



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE REFERENCIA DE PATOLOGÍA ORAL**

“Caracterización Inmunoestructural del Colágeno Tipo I en la Caries Dentinaria”.

Christopher Eduardo Flores Encina

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO – DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. T.M. Cristian Peñafiel Ekdhal**

**TUTOR ASOCIADO
Dr. Álvaro Cartagena González**

**Santiago – Chile
2011**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE REFERENCIA DE PATOLOGÍA ORAL**

“Caracterización Inmunoestructural del Colágeno Tipo I en la Caries Dentinaria”.

Christopher Eduardo Flores Encina

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO – DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. T.M. Cristian Peñafiel Ekdhal**

**TUTOR ASOCIADO
Dr. Álvaro Cartagena González**

**Santiago – Chile
2011**

***A mis padres por su apoyo constante
su amor incondicional
y la más grande herencia
Jesucristo.***

***Agradezco por sobre todo a Dios,
de quien es el Reino, el Poder y la Gloria,
por tanto, nada tengo y nada soy sino por ÉL.***

***Agradezco a Débora por ser
mi compañera incondicional,
mi cable al cielo, mi vida.***

***A mi amigo Alejandro porque sin
su motivación y expertise,
todo esto no hubiera sido posible.***

***A todos los que de una u otra
manera han colaborado en mi
formación como Persona y Profesional.***

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Hipótesis y Objetivos	10
Material y Método	11
Resultados	15
Discusión	31
Conclusiones	39
Referencias Bibliográficas	40
Anexo	46

Resumen

Introducción

La remoción de la dentina cariada se sustenta en los estudios de Takao Fusayama de la década de los '70, quién propuso que el colágeno de la dentina intertubular presente en ella se encuentra denaturado, lo que imposibilita su remineralización. Sin embargo, las técnicas utilizadas en dichos estudios no son lo suficientemente sensibles para la determinación del estado de organización ultraestructural de las moléculas de colágeno triple helicoidales.

Objetivo

En el presente estudio, se evaluó las características antigénicas del colágeno tipo I presente en la dentina intertubular infectada en caries dentinarias rápidamente progresivas, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal.

Material y Método

Veinte molares extraídos por caries y almacenados en etanol 96%, fueron caracterizados clínica e histopatológicamente. Cada espécimen fue procesado para la obtención de cortes mineralizados y desmineralizados, los cuales fueron inmunomarcados con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno tipo I, considerando sus respectivos controles. Todos los cortes fueron contrastados con tinción Gram. Como control positivo de la inmunotinción negativa del colágeno denaturado, se utilizó dentina expuesta a hipoclorito de sodio 5%.

Todos los cortes fueron observados y fotografiados tras cada paso experimental. La determinación de la intensidad de la inmunorreacción, se realizó mediante un estudio densitométrico cuyos resultados fueron analizados estadísticamente con la prueba *t* de Student para muestras pareadas, considerando un $p < 0,05$.

Resultados

Todos los especímenes presentaron caries dentinarias rápidamente progresivas. La dentina intertubular, presente en la dentina cariada profusamente infectada por bacterias Gram positivas, presentó inmunorreacción similar a la encontrada en la dentina sana en los cortes desmineralizados y en el ligamento periodontal y pulpa, en los cortes mineralizados.

Los controles negativos presentaron una inmunorreacción negativa. La dentina expuesta a hipoclorito de sodio presentó inmunorreacción positiva creciente hacia la profundidad del tejido, siendo completamente negativa en la superficie.

La diferencia densitométrica de la intensidad de inmunorreacción de los especímenes experimentales respecto de sus controles, fue estadísticamente significativa con un valor $p < 0,05$ ($p = 0,00243E^{-11}$).

Conclusiones

El colágeno tipo I presente en la dentina intertubular infectada en caries dentinarias rápidamente progresivas, preserva sus características antigénicas, no encontrándose denaturado. Esto da sustento al desarrollo de técnicas operatorias mínimamente invasivas.

Introducción

La dentina es el tejido mineralizado producido por los odontoblastos ectomesenquimáticos de la papila dental. Este proceso de síntesis ocurre en la odontogénesis durante la etapa de citodiferenciación. Estas células organizan extracelularmente una matriz orgánica que posteriormente se mineraliza a través de la precipitación de cristales de hidroxiapatita (1).

Desde una perspectiva topográfica, la dentina se puede clasificar en: dentina del manto, circumpulpar y predentina. Histogenéticamente, en un diente podemos encontrar las dentinas primaria y secundaria y como respuesta a un estímulo patológico podemos también encontrar dentina terciaria o transparente (1).

Morfológicamente, la entidad más relevante de esta biocerámica es el túbulo dentinario. Estos alojan en su interior a las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos. La presencia de estos túbulos en el espesor de la dentina divide a este tejido en un compartimento intertubular (dentina intertubular) y un compartimento intratubular (dentina intratubular) (1). Esta última, forma la pared de los túbulos dentinarios, es más mineralizada que la intertubular y está compuesta casi exclusivamente por cristales de hidroxiapatita altamente compactados. El compartimento intertubular constituye la mayor parte de las dentinas del manto y circumpulpar (1).

La dentina está compuesta por un 70% de mineral, 10% de agua y 20% de material orgánico en relación peso – peso. La fase mineral ocupa el 50% del volumen total, la fase orgánica el 30% y la fase acuosa un 20% (1, 2).

La matriz orgánica dentinaria contiene una gran variedad de macromoléculas, de las cuales las más abundantes son las proteínas colágenas las que alcanzan un 90% del total de la fase orgánica. La especie molecular de

colágeno predominante es el tipo I, aunque también se describe la presencia de trazas de colágeno tipo I Trimmer, colágenos tipo III, V y VI (3).

Las fibrillas de colágeno tipo I de la dentina intertubular, proveen un andamiaje tridimensional para la aposición de la hidroxiapatita de la fase mineral (1).

Análisis bioquímicos e inmunohistoquímicos de alta resolución han identificado dentro de la matriz orgánica, además, una categoría de proteínas no colágenas llamadas familia SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein), que incluye osteopontina, sialoproteína de hueso, proteína de la matriz dentinaria – 1, sialofosfoproteína de dentina y fosfoglicoproteínas de la matriz extracelular (4, 5)

Otro grupo de proteínas no colágenas polianiónicas presentes en la dentina son los proteoglicanos (6, 7).

La molécula de colágeno tipo I heteropolimérica, en la dentina, está constituida por dos cadenas $\alpha 1$ y una $\alpha 2$. Las interacciones intermoleculares de estas dos cadenas polipeptídicas distintas determinan la conformación cuaternaria de la molécula de colágeno. Su triple hélice tiene 300 nm de longitud y 1,5 nm de espesor. Estas moléculas de colágeno tipo I se organizan supramolecularmente, en la matriz de la dentina, sólo hasta el nivel de fibrillas (8).

Extracelularmente, las moléculas de colágeno se alinean y ordenan en un mismo plano de acuerdo con sus extremos amino y carboxilo terminales. En planos adyacentes, se encuentra desplazada en 67 nm respecto de planos superiores o inferiores. Entre las moléculas alineadas en un mismo plano queda un espacio o “zona hole” de 0.6 D y una zona de traslapamiento de 0.4 D, que suman 1 D, que corresponde a 67 nm (8, 9). Considerando lo anterior es que las fibrillas de colágeno, cuando son observadas a través de microscopía electrónica de transmisión, con tinciones de contraste adecuadas, adoptan un patrón de bandeo característico (8, 9).

La caries dental es un proceso infeccioso mediado por bacterias productoras de ácidos, que afecta a los tejidos mineralizados de las piezas dentarias (10). Las lesiones comienzan con la desmineralización progresiva del esmalte dental, tejido donde se observan las primeras alteraciones provocadas por la patología (11, 12, 13). Una vez que la enfermedad ha atravesado el límite amelodentinario y progresa hacia la dentina es capaz de promover cambios fisicoquímicos en ella tales como disminución de la cantidad de mineral (14, 15), cambios de color (16), activación de metaloproteinasas de la matriz, que pueden degradar el componente orgánico del tejido, alterando las proteínas colágenas (17), entre otros.

Semiológicamente las caries de la dentina fueron clasificadas por Miller y Massler en la década de los '60 en lesiones detenidas y activas. Una lesión detenida, inactiva o lentamente progresiva, se presenta clínicamente de un color café oscuro o negro y una consistencia dura a la exploración; por el contrario, las lesiones activas o rápidamente progresivas corresponden a aquellas caries que clínicamente presentan una dentina de un color café pálido y una consistencia blanda y friable (18).

Histopatológicamente, McKay en 1976 observó que estas caries activas presentan un profuso infiltrado bacteriano Gram positivo que distorsiona la morfología normal del tejido (19). Él describió tres zonas de infección en la caries dentinaria aguda; una muy superficial, profusamente infiltrada por bacterias Gram positivas; la segunda zona, consecutiva a la anterior, de infección secundaria donde existe invasión bacteriana a través de túbulos dentinarios que se visualizan distorsionados y expandidos hacia la dentina intertubular. La tercera zona es la más profunda y presenta infección primaria con bacterias confinadas sólo a los túbulos y el tejido dentinario presenta poca distorsión (19).

Contemporáneamente con lo anterior, Fusayama y su grupo de investigadores realizaron diversos estudios en los cuales se describió exhaustivamente la morfología de la caries dentinaria. De las observaciones anteriores se propuso que la caries dentinaria posee dos zonas topográficas: una

zona superficial con dentina infectada y fibrillas colágenas denaturadas de manera irreversible, imposible de remineralizar, que debe ser removida y una zona profunda, no infectada, con fibrillas colágenas de características normales y por lo tanto, gran capacidad de remineralización (20, 21, 22, 23, 24).

Basados en lo anterior, Sato y Fusayama en el año 1976, publican un estudio en el cual describen la técnica de remoción del tejido dentinario cariado guiada por la tinción con un colorante inespecífico (fucsina básica 0.5% en propilenglicol) de la zona superficial de la dentina cariada (25).

Desde entonces, estos hallazgos han sido la base utilizada para el diagnóstico y tratamiento de la caries, en la clínica odontológica. Numerosos estudios posteriores avalaron la capacidad de este colorante para guiar la terapéutica y el tratamiento de la caries dental (26, 27, 28).

La aparente denaturación irreversible del colágeno dentinario, se ha fundamentado en estudios ultraestructurales convencionales en los cuales las fibrillas pierden definición y el patrón de bandeo característico (29, 30). Sin embargo, la sensibilidad de las técnicas utilizadas en estos estudios no fue suficiente para demostrar la naturaleza íntima de la organización supramolecular del colágeno. Es importante considerar que estudios contemporáneos a éstos, no detectaron cambios morfológicos evidentes, en la apariencia ultraestructural de las fibrillas colágenas de la dentina cariada (31, 32).

Bioquímicamente, la denaturación de una proteína es definida como cualquier modificación no-covalente que implique la pérdida de conformación de la estructura proteica (33). La denaturación ocurre súbitamente en un rango muy definido de condiciones, donde la molécula proteica se puede alterar de diferentes modos, dependiendo de su nivel de organización (primario, secundario, terciario y cuaternario). Este proceso de denaturación transforma una molécula biológicamente activa en una entidad no funcional (33). Desde esta perspectiva, una molécula de colágeno está denaturada cuando pierde su conformación cuaternaria o triple helicoidal. La determinación de la denaturación de una proteína depende del método utilizado para observarla. Algunos detectan cambios muy

leves en la estructura, mientras otros requieren de grandes alteraciones para visualizarlos.

Lo anterior nos sugiere reexaminar los resultados obtenidos por estudios previos realizados en la matriz dentinaria cariada (20, 21, 22, 23, 24), ya que si bien se determinaron alteraciones en las fibrillas colágenas observadas con microscopía electrónica de transmisión (MET), en la zona más externa de la dentina cariada, esta técnica no permite observar el nivel de organización de las moléculas de colágeno que constituyen las microfibrillas. Además, la pérdida de enlaces intermoleculares (29, 34), alteraría la morfología fibrilar (ausencia de bandeo) pero no involucraría la alteración de la estructura cuaternaria triple helicoidal, lo que técnicamente no constituye una denaturación de la proteína.

Un método muy utilizado para detectar morfológicamente el estado denaturado o nativo de una proteína es el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales (35).

En el caso del colágeno tipo I presente en la dentina, éste puede ser estudiado por el uso de ambos tipos de anticuerpos, sin embargo, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno tipo I humano, reconoce específicamente la molécula en su estructura cuaternaria triple helicoidal; por lo tanto una reacción antígeno-anticuerpo identificable involucra la presencia de la molécula funcional en su estado nativo y no denaturado, susceptible de ser remineralizada bajo condiciones adecuadas. (36, 48, 55)

Desde esta perspectiva, estudios inmunohistoquímicos preliminares realizados por Oyarzún y col., con microscopía óptica y electrónica, demostraron que el colágeno de la dentina cariada conserva la inmunoreactividad, al utilizar un anticuerpo policlonal de conejo, anti-colágeno tipo I humano. Por otra parte, en dicho estudio fue posible detectar con microscopía inmunoelectrónica, la presencia de fibrillas con el patrón de bandeo característico, fuertemente inmunoreactivas. Con altos aumentos se logró detectar microfibrillas de entre 5 a 10 nm fuertemente inmunomarcadas, coexistiendo con las fibrillas anteriormente señaladas (36). Considerando la existencia de un patrón microfibrilar de ensamblaje lateral de las

moléculas de colágeno (37, 38, 39), estas observaciones, en dentina cariada e infectada, sugieren que en ésta condición patológica se producen modificaciones de la organización subestructural de las fibrillas y no una denaturación total e irreversible de la molécula de colágeno.

Ultraestructuralmente las fibrillas de colágeno tipo I de la dentina cariada pueden perder el patrón de bandeo característico y los enlaces intermoleculares. Sin embargo, esta evidencia no es suficiente para justificar que en una lesión dentinaria rápidamente progresiva, la matriz dentinaria deba ser removida quirúrgicamente mediante instrumentación mecánica.

Es importante mencionar que el estudio clásico de Ohgushi y Fusayama (21) (que sustenta las bases de la operatoria dental contemporánea), sugiere que el colágeno está irreversiblemente denaturado y se basa en la observación ultramicroscópica de áreas muy pequeñas de la zona externa de la lesión cariosa, en un número reducido de especímenes (n=20), en ausencia de criterios clínicos de inclusión rigurosos y sin validación histopatológica-microbiológica para determinar el grado de actividad de la lesión.

En consecuencia, en la caries dentinaria es fundamental analizar las características de las macromoléculas de su matriz orgánica en condiciones normales y patológicas; ya que las proteínas colágenas no se encontrarían denaturadas como fue detectado e interpretado previamente. Lo observado por estos investigadores sólo se relaciona con modificaciones en la organización supramolecular del colágeno, cuya expresión máxima son las fibrillas detectadas con microscopía electrónica de transmisión.

Estudios clínicos, microbiológicos y radiográficos en los cuales se realizó remoción incompleta del tejido cariado y posteriormente se aplicó una base cavitaria de hidróxido de calcio para luego sellar la cavidad con cementos de óxido de zinc-eugenol, demostraron que después de 6 meses las lesiones se detuvieron. Este hecho ha permitido suponer que la remoción total del tejido cariado no es esencial para el control de la progresión de la enfermedad (40).

Actualmente, los parámetros clásicos para la remoción del tejido dentinario cariado (dureza superficial y cambios de color) están siendo críticamente reexaminados. Es así que para el tratamiento de las caries dentinarias profundas, se ha desarrollado el concepto de excavación escalonada de la dentina cariada (Stepwise Excavation), basado en una comprensión de la patología de las lesiones y no en consideraciones puramente mecanicistas. Esta nueva filosofía de tratamiento pretende inactivar la lesión y permitir la formación de dentina terciaria, sin la necesidad de eliminar completamente el tejido cariado (41, 42, 43).

La expresión morfológica de la caries dentinaria ha sido profundamente estudiada en forma radiográfica, clínica, histológica y ultraestructural. Pero, en el ser humano, la expresión y distribución de las macromoléculas de la matriz extracelular dentinaria y sus posibles alteraciones, en el inicio y progresión de estas lesiones ha sido muy poco estudiada.

La resolución de estas interrogantes permitiría conocer los efectos de la organización estructural y molecular de la dentina normal y patológica sobre la expresión clínica de la lesión, lo que podría orientar al clínico respecto de la extensión de la remoción de tejido afectado y necesidad de tratamiento; ya que detener o prevenir la destrucción de la matriz orgánica podría permitir la reparación de la lesión mediante la remineralización de la dentina descalcificada.

Hipótesis

El colágeno tipo I presente en la dentina intertubular infectada en caries dentinarias rápidamente progresivas preserva sus propiedades antigénicas.

Objetivo General

Determinar la preservación de las características propiedades del colágeno tipo I presente en la dentina intertubular infectada en caries dentinarias rápidamente progresivas.

Objetivos Específicos

- ❖ Relacionar las propiedades inmunohistoquímicas del colágeno tipo I de la matriz dentinaria con la semiología clínica de la lesión.

- ❖ Observar la expresión de las características antigénicas del colágeno tipo I, en presencia de infección bacteriana.

- ❖ Cuantificar la reacción inmunohistoquímica del colágeno tipo I de la dentina intertubular infectada en la caries dentinaria.

Material y Método

1.1. Selección de la muestra

Se obtuvieron 20 molares portadores de caries dentinarias rápidamente progresivas extraídos por urgencia odontológica en el Servicio de Urgencia Dental del Hospital Barros Luco, de acuerdo con los criterios de obtención de muestras biológicas del servicio (anexo 1). Las características semiológicas y la actividad de las lesiones, fueron definidas clínicamente según el criterio de color (café claro) descrito por Miller y Massler (18). Los especímenes fueron seleccionados sólo por un observador, que consideró únicamente el criterio antes mencionado. Todos los especímenes fueron fijados en etanol al 96% durante siete días, según lo propuesto por Laboux y col. (44) y Otali y col. (45) para su posterior procesamiento.

1.2. Procesamiento de los especímenes y análisis morfológico

Las piezas dentarias fueron incluidas en LR White Hard Grade (London Resins) y fotopolimerizados con luz UV a 4°C, para ser seccionadas mesio-distalmente en dos segmentos con una máquina cortadora de tejidos mineralizados ISOMET 1000 (Buehler; Lake Bluff, IL, USA) bajo refrigeración constante. Ambos segmentos de cada espécimen fueron observados con un microscopio estéreo Nikon SMZ800 con sistema de epi-iluminación y trans-iluminación y fotografiados mediante una cámara digital DS-Fi1 Nikon manipulada a través del software NIS-Elements D 3.1 (Nikon); con el objeto de obtener un registro de las características macroscópicas de las lesiones.

De los segmentos vestibulares se realizaron cortes mineralizados seriados de 500 µm de espesor. Los segmentos linguales de todos los especímenes fueron

separados de la resina y desmineralizados en ácido fórmico al 10% durante 30 días a temperatura ambiente, con un recambio cada 72 hrs. según lo propuesto por Oyarzún y col. (46). Estos especímenes fueron lavados profusamente en agua corriente y conservadas en buffer fosfato salino (PBS) por 12 hrs. a 4°C, deshidratados en una serie de alcoholes de concentración ascendente, aclarados en xilol e incluidos en parafina. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 5 µm de espesor, los que fueron montados en portaobjetos silanizados.

Para realizar un diagnóstico histopatológico, un corte de cada espécimen se tiñó con Giemsa.

1.2.1. Detección inmunohistoquímica de Colágeno tipo I

Los cortes mineralizados fueron acondicionados con ácido ortofosfórico al 37% durante 30 segundos. Estos y los cortes provenientes de los segmentos desmineralizados incluidos en parafina, fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos, para inactivar la acción de la peroxidasa endógena.

Transcurrido este tiempo los cortes fueron lavados profusamente con PBS e incubados en suero normal de cabra al 5% y PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 3%, durante 30 minutos a temperatura ambiente, para el bloqueo de los sitios inespecíficos.

Todos los cortes de cada espécimen se incubaron durante 12 horas a 4°C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno tipo I humano (Sigma, C-2456), diluido en 1:500 en PBS-BSA al 3%.

La inmunorreacción fue detectada utilizando el sistema biotina – streptavidina – peroxidasa – diaminobenzidina (LSAB system HRP. DAKO®), el cual contiene el anticuerpo secundario biotilado (56).

Los cortes mineralizados de todos los especímenes fueron observados en un microscopio estéreo Nikon SMZ800 con sistema de epi-iluminación y trans-

iluminación y fotografiados mediante una cámara digital DS-Fi1 Nikon manipulada a través del software NIS-Elements D 3.1 (Nikon).

Los cortes desmineralizados e incluidos en parafina de todos los especímenes, fueron observados en un microscopio Zeiss Axioscop, las imágenes fueron capturadas usando la cámara y software antes mencionados.

Las imágenes fueron guardadas como archivos JPEG.

1.2.2. Localización de la invasión bacteriana

Después de fotografiar los especímenes inmunomarcados, los cortes experimentales y controles fueron contrastados con la técnica de Gram para la localización de bacterias, aclarados en xilol y fotografiados nuevamente.

1.2.3. Procesamiento y análisis digital de imágenes

Los límites periféricos de la lesión cariosa, en los cortes mineralizados, fueron determinados por la localización de la interfase dentina transparente - dentina sana, mediante la observación con epi-iluminación.

La delimitación de toda la dentina intertubular infectada, fue determinada localizando las bacterias más apicales del frente de avance en los túbulos dentinarios. Las bacterias contenidas en esta región de interés (ROI) fueron transportadas y superpuestas con la imagen inmunomarcada preliminarmente, mediante el software Adobe Photoshop CS4.

Posteriormente, para la evaluación de la intensidad de la inmunorreacción, se realizó un estudio densitométrico en la matriz intertubular de la dentina infectada. Para este propósito, de cada espécimen desmineralizado experimental

y control, se seleccionaron aleatoriamente 10 imágenes microscópicas con un aumento de 40x. En cada imagen microscópica se delimitaron 3 áreas de 625 μm^2 , las que contenían 81.225 píxeles respectivamente. Este análisis densitométrico se realizó con el Software Matrox Inspector 4.0.

1.2.4. Controles

El control negativo de la inmunorreacción, fue un corte de la serie de cada espécimen en el cual se omitió el anticuerpo primario y se reemplazó por suero de cabra no inmune. Como control positivo se utilizó la pulpa-predentina, la dentina sana y el ligamento periodontal de los mismos especímenes.

Para el control positivo de la identificación inmunohistoquímica de colágeno tipo I denaturado, se utilizaron segmentos de dentina sana de 125 mm^3 , desmineralizados y tratados en NaClO al 5% durante 2 minutos de acuerdo con Oyarzún y col. (47).

1.2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos tanto de las muestras experimentales como de los controles negativos fueron analizados estadísticamente mediante una análisis de distribución de datos y a través de la prueba *t* de Student para muestras pareadas, considerando un intervalo de confianza del 95% (nivel de significancia $p < 0,05$).

Resultados

Análisis morfológico

Todos los especímenes, incluidos en la resina fotopolimerizada y cortados mesio-distalmente presentaron, a la inspección visual bajo microscopía estéreo, caries dentinarias rápidamente progresivas de un color amarillo-café claro y de aspecto friable.

En los cortes desmineralizados de 5 μm y teñidos con Giemsa se observó que la dentina intertubular es marcadamente eosinófila y los túbulos dentinarios presentan en su interior corpúsculos azul de metileno positivos. En las zonas más superficiales de los cortes, estos corpúsculos se observan densamente compactados, distorsionando la histología del tejido (fig. 1).

Detección inmunohistoquímica de colágeno tipo I

Al observar la reacción de inmunoperoxidasa en los cortes mineralizados de 500 μm , incubados con el anticuerpo monoclonal anti - colágeno tipo I, esta fue positiva, coloreando de café todo el cuerpo de la lesión cariosa, el ligamento periodontal remanente y la pulpa dental (fig. 2b y 3b).

La reacción inmunoenzimática realizada en los cortes desmineralizados de 5 μm , mostró inmunopositividad en la dentina del cuerpo de la lesión cariosa, la dentina sana, el ligamento periodontal y la pulpa dental (fig. 4a).

En los cortes en los cuales se omitió el anticuerpo primario (control negativo) no se detectó la reacción de la peroxidasa en ninguno de los tejidos observados (fig. 3d, 4b, 5b, 5d, 5f).

Los especímenes que sirvieron como control positivo de la denaturación de colágeno mostraron que la superficie expuesta al hipoclorito de sodio, presentó pérdida de la inmunorreactividad. Esta se manifestó gradualmente desde la superficie hacia la profundidad del corte, pudiéndose observar una zona superficial (Zona S) completamente inmunonegativa, una intermedia (I) con inmunorreacción de mayor intensidad que la zona superficial y otra profunda (P) de dentina no afectada por el agente denaturante, que presenta inmunorreactividad positiva para colágeno tipo I comparable con la inmunorreactividad de la dentina sana (fig. 6).

Localización de la invasión bacteriana

En los cortes inmunomarcados mineralizados de 500 μm y contrastados con la tinción de Gram se pudo advertir que las lesiones cariosas de todos los especímenes presentaban una profusa infección microbiana en la dentina circumpulpar. La profundidad de la infiltración fue variable entre un espécimen y otro y entre distintos cortes de un mismo espécimen. (fig. 2c y 3c). La dentina intertubular de las zonas infectadas y la dentina intertubular de zonas no infectadas en un mismo corte presentaron inmunorreactividad positiva para el anticuerpo utilizado (fig. 2d).

Un hecho destacable fue que la dentina transparente, observable en los cortes por epi-iluminación, presentó afinidad tintorial por el cristal violeta con la técnica utilizada (fig. 2c y 3c).

En los cortes de 5 μm de los especímenes desmineralizados las bacterias Gram positivas infiltran profusamente la dentina cariada. En las zonas más superficiales se detectaron cúmulos microbianos en el límite amelodentinario y cúmulos microbianos en el espesor de la dentina circumpulpar, que distorsionaban la morfología normal del tejido (fig. 4). En zonas profundas, la infiltración microbiana intratubular fue claramente discernible. La dentina intertubular de las zonas infectadas y la dentina intertubular de zonas no infectadas en un mismo

corte presentaron inmunorreactividad positiva para el anticuerpo utilizado (fig. 5a, 5c, 5e).

En los cortes mineralizados y desmineralizados en los cuales se omitió el anticuerpo primario y contrastados con la técnica de Gram, no se detectó inmunorreacción positiva (fig. 4b, 5b, 5d, 5f).

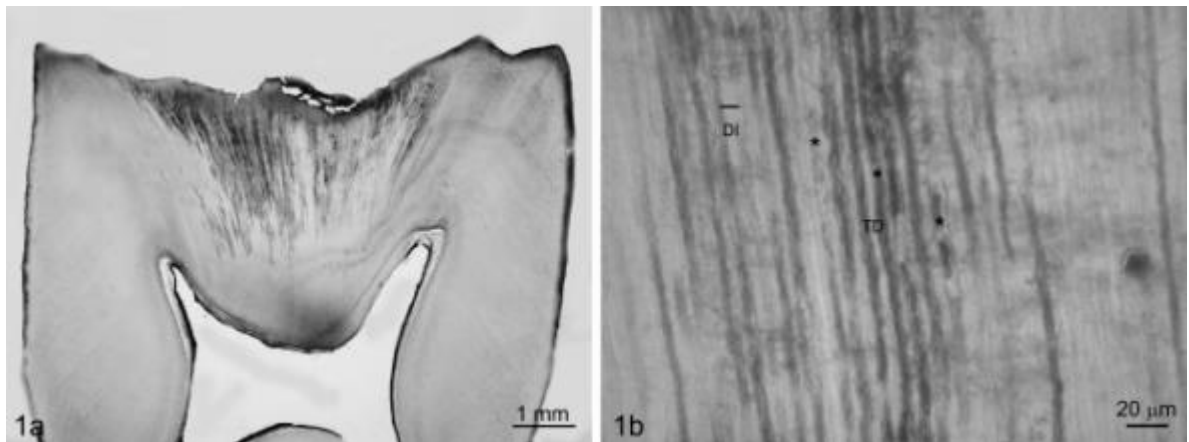
Densitometría y análisis estadístico

Considerando la distribución normal de los datos obtenidos, tanto de los especímenes control como experimental, se realizó la prueba *t* de Student (prueba de aproximación a la normal) para muestras pareadas (gráfico 1).

Aplicando esta prueba a los datos obtenidos de la densitometría de las distintas áreas comparables (ROI) (fig. 7) de los especímenes experimentales y controles negativos, el valor *p* fue inferior a 0,05 ($p = 0,00243E^{-11}$) (ver tabla 1). Este valor indica, que existen diferencias significativas en la intensidad de la inmunorreacción entre los datos obtenidos mediante densitometría digital desde la dentina intertubular infectada, de los especímenes experimentales, respecto de la dentina intertubular infectada de los controles negativos.

Resultados

Figura 1. Caracterización histopatológica de la lesión cariosa rápidamente progresiva.

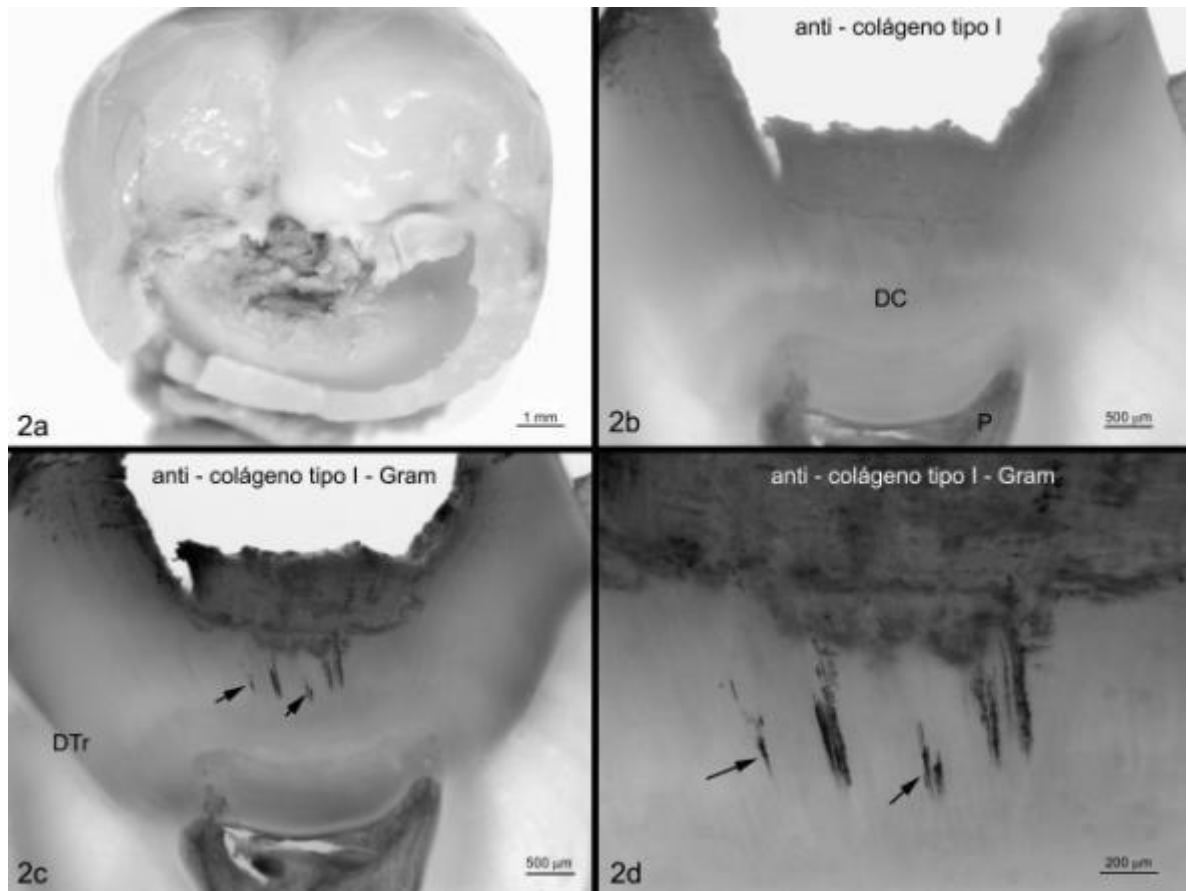


Leyenda figura 1

1a Corte desmineralizado. Tinción con Giemsa. Se observan las características histopatológicas de una caries dentinaria rápidamente progresiva, caracterizada por un profuso infiltrado microbiano en la dentina circumpulpar que alcanza profundidades variables.

1b Mayor aumento de la imagen 1a. Nótese la presencia de material azul de metileno positivo en el interior de los túbulos dentinarios (TD) (*). La dentina intertubular (DI) se observa eosinófila.

Figura 2. Caracterización inmunohistoquímica del colágeno tipo I de la dentina cariada en cortes mineralizados.



Leyenda figura 2

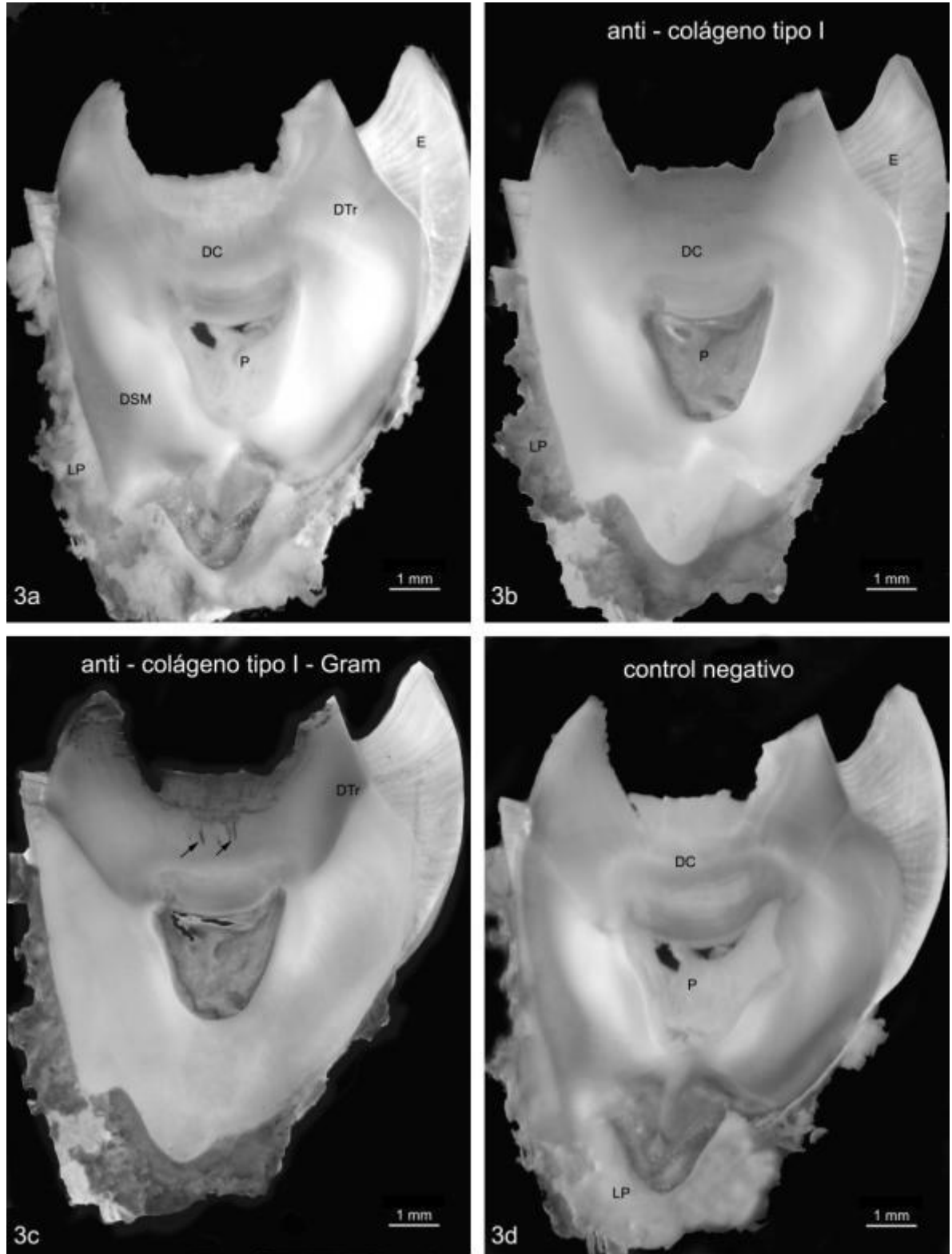
2a Primer molar inferior que presenta a la inspección clínica caries dentinaria rápidamente progresiva.

2b Especimen experimental. Corte mineralizado de 500 μm de espesor. Inmunorreacción del anticuerpo monoclonal para colágeno tipo 1 humano revelado por la reacción de inmunoperoxidasa. Nótese la inmunopositividad en todo el cuerpo de la lesión cariosa (DC = dentina cariada) y en el tejido pulpar (P).

2c El mismo corte de la imagen 2b, contrastado con tinción de Gram. Obsérvese el profuso infiltrado bacteriano Gram positivo (flechas) en la porción de dentina superficial y la presencia de otras bacterias que penetran en profundidad a la dentina a través de los túbulos dentinarios. Obsérvese que la dentina transparente (DTr) en la periferia de la lesión presenta afinidad tintorial por el cristal violeta.

2d Mayor aumento de la imagen 2c donde se visualiza la invasión de bacterias Gram positivas (flechas) a través de los túbulos dentinarios agrupados.

Figura 3. Determinación de la presencia de colágeno tipo I en cortes mineralizados.



Leyenda figura 3

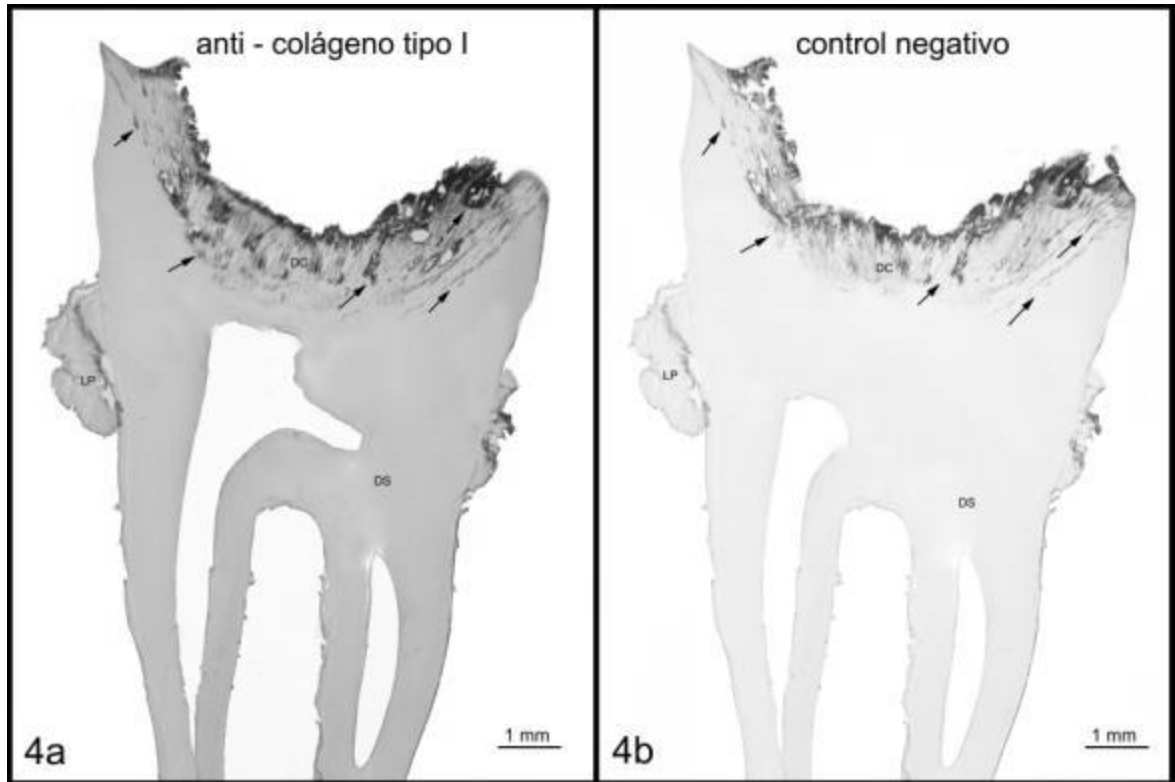
3a Corte mineralizado de 500 μm de espesor. Observado por epiluminación. Nótese la lesión cariosa en la dentina circumpulpar de un primer molar inferior. Dentina sana mineralizada (DSM), dentina transparente (DTr), pulpa (P), ligamento periodontal (LP), esmalte (E).

3b En el mismo corte de la imagen 3a se visualiza la inmunorreacción del anticuerpo monoclonal anti-colágeno tipo 1 revelado por la reacción de inmunoperoxidasa. Nótese la inmunorreacción positiva en la dentina cariada (DC). Además se puede apreciar la inmunorreacción positiva del ligamento periodontal (LP), pulpa dental (P) y esmalte (E). Obsérvese la ausencia de inmunomarcación en la dentina sana mineralizada (DSM).

3c El mismo corte de la imagen 3b, contrastado con la tinción de Gram. Se pueden visualizar los microorganismos Gram positivos (flechas) infiltrando profusamente la porción de dentina cariada más superficial. Obsérvese que la dentina transparente (DTr) en la periferia de la lesión presenta afinidad tintorial por el cristal violeta.

3d Control negativo. Corte consecutivo al corte mostrado en 3c. Nótese a la inspección visual la ausencia de inmunorreacción en la dentina cariada (DC), pulpa (P) y ligamento periodontal (LP).

Figura 4. Caracterización inmunohistoquímica del colágeno tipo I de la dentina en cortes desmineralizados.

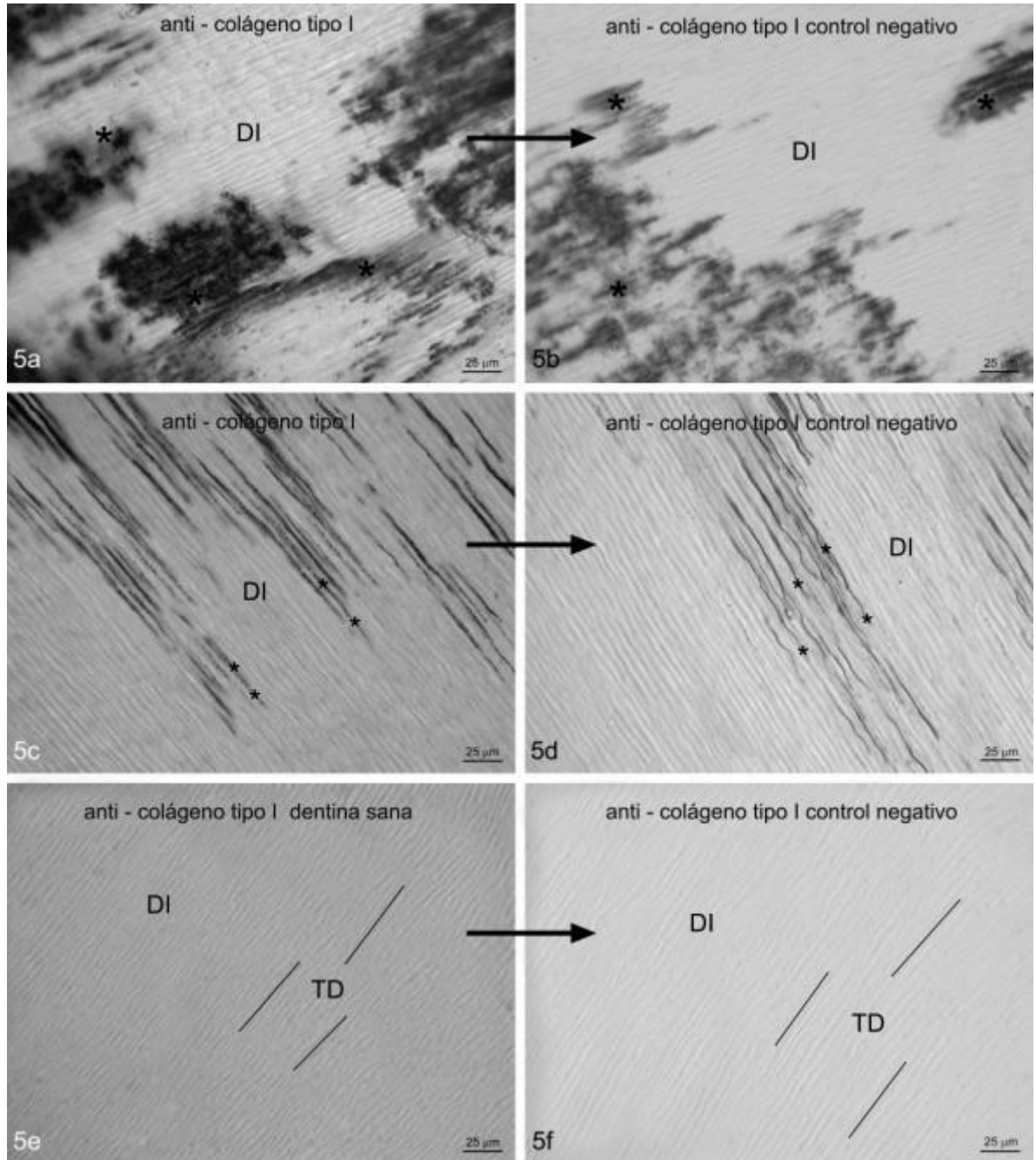


Leyenda figura 4

4a Especimen experimental. Corte desmineralizado. Inmunoperoxidasa – Tinción de Gram. Se puede observar el profuso infiltrado bacteriano Gram positivo (flechas) en la dentina de la lesión cariosa. Nótese la inmunorreacción positiva en la zona infectada de la dentina cariada (DC), la dentina sana (DS) y el ligamento periodontal (LP).

4b Especimen experimental. Control negativo. Corte desmineralizado. Inmunoperoxidasa – Tinción de Gram. Nótese la ausencia de inmunorreacción tanto en la dentina cariada (DC) como en la dentina sana (DS) y el ligamento periodontal (LP).

Figura 5. Inmunocaracterización del colágeno tipo I de la dentina cariada contrastada con Gram en cortes desmineralizados.



Leyenda figura 5

5a Especimen experimental. Corte desmineralizado. Inmunoperoxidasa para anticuerpo monoclonal. Tinción Gram. Se visualiza inmunotinción positiva en la dentina intertubular (DI) de la dentina infectada por bacterias Gram positivas (*).

5b Especimen experimental. Corte desmineralizado. Control negativo para la reacción de inmunoperoxidasa. Tinción de Gram. Se visualiza dentina intertubular (DI) de la dentina cariada, con reacción de inmunoperoxidasa negativa.

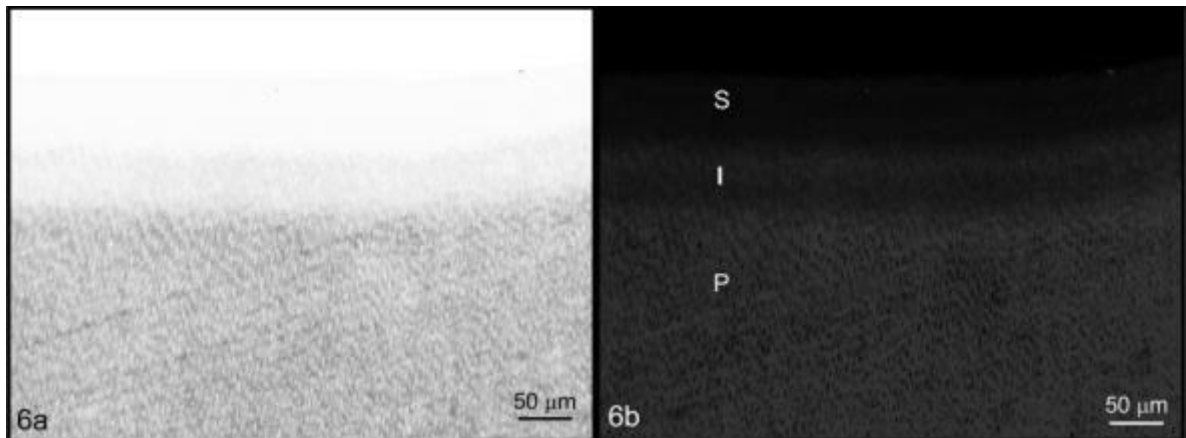
5c Especimen experimental. Inmunoperoxidasa para anticuerpo monoclonal. Tinción Gram. Nótese la inmunopositividad que muestra la dentina intertubular (DI), en la cual se puede observar la morfología tubular. Además, bacterias (*) infectan algunos túbulos distorsionando la morfología normal del tejido.

5d Especimen experimental. Control negativo para reacción de inmunoperoxidasa. Tinción de Gram. Se visualiza dentina intertubular (DI) de la dentina cariada con reacción de inmunoperoxidasa negativa y alta infiltración de bacterias Gram positivas (*).

5e Dentina sana radicular. Control positivo para reacción de inmunoperoxidasa del mismo espécimen de la imagen 5c. Se aprecia morfología normal de la dentina intertubular (DI) y túbulos dentinarios (TD) longitudinales. Completa ausencia bacteriana.

5f Dentina sana radicular. Control negativo para inmunoperoxidasa. Nótese la ausencia de tinción de peroxidasa en la dentina intertubular y de bacterias Gram positivas.

Figura 6. Evaluación de la denaturación del colágeno tipo I expuesto a NaClO en dentina sana.

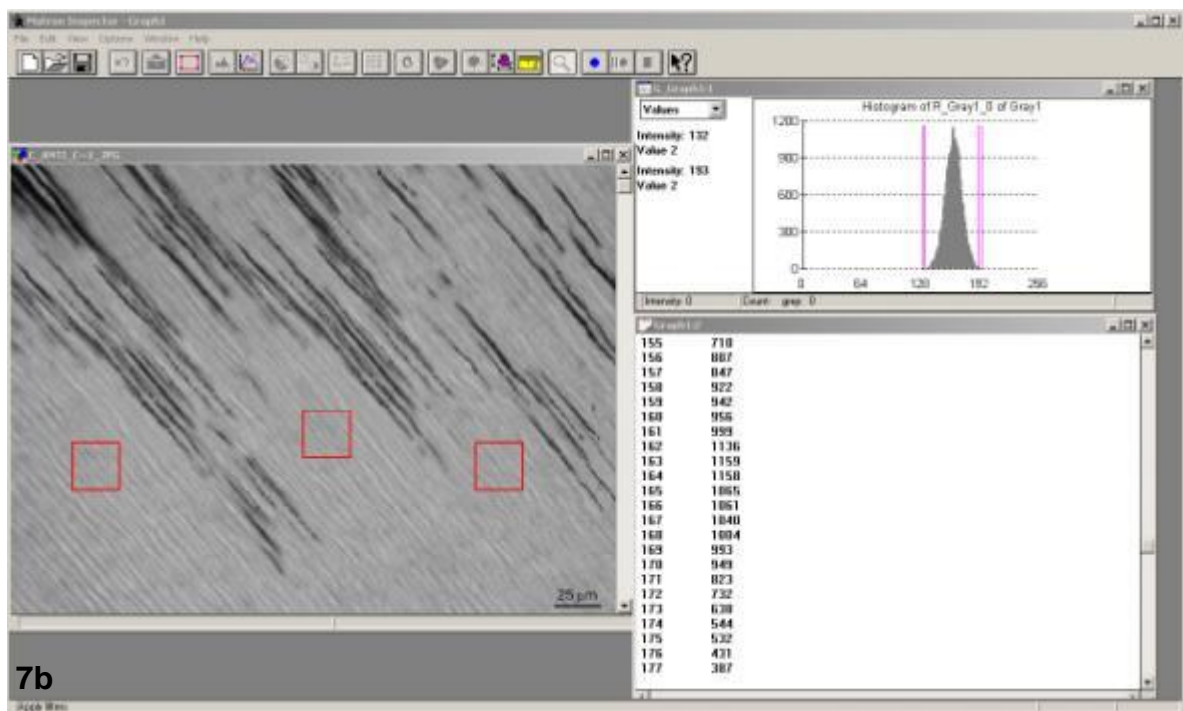
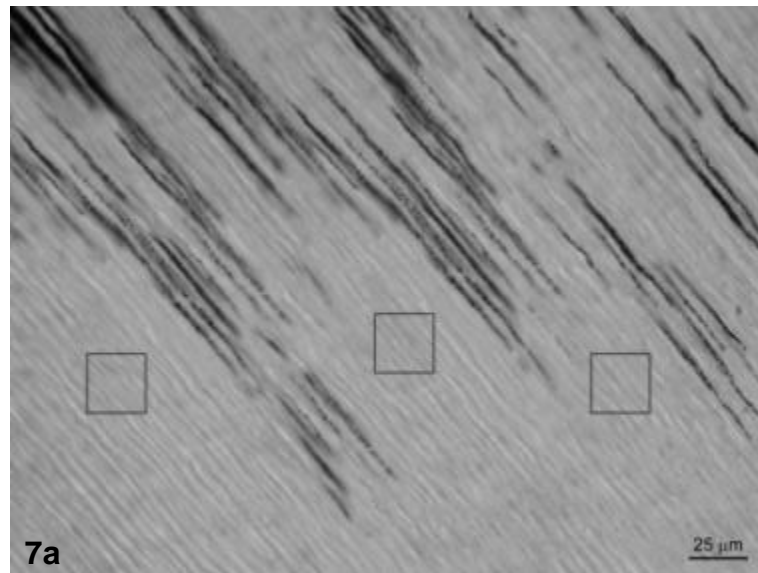


Leyenda figura 6

6a Corte desmineralizado de dentina sana, expuesto a NaClO 5% por 2 minutos. Reacción de inmunoperoxidasa para anticuerpo monoclonal anti-colágeno tipo I. Se aprecia la reacción positiva para el anticuerpo monoclonal en las zonas más profundas de la dentina, sin embargo en la porción superficial la inmunoreacción es negativa.

6b Misma imagen procesada digitalmente donde se aprecia una zona superficial (S), intermedia (I) y profunda (P). La zona S no presenta inmunorreacción, la zona I presenta una inmunorreacción atenuada respecto de P y la zona P una inmunorreacción completamente positiva para colágeno tipo I humano.

Figura 7. Procedimiento de selección de las áreas de interés, para el estudio densitométrico.

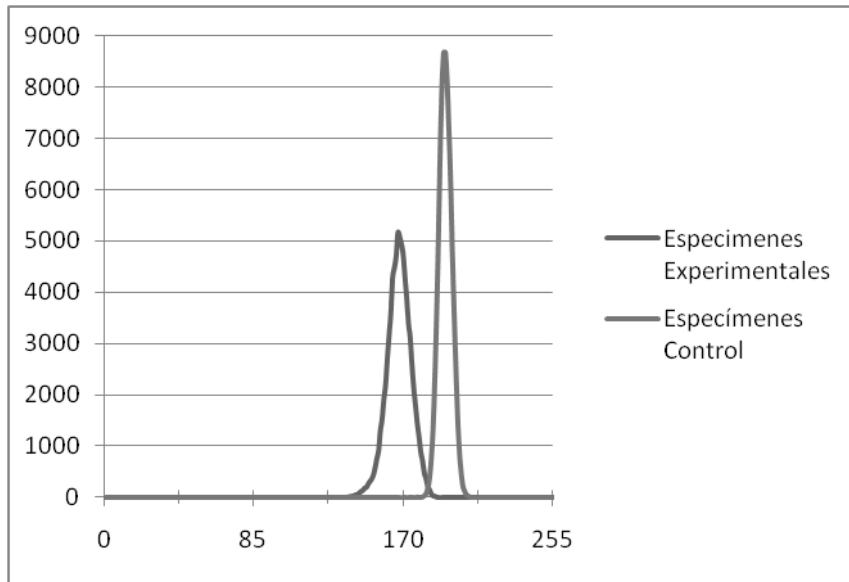


Leyenda figura 7

7a Imagen microscópica con un aumento de 40x de uno de los especímenes desmineralizados, dónde se visualiza inmunotinción positiva en la dentina intertubular de la dentina, infectada por bacterias Gram positivas. En esta imagen se delimitaron 3 áreas de interés (ROI) de $625 \mu\text{m}^2$ las que contenían 81.225 pixeles respectivamente. A estas áreas se les aplicó el análisis densitométrico con el Software Matrox Inspector 4.0.

7b Captura de imagen de la aplicación de análisis densitométrico sobre las áreas de interés (ROI). Se puede observar el listado de datos obtenidos en cada análisis, los cuales se procesaron y compararon estadísticamente mediante la prueba *t* de Student.

Gráfico 1. Gráfico de dispersión lineal de la distribución de los datos.



Leyenda Grafico 1

Se puede apreciar la distribución normal de los datos obtenidos, tanto de los especímenes normales como de los especímenes control. En la horizontal se aprecia la escala de valorización de densidad del color (0 a 255). En la vertical se cuenta la frecuencia de los pixeles para cada valor de densidad.

Tabla 1. Análisis estadístico de los datos obtenidos de los especímenes experimentales vs. especímenes control.

Prueba t de Student para muestras pareadas.

	<i>Especímenes control</i>	<i>Especímenes experimentales</i>
Media	186,9	174,03
Varianza	47,56956522	86,98467909
Número de Observaciones (n)	70	70

Coeficiente de correlación de Pearson	-0,096384171
Diferencia hipotética de las medias	0
Grados de libertad	69
Estadístico t	8,88351222
P(T<=t) una cola	0,00243E-11
Valor crítico de t (una cola)	1,667238549
P(T<=t) dos colas	0,0048625E-11
Valor crítico de t (dos colas)	1,99494539

Discusión

En el presente trabajo de investigación se realizó un análisis inmunomorfológico para estudiar la naturaleza del colágeno tipo I en dientes permanentes humanos, con el objeto de probar la hipótesis que esta macromolécula extracelular presente en la dentina intertubular infectada en caries dentinarias rápidamente progresivas, preserva sus características antigénicas.

Conocer la naturaleza morfológica y bioquímica del colágeno dentinario en estas lesiones, es esencial para el entendimiento de la biopatología de la caries, de las maniobras terapéuticas destinadas al control de la progresión de la lesión y de la restauración de las piezas dentarias afectadas.

En el año 1962 Miller y Massler definieron las caries activas, actualmente lesiones rápidamente progresivas, como entidades de color café pálido, aspecto friable y de consistencia blanda (18). Considerando lo anterior, todos los especímenes de la muestra utilizada en este estudio cumplieron con estas características semiológicas detectadas con observación bajo microscopia estereoscópica.

Es importante mencionar que la evaluación de la dureza, utilizando una sonda de caries, no fue considerada para evitar la pérdida de la integridad morfológica de los especímenes. La exclusión de las pruebas de dureza superficial para el diagnóstico de las lesiones fue compensada con el análisis histopatológico. El grado de infección y de alteración de la morfología microscópica de los cortes analizados, en todos los especímenes, concuerda con la descripción de una caries aguda, activa o rápidamente progresiva descrita por McKay en el año 1976 (19).

El ensayo inmunohistoquímico de este estudio, se realizó bajo dos condiciones diferentes: en cortes mineralizados de 500 μm de espesor y en cortes desmineralizados de 5 μm de espesor, ambos de un mismo espécimen.

En los cortes mineralizados se pudo observar que la reacción inmune se manifestó, como una coloración café en todo el cuerpo de la lesión cariosa, en la

pulpa – predentina y el ligamento periodontal, de un mismo corte. No se observó inmunorreacción en la dentina sana de los especímenes mineralizados, ya que el colágeno que la compone se encuentra asociado a las proteínas que conforman la matriz y está mineralizado, por tanto los epitopos se encuentran enmascarados (55).

La presencia de dentina transparente o terciaria en las zonas más profundas, nos permitió determinar con exactitud los límites periféricos de la lesión cariosa en la interfase dentina sana – dentina afectada por la enfermedad.

El contraste de los cortes mineralizados con la técnica de Gram permitió demostrar, en forma inequívoca, que el colágeno de la dentina intertubular en zonas profusamente infectadas, presenta una coloración positiva a la reacción de la peroxidasa. Estos hallazgos fueron comparables a los encontrados, a la inspección visual, en las zonas no infectadas de la lesión y en los tejidos que actuaron como controles positivos.

Una observación destacable fue que en todos los especímenes, las zonas de dentina transparente presentaron una afinidad tintorial por el cristal violeta o metil violeta 10B, de la tinción de Gram. Este hecho no documentado previamente en la literatura, no puede ser explicado a través de la metodología utilizada en este estudio. Esta coloración de la dentina transparente no es un artefacto de técnica dado que los especímenes, luego de teñidos por la técnica de Gram, fueron cuidadosamente diferenciados en acetona químicamente pura durante tiempos prolongados.

En los cortes desmineralizados la reacción inmunohistoquímica también se manifestó como una coloración café que tiñó tanto el colágeno de la dentina cariada como el de la dentina coronaria y radicular sanas, de un mismo corte.

La técnica de Gram, de igual manera, permitió localizar la zona infectada de la lesión. El colágeno de la dentina intertubular de esta zona presentó una inmunorreacción positiva comparable, a la inspección visual, con zonas no infectadas de la lesión y con dentina sana tanto coronaria como radicular. En los

controles negativos no se detectó inmunoreacción en el colágeno en ninguno de los cortes estudiados.

Se pudo apreciar, a la inspección visual de los cortes microscópicos, que la intensidad de la inmunoreacción en la dentina cariada infectada en los cortes inmunomarcados, fue considerable; mientras que en los controles negativos no se apreció inmunotinción. Con el fin de objetivar esta apreciación, se realizó un estudio densitométrico digital para cuantificar estas diferencias. Este tipo de estudio consiste en la distribución de los pixeles que conforma el área de interés (ROI) en una escala de grises (Value), permitiendo categorizar las imágenes según el valor de gris predominante o densidad de color (figura 7).

El procesamiento estadístico de los datos obtenidos mediante la prueba *t* de Student para muestras pareadas de distribución normal, determinó que existen diferencias estadísticamente significativas de la densidad de color, entre los grupos de especímenes estudiados ($p = 0,00243E^{-11}$) (ver tabla 1). Este valor tan pequeño de *p*, nos dice que la diferencia entre los dos grupos es evidente, lo que se puede corroborar visualmente en la figura 4.

Estos resultados evidentemente no concuerdan con lo reportado históricamente por la literatura odontológica, dónde se asume que el colágeno de la dentina de las zonas infectadas está irreversiblemente denaturado y que debe removerse mecánicamente mediante procedimientos operatorios odontológicos, dado que la remineralización no ocurre sobre un sustrato colágeno con tales niveles de desorganización (20, 21, 22, 23, 24, 25).

Este concepto fue primeramente introducido en los años '70 por Takao Fusayama y col. el cual, a través de observaciones con microscopía electrónica de transmisión, observó que el colágeno de la dentina infectada pierde parcialmente el patrón de bandeo característico y con técnicas bioquímicas determinó la pérdida de enlaces intermoleculares de las fibrillas colágenas (29, 30).

Es importante mencionar que en los estudios de Fusayama, los criterios de inclusión de los especímenes en sus protocolos experimentales, no están claramente establecidos, no existiendo referencias concretas del grado de

actividad y semiología macroscópica de las lesiones. Un punto controversial respecto de las observaciones estructurales de Fusayama, fue que la visualización de ésta aparente pérdida de bandeado de las fibrillas, se realizó en microfotografías electrónicas de elevado aumento, tomadas en zonas muy restringidas de la lesión cariosa y con una técnica de microscopía electrónica convencional poco sensible y específica para la determinación de moléculas de colágeno triplehelicoidal denaturada.

En el presente estudio, los criterios de inclusión respecto de la actividad de las lesiones fueron rigurosamente establecidos, mediante inspección visual y análisis histopatológico. La naturaleza íntima del colágeno intertubular, fue analizada mediante el uso de un anticuerpo monoclonal de ratón anti colágeno tipo I humano.

Si bien el colágeno puede ser estudiado por el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno tipo I humano, reconoce específicamente la molécula en su estructura cuaternaria triple helicoidal (determinante antigénico helicoidal); por lo tanto una reacción antígeno-anticuerpo identificable involucra la presencia de la molécula funcional en su estado nativo y no denaturado (55).

En la naturaleza, cualquier molécula antigénica, en éste caso el colágeno tipo I, interactúa con un anticuerpo específico según sus determinantes antigénicos, los que pueden determinar interacciones fuertes, débiles o ninguna interacción (48).

Los determinantes antigénicos del colágeno pueden ser clasificados en tres categorías (ver figura 8):

Determinante helicoidal: el reconocimiento por el anticuerpo depende de la conformación tridimensional de la molécula de colágeno, es decir, la presencia de una triple hélice intacta (48).

Determinante central: localizado en una porción helicoidal del colágeno nativo. En este caso, el reconocimiento se basa únicamente en la secuencia

aminoacídica y no en la conformación tridimensional. Este determinante es expuesto cuando la molécula de colágeno está denaturada (49).

Determinante terminal: localizado en las regiones terminales no helicoidales (telopéptidos) de la molécula. Su reconocimiento no asegura la presencia exclusiva de moléculas de colágeno intactas, pues también puede ser reconocido en moléculas de colágeno denaturado (48).

Figura 8

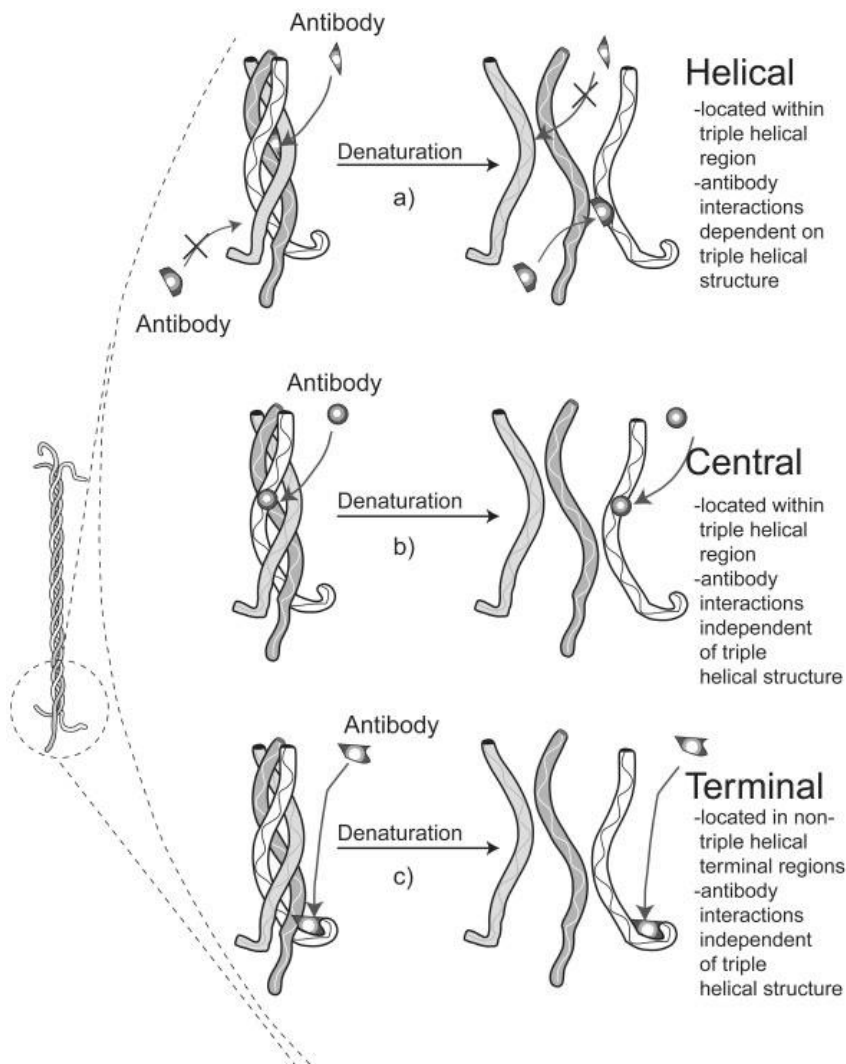


Imagen que representa los determinantes antigénicos del colágeno tipo I (48)

Tanto el determinante central como el terminal, pueden ser reconocidos por el anticuerpo policlonal, por lo cual este tipo de anticuerpo no es el más adecuado para la evaluación de la no denaturación del colágeno.

En tanto, el anticuerpo usado en este estudio, que además es utilizado en los test de ELISA y Western Blot, no reconoce en el tejido fibrillas que contengan moléculas de colágeno denaturadas y tampoco presenta reactividad cruzada con los otros tipos de colágeno (49).

El epitopo reconocido por este anticuerpo monoclonal, es sensible a la fijación de rutina con formalina y presenta un mejor inmunoreconocimiento sobre tejidos fijados en alcoholes (49). Considerando lo anterior, en este estudio, los especímenes fueron fijados en etanol al 96% durante siete días.

El uso de anticuerpos monoclonales para la determinación de los estados nativos o denaturados de macromoléculas, se ha transformado en una herramienta útil e irremplazable para el estudio de la dinámica molecular en los tejidos conectivos normales y patológicos (50, 51, 55).

De esta perspectiva, en el presente trabajo de investigación, la presencia de inmunorreactividad positiva en la zona de dentina infectada de todos los especímenes, nos demuestra que la proteína no se encuentra denaturada. Esta aseveración se sustenta, además, con la inclusión de especímenes cuyo colágeno dentinario fue modificado por efecto del tratamiento con hipoclorito de sodio; agente oxidante cuya capacidad para denaturar macromoléculas extracelulares ha sido ampliamente documentada (47). El colágeno de la dentina afectada por el hipoclorito de sodio (NaClO 5%) no presentó inmunorreactividad positiva a la reacción de la peroxidasa, comparable con lo encontrado en los controles negativos.

Si el colágeno presente en las zonas más infectadas de la dentina cariada de los especímenes experimentales estuviera denaturado, como indica la literatura preexistente, se debió haber obtenido imágenes similares a las obtenidas en los controles negativos o de los tejidos tratados con hipoclorito de sodio, situación que

no se detectó y que se corroboró a través del análisis estadístico de los datos obtenidos mediante densitometría digital.

La ausencia de bandeo en las fibrillas de colágeno de la dentina cariada observada por Fusayama y col. podría interpretarse, de acuerdo con estos resultados, como una alteración de la organización supramolecular del colágeno y no a una pérdida de la estructura cuaternaria de la proteína. Esto ya fue propuesto inicialmente por Oyarzún y Cartagena (36) en un estudio en el cual, utilizando anticuerpos policlonales anti-colágeno tipo I y microscopía electrónica de transmisión, observaron que el anticuerpo utilizado marcaba fuertemente fibrillas de colágeno intactas y fibrillas de colágeno parcialmente desorganizadas. Estas últimas permitían la visualización del patrón microfibrilar en el seno de la dentina infectada. Estas microfibrillas, carentes de bandeo, presentaron una marcada inmunoreacción.

Considerando lo anterior resulta imprescindible realizar un estudio con microscopía inmunoelectrónica con el anticuerpo monoclonal propuesto, para confirmar o refutar la proposición de que se mantiene la inmunorreactividad de las fibrillas de colágeno parcialmente modificadas por el avance y progresión de la lesión.

La evidencia clínica respecto de la detención de las lesiones cariosas utilizando criterios de odontología mínimamente invasiva, soporta nuestros hallazgos (42, 43, 52, 53). Actualmente está ampliamente documentado el hecho de que la mantención de la dentina infectada y la colocación de restauraciones cuyo borde cavo superficial presenten un sellado perfecto, invariablemente implica la detención del proceso cariogénico y la remineralización total del tejido reblandecido e infectado (54). Esta nueva filosofía, para el tratamiento de la caries dentinaria, está claramente en contraposición con lo propuesto por Fusayama en la década de los '70, quién recomendó la remoción total de la dentina infectada partiendo del supuesto de la imposibilidad de obtener remineralización de los tejidos y cuya justificación fue la denaturación total e irreversible de las fibrillas de colágeno.

La metodología utilizada en el presente trabajo de investigación permitió comprobar la hipótesis propuesta. Este hecho involucra reexaminar los criterios de remoción de tejido dentinario afectado por la patología, considerando la dinámica molecular de las proteínas extracelulares de la matriz dentinaria. Es necesario el desarrollo de estudios relacionados con los mecanismos celulares y moleculares encargados del inicio y progresión de la caries dental, con el objeto de aportar conocimientos básicos que permitan en el futuro diseñar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad infecciosa.

Conclusiones

- ❖ El colágeno tipo I presente en la dentina intertubular infectada en caries dentinarias rápidamente progresivas preserva sus características antigénicas, no encontrándose denaturado.

Referencias Bibliográficas

1. Linde A., Goldberg M. (1993) Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(5): 679-728.
2. Goldberg M, Septier D, Lecolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, Gafni G, Dillouya D, Vermelin L, Thoneman B, Schmalz G, Bissila-Mapahou P, Carreau (1995) Dental Mineralization. *Int J Dev Biol JP* 39:93-110.
3. Butler, WT. (1998) Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci.* 106 (1) 204-210
4. Qin C, Baba O, Butler WT. (2004) Post-translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15: 126-136.
5. Goldberg M, Smith AJ. (2004) Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 15: 13-27.
6. Goldberg M, Takagi M. (1993) Dentine proteoglycans: composition, ultrastructure and functions. *Histochem J* 25: 781-806.
7. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. (2001) Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12:331-349.
8. Miller EJ (1984) Chemistry of the collagens and their distribution in extracellular matrix biochemistry. Karl A. Piez and A. H. Reddi (eds), pp 41-81
9. Piez KA. (1984) Molecular and aggregate structures of the collagens in extracellular matrix biochemistry. Karl A. Piez and A. H. Reddi (eds), pp 1-39.
10. Thylstrup A, Bruun C, Holmen L. (1994) In vivo caries models –Mechanisms for caries initiation and arrestment. *Adv Dent Res* 8: 144-157.
11. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Straford S, Wood SR, Kirkham J. (2000) The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 11(4): 481-495.

12. Wöltgens JHM, Ety EJ, Geraets WGM. (1990) Post-eruptive age dependency of cariogenic changes in enamel of permanent teeth of children. *J Biol Buccale* 18: 49-53.
13. Shellis RP, Hallsworth AS, Kirkham J, Robinson C. (2002) Organic material and the optical properties of the dark zone in caries lesions of enamel. *Eur J Oral Sci* 110: 392-395.
14. Kney JH, Balooch M, Haupt DL, Marshall SJ, Marshall GW. (1995) Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res* 74(5): 1179-1184.
15. Banerjee A, Boyde A. (1998) Autofluorescence and mineral content of carious dentine: scanning optical and backscattered electron microscopic studies. *Caries Res* 32: 217-226.
16. Kleter G. (1998) Discolorations of dental carious lesions (a review). *Arch Oral Biol* 43: 629-632,
17. Kleter G, Damen J, Buijs M, Ten Cate JM. (1997) The Maillard reaction in demineralized dentin in vitro. *Eur J Oral Sci* 105: 278-284
18. Miller WA, Massler M. (1962) Permeability and staining of active and arrested lesions in dentin. *Br Dent J* 112: 187-197.
19. McKay GS. (1976) The histology and microbiology of acute occlusal dentine lesions in human permanent molar teeth. *Archs Oral Biol* 21: 51-58.
20. Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. (1966) Relationship between hardness, discoloration and microbial invasion in carious dentin. *J Dent Res* 45:1033-1046.
21. Ohgushi K, Fusayama T. (1975) Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res* 54, 1019-1026
22. Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. (1977) Collagen biochemistry of the two layers in carious dentin. *J Dent Res* 56 (10): 1233-1237

23. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. (1983) The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentine. *J Dent Res* 62(1): 7-10.
24. Nakornchai S, Atsawasuan P, Kitamura E, Surarita R, Yamauchi M. (2004) Partial biochemical characterization in carious dentin of human primary teeth. *Archs Oral Biol* 49: 267-273.
25. Sato Y, Fusayama T. (1976) Removal of dentin by Fuchsin staining. *J Dent Res* 55 (4): 678-683
26. List G, Lommel T, Tilk MA, Murdoch H. (1987) Use of a dye in caries identification. *Quintessence Int*;18 (5): 343-345
27. Van de Rijke JW. (1991) Use of dyes in cariology. *Int Dent J*; 41 (2): 111-116
28. Maupomé G, Hernández JC, García M, Trejo A, Hernández M, Diez de Bonilla J. (1995) In vivo diagnostic assesment of dentinal caries utilizing acid red and povidone-iodine dyes. *Op Dent*; 20: 119-122.
29. Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. (1997) Collagen biochemistry of the two layers in carious dentin. *J Dent Res* 56 (10): 1233-1237.
30. Ohgushi K, Fusayama T. (1975) Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res* 54, 1019-1026.
31. Johanssen E, Parks H (1961). Electron-microscopic observations on soft carious human dentin. *J Dent Res* 40 (2): 235-248.
32. Frank RM, Steuer P, Hemmerle J. (1989) Ultrastructural study on human root caries. *Caries Res* 23: 209-217.
33. Shortle D. (1996) The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J* 10: 27-34.
34. Kleter G, Damen J, Buijs M, Ten Cate J. (1998) Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. *J Dent Res* 77(3):488-495.

35. Dodge G, Poole R. (1989) Immunohistochemical detection and immunoelectron analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin-1. *J Clin Invest* 83:646-661.
36. Oyarzún A, Cartagena A. (2003) Immunoelectron and confocal microscopic evaluation of collagen in carious dentin. *J Dent Res* 82(Spec Iss C), Divisional Abstract: Chilean Section.
37. Trelstad R, Hayashi K, Gross J. (1976) Collagen fibrillogenesis: Intermediate aggregates and suprafibrillar order. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(11):4027-4031.
38. Hulmes D, Jesior J, Miller A, Berthet C, Wolff Ch. (1981) Electron microscopy shows periodic structure in collagen fibril cross sections. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(6):3567-3571.
39. Christiansen D, Huang E, Silver F. (2000) Assembly of type I collagen: fusion of fibrils subunits and the influence of fibril diameters on mechanical properties. *Matrix Biology* 19:409-420.
40. Maltz M, de Oliveira E, Fontanella V, Bianchi R. (2002) A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int* 33:151-159.
41. Bjorndal L, Larsen T, Thylstrup A. (1997) A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res* 31:411-417.
42. Bjorndal L. (2002) Dentin caries: Progression and clinical management. *Oper Dent* 27:211-217.
43. Kidd E.A.M. (2004) How "clean" must a cavity be before restoration? *Caries Res* 38:305-313.
44. Laboux O, Dion N, Arana-Chavez V, Ste-Marie LG, Nanci A. (2004) Microwave irradiation of ethanol-fixed bone improves preservation, reduces processing

time, and allows both light and electron microscopy on the same sample. *J HistochemCytochem.* 52(10):1267-75.

45. Otali D, Stockard CR, Oelschlager DK, Wan W, Manne U, Watts SA, Grizzle WE. (2009) Combined effects of formalin fixation and tissue processing on immunorecognition. *Biotech Histochem.* 84(5):223-47.
46. Oyarzún A, Rathkamp H, Dreyer E. (2000) Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of the effects of phosphoric acid etching on dentin proteoglycans. *Eur J Oral Sci.* 108(6):546-54.
47. Oyarzún A, Cordero AM, Whittle M. (2002) Immunohistochemical evaluation of the effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans. *J Endod.* 28(3):152-6.
48. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. (2004) Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Nov 15;71(2):343-54.
49. Sigma Aldrich Inc. (2002) Información del producto: anticuerpo monoclonal de ratón anti – colágeno tipo I CLONE COL-1 C 2456. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/c2456dat.Par.0001.File.tmp/c2456dat.pdf> (Junio 2011)
50. Hollander AP, Heathfield TF, Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C, Poole AR. (1994) Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest.* 93(4):1722–1732
51. Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. (1995) Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest.* 96(6):2859–2869.
52. Maltz M, Oliveira EF, Fontanella V, Carminatti G. (2007) Deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: 40-month follow-up study. *Caries Res.* 41(6):493–496.

53. Alves LS, Fontanella V, Damo AC, Ferreira de Oliveira E, Maltz M. (2010) Qualitative and quantitative radiographic assessment of sealed carious dentin: a 10-year prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 109(1):135-41.
54. Mertz-Fairhurst EJ, Curtis JW Jr, Ergle JW, Rueggeberg FA, Adair SM. (1998) Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc.* 129 (1):55-66.
55. Suppa P, Ruggeri A Jr, Tay FR, Prati C, Biasotto M, Falconi M, Pashley DH, Breschi L. (2006) Reduced antigenicity of type I collagen and proteoglycans in sclerotic dentin. *J Dent Res.* 85(2):133-7. Erratum in: *J Dent Res.* 2006 Apr;85(4):384.
56. DAKO (2007) Información del producto: Universal Dako LSAB® + System-HRP. <http://www.dako.com/download.pdf?objectid=105408002> (Agosto 2011)

Anexo 1

Servicio de Salud Metropolitano Sur
Complejo Asistencial Barros Luco
Unidad de Emergencia
Servicio de Urgencia Dental

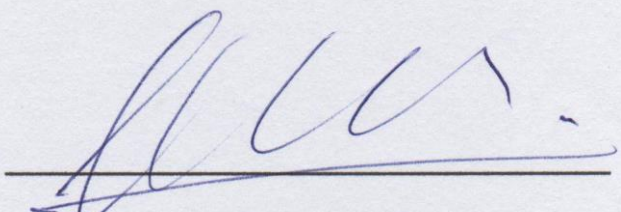
Santiago 25 de marzo de 2011

Sres. Comisión Revisora de Trabajos de Investigación
Facultad de Odontología
Universidad de Chile
Presente

De mi consideración:

A través de esta carta certifico ante ustedes que los pacientes que acuden al Servicio de Urgencia Dental de la Unidad de Emergencia del Complejo Asistencial Barros Luco del Servicio de Salud Metropolitano Sur, han sido informados que las piezas dentales extraídas podrían ser utilizadas para fines de investigación y docencia universitaria, dejan en claro que en ningún caso serán utilizadas para identificación y análisis genético o algún otro uso diferente a los antes descritos. Solo las muestras de los pacientes que lo permiten son conservadas para su posterior manipulación, el resto son desechadas como residuo biológico.

Atentamente,



Prof. Dr. Raúl Sáez Salgado

Jefe de Turno Box Dental Unidad de Emergencia