulfato o condroitín 4 sulfato. Después de usar la condroitinasa ABC, tanto el DS como el C4-S son reconocidos; después de la digestión con condroitinasa AC-II el C4-S es trincipalmente reconocido aunque no exclusivamente, porque la enzima puede degradar los residuos de ácido glucurónico de las cadenas de DS debido a su leve actividad endoglicosídica (49). Se empleó en una dilución de 1:50.

5-D-4: Esta IgG de ratón reconoce hexasacáridos hipersulfatados de queratán sulfato (50). Se utilizó en una dilución de 1:50.

Los tres anticuerpos empleados fueron aislados y caracterizados por Caterson y col. (49,50).

Reacciones Inmunohistoquímicas:

Los cortes se llevaron a temperatura ambiente y se rehidrataron en Buffer fosfato salino (PBS). Cuando fue necesario los cortes se sometieron a digestión con 150 pl de condroitinasa ABC o ACII a 0,1U/ml en PBS por una hora a 37°C y lavadas en PBS. Todas las secciones se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS (BSA/PBS) por 5 min, para disminuir uniones no inmunológicas del anticuerpo. Fueron luego incubadas en el anticuerpo primario por 30 min. a 1 hora, 5 minutos cada una. Bloqueadas Incubadas en el Ac secundario diluido en 1% BSA/PBS por 1 hora a 22°C y lavadas en PBS 2 nuevamente con 3% BSA/PBS. 1% BSA/PBS por 1 hora. Tanto para los anticuerpos primarios de IgG como de IgM el Ac secundario utilizado fue de cabra antirátón conjugado con fluoresceína isotiocianato (GamFITC).

nuevamente con 3% BSA/PBS. 1% BSA/PBS por 1 hora. Tanto para los anticuerpos primarios de IgG como de IgM el Ac secundario utilizado fue de cabra antirátón conjugado con fluoresceína isotiocianato (**GamFITC**). Posteriormente los cortes se cubrieron con medio de montaje fluoromount B.

Como controles se realizó incubación sin Ac primario, incubación con **suero** no inmune de ratón en lugar del Ac primario y para los Acs 3B3 y **236** tratamiento sin digestión con condroitinasa.

CUADRO RESUMEN DE LOS TRATAMIENTOS EMPLEADOS

ANTICUERPO	TRATAMIENTO	ANTIGENO
-----Enzimático-----		
2-B-6	ABC	DS, C-4-S
2-B-6	AC-II	C-4-S
3-B-3	ABC	C-6-S
5-D-4		KS

Tinción de Von Kossa:

En los gérmenes dentarios se realizó una tinción argéntica para identificar depósitos de calcio a través de microscopía óptica. Para esto las muestras se fijaron en Karnovsky y se sometieron a técnica histológica corriente sin descalcificar. Una vez realizados los cortes, las muestras se sometieron a tinción con una solución de nitrato de plata al 1% en agua, con luz de día.

Microscopia Electrónica de Barrido

Con el objeto de relacionar los cambios morfológicos de la dentina con los cambios histoquímicos, se observó dentina de molares homólogos de las mismas ratas Sprague-Dawley empleada para inmunohistoquímica. Estos molares se observaron sin decalcificar mediante microscopía electrónica de barrido (Zeiss DSM 940). Para esto las muestras se fijaron en Karnovsky por 12 hrs a 4°C. Se fracturaron en sentido sagital, se lavaron y se deshidrataron en acetonas ascendentes, se secaron a temperatura ambiente y se sombrearon con oro.

4. RESULTADOS

Se observaron molares de rata de 3 días de edad (molar en estado de campana), de 4 semanas de edad (molar adulto en oclusión reciente) y de 130 semanas de edad (molar senescente). Estas muestras se observaron a microscopia óptica con técnica de inmunohistoquímica para GAGs de condroitín 4 sulfato, dermatán sulfato, condroitín 6 sulfato y queratán sulfato y con tinción de Von Kossa solamente los gérmenes dentarios. Los molares homólogos de las ratas en las tres etapas de la dentinogénesis se examinaron con microscopía electrónica de barrido.

GERMEN DENTARIO

Tinción de Von Kossa:

Estos gérmenes en estado de campana avanzada presentaban odontoblastos diferenciados que ya habían comenzado a sintetizar dentina calcificada en la zona cuspídea (fig. 1), lo que se corroboró a través de una tinción de Von Kossa (fig. 2). Esta técnica que permite identificar depósitos de calcio, mostró que en esta etapa la dentina mineralizada formaba una delgada capa que rodeaba gran parte de la pulpa (fig. 2). Los ameloblastos también habían iniciado la síntesis de preesmalte. Estos gérmenes presentaban dentina del manto calcificada con un grosor máximo en el vértice cuspideo, decreciendo en grosor hacia los bordes laterales (fig. 1), hacia la zona cervical continuaba la disminución de grosor hasta perderse completamente, ya que en esta etapa no comenzaba aun la formación de dentina radicular.

Microscopía Electrónica de Barrido:

A nivel coronario se observó desde afuera hacia adentro sólo parte del órgano del esmalte (estrato intermedio y ameloblastos), preesmalte, límite amelodentinario, dentina, predentina y cámara pulpar (fig. 1A). Los ameloblastos presentaron su típica disposición en empalizada en estrecha relación con las células del estrato intermedio (fig. 1B). En la predentina se observó claramente la trama colágena y los túbulos dentinarios tanto en predentina como en dentina (fig. 1D y 1E).

Inmunohistoquímica:

C-4-S, DS. Se observó igual marcación al realizar digestión previa con condroitinasa ABC o condroitinasa AC-II, por lo que la inmunofluorescencia positiva indica presencia de C-4-S y DS. El Condroitín 4 sulfato y o dermatán sulfato fueron los únicos GAGs observados en estado de campana avanzada. Estos GAGs se distribuyeron en predentina donde la fluorescencia observada fue más evidente en torno a los túbulos dentinarios que en el resto de la futura dentina; se observó también marcación positiva en la dentina pero solamente en los túbulos dentinarios (fig. 3A 3B). El resto de los tejidos, órgano del esmalte y cestos de la papila dentaria resultaron negativos para este anticuerpo Tabla I.

C-6-S. El anticuerpo 3-B-3 anti epitopos de C-6-S dió resultados negativos en los gérmenes dentarios en estado de campana avanzada (fig. 3C y 3D). Tabla I.

KS. Al emplear el anticuerpo 5-D-4 para pesquisar la presencia de queratán sulfato en gérmenes dentarios en estado de campana avanzada no se observó marcación positiva en ninguno de los tejidos (fig. 3E y 3F). Todos los tejidos restantes: órgano del esmalte, papila dental, etc. no presentaron inmunofluorescencia para ninguno de los GAGs estudiados.

MOLARES ADULTOS

Estos molares presentaron formación completa de la corona. El primer molar tenía formación radicular bastante avanzada pero sin cierre apical. El tercer molar se encontraba iniciando su erupción.

Microscopía Electrónica de Barrido:

Fue evidente en todos los molares la presencia de túbulos dentinarios a lo largo de toda la dentina, estos conductillos presentaban su lumen abierto (fig. 4A y 4B). En las cúspides en la zona libre de esmalte los túbulos dentinarios se observaban abiertos en la zona más superficial y aroximadamente a 6 μ m de profundidad presentaban una obliteración parcial (fig. 4D).

Inmunohistiquímica

C-4-S, DS : Se distribuyó en predentina en forma homogénea y en las paredes de los túbulos dentinarios (fig. 5A y 5B). La marcación en predentina se observó tanto en la predentina coronaria como la radicular,

lo mismo ocurrió con los túbulos dentinarios que evidenciaron la presencia de C-4-S, DS en toda la dentina con intensa fluorescencia (Tabla I). Al comparar los tres molares de un mismo maxilar la fluorescencia de los túbulos dentinarios fue decreciendo ordenadamente desde el primer molar hasta el tercer molar.

C-6-S : Este GAG se observó exclusivamente en predentina, teniendo en la predentina coronaria una marcación más intensa hacia el cuerpo del edenzoblasto y menor fluorescencia hacia la zona más próxima a dentina, (**fig. 6A y 6B**). Esta diferencia entre dentina proximal y distal observada a nivel coronario, fue casi inadvertida a nivel radicular.

K-S : Se demostró su presencia en predentina coronaria y radicular (**fig. 7A**), y sólo en algunos túbulos de los bordes laterales de las cúspides (**fig. 7B**) y en algunos túbulos de las raíces.

MOLARES SENESCENTES

Estos molares presentaron sus cúspides totalmente atrisionadas presentando una superficie oclusal plana, la cámara pulpar se encontraba de tamaño y la dentina reaccional formaba gran parte de la superficie oclusal

Microscopía Electrónica de Barrido:

A nivel coronario estos presentaban gran parte de los túbulos dentinarios obliterados y aquellos conductillos no obliterados presentaban el lumen con su diámetro muy disminuido (**fig. 8A**).

Inmunohistoquímica

C-4-S : DS Se observó en predentina que, como se indicó antes presentaba un grosor bastante disminuido y en escasos tubulillos dentinarios (**fig. SK y 9B**), a diferencia de los molares adultos donde el C-4-S, DS se presentó en prácticamente todos los tubulillos dentinarios y con una fluorescencia muy marcada. No fue posible determinar si aquellos tubulillos que presentaron marcación positiva para C-4-S, DS correspondían con los que se observaron abiertos con microscopía electrónica de barrido. Tabla I.

C-6-S: Este GAG en molares de 130 semanas dió marcación positiva, pero suave a nivel de predentina, esta inmunofluorescencia observada en la

pre dentina fue homogénea (fig. 10A y 10B).

KS: La inmunofluorescencia observada se limitó a la pre dentina, donde no alcanzó gran intensidad (fig. 11A y 11B).

En la figura 12 se propone la distribución de los glicosaminoglicanos de condroitin cuatro sulfato, dermatán sulfato, condroitín seis sulfato y de queratán sulfato en las tres etapas de la dentinogénesis estudiadas en molares de rata.

T A B L A I

Distribución de Glicosaminoglicanos en dentina en tres etapas de la dentinogénesis.

Edad	Anticuerpo	Antígeno	D E N T I N A					
			C o r o n a r i a			R a d i c u l a r		
			PDPROX	PDDIST	TUBULO	PDPROX	PDDIST	TUBULO
3 días	2-B-6	C-4-S	+++	+++	+++	A	A	A
	3-B-3	C-6-S	-	-	-	A	A	A
	5-D-4	K-S	-	-	-	A	A	A
4 sem.	2-B-6	C-4-S	++	++	+++	+	+	+
	3-B-3	C-6-S	+++	+	-	+	+	-
	5-D-4	K-S	++	++	+ -	+	+	-
130 sem.	2-B-6	C-4-S	+	+	+ -	+	+	-
	3-B-3	C-6-S	+	+	-	+	+	-
	5-D-4	K-S	+	+	-	+	+	-

PDPROX = Pre dentina proximal

PDDIST = Pre dentina distal

TUBULO = Túbulos Dentinarios

A = Ausente en esta etapa del desarrollo

Las cruces representan una estimación de la intensidad relativa de fluorescencia en sitios vecinos y comparándose siempre entre un mismo anticuerpo.

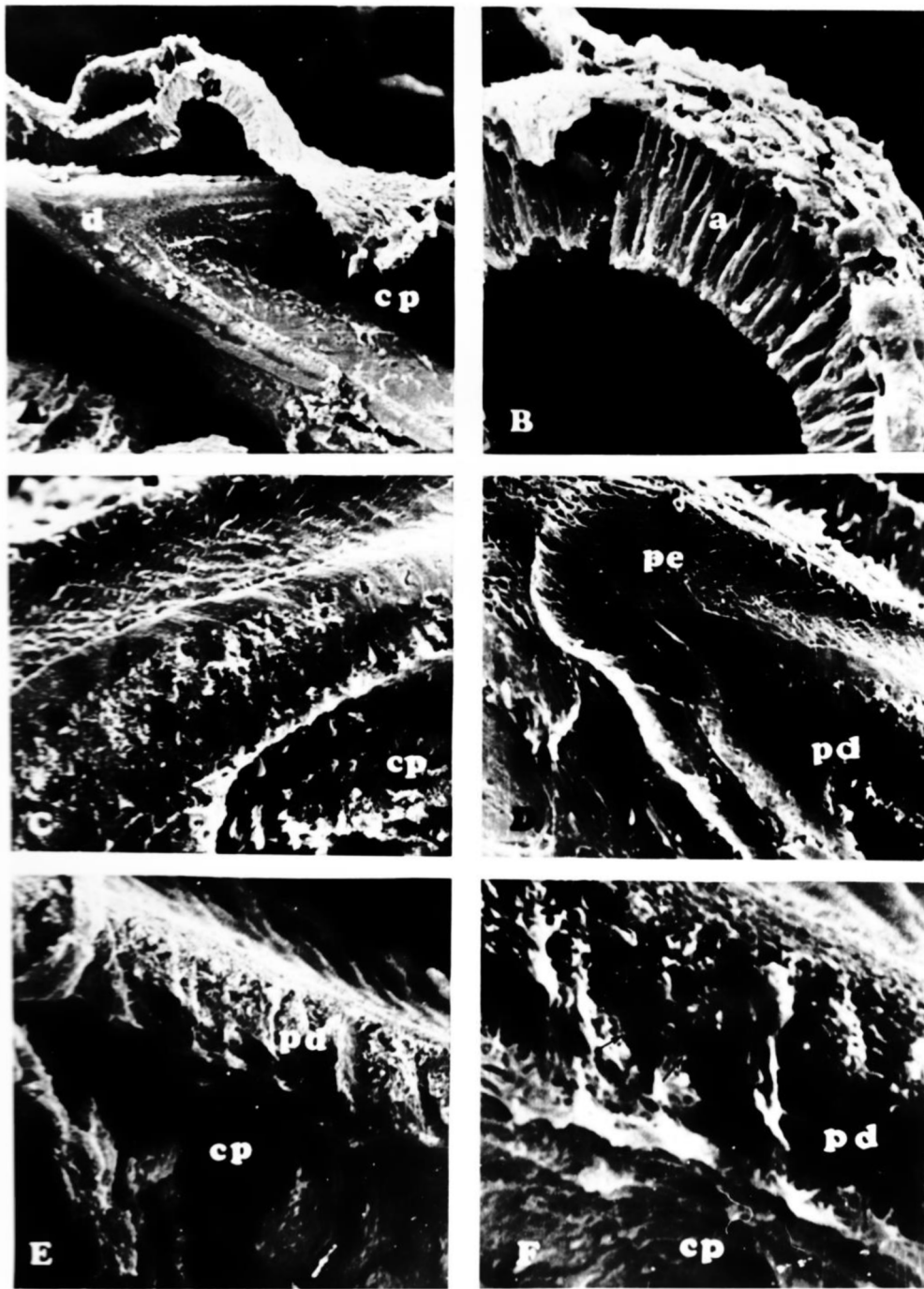


FIG. 1: Germen dentario en estado de campana avanzada cortado en sentido sagital observado con microscopía electrónica de barrido. A: Cúspide de un molar en que se observa los ameloblastos (a) desprendidos del preesmalte, dentina (d), predentina (*), y cámara pulpar (cp). B: a mayor aumento se observa los ameloblastos junto al estrato intermedio, el resto de las estructuras se ha desprendido. C: interfase preesmalte-dentina (*) y cámara pulpar (cp). D: Vértice de una cúspide en que se observa preesmalte y predentina. E: Zona media de la corona, nótese los esbozos de túbulos dentinarios en la predentina (pd). F: predentina en la que se distinguen las fibras colágenas (flechas) formando una trama.

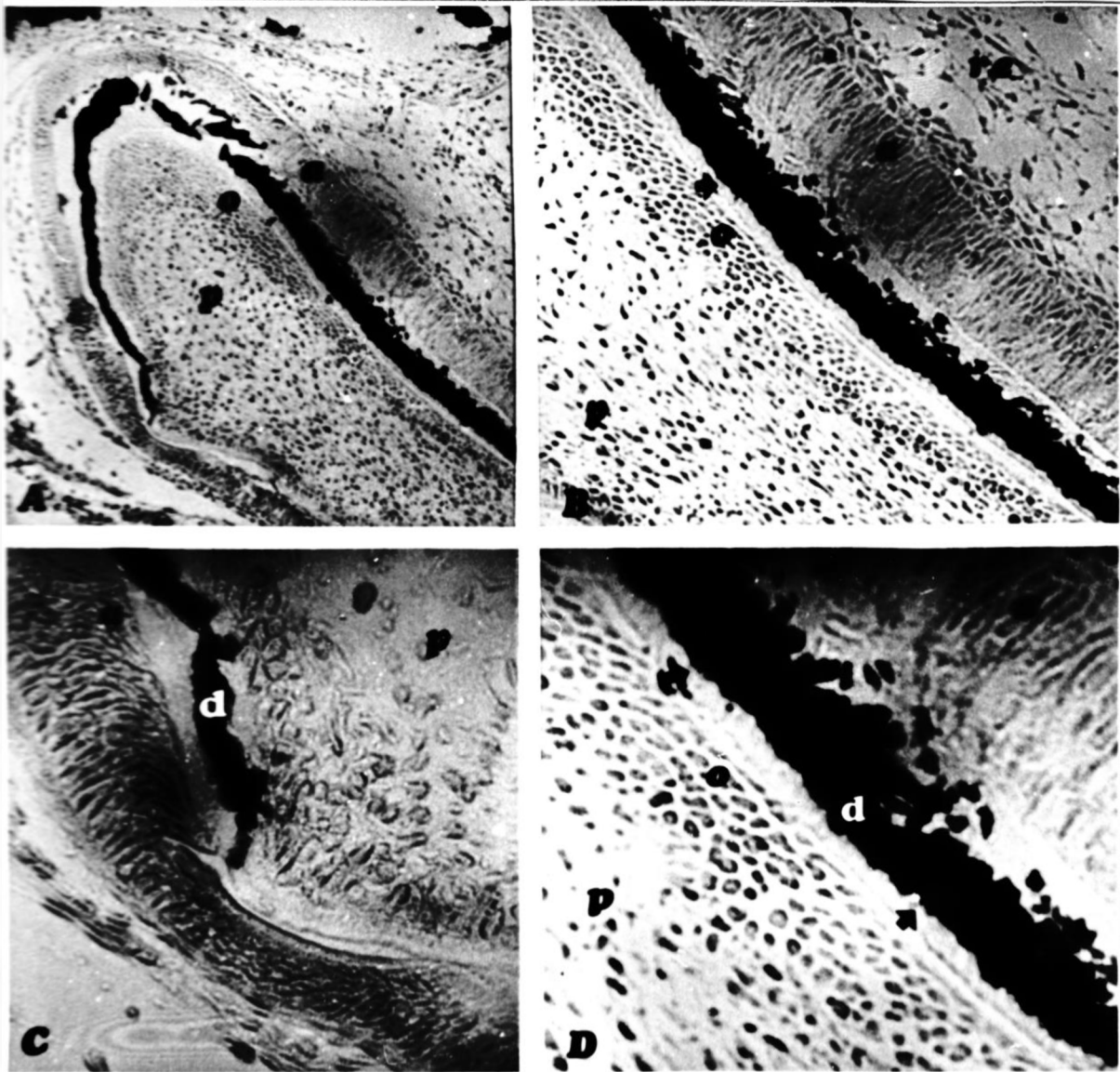


Fig. 2: Germen dentario (campana avanzada) sin descalcificar, con tinción Von Kossa se observa en negro la dentina (d) mineralizada, se observan también ameloblastos (a), retículo estrellado (re), odontoblastos (o) junto a la predentina (puntas de flecha) y la papila dentaria (p). Aumentos fig. A x10, fig. B x40, fig. C y D x60.

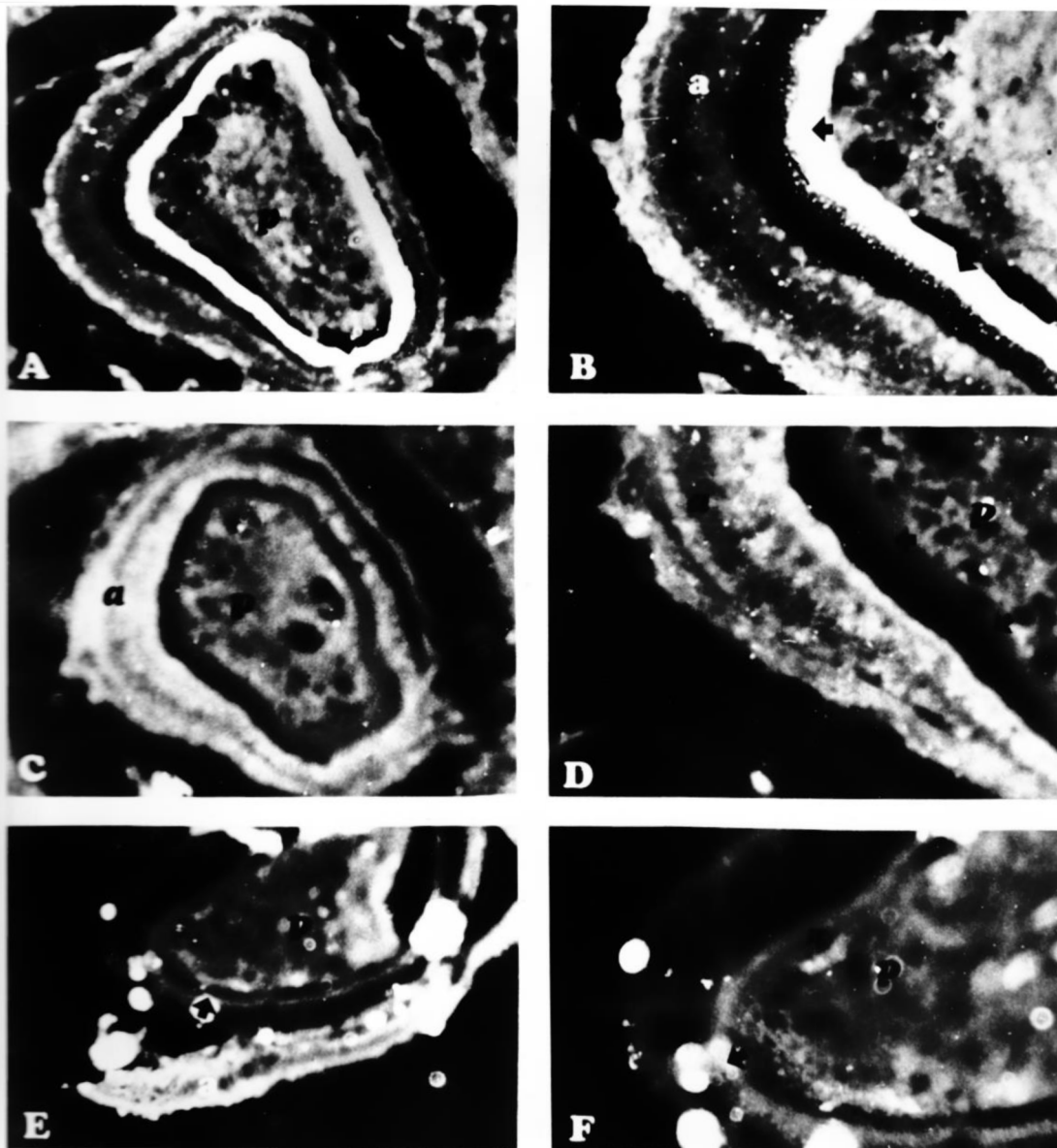


Fig. 3: Germen dentario en estado de campana avanzada descalcificado. En las figuras A y B se observa marcación positiva para condroitín 4 sulfato y dermatán sulfato en predentina (punta de flecha) y túbulos dentinarios (flecha), ameloblastos (a). En las figuras C, D, E y F se observa inmunofluorescencia negativa para estas estructuras. Predentina (flechas), Papila dentaria (p). Figs. del lado izquierdo x10, fig. lado derecho x40.

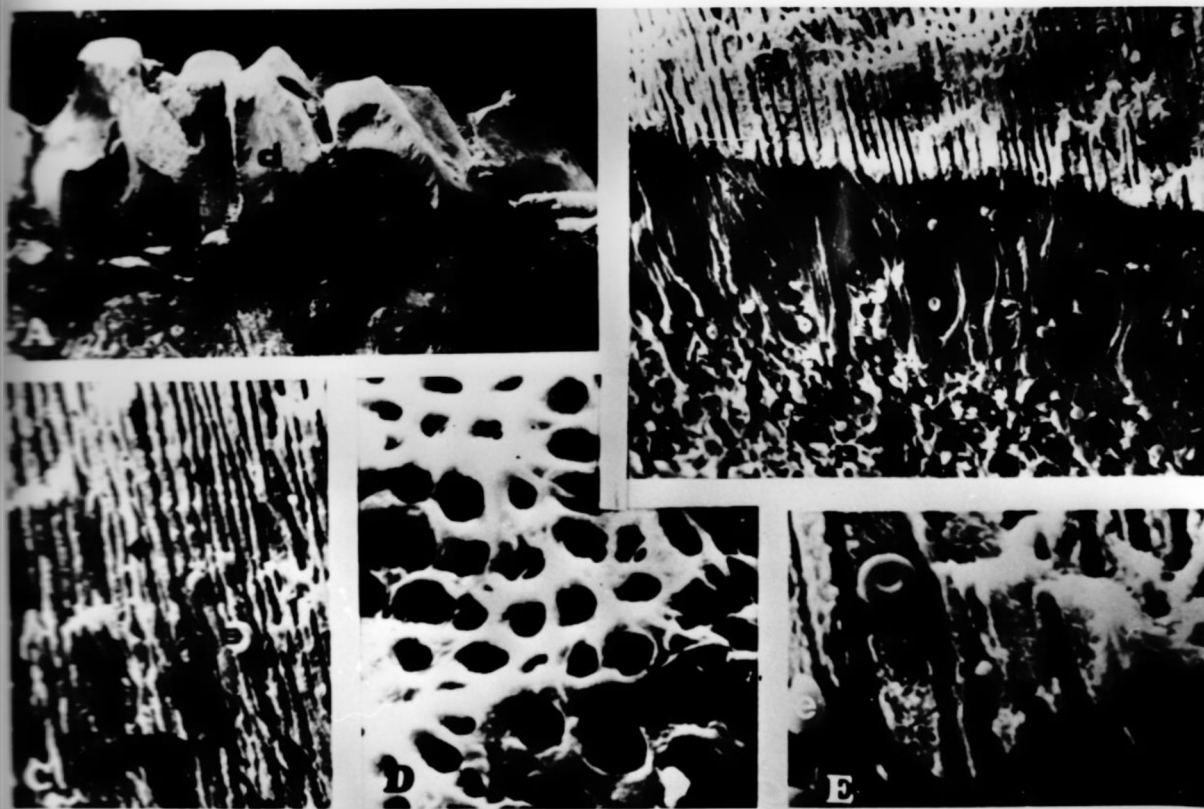


Fig. 4: Molar adulto sin descalcificar observado con M.E.B.. A: corte sagital de dos molares en que se observa la dentina (d). B y C: a mayor aumento se observa una gran cantidad de túbulos dentinarios (puntas de flecha) con su lumen abierto. D: superficie de la dentina de la zona libre de esmalte. E: se observa la trama colágena (flechas) de la predentina. pulpa (p).

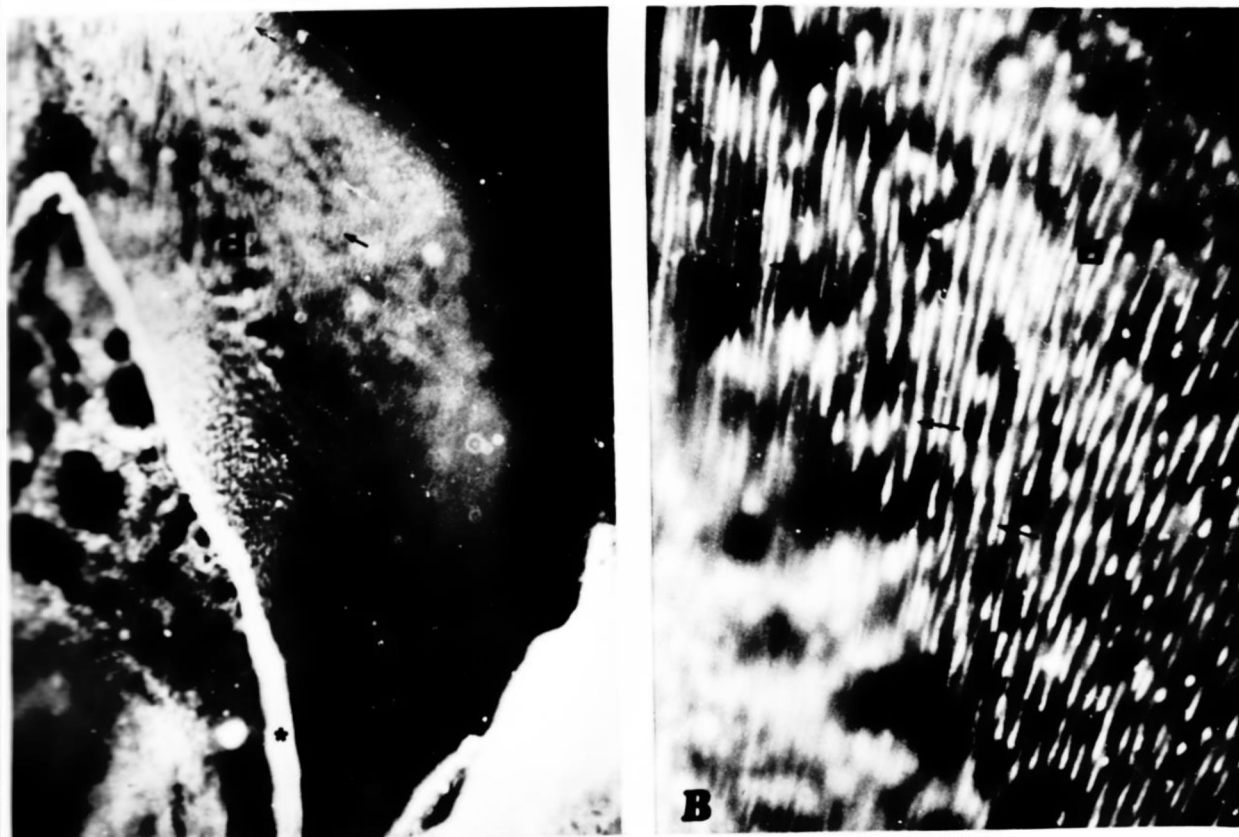


Fig. 5: Microscopia óptica de molar adulto desmineralizado y tratado con anticuerpo anti C-4-S seguido de segundo anticuerpo conjugado a FITC. A: nótese la marcación positiva para condroitín 4 sulfato y dermatán sulfato a nivel de predentina (*) y túbulos dentinarios (flechas), pulpa (p). x10. B: Acercamiento de la dentina en que se ve con mayor claridad la inmunofluorescencia positiva en los túbulos dentinarios. x60.

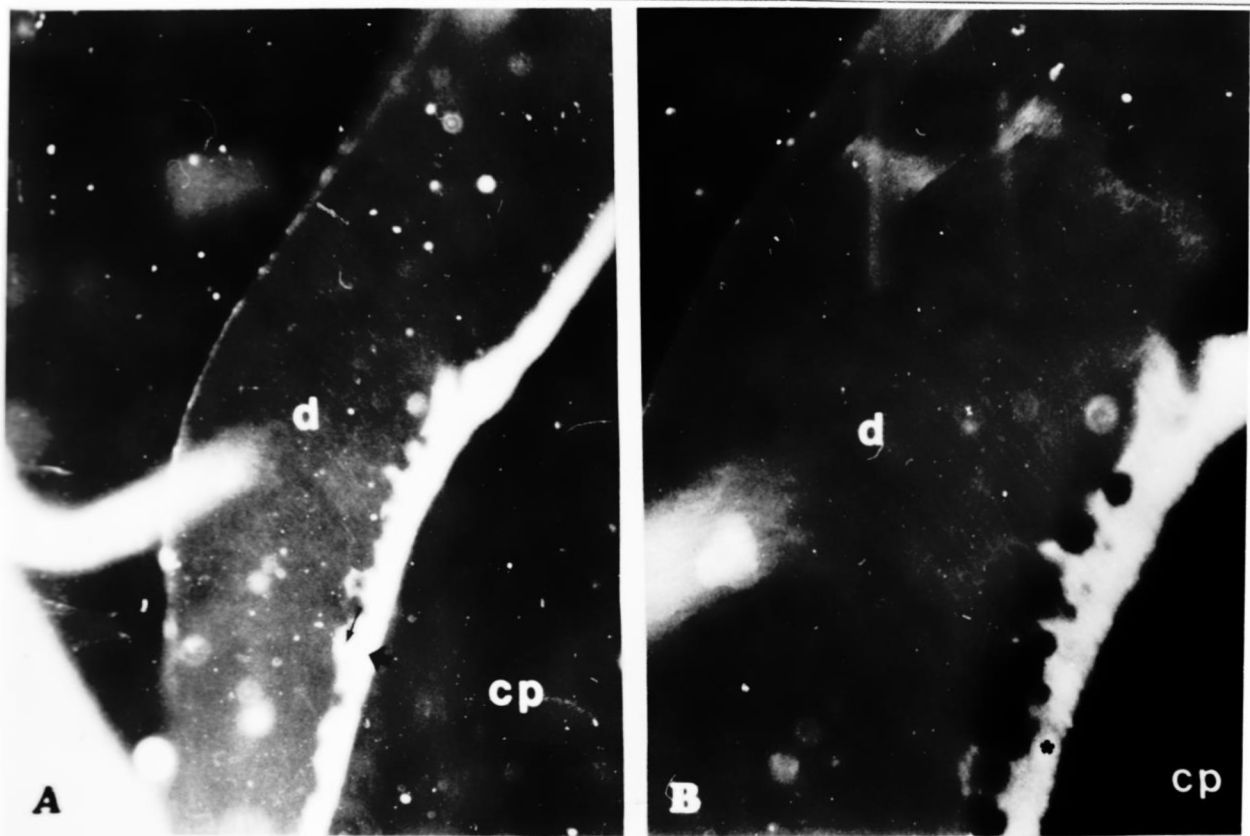


Fig. 6: Microscopia óptica de molar adulto desmineralizado y tratado con anticuerpo 3-B-3 y segundo anticuerpo conjugado a FITC. A: el glicosaminoglicano de C-6-S sólo se observó en predentina (*), teniendo mayor intensidad en la predentina proximal (punta de flecha) que en la predentina distal, x20. B: aumento de la misma área, nótese la ausencia de inmunofluorescencia en los conductillos, x40.

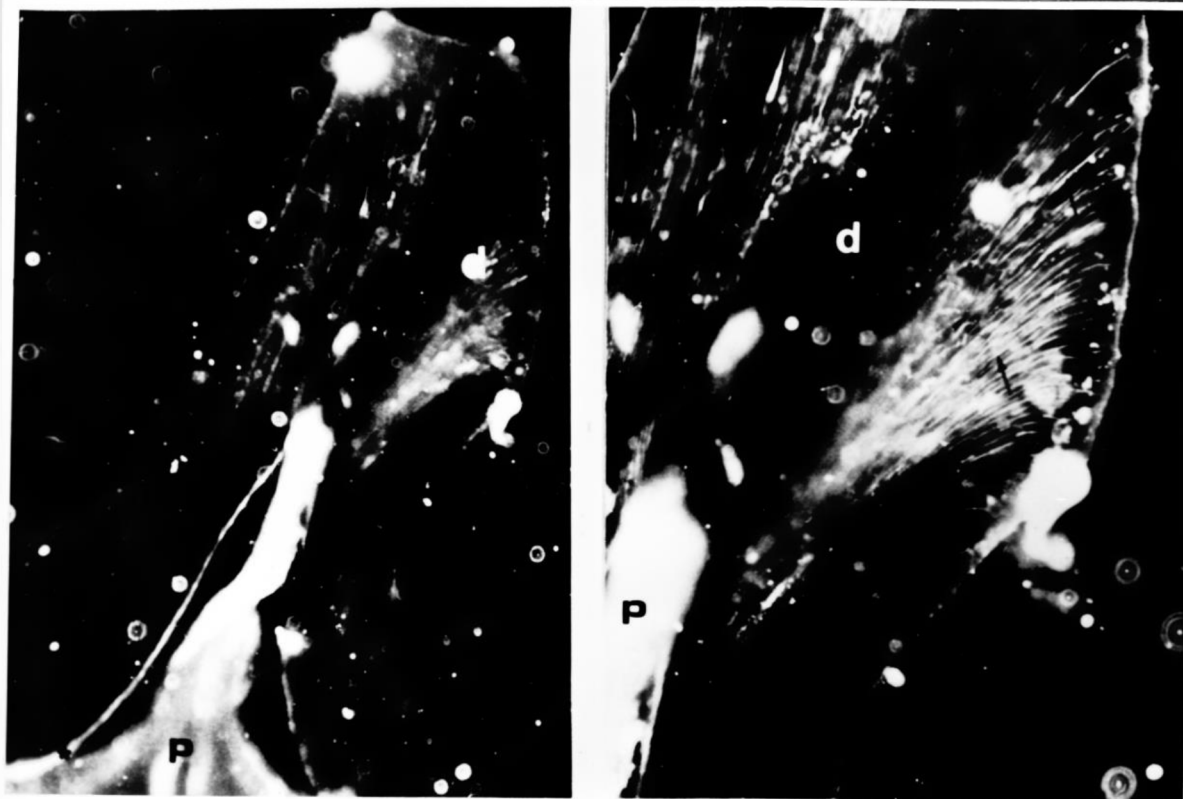


Fig. 7: Molar adulto desmineralizado y tratado con anticuerpo 5-D-4 y seguido de segundo anticuerpo conjugado a FITC. A: se observa inmunofluorescencia positiva para queratán sulfato en predentina (*) y solamente en los túbulos dentinarios (flechas) de los bordes laterales de las cúspides, x10. B: la misma zona a mayor aumento permite ver túbulos dentinarios individualmente, x40.



Fig. 8: Molar senescente sin descalcificar fracturado a través de la dentina, y observado con microscopía electrónica de barrido. Fig. A y B nótese la escasa cantidad de túbulos con su lumen abierto (puntas de flecha). dentina intertubular (di).

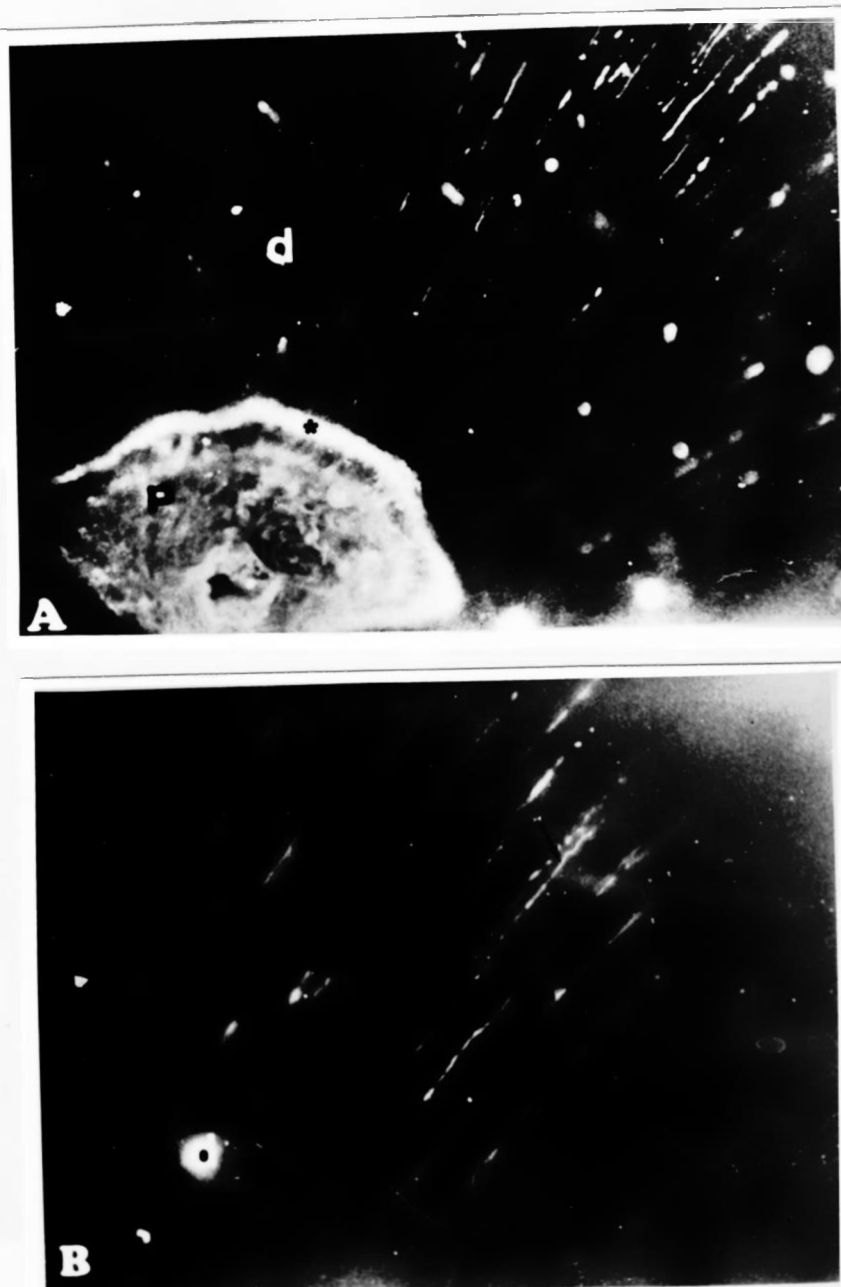


Fig. 9: Microscopía óptica de molar senescente descalcificado y tratado con inmunofluorescencia. A: se observa marcación positiva para C-4-S y DS en predentina (*) la que se encuentra de menor grosor x40. El mismo antígeno se presenta además en escasos túbulos dentinarios (flechas). La pulpa (p) ha disminuido de tamaño en relación a las etapas previas a expensas de la dentina (d) que ha aumentado su extensión. B: el mismo antígeno se presenta además en escasos túbulos dentinarios (flechas) x60.

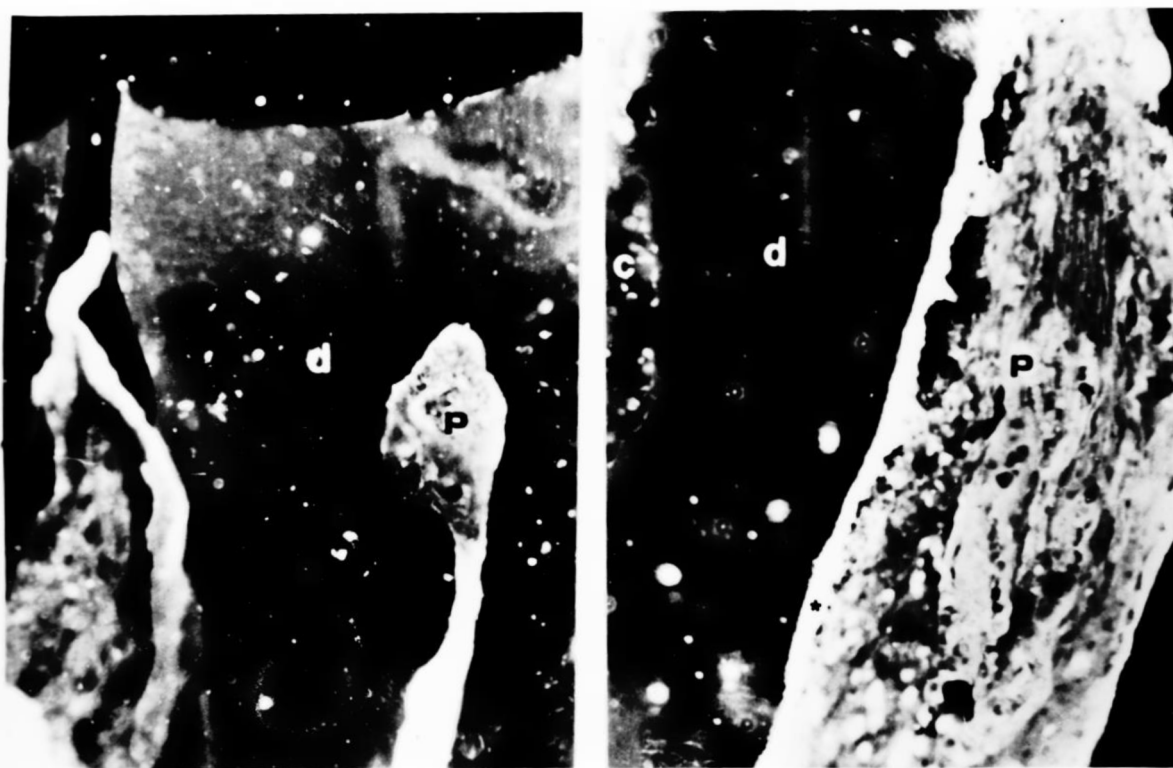


Fig. 10: Microscopía óptica de molar senescente desmineralizado y tratado con anticuerpo 3-B-3, seguido de segundo anticuerpo conjugado a FITC. A: se observa C-6-S en predentina (*) distribuida en forma homogénea y marcación de menor intensidad en la pulpa dentaria. Nótese la atrisión cuspeada, x10. B: a mayor aumento se observa la predentina (*) con inmunofluorescencia positiva, x40.

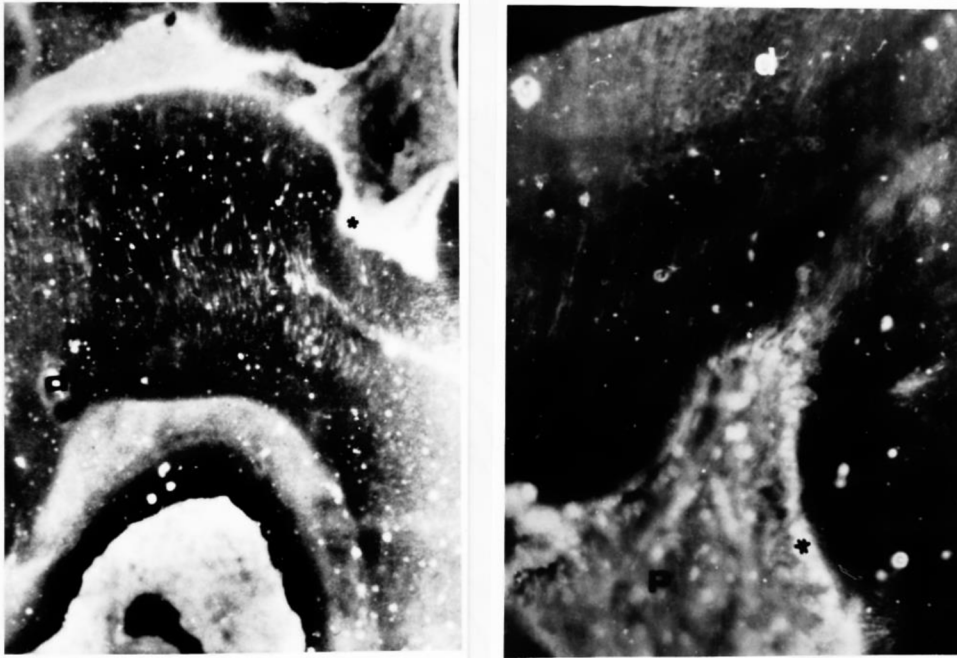


Fig. 11: Microscopía óptica de molar senescente desmineralizado y tratado con inmunofluorescencia. A: Nótese la inmunofluorescencia positiva del glicosaminoglucano de queratán sulfato en pulpa (p) y predentina (*) x40. B: mayor aumento de la zona cuspeada x60.

Germen dentario

Molar adulto

Molar senecto

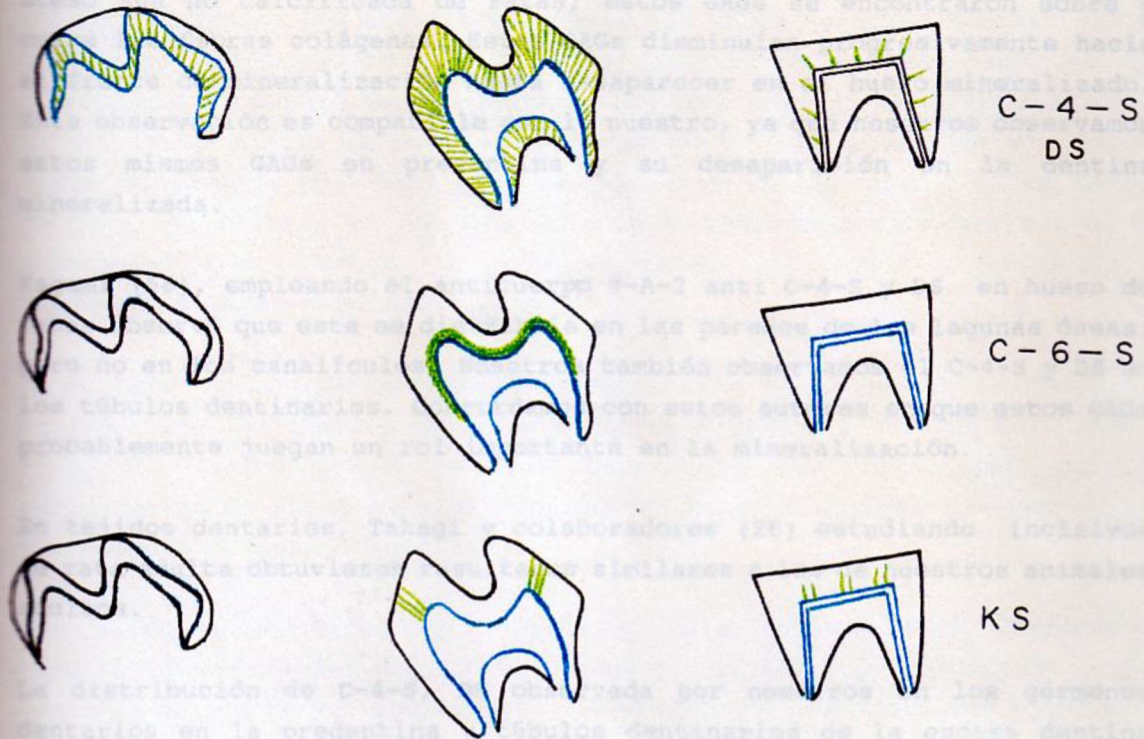


Fig. 12: Propuesta de distribución de glicosaminoglicanos en dentina en tres etapas de la dentinogénesis. En color verde se indica la inmunofluorescencia positiva para los antígenos correspondientes. En la primera columna se esquematizaron los gérmenes dentarios en estado de campana avanzada, en la segunda columna se perfilaron los molares adultos y en la tercera los molares senescentes. El C-4-S y DS se observó principalmente en predentina y túbulos dentinarios tanto en germen dentario como en molar adulto, en molar senescente se observó en predentina y en escasos conductillos dentinarios. El C-6-S se ubicó en predentina en molares adultos y senescentes, no siendo observado en los gérmenes dentarios. El KS se encontró también en predentina y túbulos dentinarios de molares adultos y senescentes, sin observarse en gérmenes dentarios.

5. DISCUSION

Las diferencias en la distribución de GAGs en tejidos mineralizados ha sido reportada en tejidos tales como hueso (56), cartilago (3), cáscara de huevo (54), los que tienen en común la presencia de colágeno.

A nivel óseo, el cual podría considerarse uno de los tejidos calcificados, no dentarios, más similares a la dentina, Hishikawa (55) en un estudio inmunocitoquímico observó C-4-S, C-6-S y KS en la matriz de hueso aun no calcificada de ratas; estos GAGs se encontraron sobre y entre las fibras colágenas. Estos GAGs disminuían progresivamente hacia el frente de mineralización hasta desaparecer en el hueso mineralizado. Esta observación es compatible con lo nuestro, ya que nosotros observamos estos mismos GAGs en predentina y su desaparición en la dentina mineralizada.

Kagami (56), empleando el anticuerpo 9-A-2 anti C-4-S y DS en hueso de ratas observó que este se distribuía en las paredes de las lagunas óseas, pero no en los canalículos. Nosotros también observamos el C-4-S y DS en **los** túbulos dentinarios. Concordamos con estos autores en que estos GAGs probablemente juegan un rol importante en la mineralización.

En tejidos dentarios, Takagi y colaboradores (26) estudiando incisivos de rata adulta obtuvieron resultados similares a los de nuestros animales adultos.

La distribución de **C-4-S, DS** observada por nosotros en los gérmenes dentarios en la predentina y túbulos dentinarios de la escasa dentina formada, es un hallazgo no reportado previamente.

En ratas adultas la distribución de C-4-S, DS fue similar a la observada en gérmenes dentarios, esta ubicación de C-4-S, DS en predentina y paredes de túbulos dentinarios es la misma observada por Takagi y col (26) en incisivos de ratas. Paralelamente hemos encontrado en dentina radicular humana C-4-S, DS en la misma ubicación antes descrita (58).

En ratas senescentes la determinación de C-4-S, DS nos mostró que estos se distribuía en predentina y en escasos túbulos dentinarios, aún cuando no podemos afirmar que aquellos conductillos que presentaron fluorescencia positiva con el anticuerpo 2-B-6 correspondan con aquellos que se observaron con su lumen abierto al MEB. Esta posibilidad parece muy

sugerente si consideramos que en el estudio antes señalado (58) realizado con dentina radicular de personas de la tercera edad el C-4-S y o DS se observó en predentina y sólo en túbulos dentinarios de zonas opacas, es decir en dentina con túbulillos no calcificados, y en aquellas zonas de dentina transparente debido a la calcificación de los túbulos dentinarios, no se observó fluorescencia.

La presencia de C-4-S, DS en los túbulos dentinarios ya en la etapa de campana avanzada, su persistencia en molares adultos que mantienen sus conductillos con el lumen abierto y su desaparición casi completa en molares senectos, nos lleva a coincidir con Takagi y colaboradores (26), en que el C-4-S y/o DS podría estar jugando un rol inhibitor de la mineralización dentro de los conductillos dentinarios. Si esto fuese así, el determinar si solamente la ausencia de C-4-S, DS o la intervención de otros factores se requieren para la calcificación de estos túbulos sería de gran importancia en el conocimiento y tratamiento de una serie de patologías que afectan la dentina tales como la caries dental, hipersensibilidad dentinaria, etc.

En el caso de la hipersensibilidad dentinaria en la que se ha descrito conductillos dentinarios abiertos hacia la superficie externa del diente (57), la determinación de los mecanismos que participan en la obliteración de estos túbulos dentinarios traería grandes avances en el tratamiento de esta condición.

Los estudios in vitro de Bouvier y cols (59) quienes observaron mineralización de una matriz de colágeno con C-4-S y células de pulpa dentaria humana se contraponen a lo observado por nosotros, que sugerimos un rol inhibitor de la mineralización al C-4-S. La mineralización observada por estos autores en los cultivos de células de pulpa dentaria podría haber sido inducida por otro estímulo no identificado.

El C-6-S no fue observado en gérmenes dentarios en estado de campana avanzada, sin embargo en el trabajo de Nieminen y cols. (52) quienes emplearon un anticuerpo que ellos purificaron y que llamaron 7C5 observaron marcación positiva para C-6-S en pulpas de molares de ratones erupcionados y sin erupcionar, sin especificar exactamente la etapa de la dentinogénesis. Esta diferencia con nuestro trabajo la atribuimos fundamentalmente al anticuerpo empleado, ya que el anticuerpo 3-B-3 utilizado por nosotros requiere de digestión previa con condroitinasa, no así el anticuerpo 7C5 lo que podría determinar diferencias de reactividad entre ambos anticuerpos. También podría deberse aunque con menor

probabilidad a que los molares estudiados por este autor no son de la misma especie estudiada por nosotros.

En ratas adultas, el C-6-S se ubicó en predentina y pulpa lo que también coincidió con lo reportado por Takagi (26) y Nieminen (52). Sin embargo, nosotros observamos que la intensidad de la marcación a nivel coronario fue mayor en la mitad de la predentina más próxima a los odontoblastos, hecho no reportado en el trabajo de Takagi y cols (26). Lo cual podría deberse a diferencias en el modelo dentario empleado (los incisivos de rata son de erupción continua y los molares de estos mismos animales no).

En experiencias realizadas en dentina radicular humana (58) también observamos distinta intensidad de marcación en la predentina proximal y distal al estudiar el C-6-S. Esto concuerda con lo expresado por Goldberg y cols. (39) quienes proponen que los proteoglicanos se secretan en dos frentes a nivel de predentina y que pudieran ser reabsorbidos o degradados en un frente más distal.

El C-6-S en la predentina radicular de las ratas adultas no expresó una diferente intensidad como lo observado a nivel coronario, tampoco detectamos este hecho en la predentina de las ratas senectas, en las cuales la marcación de la predentina fue tenue y homogénea. Esta diferente modalidad de expresión del C-6-S en predentina radicular y coronaria podría deberse a diferente velocidad de mineralización y formación de dentina entre la zona coronaria y radicular en esta etapa específica.

El rol preciso del C-6-S es difícil de conocer y explicar con estos datos, Nieminen y col (52) le atribuyen un rol en la diferenciación de odontoblastos. Nosotros pensamos que la diferente expresión del C-6-S en predentina podría indicar un rol en la organización del colágeno y matriz que se va a mineralizar. Esto debido a que se observó que solo está presente en matrices con colágeno que van hacia la mineralización. El C-6-S no se observó en túbulos dentinarios en ninguna de las etapas del desarrollo estudiado, y estos túbulos dentinarios pueden eventualmente calcificarse sin una trama colágena como la presente en la dentina intertubular. Aún cuando se ha descrito la presencia de fibras colágenas a lo largo de los túbulos dentinarios en aproximadamente un 60% de ellos (33) no se sabe si estos túbulos con fibras colágenas son más susceptibles de calcificarse o si este colágeno dispuesto a lo largo de los túbulos dentinarios juega algún rol estructural o de otro tipo en la dentina.

Esto nos lleva a pensar que el C-6-S podría participar en la organización de la matriz colágena que va a calcificarse. Según Goldberg y col. (40) a nivel de predentina los productos sintetizados por el odontoblasto al ser secretados hacia la predentina crean corrientes que empujan a las fibrillas colágenas hacia el límite predentina-dentina y esto contribuye a su disposición paralela al frente de mineralización.

La ausencia de **KS** en los gérmenes dentarios y su presencia en predentina de molares adultos y senectos es un dato que se correlaciona con lo descrito para el KS en cartílago, donde Mason y Wisteman (61) describen que entre el nacimiento y los 60 años de edad aproximadamente un 30% del condroitín sulfato es reemplazado por queratán sulfato. Aún cuando no se conoce el significado funcional Roberts y Paré (51) suponen que este cambio de GAGs implica una disminución de la densidad de las cargas en el tejido lo que traería una leve disminución de la resiliencia entre los primeros años de vida y la edad adulta. Desconocemos por ahora si esta disminución progresiva del C-4-S implicaría una disminución de la resiliencia de la dentina.

En otros modelos, tales como la cáscara de huevo y estatoconios de gallina el KS se ha descrito en zonas que comienzan a mineralizarse (54, 60). El **KS** observado en predentina de molares adultos y senectos presenta igual distribución a la descrita por Takagi y col. (26) en incisivos de rata. Sin embargo nosotros también observamos este GAG en algunos túbulos del tercio medio de las cúspides de ratas adultas, y en escasos túbulos de dentina radicular humana de adultos.

Esto nos sugiere que el KS favorecería la precipitación de sales en los escasos túbulos en que esta presente, sin embargo su ausencia en los gérmenes dentarios donde ya se había iniciado la mineralización de la dentina nos indicaría que en caso de que participe a favor de la mineralización dentinaria, este GAG no sería un factor crucial, si no más bien un coadyuvante o un componente que al desbalancearse en relación a otros podría permitir la precipitación de sales a nivel intratubular.

Es evidente a partir de este trabajo que los GAGs de C-4-S, DS, C-6-S y KS se distribuyen de manera diferente en las distintas zonas de la dentina y que esta localización cambia durante el desarrollo del diente.

La resolución de estos problemas nos parece fundamental para una comprensión más acabada de la serie de fenómenos de mineralización que ocurren en las piezas dentarias tanto en condiciones fisiológicas como

patológicas a través de la odontogénesis. Esto podría reflejarse a futuro en nuevas terapias para estas patologías.

6. CONCLUSIONES

La distribución de glicosaminoglicanos de condroitín cuatro sulfato (C-4-S)-dermatán sulfato (DS), condroitín seis sulfato (C-6-S) y queratán sulfato (KS) varía espacial y temporalmente durante la dentinogénesis en la rata.

Los glicosaminoglicanos de C-4-S y/o DS se presentan en predentina y túbulos dentinarios con su lumen abierto en la etapa de campana avanzada y en molares adultos, mientras que en molares senescentes se observa en predentina y en escasos túbulos dentinarios estando en esta etapa la mayoría de los túbulos dentinarios con su lumen obliterado.

El C-6-S se observa en molares adultos y senescentes solamente en predentina y en los molares adultos a nivel coronario presenta una distribución diferenciada siendo mayor su presencia en la predentina proximal que en la predentina distal.

El KS se distribuye en predentina en molares adultos y senescentes y solamente en escasos túbulos dentinarios en estas dos etapas.

RESUMEN

Para conocer la distribución de glicosaminoglicanos (GAGs) de condroitín cuatro sulfato (C-4-S), dermatán sulfato (DS), condroitín seis sulfato (C-6-S) y queratán sulfato (KS) y su relación con los cambios morfológicos que ocurren durante la dentinogénesis, se empleó dientes de rata Sprague-Dawley en tres estadios de la dentinogénesis.

Los molares empleado se encontraban en estado de campana avanzada molares recientemente erupcionado y molares senescentes los que fueron tratados de la siguiente forma: se fijaron en una solución con paraformaldehído y glutaraldehído, se descalcificaron en EDTA al 10%, se cortaron en crióstato y se les aplicó una técnica inmunohistoquímica con los anticuerpos 2-B-6, 3-B-3 y 5-D-4 contra antígenos de C-4-S, DS, C-6-S y KS respectivamente. Molares homólogos sin descalcificar se observaron a microscopía electrónica de barrido para relacionar los cambios morfológicos con la presencia de los GAGs en estudio.

En estado de campana avanzada los únicos GAGs observados fueron el C-4-S y/o DS en predentina y túbulos dentinarios. En molares adultos se observó los tres antígenos en estudio en la predentina y los GAGs de C-4-S y/o DS se encontraron además en dentina en los túbulos dentinarios que en esta etapa presentaban su lumen abierto. Los molares senescentes presentaron los tres GAGs en estudio en predentina y C-4-S y/o DS solamente en escasos túbulos dentinarios, observándose a microscopio electrónico de barrido que la gran mayoría de los túbulos dentinarios estaban obliterados en esta etapa.

Se concluyó que la distribución de los glicosaminoglicanos en estudio varía espacial y temporalmente y que estos cambios se relacionan con los cambios morfológicos que sufre la dentina.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.-Grunert, G. y C. Mery. Bioestructura de los tejidos animales. Matriz extracelular. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. 1989. Pg 52-66
 - 2.-Boskey, A. L. (1981). Current Concepts of the Physiology and Biochemistry of Calcification. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 157: 225-252.
 3. Poole, A. R. y C. L. Rosenberg. Proteoglycans, Chondrocalcin and the calcification of cartilage matrix in endochondrial ossification. En: Biology of Proteoglycans. Wight, T. N., Mecham, R.P. eds. Academic Press Inc. 1987 pp 187-210.
 4. Linde, A. Dynamic Aspects of Dentinogenesis. En: The chemistry and biology of mineralized tissues. Proceedings the second International Conference on the chemistry and biology of Mineralized Tissues. Alabama, Sept 9-14. 1984.
 5. Romberg, R. W., Werness, P.G., Lollar, P., Riggs, L. y K.G. Mann. (1985). Isolation and Characterization of Native Adult Osteonectin. *J. Biol. Chem.* 260, 5: 2728-2736.
 6. Finkelman, R.D. and W.T. Butler. (1985). Appearance of Dentin 7-Carboxyglutamic Acid-Containing proteins in Developing Rat Molars in vitro. *J. Dent. Res.* 64 (7): 1008-1015.
 7. Gorter de Vries, I., Quartier, E., Boute, P., Wise, E and D. Coomans. (1987). Immunocytochemical Localization of Osteocalcin in developing rat teeth. *J. Dent. Res.* 66 (3): 784-790.
 8. Lussi, A., Crenshaw, M.A. and A. Linde. (1988). Induction and Inhibition of Hydroxyapatite formation by Rat Dentine Phosphoprotein in vitro. *Archs Oral Biol.* 33 (9): 685-691.
 9. Marsh, M. (1989). Binding of Calcium and Phosphate ions to Dentin Phosphoprotein. *Connect. Tiss. Res.* 21: 205-211.
 10. Linde, A. and A. Lussi. (1989). Mineral Induction by Polyanionic Dentin and Bone Proteins at Physiological conditions. *Connect. Tiss. Res.* 21: 171-178
- Lussi, A. y A. Linde. (1993). Mineral induction *in vivo* by dentine

proteins. *Caries Res.* 27: 241-248.

12. Shephard, N. y N. Mitchel. (1985). Ultrastructural modifications of proteoglycans coincident with mineralization in local regions of rat growth plate. *Bone Surg.* 67 (3): 455-464.

13. Hirscham, Albert and Dziewiatkowski. (1966). Protein Polysaccharide Loss during Endochondrial Ossification: Immunochemical Evidence. *Science* 154: 393-395.

14. Engfeldt, B. and A. Hjerpe. (1972). Glycosaminoglycans of Dentine and Predentine. *Calc. Tiss. Res.* 10: 152-159.

15. Takagi, M., Parmley, R. and F. Denys (1981). Ultrastructural Localization of complex Carbohydrates in odontoblasts, predentin and dentin. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (6): 747- 758.

16. Linde, A. Jontell, M., Lundgren, T. Nilson, B. and U. Svanberg (1983). Noncollagenous Proteins of Rat Compact Bone. *J. Biol. Chem.* 25: 1698-1705.

17. Ten Cate, A. R. Dentin-Pulp complex. En *Oral Histology: Development, Structure, and Function.* 2° Ed. The C. V. Mosby Company 1985, St Louis Toronto.

18. Andujar, M. B. y H. Maglore (1990) Collagen expresion and tooth development. *J. Biol. Buccale* 18: 117-122.

19. Ten Cate, A. Conferencia en taller de Biología del Complejo Pulpo - Dentinario. Valparaíso 29-30 Octubre 1992.

20. Linde, A. (1985). The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J. Dent. Res.* 64 (Spec. Iss): 523-529.

21. Hjerpe, A. y Engfeldt (1976). Proteoglycans of dentin and predentin. *CAC. Tiss. Res.* 22: 173-182.

22. Dimuzio, M., Bhowan, M. and W. T. Butler (1983). The Biosynthesis of Dentin Carboxyglutamic acid containing proteins by Rat incisor Odontoblasts. *Biochem. J.* 216: 249- 257.

23. Jones, I. L. and A. G. Leaver. (1974). Studies on the Minor

Components of the Organic Matrix of Human Dentine. *Archs. Oral Biol.* 19: 371-380.

24.- Rahemtulla, F., Prince, C. W. and W. T. Butler. (1984). Isolation and Partial Characterization of Proteoglycans from Rat Incisors. *Biochem. J.* 218: 877-885.

25.- Brandford, W. (1978). Molecular organization of heparan sulphate proteoglycan from human dentine. *Archs Oral Biol.* 23: 1141-1144.

26.- Takagi, M., Hishikawa, H. Hosokawa, Y., Kagami, A. y F. Rahemtulla. (1990). Immunohistochemical localization of glycosaminoglycans and proteoglycans in predentin and dentin of rat incisors. *J. Histochem. Cytochem.* 58: 319-324.

27.- Bhaskar, S. N. Orban's Oral Histology and Embriology. The C. V. Mosby Co. St Louis 1976. 28.- Garberoglio, R. y M. Brannstrom (1976) Scanning Electron Microscopic Investigation of Human Dentinal Tubules. *Arch Oral Biol.* 21: 355-362.

29.- Thomas, H. F. y Payne, R. (1993). The ultrastructure of dentinal tubules from erupted human premolar teeth. *J. Dent. Res.* 65: 532-537.

30.- Holland, G.R. (1976). The extent of the odontoblast process in the cat. *J. Anat.* 121: 133-149.

31.- Szabo, J., Trombitas, K. y Szabo, Il. (1984). The odontoblast Process and its Branches in Human Teeth observed by Scanning electron microscopy. *Arch. Oral. Biol.* 29: 331-333.

32.- Johnsen, D. C. (1985). Inervation of teeth: qualitative, quantitative, and developmental assesment. *J. Dent. Res.* 64 (Spec. Iss): 555-563 a

33.- Dai, X. F., Ten Cate, A. R. and H. Lime Back. (1991). The extent and distribution of intratubular Collagen Fibrils in Human Dentine. *Archs Oral Biol.* 36 (10): 775-778.

34.- Tanaka, T. (1980). The origin and localization of dentinal fluid in developing rat molar teeth studied with lanthanum as a tracer. *Arch Oral*

Biol. 25: 153-162.

35. Thomas, H. F. y P. Carella. (1984). Correlation of scanning and transmission electron microscopy of human dentinal tubules. *Archs. Oral Biol.* 29 (8): 641-646.

36. Goldberg, M. y D. Septier (1983). Electron microscopic visualization of proteoglycans in rat incisor predentine and dentine with cuprolinic blue. *Archs Oral Biol.* 28: 79-83.

37. Goldberg, M. y D. Septier (1985). Improved lipid preservation by malachite Green-Glutaraldehyde Fixation in rat incisor predentine and dentine. *Archs Oral Biol.* 30, 10: 717-726.

38. Goldberg, M. y D. Septier. (1986). Visualization of proteoglycans and membrane associated components in rat incisor predentine using Ruthenium Hexamine Trichloride. *Arch. Oral Biol.* 31: 205-213.

39. Goldberg, M. and D. Septier. (1989). Visualization of Predentine Matrix components and endocytic structures in Rat Incisors Odontoblasts with Tannic Acid. *J. Biol. Buccale.* 17: 245-254.

40. Chardin, J. Septier, D. y M. Goldberg. (1990). Ultrastructural visualization of proteoglycans in rat incisor dentin and predentin with glutaraldehyde cetilpyridinium chloride. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 885- 894.

41. Ortega, A. V. y Oyarzún, A. Ultrastructural visualization of proteoglycans in dentin. *J. Dent. Res.*

42. Lau, E. Arechaga, J. and J. V. Ruch. (1983). Glycosaminoglycans in Embryonic Mouse Tooth Germs. A Histochemical Analysis. *J. Biol. Buccale.* 11: 23-34.

43. Linde, A., Johansson, S., Jonsson, R. and M. Jontell. (1982). Localization of fibronectin during Dentinogenesis in Rat Incisor. *Archs. Oral Biol.* 27: 1069-1073.

44. Weber, D. F. (1974). Human Dentin Sclerosis: A Microradiographic Survey. *Archs. Oral Biol.* 19: 163-169.

45. Nalbandian, J., Gonzalez, F. y R. Sognaes. (1960). Sclerotic Age Changes in Root Dentin of Human Teeth as Observed by Optical, Electron and X-Ray Microscopy. *J. Dent. Res.* 39, 3: 598-607.

46. Mendis, B. R. y A. Darling. (1979). A scanning electron microscope and microradiographic study of closure of human coronal dentinal tubules related to occlusal attrition and caries. *Arch. Oral Biol.* 24: 725-733.
47. Morse, D.R. (1991). Age related changes of Dental Pulp. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 4: 720-745.
48. Hawkinson, R. W. and D. R. Eisenmann. (1983). Electron Microscopy of Dentinal Tubule Sclerosis in the Enamel-Free Region of the Rat Molar. *Arch. Oral Biol.* 28: 409-414.
49. Caterson, B., Calabro, T. and A. Hampton. Monoclonal Antibodies as Probes for Elucidating Proteoglycan Structure and Function. En: *Biology of Proteoglycans*. Wight, T. N., Mecham, R. P. eds. Academic Press Inc. 1987 pp 1-25.
50. Caterson, B., Christner, J. E., Baker, J. R. (1983). Identification of a Monoclonal Antibody that Specifically recognizes corneal and skeletal Keratan Sulphate. *J. Biol. Chem.* 258: 8848-8854.
51. Roberts, C. R. y P. D. Paré. (1991). Composition changes in human tracheal cartilage in growth and aging, including changes in proteoglycan structure. *Am. J. Physiol.* 261: L92 -L100.
52. Nieminen, P., Vainio, S., Jernvall, J., Lukinmaa, P.L., Lehtonen, E. e I. Thesleff. (1993). A Chondroitin sulfate epitope in mammalian dental pulp and its developmental expression in mouse dental papilla. *J. Dent. Res.* 72 (11): 1460-1472.
53. Jackson, R., Busch, S. y A. Cardin. (1991). Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and role in Physiological Processes. *Physiol. Rev.* 71 (2): 481-539.
54. Arias, J. L., Carrino, D. A., Fernandez, M. S., Rodriguez, J. P., Dennis, J. E., Caplan, A. I. (1992). Partial biochemical and immunochemical characterization of avian eggshell extracellular matrix. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 293-302.
55. Hishikawa, H. (1991). Ultrastructural Immunocytochemistry of

proteoglycans in predentin and dentin of rat incisors. *Nihon Univ. Sch Dent.* . Res. 33: 249. Res.

Kagami, A. (1991). Ultrastructural Immunocytochemistry of proteoglycans in bone lacunae and canaliculi in rat premaxillary bone. *Nihon Univ. Sch. Dent.* Res. 33: 258.

57. Absi, E. G. Addy, M. y D. Adams. (1987). Dentine hypersensitivity. A study of the patency of dentinal tubules in sensitive and non sensitive cervical dentine. *J. Clin. Periodontol.* 14: 280-284.

58. Ortega, A. V., Fernandez, M. S. y J. L. Arias. Localización inmunohistoquímica de glicosaminoglicanos en dentina humana. V Reunión Anual de International Association for Dental Research. Chile. Santiago, Octubre 1992.

59. Bowvier, M., Joffre, A. y H. Magloire. (1990). In vitro mineralization of a three-dimensional collagen matrix by human dental pulp cells in the presence of chondroitin sulphate. *Archs. Oral Biol.* 15: 301-309.

Fermin, C. D., Lovett, A. E., Igarashi, M., y K. Dunner (1990) Immunohistochemistry and Histochemistry of the inner ear gelatinous membranes and statoconia of the chick (*Gallus domesticus*) *Acta Anat.* 138: 75-83.