

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE ODONTOLOGIA
VALPARAISO

53000
45000
155000

COMPONENTES NO COLAGENOS EN PREDENTINA DE INCISIVOS DE RATA

**SEMINARIO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO
DE CIRUJANO - DENTISTA**

PROFESOR GUIA: Dr. Eduardo Couve Montane
Profesor Adjunto Catedra de Biología
Departamento de Biología, Esc. de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de Valparaíso

PROFESOR INFORMANTE: Dr. Pedro Gorgollon Castro
Profesor Adjunto Catedra de Histología
Departamento de Anatomía, Esc. de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de Valparaíso



ALUMNOS: SANDRA CORTES VASQUEZ
MARINA GARBARINO GIORA

1991

" En la evolución del saber humano, la investigación biológica se constituye en la vía de acceso al conocimiento del propio hombre. Ella define el límite entre lo conocido y lo ignorado mediante procesos creativos cuyas aplicaciones se constituyen en beneficios para la salud de la humanidad ".

a nuestras FAMILIAS.

AGRADECIMIENTOS

Nuestra sincera gratitud al Dr. Eduardo Couve Montané por su valiosa calidad humana siempre dispuesto a orientarnos y aconsejarnos, pero muy especialmente por su capacidad formativa que nos permitió comprender la relevancia del conocimiento científico como parte de la formación integral de un profesional de la salud.

En forma particular queremos agradecer a la señorita Loreto Salazar por su amable, preocupada y desinteresada colaboración.

Al señor Fidel Vargas agradecemos su valiosa colaboración en el procesamiento del material fotográfico.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y METODOS	38
RESULTADOS	47
DISCUSION	63
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	75

RESUMEN

El presente seminario de tesis tuvo como objetivo principal analizar la dinámica de componentes no colágenos sulfatados durante distintas etapas de la dentinogénesis en incisivos de ratas, mediante técnicas de incorporación de $^{35}\text{-S04}$. Para ello, en una primera etapa, se realizó una revisión bibliográfica del tema, cuyo contenido se entrega como marco conceptual general. Luego se desarrolló una descripción y análisis del proceso de dentinogénesis.

Durante la dentinogénesis los odontoblastos secretan una matriz orgánica, la preentina, la cual después de cierto tiempo se mineraliza para formar la dentina. La matriz preentinaria consiste principalmente en colágeno tipo I y proteoglicanos (PGs), el primero de estos componentes cumple un rol estructural, mientras que los proteoglicanos parecen desempeñar diversas funciones dentro de la matriz. Estos están constituidos por una proteína central a la cual se unen covalentemente cadenas laterales de GAGs sulfatados.

La segunda etapa de este seminario correspondió a su ejecución experimental de acuerdo a los objetivos planteados y basado en una pauta de trabajo que se incluye en materiales y método. Para ello fueron inyectadas 9 ratas Sprague-Dawley de un peso promedio de 87,55 g vía yugular externa con $^{35}\text{-S04}$. Posteriormente a las 4 y 24 horas los animales fueron fijados mediante perfusión intracardíaca.

Las mandíbulas izquierdas se desmineralizaron y se seleccionaron 4 regiones del incisivo de rata (A, B, C y D), las que representan distintos estados de maduración del odontoblasto. Secciones de 1 um fueron procesadas para realizar técnicas citoquímicas y radioautográficas a microscopia óptica.

Finalmente, en una última etapa se presentaron los resultados y luego de su análisis, se realizó la discusión de los datos obtenidos. Para esto, se analizaron los espesores de preentina en las distintas regiones. Se contabilizaron granos radioautográficos utilizando una plantilla de 30 um de base x 40 um de alto, que incluía dentina, preentina y odontoblastos. Se observó que el espesor preentinario, así como la incorporación de ^{35}S disminuyen desde la región apical (A) hacia la región incisal (D), donde se ha concretado la dentinogénesis primaria.

Podemos concluir que la incorporación del radioisótopo a compuestos sulfatados en preentina de incisivos de rata decrece hacia la región incisal y esto podría relacionarse con una conversión más rápida de la preentina a dentina en esta región, con una variación del contenido de los proteoglicanos lo que permitiría la existencia de un sustrato más rápidamente mineralizable.

INTRODUCCION

En esta introducción se analizará en primer lugar el marco conceptual general sobre el cual se desarrolló el presente seminario de tesis y para lo cual se ha contemplado una revisión general de los conceptos básicos sobre matriz extracelular, sus componentes y sus funciones. Luego se tratará de la misma forma, la matriz extracelular de los tejidos mineralizados, sus características y los componentes que serán promotores o reguladores del proceso que se producirá para dar formación a tejidos como la dentina.

MATRIZ EXTRACELULAR

I. Generalidades.

La matriz extracelular consiste en elementos fibrosos embebidos en una sustancia amorfa producidos principalmente por células mesenquimáticas y también por células epiteliales. Su constitución se caracteriza por una compleja trama de macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos que se ensamblan formando una red organizada en el espacio extracelular de la mayoría de los tejidos. Además de actuar como cemento biológico universal, forma estructuras altamente especializadas del tejido conjuntivo como el cartílago y los tendones, también estructura las láminas basales. A través de la mineralización mediada por el depósito secundario de

cristales de fosfato cálcico, la matriz extracelular puede calcificarse formando estructuras duras como los huesos y los dientes (Fig.1). También puede adoptar un orden casi cristalino formando la matriz transparente de la córnea o adquirir la organización entrelazada de las fibras de colágeno de los tendones, que les confiere una enorme resistencia a la tracción.

La matriz extracelular desempeña un papel mucho más activo y complejo que un simple armazón relativamente inerte que estabiliza la estructura física de los tejidos. Participa en la regulación del comportamiento de las células que se encuentran en contacto, influye sobre su desarrollo, migración, proliferación, forma y funciones metabólicas. Su composición molecular es tan compleja como las funciones que desempeña (Alberts, 1984). Los componentes extracelulares de tejidos conectivos son responsables de sus propiedades fisiológicas, por lo tanto, es necesario conocer las características estructurales de las matrices para comprender sus funciones (Linde, 1989).

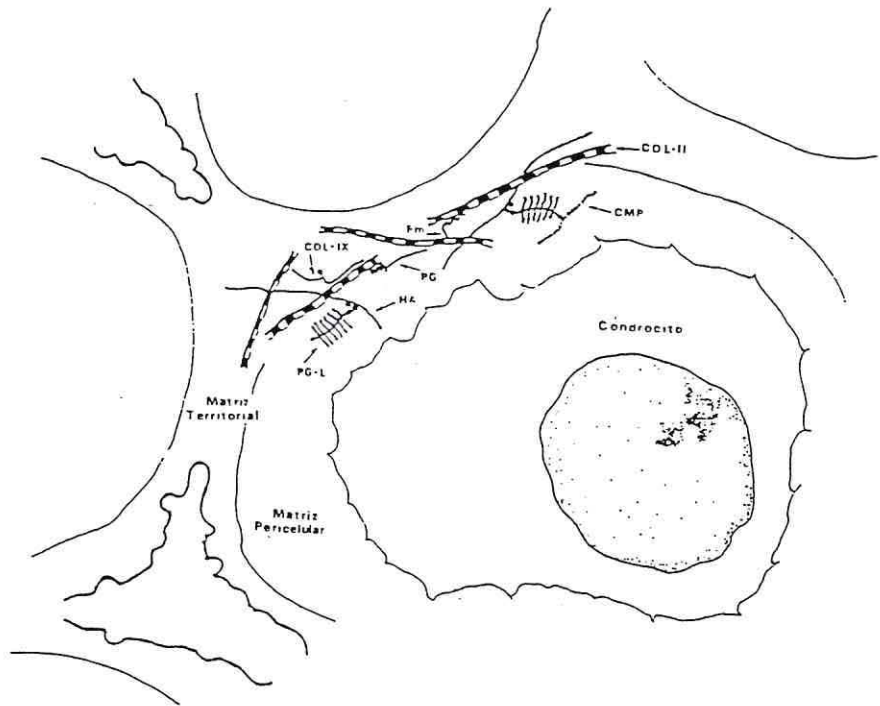
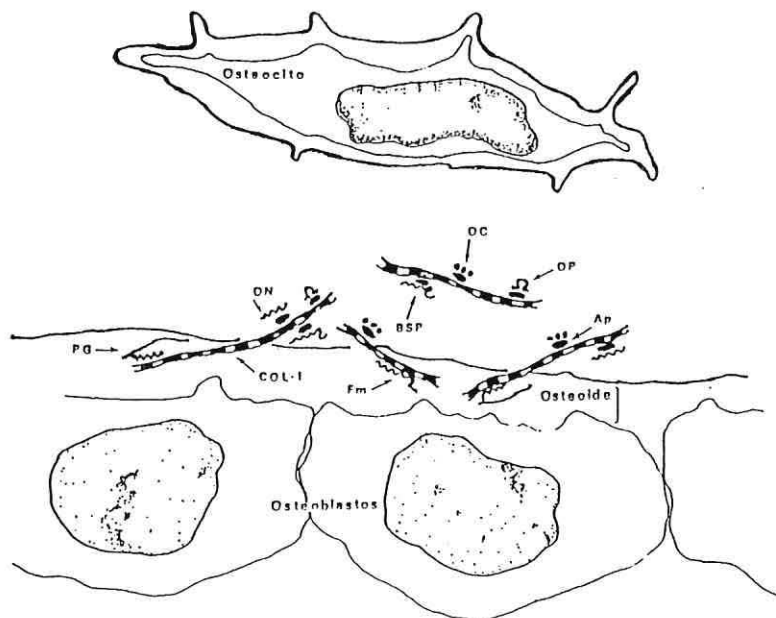


Fig.1

A. Esquema que muestra al condrocito y su matriz extracelular.



B. Esquema de la matriz mineralizada de hueso.

- | | |
|--|-------------------|
| HA: ácido hialurónico | OC: osteocalcina |
| BSP: sialoproteína de hueso | ON: osteonectina |
| CMP: proteína matriciales de cartilago | OP: osteopontina |
| COL (I, II, IX): colágeno | PG: proteoglicano |
| Fm: fibromodulina | Ap: apatita |

II . Componentes

La matriz extracelular está compuesta principalmente por proteínas fibrosas incluidas en un gel de polisacárido hidratado. Los componentes orgánicos de la matriz extracelular se pueden dividir en dos grupos :

1. Componente colágeno.
2. Componentes no colágenos.

1. Componente colágeno

El colágeno constituye el 25% de la proteína total en los mamíferos. El rasgo principal de las moléculas de colágeno es su estructura rígida. Se trata de tres cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas alfa que están enrolladas entre sí formando una hélice regular, la cual constituye una molécula de colágeno, de aproximadamente 300 nm de largo y 1,5 nm de diámetro.

Hasta el momento se han caracterizado trece cadenas alfa de colágeno (Ramirez y Di Liberto, 1990), genéticamente distintas y de unos mil residuos de aminoácidos cada una de ellas. Aunque en principio, a partir de las diferentes combinaciones de las cadenas alfa se podrían formar más de 100 tipos distintos de moléculas de colágeno de triple hebra, se han descrito sólo una docena de ellas dentro de la gran familia génica del colágeno. Entre los tipos principales de colágeno podemos nombrar los tipo I, II, III, IV y V. Los tipos I, II y III se encuentran en tejido conjuntivo, y de ellos, el tipo I

es el más frecuente constituyendo el 90% del colágeno del cuerpo. Los genes que codifican para estas cadenas han sido localizados en los Cromosomas 17 para (α 1(I)), 7 para (α 2(I)), 12 para (α 1(II)), 2 para (α 1(III)) y 13 para ambas cadenas del colágeno tipo IV.

TABLA I Tipos de colágeno y sus propiedades

(Alberts, 1984)

Tipo	Fórmula molecular	Forma polimerizada	Rasgos característicos	Distribución en los tejidos
I	$[\alpha$ 1(I)] ₂ α 2(I)	fibrilla	poca hidroxilisina poco carbohidrato fibrillas anchas	piel, tendón hueso, córnea
II	$[\alpha$ 1(II)] ₃	fibrilla	mucha hidroxilisina mucho carbohidrato generalmente fibrillas más finas que el tipo I	cartilago disco intervertebral, notocorda cuerpo vitreo del ojo
III	$[\alpha$ 1(III)] ₃	fibrilla	mucha hidroxiprolina poca hidrolisina poco carbohidrato	piel, vasos sanguíneos, órganos internos
IV	$[\alpha$ 1(IV)] ₃	lámina basal	muchísima hidroxilisina, mucho carbohidrato	láminas basales
V	$[\alpha$ 1(V)] ₂ 2(V)	desconocida	mucha hidroxilisina mucho carbohidrato	difundido

Las cadenas alfa son sintetizadas en los ribosomas como cadenas de procolágeno teniendo péptidos de extensión de tamaño considerable en los terminales amino y carboxilo. Estas extensiones son necesarias para el ensamblaje de tres procadenas de colágeno a una molécula de triple hélice que conforma el procolágeno. Las procadenas de colágeno, sin embargo, deben sufrir modificaciones post-transicionales de hidroxilación y glicosilación antes de la formación de la triple hélice. La prolina, y en menor grado, los residuos de lisina son hidroxilados. Las moléculas de procolágeno son transportadas a través del complejo de Golgi y exocitadas vía gránulos secretores. Las extensiones terminales de las moléculas de procolágeno son escindidas extracelularmente por la procolágeno peptidasa y las moléculas de colágeno formadas pueden ensamblarse espontáneamente en fibrillas. Las fibrillas se estabilizan por uniones intermoleculares covalentes que involucran los residuos de lisina e hidroxilisina (Weinstock y Leblond, 1974; Hay, 1981; Alberts, 1984; Linde, 1985; Leblond, 1989).

Las fibras de colágeno están estructuradas para resistir fuerzas tensionales y reforzar mecánicamente el gel de proteoglicanos. En los tejidos mineralizados, el colágeno constituye la red sobre la cual se depositan los cristales minerales (Heinegard y Oldberg, 1989; Linde, 1984).

2. Componentes no colágenos

- A. Glicoproteínas
 - Fibronectina
 - Laminina
- B. Fosfoproteínas
 - Osteonectina
 - Fosfoproteínas de alto grado de fosforilación (PP-H)
 - Fosfoproteínas de bajo grado de fosforilación (PP-L)
- C. Proteoglicanos (PGs)
- D. Otros componentes - Proteínas séricas, hormonas, factores de crecimiento, lípidos, iones y otros.

A. Glicoproteínas

Fibronectina

Es una glicoproteína extracelular encontrada en tejidos conectivos y varias membranas basales. Se ha sugerido como un mediador de la adhesión celular, fomentando así la adherencia de diversos tipos celulares a otras células, al colágeno y a otros sustratos (Alberts 1984). Además se encuentra en elevadas concentraciones en las regiones de migración celular durante el desarrollo, por lo que se cree que esta glicoproteína influye sobre la migración celular in vivo.

Laminina

Corresponde a uno de los componentes mayoritarios de las láminas basales. Es una glicoproteína flexible formada por tres brazos cortos (37nm) y uno largo (77nm). La conforman tres polipéptidos, los cuales han sido completamente secuenciados. Posee un 12-15% de carbohidratos, cuya función es aún desconocida. Los distintos dominios presentes en la estructura de laminina, permiten distintas interacciones arquitectónicas en la conformación de láminas basales (Campbell y Terranova, 1988; Yurchenco y Schittny, 1990).

B. Fosfoproteínas

Son de naturaleza altamente aniónica. Casi la mitad de su contenido de aminoácidos lo constituyen residuos de serina. Se han identificado fosfoproteínas de alto (PP-H), mediano (PP-M) y bajo grado de fosforilación (PP-L). Pueden asociarse con el colágeno y se postulan como promotoras de la mineralización.

C. Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PGs) consisten en una proteína central a la cual se unen covalentemente cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs, anteriormente conocidos como mucopolisacáridos, son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas, compuestas por unidades repetidas de disacáridos. Uno de los residuos de

azúcar del disacárido repetido, siempre es un aminoazúcar (N-acetilglucosamina ó N-acetilgalactosamina). Constituyen del 50 al 90% del peso molecular de los PGs y tienen una intensa carga negativa por la presencia de grupos sulfato, carboxilo o de ambos en muchos de los residuos de azúcar (Fig. 2) .

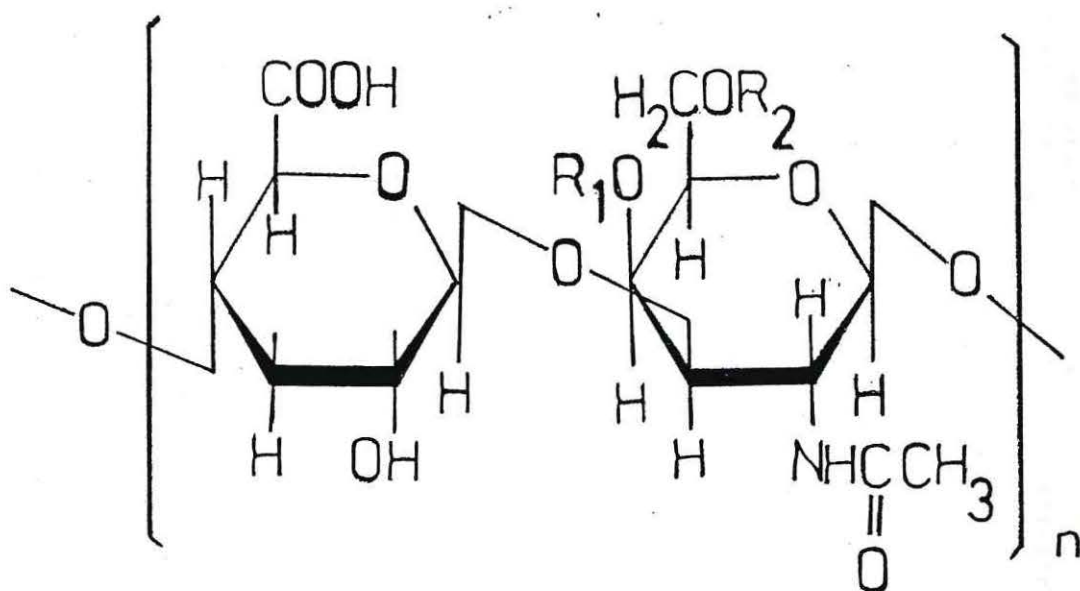


Figura 2 Secuencia de disacárido repetido. Para condroitin sulfato: ácido D-glucurónico y N-acetil-D-galactosamina.

Se han diferenciado siete grupos de GAGs, según su residuo de azúcar, el tipo de enlace entre los residuos y el número y localización de los grupos sulfato. Corresponden al ácido hialurónico (el único GAG en que ninguno de los azúcares está sulfatado), condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, dermatán sulfato, heparan sulfato, heparina y keratan sulfato (Tabla II).

TABLA II Glicosaminoglicanos
(Alberts, 1984)

GAG	Peso Molecular	Disacárido repetido (A-B)n Monosacárido A Monosacárido B	Sulfatos por unidad de disacárido	Unido a proteína	Otros azúcares componentes	Distribución en los tejidos
Acido hialurónico (HA)	4000 a 8 x 10 ⁶	Acido D-glu-curónico N-acetil-D-glucosamina	0	-	0	varios tejidos conjuntivos, piel, cuerpo vitreo, cartilago, liquido sinovial.
Condroitin-4-sulfato (C-4-S)	5000-50000	Acido D-glu-curónico N-acetil-D-galactosamina	0,2-1,0	+	D-galactosa D-xilosa	cartilago, córnea hueso, piel, arterias.
Condroitin-6-sulfato (C-6-S)	5000-50000	Acido D-glu-curónico N-acetil-D-galactosamina	0,2-2,3	+	D-galactosa D-xilosa	córnea, hueso, piel, arterias
Dermatan sulfato (DS)	15000-40000	Acido D-glu-curónico Acido L-idurónico	1,0-2,0	+	D-galactosa D-xilosa	piel, sangre, vasos, corazón válvulas cardiacas.
Heparan sulfato (HS)	5000-12000	Acido D-glu-curónico Acido L-idurónico	0,2-3,0	+	D-galactosa D-xilosa	pulmón, sangre, vasos, corazón, válvulas cardiacas.
Heparina	5000-25000	Acido D-glu-curónico Acido L-idurónico	2,0-3,0	+	D-galactosa D-xilosa	pulmón, hígado, piel, células cebadas.
Keratan sulfato (KS)	4000-19000	D-galactosa N-acetil-D-glucosamina	0,9-1,8	+	D-galactosamina D-manosa L-fucosa ácido siálico	cartilago, córnea, disco intervertebral

Estos GAGs, a excepción del ácido hialurónico, están unidos covalentemente a proteínas formando las moléculas de PG, que anteriormente eran llamadas mucoproteínas (Fig. 3A y 3B).

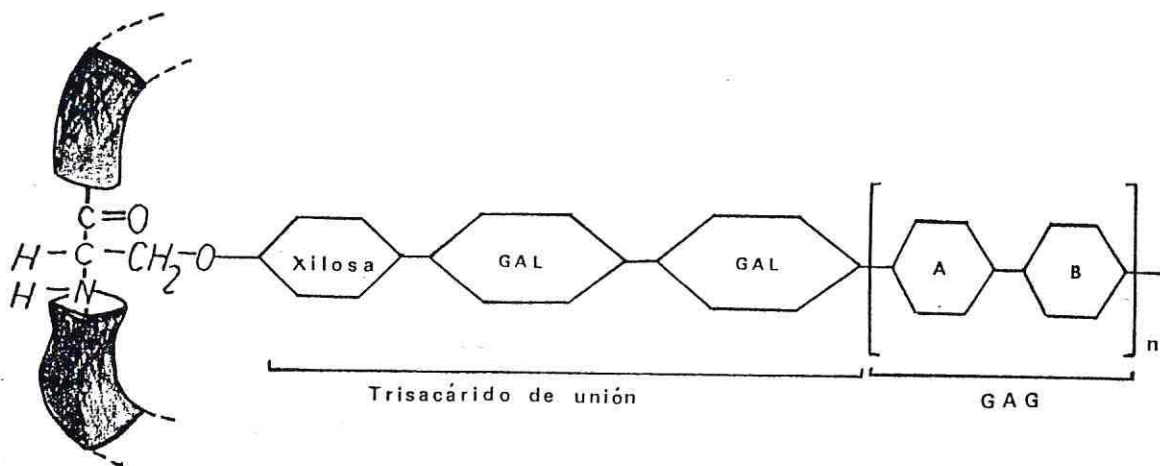


Figura 3A Esquema de la unión entre una cadena de GAGs y un residuo de serina de una proteína central en la molécula de PGs mediante un "trisacárido de unión" específico.

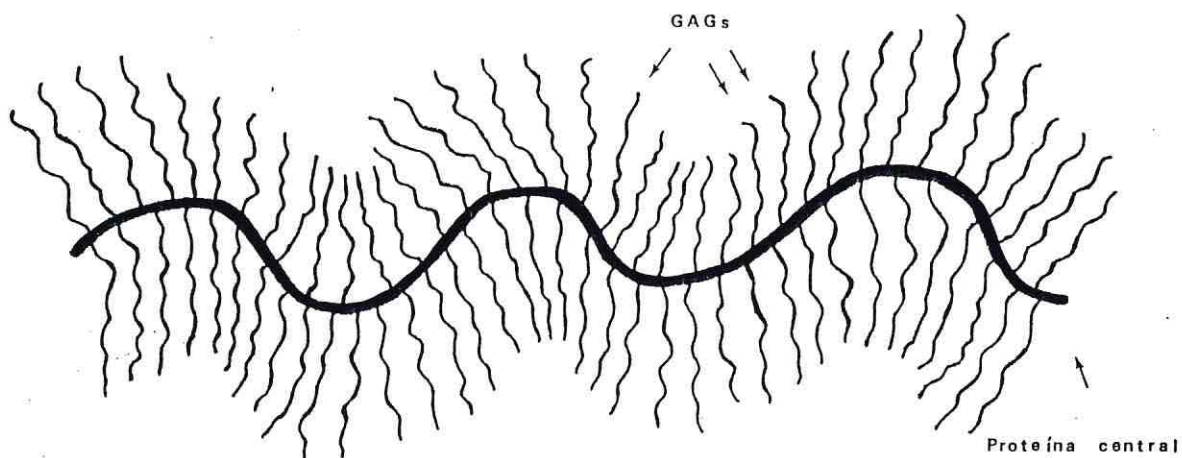


Figura 3B Esquema de una molécula típica de PG, formada por numerosas cadenas de GAGs unidas covalentemente a un núcleo proteico.

La síntesis de la proteína central ocurre en el retículo endoplásmico rugoso, donde comienza la adición de oligosacáridos por enlaces de O y N. Seis glucosiltransferasas diferentes y sulfotransferasas que pueden estar unidas a membrana, están involucradas en la síntesis de condroitin sulfato. El paso inicial es la transferencia de xilosa desde xilosa difosfato uridina al hidroxilo de la serina de la proteína central. Son adicionados dos residuos de galactosa, luego ácido glucurónico y N-acetilgalactosamina, todo esto involucrando diferentes transferasas. Unidades repetidas de ácido glucurónico y N-acetilgalactosamina son luego adicionadas por dos enzimas finales. La sulfatación retrasa la elongación de la cadena que ocurre en las cisternas trans y túbulos del aparato de Golgi (Velasco, 1988; Hay, 1981; Ito y col., 1987).

Las cadenas de condroitin sulfato se unen a los residuos de serina y las cadenas de keratan sulfato, probablemente, a los oligosacáridos cuando la proteína central se mueve en la región del aparato de Golgi. Experimentos in vitro indican que la incorporación de azufre al PG, del comienzo al final, es muy rápida (Hay 1981). Condroitin sulfato se une a una proteína central mediante uniones glucosídicas entre los residuos de xilosa del condroitin sulfato al grupo hidroxilo de los residuos de serina de la proteína central (Fig.3). Además el keratan sulfato y otros oligosacáridos se unen a los

grupos hidroxilo de la serina y treonina de la proteína central.

Los PGs pueden unirse específicamente entre sí y con otros componentes macromoleculares de la matriz como colágeno, elastina, fibronectina. Se ha visto que existen grandes agregados de PG unidos no covalentemente a una molécula de ácido hialurónico a través de sus proteínas centrales. En algunos casos, hasta 100 monómeros de PG unidos a una sola cadena de ácido hialurónico, forman un complejo de alto peso molecular y ocupan un volumen equivalente al de una bacteria (Hay, 1981; Alberts, 1984).

En cartílago los monómeros de PGs no parecen estar agregados en polímero cuando dejan la célula y el ensamblaje puede ocurrir a cierta distancia. El tamaño y longitud de los GAGs y de la proteína central pueden diferir dependiendo del tejido en el cual se encuentran. Estudios bioquímicos han demostrado que los PGs de dentina difieren en composición y tamaño de aquellos del cartílago (Linde, 1984; Heinegard y Oldberg, 1989). En este último, los PGs son de gran tamaño y forman agregados con el ácido hialurónico, sin embargo en hueso y dentina esto no sucede y los PGs son pequeños y contienen sólo una o dos cadenas de condroitin sulfato unidas a una proteína central (Ito y col., 1987; Boskey, 1989; Sauren y col., 1989; Linde, 1989).

Los PGs tienen la propiedad de ser hidrofílicos debido a su fuerte carga negativa por lo cual durante la rutina

de procesamiento es necesario agregar al fijador agentes como Cetylpyrimidinium Chloride, Alcian Blue, nitrato de bismuto, rojo de rutenio, ácido tánico, Safranin-O, acridine orange, Cuprolinic Blue; de lo contrario más del 50% de estos componentes se pierden de los tejidos. Cetylpyrimidinium Chloride precipita los GAGs sulfatados y hace posible la retención de estas moléculas (Chardin y col., 1990; Young y col., 1989; Sauren y col., 1989; Chan y Wong, 1989; Goldberg y col., 1978; Volker y col., 1989; Tawara y col., 1988; Lormee y col., 1989).

Los PGs tienen la capacidad de formar geles hidratados incluso a concentraciones muy bajas. Esta tendencia está notablemente incrementada por su elevada densidad de cargas negativas que atraen cationes osmóticamente activos. Esto genera turgencia en la matriz extracelular que resiste las fuerzas de compresión a diferencia de las fibrillas de colágeno que resisten las fuerzas traccionales (Linde, 1984). Debido a su organización hidratada las cadenas de GAGs permiten la rápida difusión de moléculas hidrosolubles, la migración celular, diferenciación y el desarrollo de procesos celulares (Lelongt y col., 1988; Kogaya y Furuhashi, 1988). Se ha descrito que los PGs de la membrana basal renal (heparan sulfato) juegan un rol importante en la filtración (Hay, 1981; Alberts, 1984).

En los procesos de mineralización de tejidos se les han atribuido diferentes y controvertidos roles. Se ha

sugerido que participarían en la fibrillogénesis del colágeno y posiblemente podrían inhibir la mineralización. (Linde, 1984; 1985 y 1989; Boskey, 1989; Heinegard y Oldberg, 1989).

D.Otros componentes

Circulando dentro de la matriz extracelular se pueden encontrar diversos componentes orgánicos tales como proteínas séricas, hormonas, factores de crecimiento y lípidos. Además existen componentes inorgánicos como iones. Todos ellos desempeñan roles interactuando con el medio extracelular, las células y con otros elementos allí presentes.

DENTINA

I. Formación y Organización General de la dentina

La dentina es elaborada por células altamente diferenciadas, los odontoblastos, que están localizados en la periferia de la pulpa, formando la capa odontoblástica, con cuerpos celulares más o menos columnares los que varían su morfología según su estado de maduración. De acuerdo a investigaciones realizadas en relación a la ultraestructura de odontoblastos en incisivos de rata, Takuma y Nagai (1971) han observado e identificado varios estados de desarrollo y maduración desde la zona germinal (apical) hasta incisal; en premolares humanos, Couve (1986) describió la morfología de odontoblastos relacionada con su ubicación dentro del diente, clasificando 4 estados: preodontoblasto, odontoblasto secretor, odontoblasto transicional y odontoblasto envejecido.

Durante la formación dentinaria los odontoblastos tienen características de síntesis y secreción, destacando en ellos un retículo endoplásmico rugoso desarrollado, muchas mitocondrias, un aparato de Golgi prominente y numerosas vesículas secretoras. El proceso odontoblástico que atraviesa la predentina presenta escasos organelos, pero contiene abundantes filamentos dispuestos en forma longitudinal y microtúbulos, presumiblemente, para facilitar el transporte intracelular.

Una vez que los odontoblastos alcanzan su maduración a partir de las células ectomesenquimáticas indiferenciadas de la papila, el próximo paso en la formación de dentina es la producción de su matriz orgánica, la preentina (Ten Cate, 1986). Durante la dentinogénesis, la primera matriz orgánica secretada corresponde a la preentina del manto, en la cual se han identificado colágeno tipo I y V, fibronectina, Gla-proteínas, pero no se han demostrado fosfoproteínas. Posteriormente se produce la cristalización mediada por vesículas matriciales que contienen fosfatasa alcalina, formándose la dentina del manto, que en un diente maduro presenta un espesor de 20 micrones. Es estructuralmente más irregular, menos mineralizada que el resto de la dentina primaria, llamada dentina circumpulpar, y constituye una pequeña porción del volumen dentinario total. También existen diferencias en el mecanismo de formación de ambas dentinas (Kogaya y Furuhashi, 1988; Linde, 1989).

La formación de la dentina circumpulpar ocurre en dos pasos subsecuentes y simultáneos, el primero corresponde a la formación de su matriz orgánica y el segundo, su posterior mineralización. El tiempo que media entre estos dos pasos, se representa morfológicamente como el espesor de preentina. En un estudio realizado en premolares humanos en desarrollo, se observó que el ancho preentinario disminuye en más de un 60% en la región

terminal de dentinogénesis primaria (coronal) respecto de la región más activa (apical) (Couve, 1987). En incisivos de rata se pudo corroborar la misma tendencia a la disminución de la predentina, encontrándose un mayor grosor en la región más apical que en incisal, donde la dentina primaria ya ha sido formada (Couve y col., 1987). Funcionalmente, la predentina podría representar la zona para la formación y maduración de la red colágena de la matriz dentinaria, lo cual es fundamental para su posterior mineralización.

La predentina contiene principalmente colágeno tipo I y PGs, además una pequeña cantidad de PP-L y Osteonectina/SPARC. Difiere de la matriz orgánica de la dentina circumpulpar, ya que componentes macromoleculares tales como Gla-proteínas, PP-H y algunos PGs son incorporados en el frente de mineralización. En dicho frente es posible identificar los calcoferitos, primeros núcleos de mineralización. Algunos constituyentes de la predentina son metabolizados posiblemente en el proceso odontoblástico.

Durante la formación de los tejidos mineralizados tales como hueso y dentina, los cristales minerales son depositados en una sustancia orgánica extracelular cuyos constituyentes son factores decisivos en la determinación de la tasa de formación mineral y de las características del mineral formado (Tabla III).

TABLA III Comparación de componentes extracelulares orgánicos de dentina, predentina, pulpa y hueso

	Dentina	Predentina	Pulpa	Hueso
Colágeno	Tipo I	Tipo I	Tipo I	Tipo I
	Tipo V	(trimero tipo I)	Tipo III	Tipo V
PGs	pequeño	pequeño inter-mediaro	grande (y pequeño?)	pequeño
Proteínas no colágenas	PP-H	PP-L	fibronectina,	PP-L
	PP-L	Osteonectina/	Osteonectina/	Gla-prot.
	Gla-proteínas, MGP,	SPARC	Osteonectina/	MGP
		MGP	SPARC	
	Osteonectina/			Osteonectina/
	SPARC			SPARC
	95K GP			Osteopontina
	60K GP,			(44K)
	GlicoPs ácidas			GlicoPs ácidas
	Proteínas séricas			Proteínas séricas

La dentinogénesis es un proceso altamente regulado y controlado por factores celulares y extracelulares. El odontoblasto posee dos niveles de secreción, uno proximal al cuerpo odontoblástico, donde se exocitan los constituyentes de la predentina y uno distal, en el frente de mineralización, en el cual son secretados componentes presumiblemente de importancia para la formación mineral. Se cree que la iniciación de cada cristal mineral es facilitada por algún tipo de nucleación. Un núcleo mineral eventualmente podría crecer y fusionarse. La tasa de formación mineral así como el tipo de mineral formado, dependen de factores tales como pH, concentraciones de calcio y fosfato y otros iones. Debido a que los cristales de hidroxiapatita en dentina y hueso se ven en estrecha relación con las fibras de colágeno, muchos autores han sugerido propiedades del colágeno dentro de tejidos mineralizados, que podrían conferir una función nucleadora a este mayoritario constituyente de la matriz. El interés se ha enfocado, sin embargo al rol de las proteínas no colágenas en la mineralización (Fig.4).

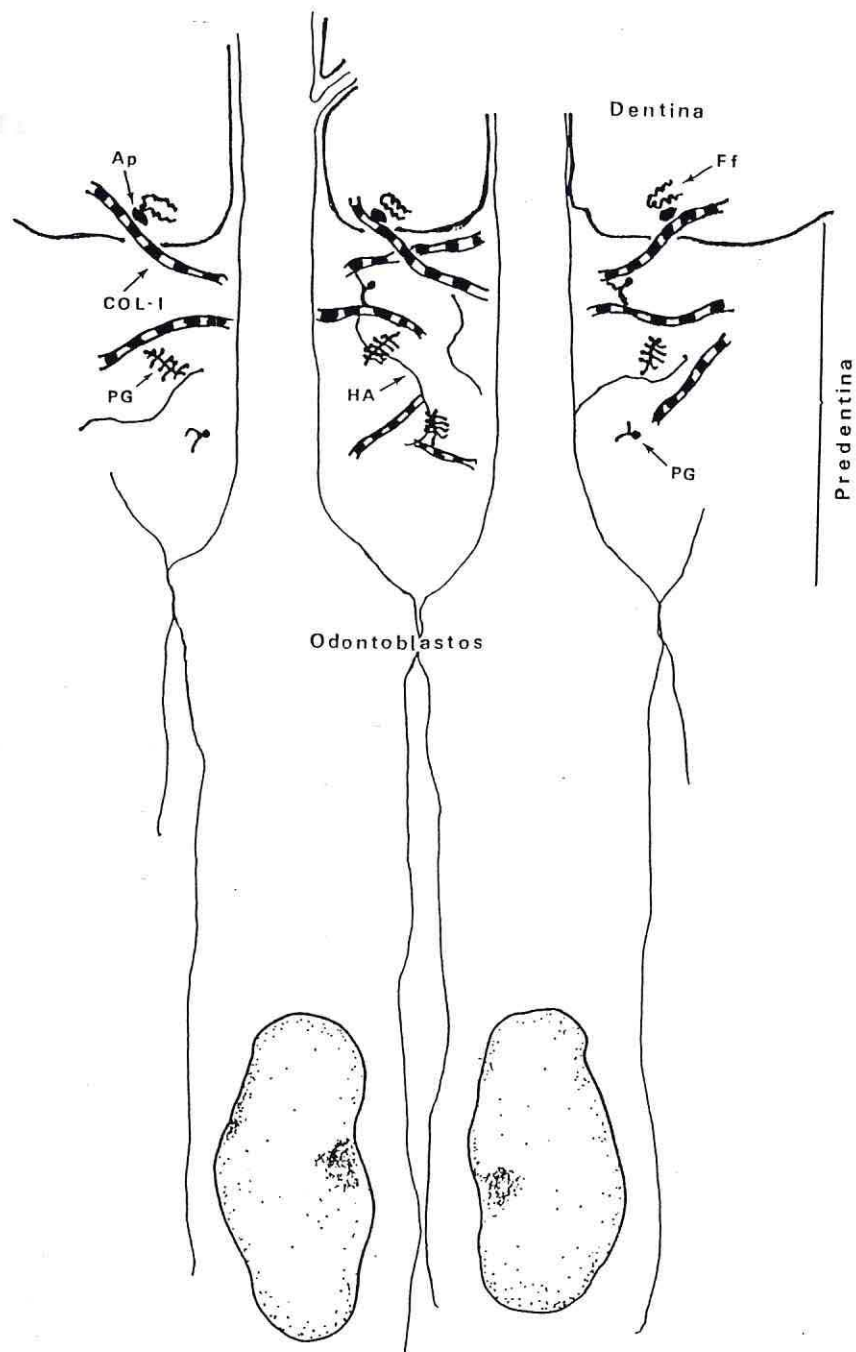


Figura 4 Representación esquemática de la matriz extracelular de predentina y sus componentes secretados por los odontoblastos.

Ap: cristal de apatita
COL-I: colágeno tipo I
Ff: fosfoforina
HA: ácido hialurónico
PG: proteoglicano

II. Componentes

La matriz dentinaria está compuesta por una fase mineral (70%) y otra orgánica (20%). En esta última encontramos componentes colágenos (90%) y componentes no colágenos (10%) como fosfoproteínas y PGs.

Las principales proteínas no colágenas de hueso y dentina son aniónicas y debido a esta característica tienen afinidad por cationes como calcio, lo que sugiere que las PP-H y los PGs pueden actuar como nucleadores para la hidroxiapatita in vivo. Sin embargo, no hay evidencia directa hasta el momento que indique que en hueso y dentina las proteínas no colágenas tengan la capacidad de nuclear apatita en condiciones iónicas fisiológicas. En cambio, estas moléculas en solución ejercen un efecto inhibitorio en la inducción y crecimiento mineral. En estudios in vitro, se ha demostrado que cantidades muy pequeñas de proteínas no colágenas dentinarias son capaces de inducir apatita a concentraciones fisiológicas de iones calcio y fosfato. La hipótesis subyacente plantea que las proteínas no colágenas inmovilizadas en un soporte sólido, presumiblemente colágeno en el tejido, podrían inducir más que inhibir la formación mineral (Linde, 1989; Bouvier y col., 1990).

1. Componente colágeno

El colágeno dentinario es principalmente del tipo I al igual que en hueso. Es sintetizado por el odontoblasto y secretado a la predentina donde las moléculas de colágeno son dispuestas en fibras. Estas fibras forman una trama densa en la cual se depositan los cristales minerales (Linde, 1989).

La síntesis, migración y liberación del colágeno por el odontoblasto fue estudiado por Weinstock y Leblond (1973) mediante radioautografía usando prolina 3H.

2. Componentes no colágenos

Las proteínas no colágenas dentinarias pueden ser clasificadas en 5 grupos: fosfoproteínas, proteínas que contienen gamma-carboxiglutamato, proteoglicanos, glicoproteínas ácidas y proteínas plasmáticas. Con la excepción de los proteoglicanos y de las proteínas plasmáticas, estas proteínas no colágenas no están presentes en predentina (Linde, 1985). En la dentina están fuertemente asociadas con la fase mineral, tanto así que son extraíbles sólo después de la desmineralización.

**TABLA IV Macromoléculas no colágenas
dentinarias**
(Linde, 1984)

Componentes	Características
A. Fosfoproteínas	Contienen altos niveles de serina y ácido aspártico; con alto y bajo grado de fosforilación (PP-H, PP-M y PP-L); PP-H es el mayor componente no colágeno en dentina, pero no está presente en predentina.
B. Gla-proteína	Varias proteínas que contienen gamma - carboxiglutamato; ausente de predentina.
C. Glicoproteínas	Varias glicoproteínas ácidas. Osteonectina: presente en dentina. Fibronectina: presente sólo en dentina del manto.
D. Proteínas séricas y otros componentes	Albúmina, Igs, glicoproteína alfa - 2HS. Proteolípidos, fosfolípidos, iones.
E. PGs y GAGs	Presentes en dentina y predentina. En dentina virtualmente sólo C-4-S. También C-6-S, HA, DS y HS.

A. Fosfoproteína

La fosfoproteína es la proteína no colágena dentinaria mayoritaria. Existen en dentina fosfoproteínas con diferentes grados de fosforilación, pero la más común es la fosfoproteína altamente fosforilada (PP-H), también denominada fosfoforina. En dentina la PP-H constituye la mitad o más de las proteínas no colágenas. No se ha identificado ninguna PP-H en hueso, manifestándose así una diferencia entre hueso y dentina. Las fosfoproteínas de bajo grado de fosforilación (PP-L) se han aislado en dentina y hueso en cantidades variables.

La vía metabólica de la fosfoproteína en incisivos de rata ha sido estudiada mediante radioautografía por distintos autores (Weinstock y Leblond, 1973; Inage y Toda, 1988), observándose que ésta aparece en dentina a los 30 minutos después de la inyección del precursor marcado a diferencia del colágeno que aparece después de 4 horas. La fosfoproteína sería secretada directamente al frente de mineralización, ya que no se ha identificado en predentina (Rahima y col., 1988; Rabie y Veis, 1991).

Tienen gran afinidad con calcio, pero no existen sitios de unión específicos. Se ha visto que las fosfoproteínas pueden influir en la conversión de fosfato de calcio amorfo a hidroxapatita. In vitro inhiben el crecimiento del cristal. Concentraciones altas ejercen función inhibitoria, mientras que concentraciones bajas inmovilizadas en un soporte sólido pueden inducir

formación de hidroxiapatita en solución de fosfato cálcico a concentraciones fisiológicas. Tienen fuerte afinidad por la superficie del cristal de apatita y algunas de ellas pueden unirse covalentemente al colágeno. Así la PP dentinaria controla el crecimiento del cristal de apatita y consecuentemente regula el tamaño del cristal en el proceso de mineralización de la dentina circumpulpar (Inage y Toda, 1988).

B. Gla-proteínas

Las proteínas que contienen el aminoácido gamma-carboxiglutamato, tienen la capacidad de unir cationes tales como calcio mediante sus grupos carboxilos. Dentro de estas proteínas se han identificado dos grupos en hueso y dentina: Gla-proteínas de matriz (MGP) y osteocalcina. Sus funciones aún no están claras. No están presentes en la predentina y en la dentinogénesis circumpulpar son secretadas directamente al frente de mineralización. Se ha informado que son potentes inhibidores de la formación de hidroxiapatita, de su crecimiento in vitro y podrían estar involucradas en el reclutamiento de osteoclastos (Boskey, 1989).

C. Glicoproteínas

Osteonectina

La osteonectina es una glicoproteína ácida que contiene ácido aspártico y glutámico, además de

carbohidratos y fósforo orgánico. Tiene alta afinidad por el colágeno y la hidroxiapatita in vitro; se ha informado como un potente inhibidor de hidroxiapatita, asociándose con la dentina tubular. También se encuentra en ligamento periodontal, encía, pulpa, mesenterio y otros. Aún no se conoce su rol específico en la biomineralización (Linde, 1989 ; Boskey, 1989).

Fibronectina

La fibronectina está presente en el tejido conectivo pulpar y sólo en la matriz orgánica de la dentina del manto. No puede demostrarse en estadios tardíos de la dentinogénesis como tampoco en predentina ni en dentina circumpulpar.

D. Proteínas séricas y otros componentes

La dentina contiene proteínas séricas, pero se cree que podrían estar allí presentes por contaminación con sangre durante la preparación. Se ha logrado aislar albúmina después de la desmineralización dentinaria, pero aún no está claro si es sintetizada por el odontoblasto. Se puede visualizar radioautográficamente albúmina con ¹²⁵I en el frente de mineralización a las 6 horas postinyección y dentro de la dentina a los 3 días postinyección. Esto podría indicar un transporte intracelular rápido a través del odontoblasto, pero la

significancia biológica de este hallazgo está aún en discusión (Linde, 1984).

También se han encontrado proteínas séricas como IgG, IgE y glicoproteína alfa - 2HS (Boskey, 1989); estas proteínas son sintetizadas por células de otros tejidos y por esto se cree que no tienen un rol específico y esencial en la mineralización.

En predentina se ha observado una relación entre GAGs y fosfolípidos y se ha sugerido que estos componentes podrían formar lipo-proteoglicanos y se les ha atribuido un activo rol en la mineralización in vitro e in vivo, presentando distinta distribución en los tejidos calcificados.

E. Proteoglicanos

Otro grupo de los componentes no colágenos de la dentina son los proteoglicanos. El conocimiento del tipo y distribución de éstos en la predentina y dentina es un prerrequisito para comprender su rol en la dentinogénesis (Takagi y col., 1989).

Linde empleando métodos bioquímicos estudió el contenido de GAGs en el tejido conectivo pulpar de distintas especies en varios estados de desarrollo. Realizó tratamiento enzimático con papaína y encontró condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato, ácido hialurónico y keratan sulfato, observando diferencia entre las especies

estudiadas. Condroitin sulfato y ácido hialurónico están presentes en el tejido pulpar de todas las especies y en dientes dentinogénicamente activos, representando condroitin sulfato el 70% de los GAGs presentes.

La matriz predentinaria consiste principalmente en PGs y colágeno. En un estudio en predentina de conejillos de india, Linde demostró la presencia de condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, ácido hialurónico, dermatan sulfato y keratan sulfato, con un porcentaje del 65% de condroitin sulfato y del 20% de ácido hialurónico (Linde, 1985).

Con el uso de inmunohistoquímica se detectó la distribución de GAGs en predentina y dentina mediante anticuerpos monoclonales desarrollados para varios GAGs y PGs, encontrándose condroitin-4-sulfato, dermatan sulfato pequeño y grande, keratan sulfato, condroitin sulfato y condroitin-6-sulfato, en predentina de rata, en tanto que en dentina de la misma especie se encontró condroitin-4-sulfato y dermatan sulfato pequeño. Resultando ser condroitin-4-sulfato el GAG mayoritario en dentina. Mientras la predentina tuvo una distribución relativamente homogénea de GAGs y PGs, la dentina reveló una intensa actividad en los túbulos dentinarios alrededor de los procesos odontoblásticos con un mínimo de actividad en el resto de la matriz dentinaria. Estudios bioquímicos previos de predentina y dentina de rata, han identificado condroitin-4-sulfato y condroitin-6-sulfato en una razón

de 10:1 en predentina versus dentina (Takagi y col., 1990).

Los PGs sulfatados son transportados a través del proceso odontoblástico en gránulos secretores elongados, posiblemente el mismo tipo de gránulo que está marcado después de la administración de fucosa 3H o prolina 3H (Weinstock y Young, 1972). Son necesarios mayores estudios para saber si la proteína central y el colágeno son empaquetados en el mismo gránulo secretor o en forma separada. La descarga de los PGs es depositada en la predentina proximal (Chardin y col., 1990; Beertsen y Niehof, 1986). Sundström (1971) encontró evidencia de dos pools metabólicos de PGs en experimentos radioautográficos usando 35-S04. Un pool se incorpora rápidamente a la dentina mineralizada y es secretado directamente al frente de mineralización. El otro pool permanece en la predentina por un tiempo más extenso (Linde, 1985). Estudios bioquímicos de Rahemtulla y col. (1984), Weinstock y Young (1972) también verifican esta observación.

Los PGs, dentro de la matriz están involucrados en diversas funciones pudiendo variar considerablemente debido al amplio rango existente en la composición química de éstos.

Influencian la formación extracelular de fibrillas colágenas y estabilizan su ensamblaje. En predentina, luego de la fase de maduración están estrechamente relacionados con colágeno. En la dentina los PGs persisten

con la forma de finos gránulos de aproximadamente 100 Å ligados a las estriaciones periódicas (Goldberg y col., 1978).

El condroitin-4-sulfato tiene un rol en la diferenciación de la pulpa dental permitiendo la mineralización in vitro. La síntesis y deposición de proteínas no colágenas involucradas en la mineralización pueden ser inducidas por condroitin sulfato (Bouvier y col., 1990). Tziafas (1988) estudió el efecto de los GAGs en odontoblastos de rata in vitro y concluyó que éstos son capaces de mantener el estado de polarización en dichos cultivos.

En los tejidos los PGs presumiblemente pueden disminuir el rango de difusión de iones tales como calcio y fosfato. Los PGs unen electrostáticamente iones calcio, siendo esto un prerrequisito para inducir la formación de cristales in vitro a pH fisiológico y condiciones iónicas óptimas. Los grupos sulfato y carboxilo podrían actuar como un locus dentro de la matriz permitiendo concentraciones de calcio y fosfato suficientes que se requieren para la nucleación. Se ha sugerido que su gran extensión molecular en solución sería la responsable primaria de su capacidad de regular la formación mineral.

Se ha establecido, mediante estudios bioquímicos, diferencias cuantitativas y cualitativas entre GAGs de predentina y dentina observándose una disminución significativa en esta última. La diferencia entre PGs de



dentina y predentina podría explicar la relación de los PGs con la mineralización. Estudios realizados usando reactivos catiónicos sugieren que la pérdida de GAGs puede ser producto de una remoción de éstos durante la mineralización dentinaria o de un enmascaramiento de algunos de ellos. También se ha planteado la posibilidad que ocurra un cambio en la molécula (Takagi y col., 1990). Se han observado enzimas degradadoras de PGs, tal como cathepsin D en la predentina distal, produciéndose pérdida de GAGs acompañada de proteólisis de las proteínas centrales. Los fenómenos de enmascaramiento y desaparición de PGs podrían, además, estar relacionados con la presencia de lisosomas en las prolongaciones odontoblásticas (Goldberg, 1985; Linde, 1984; Chardin y col., 1990; Takagi y col., 1990).

La tinción encontrada por Takagi y col. (1990) en el espacio periodontoblástico y en la pared del túbulo dentinario, podría indicar que los PGs teñidos inhiben la mineralización de estos sitios y así, la carencia de mineralización podría facilitar la mantención de estructuras tubulares.

Se han aplicado técnicas radioautográficas usando ³⁵S-04 para localizar estos componentes. (Weinstock y Young, 1972; Ito y col., 1987; Young y col., 1989; Heremans y col., 1988; Lelongt y col., 1988). Las ventajas que implica el uso de esta técnica son su especificidad debida a la limitada incorporación del isótopo en otros

componentes, a la alta actividad específica del isótopo y bajo costo.

Actualmente la naturaleza y distribución precisa de PGs en preentina y dentina pueden ser directamente identificados mediante anticuerpos monoclonales (Takagi y col., 1990).

Muchas de estas proteínas matriciales pueden ser acumuladas pasivamente en la matriz mineralizada. Podrían desempeñar roles como factores de adhesión, quimioattractivos, factores de crecimiento o modificadores matriciales. Su asociación con el mineral puede ocurrir después que esta función se ha cumplido (Boskey, 1989).

Luego de esta revisión de matrices extracelulares y el rol de algunos de sus componentes, el presente trabajo persigue lograr una mejor comprensión sobre el comportamiento y la relevancia dentro de la dentinogénesis del grupo de componentes no colágenos mayoritario de la preentina, los PGs, mediante la incorporación del precursor 35-S04.

La influencia de los PGs en la diferenciación de células en crecimiento, en la mantención de estados polarizados en cultivos de odontoblastos y la capacidad de estimular la síntesis y deposición de proteínas no colágenas involucradas en la mineralización, podría utilizarse para orientar estudios experimentales en vías

de crear una base cavitaria de acción biológica. Dicha base permitiría liberar PGs en la zona de aplicación, o bien inducir la síntesis de estas macromoléculas de modo de permitir a las células mesenquimáticas pulpares subyacentes a la zona afectada, diferenciarse en odontoblastos secretores de predentina, consiguiéndose así el esperado proceso de reparación tisular.

El interés de este seminario de tesis se enfocó hacia el análisis de la incorporación de $^{35}\text{S-O}_4$ a predentina. De acuerdo a la revisión bibliográfica el espesor de predentina varía a lo largo del incisivo de rata, siendo mayor en aquellas regiones de dentinogénesis inicial y decreciendo hacia las zonas terminales. Así mismo se ha expuesto que los PGs (compuestos sulfatados) se pierden o sufren transformaciones a medida que se desarrolla la dentinogénesis. Esto podría hacernos suponer que el espesor de predentina estaría relacionado con la cantidad de PGs presentes.

OBJETIVOS

- 1.- Conocer a través de una metodología experimental de tipo descriptivo y cuantitativo la dinámica de los componentes no colágenos sulfatados de la preentina durante la dentinogénesis en incisivos de ratas.
- 2.- Correlacionar los espesores de preentina con la incorporación de $^{35}\text{S-O}_4$ para distintos estados de desarrollo.
- 3.- Comprender la dinámica de la incorporación de $^{35}\text{S-O}_4$ a preentina para dos tiempos.

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación

En el presente estudio se utilizaron 9 ratas macho Sprague-Dawley de peso promedio 87,55 g y de 30 días de vida postnatal. Los animales fueron seleccionados de 2 camadas dejando cada madre con 8 crías, a los 21 días las ratas fueron destetadas y 5 machos de similar peso se seleccionaron para los experimentos.

Radioisótopo

Para los estudios radioautográficos los animales fueron previamente anestesiados con éter mediante inhalación. Luego, mediante disección fue expuesta la yugular externa procediendo a inyectar Sulfato de Sodio en solución acuosa pH 8.0, como radiocompuesto sulfatado ($\text{Na}_2\text{-}^{35}\text{-SO}_4$, Activ. Espec. 482,20 MC/MM; Nex041-NEN). Cada animal fue inyectado con una dosis de 100uCi por cada 10 gramos de peso. Se consideraron dos tiempos experimentales de incorporación del radioisótopo, un grupo de 5 ratas para ser procesadas a las 4 horas post inyección y otro de 4 ratas a las 24 horas.

Los radiocompuestos sulfatados ($^{35}\text{-S}$) presentan una vida media de actividad emisora (emisor beta) de 87.44 días, razón por la cual la obtención de las muestras y procesamiento de ellas requirió un tiempo de tratamiento

dentro de los plazos que caracterizan a este tipo de emisor radioactivo.

Obtención de muestras

Las ratas recibieron una inyección intraperitoneal de pentotal sódico a una concentración de 60 mg por kg peso. Posteriormente se procedió a abrir el tórax inyectándose el ventrículo izquierdo y rompiéndose la aurícula derecha. Se perfundió con solución de Ringer durante 10 a 15 segundos para limpiar los vasos sanguíneos. Luego se reemplazó la perfusión por solución fijadora de Karnovsky modificada por 10 a 15 minutos con un volumen de 200 a 300 ml y con un flujo de 0,5 ml/seg. La solución fijadora contenía el compuesto cetylpyridinium chloride para preservar una mayor cantidad de glicoconjugados.

Terminada la fijación se disecaron las mandíbulas, se limpiaron, se dividieron en la línea media y se dejaron durante 2 horas en la misma solución fijadora, para luego proceder a lavarlas en buffer Cacodilato 0,2 M por 2 horas.

Los incisivos inferiores se desmineralizaron manteniéndolos en solución de Acido Etilén Diamín Tetraacético (EDTA) al 4,13% más 4,5 g de NaOH ajustado a pH 7,4 durante 19 días a 4 C.

Una vez cumplida la demineralización se realizaron cortes transversales, dividiendo al incisivo en 4 regiones, tomando puntos referenciales trazados

radialmente y equidistantes a 4,5 mm partiendo por aquel punto ubicado a 4 mm de la zona germinal del incisivo, en la cual comienza la mineralización. Se obtuvieron 5 segmentos con superficies, denominándose regiones A, B, C y D a los 4 primeros segmentos, descartándose del presente estudio el quinto, correspondiente al extremo incisal (Fig. 5).

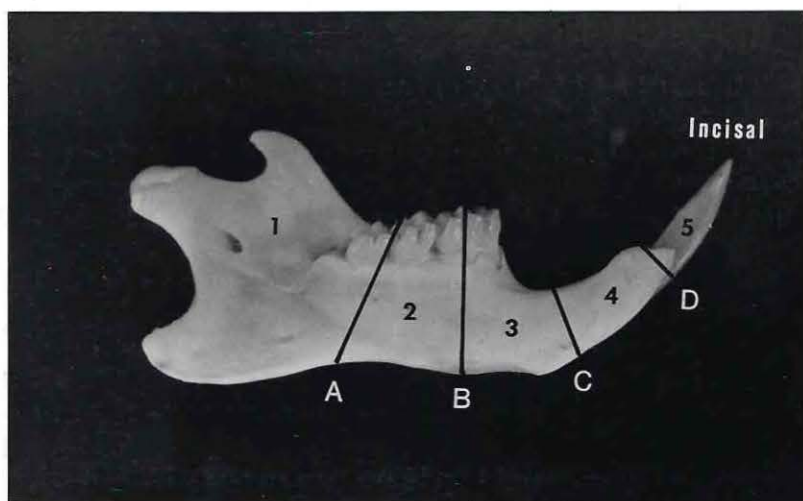


Figura 5 Vista lingual de la hemimandíbula izquierda. Se muestran las cuatro secciones de corte radial del incisivo (A, B, C y D), las que generan cinco segmentos. Las superficies incisales de los segmentos 1, 2, 3 y 4 fueron empleadas para los estudios de predentina. El segmento 5 no fue utilizado en el presente estudio. (3x)

Inclusión y corte de las muestras

Las muestras fueron lavadas en Buffer cacodilato, deshidratadas e incluidas en Epon 812 y luego se procedió a realizar cortes de aproximadamente 1 μ m de espesor para microscopia óptica. De cada región de las 9 ratas se montaron tres portaobjetos conteniendo 4 cortes cada uno de ellos.

Un portaobjeto de cada una de las regiones se tiñó con azul de toluidina para medir espesores de predeentina.

El resto de las muestras fueron teñidas con hematoxilina férrica de Regaud.

Procesamiento radioautográfico

Las muestras se cubrieron con emulsión radioautográfica Kodak NTB2 y fueron colocadas en cajas oscuras para radioautografía, las cuales se enumeraron de 1 a 9 y cada una contenía 8 muestras. El procedimiento fue efectuado en un cuarto oscuro a 28 C y 80% de humedad relativa ambiental.

Las cajas se dividieron en 2 series según el tiempo de exposición de la emulsión al radioisótopo.

Las cajas # 1, 2, 3, 4 y la mitad de las muestras de la caja 9 fueron expuestas por 7 días.

Las cajas # 5, 6, 7, 8 y la mitad de las muestras de la caja 9 fueron expuestas por 10 días.

Las muestras fueron mantenidas a 4°C.

Además en cada caja se incluyó un portaobjeto con

emulsión radioautográfica para control de background.

Para el revelado se utilizó solución de revelador Kodak D170, agua destilada con unas gotitas de ácido acético y fijador, a 18 C. Finalmente, las muestras fueron lavadas y cubiertas con cubreobjetos y selladas con Epon 812.

Video análisis y conteo de granos

Para efectuar el análisis de las muestras se utilizó un sistema compuesto por un microscopio óptico Orthomat-Leitz (MO), al cual se incorporó una cámara de video de alta sensibilidad (Ikegami) (CV), con su respectivo monitor de video (Ikegami) (MV). Como accesorio para este sistema se diseñó un contador electromagnético (CE) con el que se efectuó el conteo de granos radioautográficos directamente sobre la pantalla (Fig. 6).

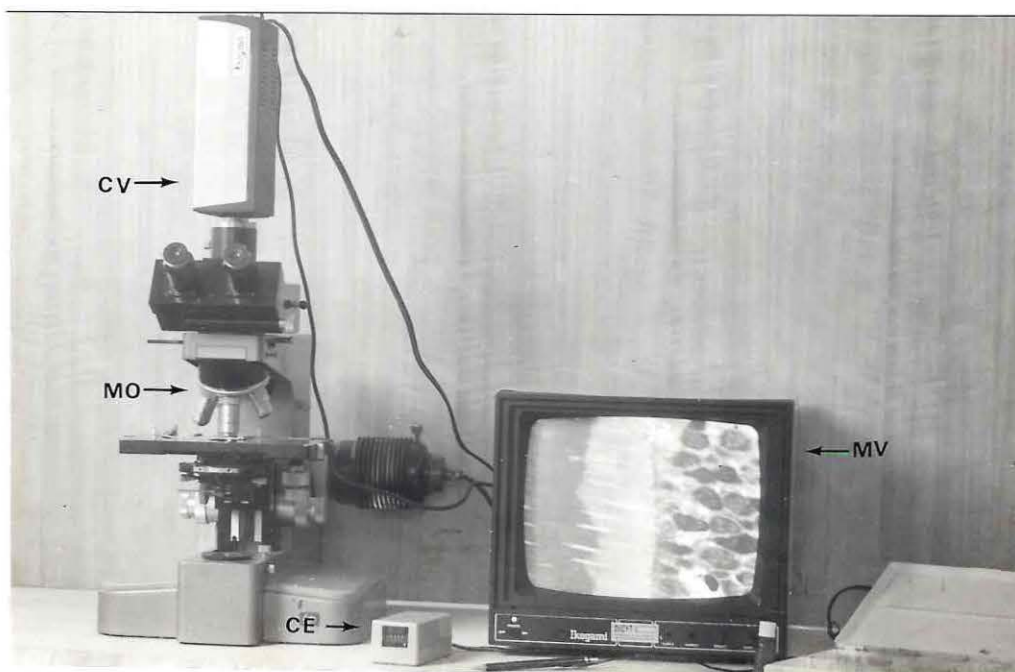


Figura 6 Sistema de video análisis.

Todas las observaciones se realizaron con objetivo de inmersión (100x).

Para proceder a realizar el conteo de granos en cada una de las cajas ,previamente fue necesario confeccionar una plantilla para delimitar el area a medir en cada muestra. La plantilla consistió en una lámina de celuloide con las medidas de 12 cm de ancho x 16 cm de largo, equivalentes a 30 um de ancho x 40 um de largo, de lo cual resulta un área de 1200 um². De cada portaobjeto que contenía 4 cortes de la misma región, se eligieron 2 cortes para efectuar el conteo. En el corte elegido la plantilla se ubicó en la zona más alta y central de la superficie vestibular del incisivo de rata (Fig. 7A). De dicho corte se efectuaron 2 mediciones.

En cada una de las mediciones la plantilla se ubicó de manera tal que dentro del área mencionada, estuviesen representados 10 um de odontoblastos, la predentina y la dentina (Fig. 7B).

Los datos fueron registrados para número de granos en odontoblastos, número de granos en predentina y número de granos en dentina. Para las zonas de odontoblasto y dentina se procedió a contabilizar dichos granos en forma directa y para la zona de predentina se utilizó el contador electromagnético. Conjuntamente se realizó la medición del espesor de predentina en cada una de las muestras.

Para efectuar el conteo de granos se calibró a un observador en parámetros tales como ubicación frente al monitor, distancia de éste con respecto al monitor, forma de contabilización de granos.

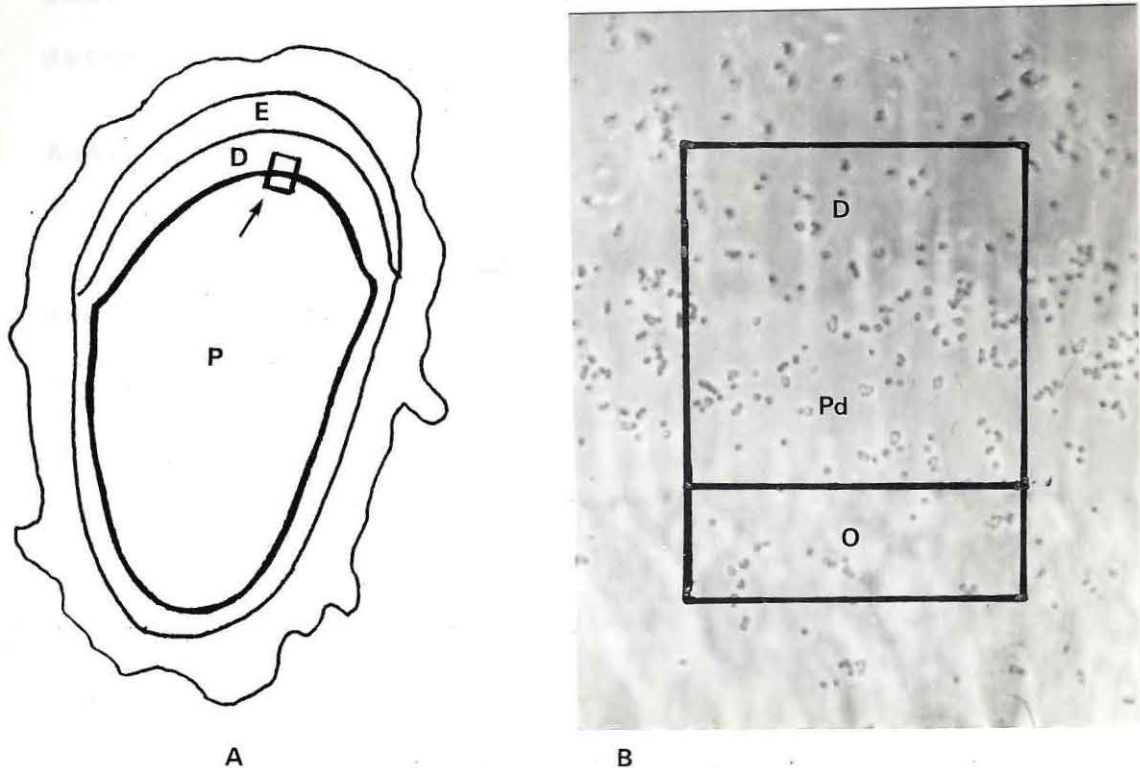


Figura 7

A. Esquema que muestra un trazado de una sección transversal de incisivo de rata. Sobrepuesto a la zona más labial del área pulpo (P) - dentinaria (D) se ubicó la plantilla de mediciones (†).

B. Microfotografía del área de estudio pulpo-dentinaria con la plantilla posicionada sobre odontoblastos (O), predentina (Pd) y dentina (D). (1500x)

Para contabilizar los granos se acordó previamente la forma de enfocarlos, distinción de unidad, ubicación límite dentro de la plantilla.

Además se procedió a realizar el conteo al azar de 4 zonas de cada portaobjeto control de emulsión radioautográfica, de las 9 cajas expuestas, para determinar el background existente.

Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados estadísticamente mediante análisis de varianza y test de Student, de acuerdo a software computacional convencional.

Soluciones empleadas

SOLUCION RINGER

(Perfusión)

NaCl	6,5 g	3,25 g
KCl	0,14 g	0,07 g
CaCl ₂	0,12 g	0,06 g
NaHCO ₃	0,2 g	0,1 g
	1,0 L	0,5 L

BUFFER CACODILATO 0,2 M

Cacodilato de Na 8,56 g

Llevar a 200 ml con agua destilada

SOLUCION KARNOVSKY MODIFICADA (300 ml)

(Fijador)

Cacodilato	0,2 M	150 ml
Glutaraldehido	25 %	30 ml
Formaldehido		6 ml
Cetylpyridinium (0,5 %)		1,5 g

Llevar a 300 ml y ajustar pH 7.4

SOLUCION EDTA

(Desmineralización)

EDTA	41,13 g
NaOH	4,5 g

Ajustado a pH 7.4

RESULTADOS

Los resultados experimentales del presente seminario de tesis involucran dos aspectos:

I. Caracterización de espesores de predentina por regiones.

II. Contabilización de granos radioautográficos por región en diferentes tiempos de incorporación (4 y 24 horas). El material obtenido de ambos grupos fue ordenado y procesado para fines estadísticos.

I. MEDICION DE ESPESORES DE PREDENTINA.

Se realizó la medición de espesores de predentina en cortes de 1 um teñidos con azul de toluidina para las 4 regiones del incisivo de las 9 ratas.

En la Fig. 8 se presentan microfotografías ópticas de las cuatro regiones (A-D). Es posible observar cambios en la configuración del frente de mineralización, en especial en la región A, la cual muestra un borde irregular marcado por formaciones calcoferíticas (compare A con C). El espesor de predentina en la región A alcanza un promedio de 20,31 um. En esta región de predentina es posible diferenciar dos zonas, una proximal (p) en relación al límite predentina-odontoblastos y otra zona distal (d) en relación al frente de mineralización. En las regiones B, C y D no se aprecian estas zonas con distinta afinidad de tinción.

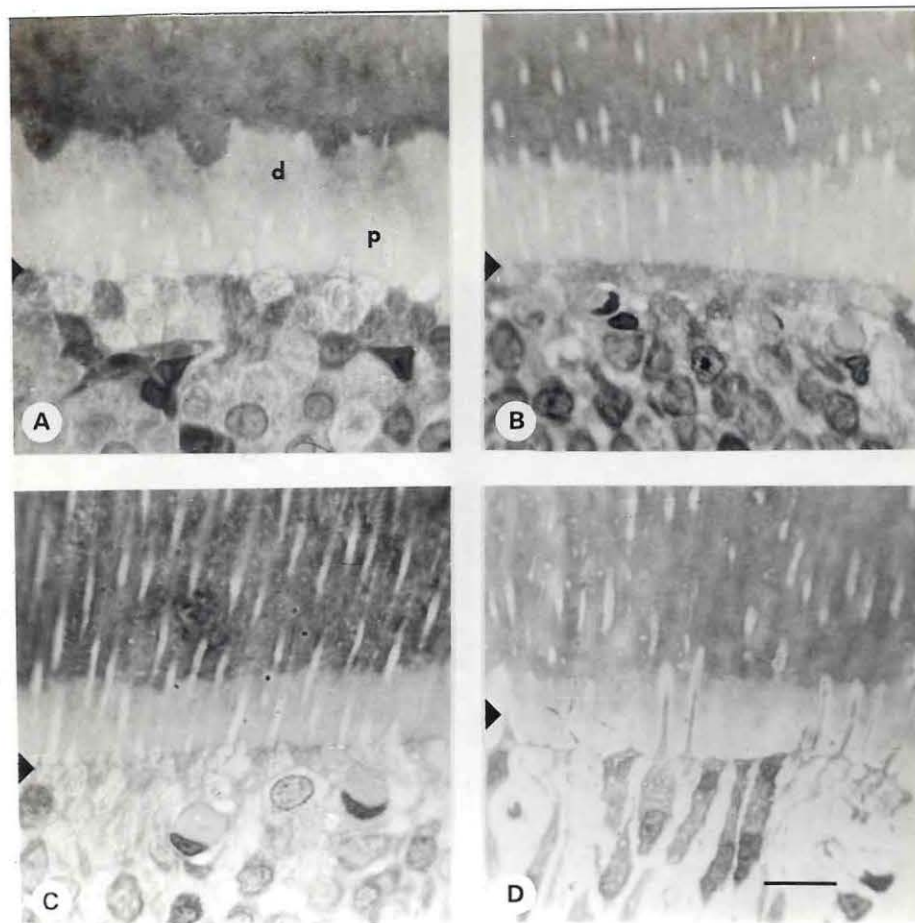


Figura 8 Microfotografías ópticas de las cuatro regiones del incisivo (A, B, C y D). Se puede apreciar las diferencias de espesor en predentina para cada región. En A, la predentina evidencia una zona proximal (p) y una distal (d). En D el tejido pulpar se encuentra ligeramente desprendido. El límite predentina-odontoblastos está marcado. Tinción Azul de Toluidina. Aumento 1000x. (Barra = 10um).

Los resultados de las mediciones se presentan en la Tabla V.

TABLA V Espesores de predentina.

(micrones)

	Región A	Región B	Región C	Región D
Rata 1	19	14,25	11,44	9,31
Rata 2	20,31	17,09	12,69	8,56
Rata 3	18,56	17,06	12,94	7,38
Rata 4	20,06	17,7	13,48	8,62
Rata 5	22,62	16,68	15,5	9,13
Rata 6	21,38	18,15	15,06	7,31
Rata 7	20,44	16,44	13,47	9,06
Rata 8	19,19	16,62	13,39	9,44
Rata 9	21,25	16,22	15,06	8,44
\bar{x}	20,31	16,69	13,67	8,58
SD	1,30	1,10	1,32	0,78

ESPESORES DE PREDENTINA

(micrones)

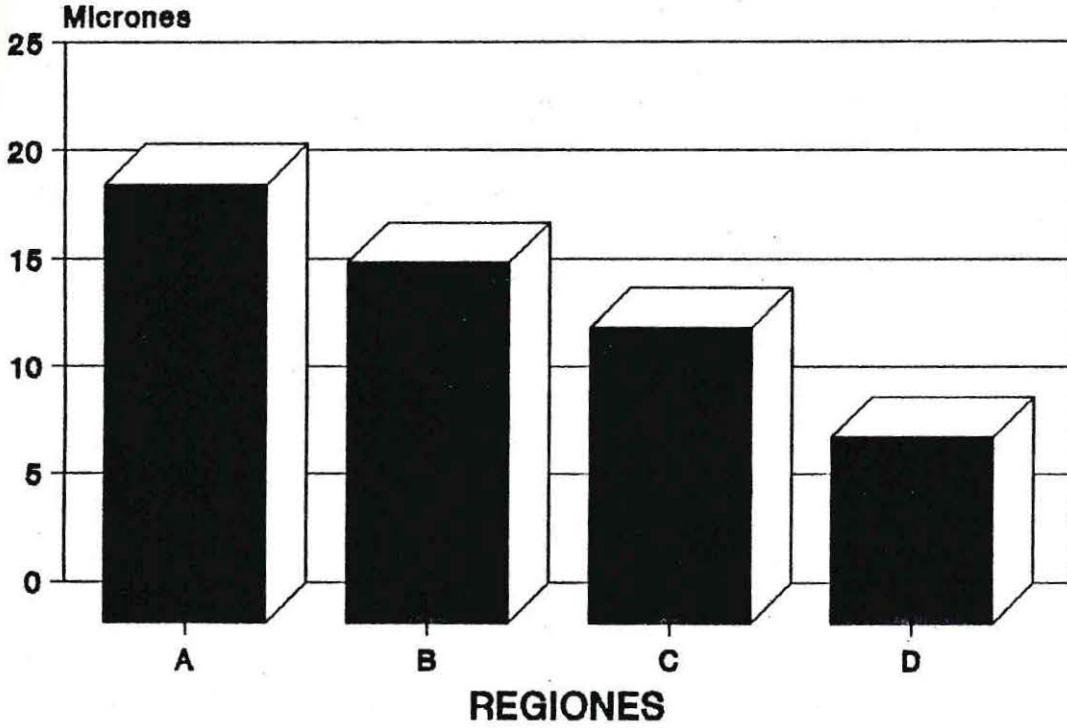


Figura 9 Se observa una disminución paulatina de los espesores de predentina desde la región A (apical) hacia D (incisal). El espesor de la región D corresponde a un 42,24% del espesor de la zona A.

II. INCORPORACION DE 35-S04.

A continuación se presenta el comportamiento de la incorporación de 35-S04 a las zonas de odontoblastos, predentina y dentina en cada una de las regiones, a las 4 y 24 horas postinyección. Los datos han sido obtenidos de acuerdo a la metodología propuesta anteriormente.

TABLA VI Incorporación de 35-S04 a las 4 horas postinyección.

(Número de granos)

	Región A	Región B	Región C	Región D
Odontoblastos	10,65	10,15	8,25	4,35
Predentina	36,7	22,05	18,1	11,95
Dentina	7,5	11,35	11,9	16,7
Granos totales	54,85	43,55	38,25	32,94

Se puede observar una disminución de granos totales hacia la zona D.

En predentina se visualiza una disminución del conteo de granos desde A hacia D.

En dentina aumenta el marcaje en la región D.

En la Fig. 10 es posible apreciar la marcación radioautográfica para cada región.

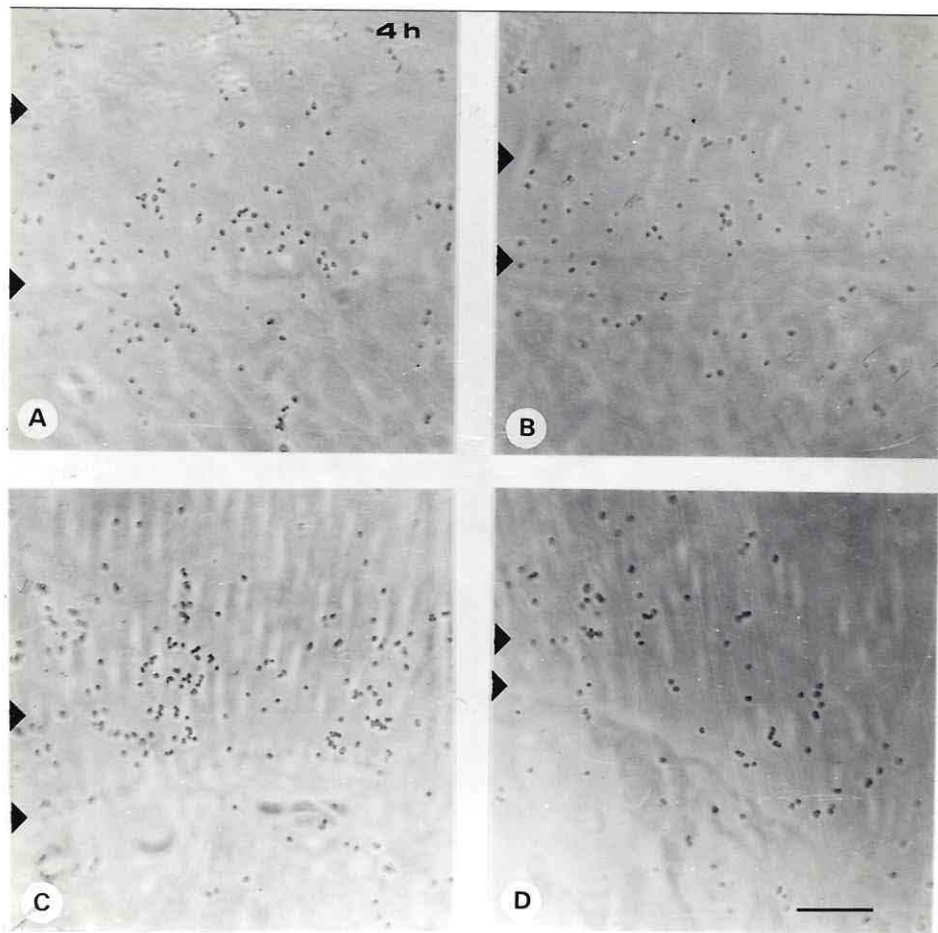


Figura 10 Microfotografías ópticas de la marcación radioautográfica para las cuatro regiones del incisivo, 4 horas postinyección de 35-S04. Los granos radioautográficos se observan principalmente sobre los límites de predentina (flechas). Contraste de fase. Aumento 1000x. (Barra = 10um).

**TABLA VII Incorporación de 35-S04 a las 24 horas
postinyección
(Número de granos)**

	Región A	Región B	Región C	Región D
Odontoblastos	8.31	7.37	6.06	9.87
Predentina	57.37	33.69	24.19	19.43
Dentina	13.06	19.62	30.5	53.3
Granos totales	78.74	60.68	60.75	82.3

A las 24 horas postinyección se aprecia una mayor incorporación de granos totales con respecto a lo observado en el grupo de las 4 horas. El comportamiento de incorporación es distinto, ya que el conteo es mayor hacia la región D.

En predentina se observa una tendencia a la disminución de incorporación hacia la región D similar a la visualizada a las 4 horas, a pesar de existir diferencia en los valores absolutos de incorporación a predentina entre las 4 y 24 horas.

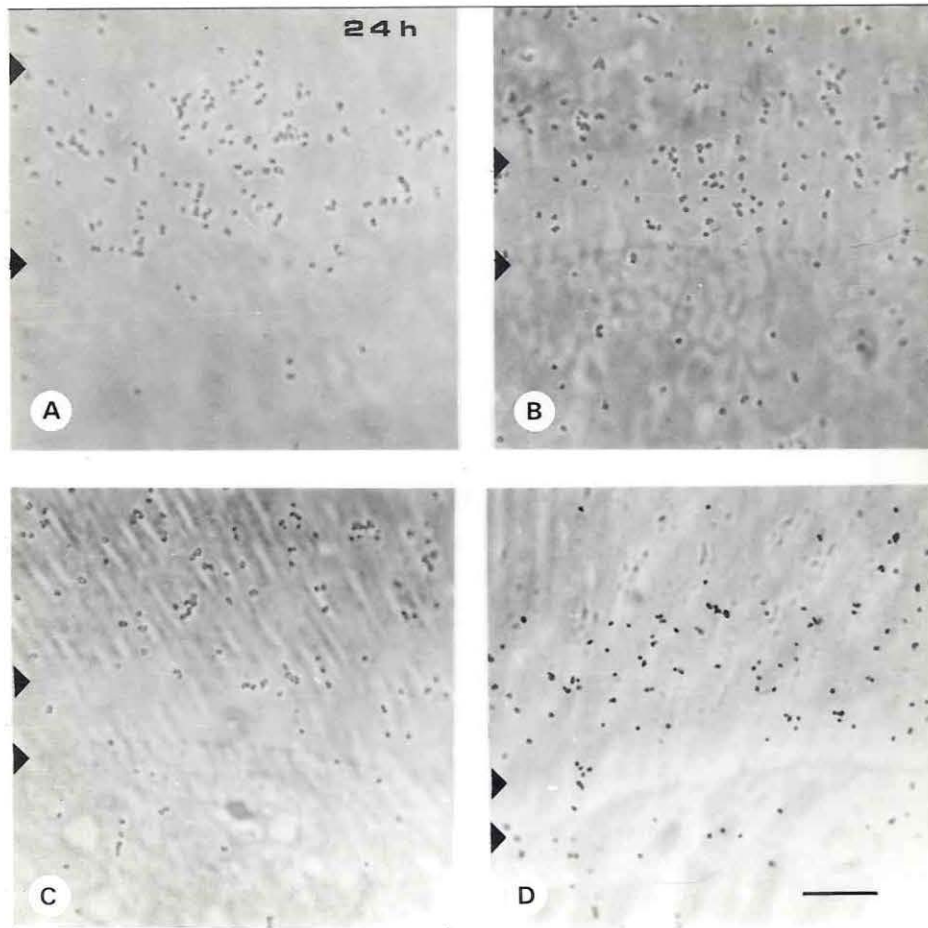


Figura 11 Microfotografías ópticas de marcación con 35-SO₄, 24 horas postinyección. En la región A los granos radioautográficos se mantienen sobre la predentina, sin embargo, en C y D se observa un marcado desplazamiento de la marcación hacia la dentina. Contraste de fase. Aumento 1000x. (Barra = 10 μ m)

La Tabla VIII presenta la incorporación del isótopo a predentina a las 4 horas en los 9 animales de experimentación.

TABLA VIII Incorporación de 35-S04 a predentina.

(Número de granos)

	Región A	Región B	Región C	Región D
Rata 1	38,250	20,500	13,250	10,750
Rata 2	36,000	26,250	18,000	12,500
Rata 3	18,250	16,750	15,250	5,750
Rata 4	50,750	22,500	20,000	11,500
Rata 5	40,250	24,250	24,000	19,250
Rata 6	38,750	19,250	17,500	20,000
Rata 7	83,000	32,250	40,750	21,000
Rata 8	67,250	30,000	15,500	19,750
Rata 9	40,500	53,250	23,000	17,000
\bar{x}	45,89	27,22	20,8	15,27
SD	19,00	10,96	8,28	5,33

Dentro del procesamiento estadístico de los datos se analizaron la totalidad de las ratas en relación a su comportamiento de incorporación de 35-S04 a predentina para los tiempos experimentales. El interés de este análisis es poder establecer diferencias grupales entre los animales y regiones del incisivo para ambos tiempos. Se obtuvo un primer dendograma en el cual se puede observar relaciones entre los animales (Fig. 12) y otro donde se aprecian relaciones entre las regiones del incisivo (Fig. 13).

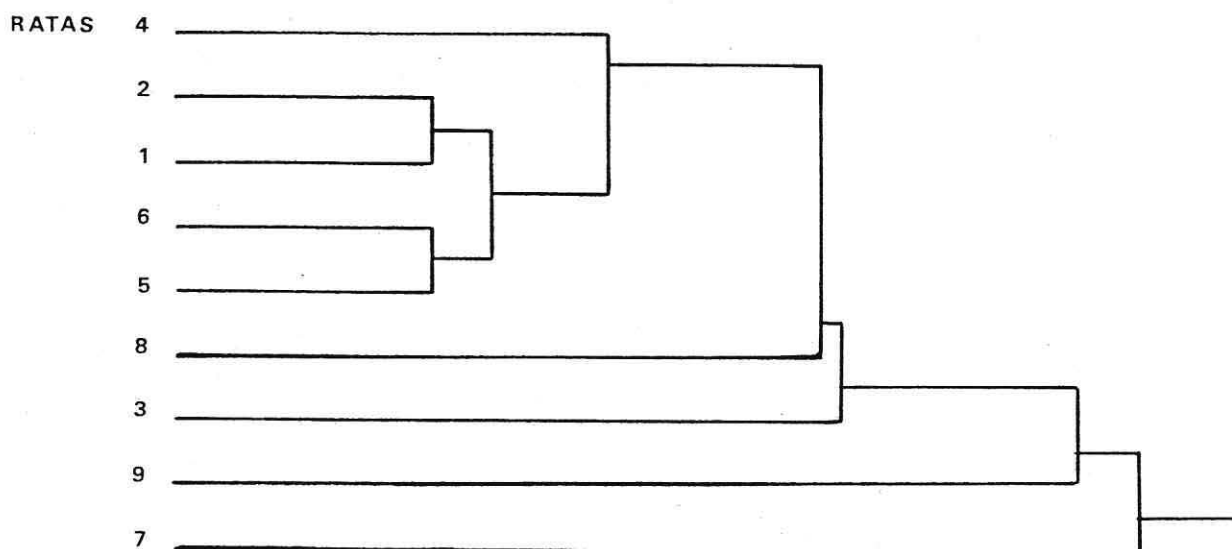


Figura 12 Dendograma que muestra el comportamiento de la incorporación de 35-S04 en predentina para las 9 ratas.

Se puede apreciar que las ratas 3, 6 y 7 presentan un comportamiento de agrupación distinto a lo esperado en base al tiempo de incorporación al que fueron sometidas.

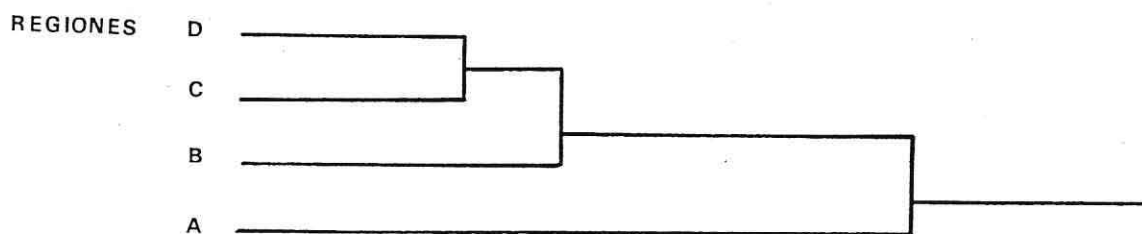


Figura 13 Dendograma para el comportamiento de la incorporación de 35-SO4 en las cuatro regiones del incisivo de rata.

Sin embargo, en la Fig. 13 el dendograma que relaciona el comportamiento de incorporación de las distintas regiones, muestra un comportamiento grupal ordenado con tendencia a la disminución de la incorporación de 35-SO4 en predentina, desde la región A hacia D en las 9 ratas.

En la Fig. 14 se grafica el comportamiento de la incorporación a predentina para 4 y 24 horas

Incorporación de 35-SO4 a predentina en las
regiones a las 4 y 24 horas

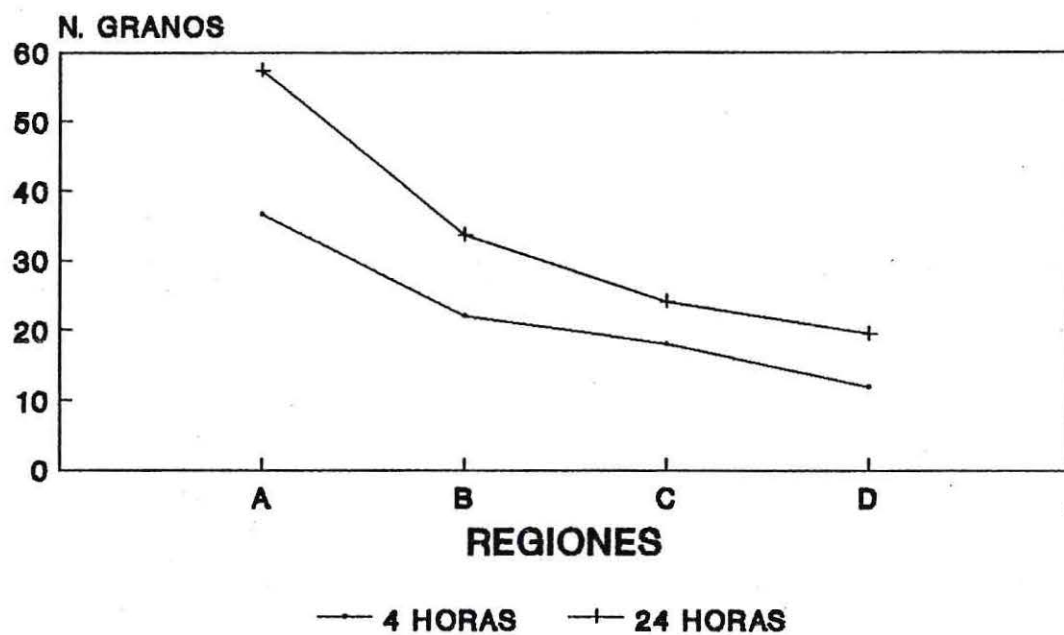


Figura 14 En este gráfico se presenta el comportamiento de la incorporación de 35-SO4 a predentina para 4 y 24 horas. Se observa que ambas curvas presentan una conducta similar con tendencia a la disminución desde la región A hacia D.

En la Tabla IX se muestra una comparación entre conteos obtenidos usando una base de 30 um y por otra parte se calculó la densidad de granos en las distintas regiones de predentina.

TABLA IX Incorporación de 35-904 en predentina a las

4 horas por densidad y base

Región	Densidad (N.Granos/100um ²)	Base (N.Granos/30um base)
A	6.054	36.7
B	4.45	22.05
C	4.52	18.1
D	4.56	11.95

INCORPORACION DE 35-S04

PREDENTINA 4 HORAS

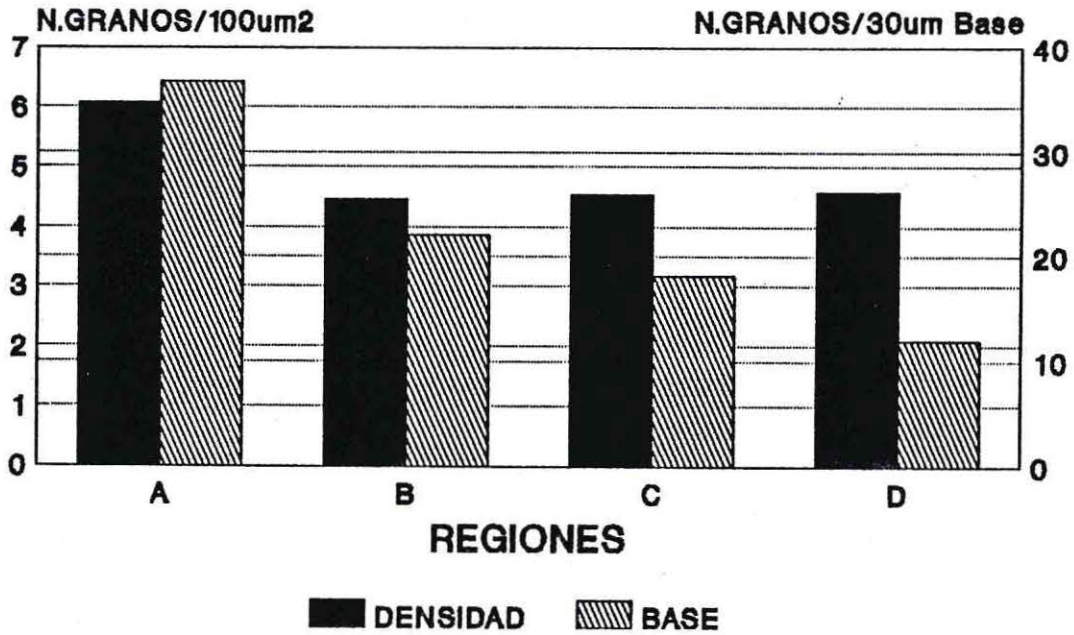


Figura 15 En este gráfico se puede apreciar en lo que respecta al análisis por base, una disminución de la incorporación de 35-S04 hacia las regiones terminales. Sin embargo, al graficar la densidad de granos se puede visualizar que ésta es mayor en la región A, para luego ir disminuyendo en B y estabilizarse hacia las regiones C y D.

La Tabla X presenta, del mismo modo que la anterior, los resultados por densidad y base a las 24 horas.

TABLA X Incorporación de 35-SO4 en predentina a las 24 hrs. por densidad y base.

Región	Densidad (N.Granos/100um ²)	Base (N.Granos/30um base)
A	9.4	57.37
B	6.75	33.69
C	5.72	24.19
D	7.63	19.43

INCORPORACION DE 35-SO4

PREDENTINA 24 HORAS

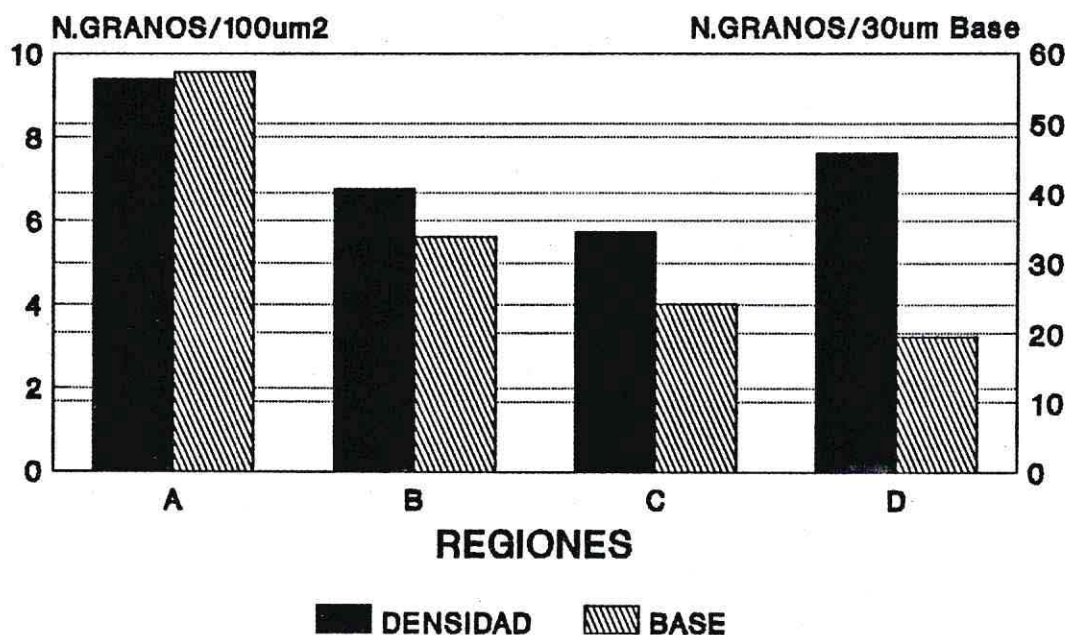


Figura 16 Se puede observar en el análisis por base la tendencia hacia la disminución mencionada para lo graficado en la Figura 14.

Sin embargo el análisis por densidad muestra un comportamiento diferente, ya que se aprecia una disminución en la incorporación de 35-SO4 desde la región A hacia C, pero luego se produce un incremento en la región D.

DISCUSION

La matriz extracelular (M.E.C.) consiste en una trama de macromoléculas que son secretadas en forma local por células especializadas. El avance en el estudio de M.E.C. y sus componentes ha permitido comprender que esta matriz desempeña un papel activo y complejo sobre las células que están en contacto con ella, influyendo en el desarrollo, polaridad y comportamiento celular.

En el caso de tejidos duros, como hueso y dentina, esta matriz se mineraliza. La formación dentinaria representa un proceso complejo, donde el odontoblasto elabora una matriz orgánica no calcificada, denominada predentina, que luego es mineralizada mediante un proceso altamente regulado y controlado por diversos factores celulares y extracelulares (Linde, 1984, 1989; Ten Cate, 1986).

El mayor componente de la matriz orgánica secretada por el odontoblasto es el colágeno tipo I (90%) y el resto consiste en moléculas de proteínas, hidratos de carbono y lípidos.

El colágeno ha sido ampliamente estudiado, asignándosele principalmente un rol estructural. Dentro de la mineralización se piensa que debe poseer un papel fundamental interactuando con otros componentes matriciales, pero esto aún no ha sido definido con exactitud (Leblond, 1989).

Los componentes no colágenos de la matriz orgánica constituyen alrededor de un 10%, encontrándose entre ellos las fosfoproteínas, las Gla-proteínas de tipo osteocalcina y del tipo Gla-proteínas matriciales (MGP), diferentes glicoproteínas acídicas, proteínas séricas y proteoglicanos (PGs). La función de estos componentes en el proceso de mineralización es explicable en virtud de sus propiedades fisicoquímicas (Boskey, 1989).

Los PGs representan el mayor porcentaje dentro de los componentes no colágenos de la predentina, es por esto que han sido objeto de diversos estudios tendientes a clarificar sus roles en el proceso de la mineralización. Sundström (1971) encontró evidencia de dos frentes de secreción diferentes de PGs sulfatados en incisivos de rata. Parece estar claro que un primer pool de secreción de PGs se llega a incorporar dentro de la dentina mineralizada rápidamente de la misma forma que las fosfoproteínas. El otro, por el contrario, permanece en la predentina por un tiempo mayor y llegará a metabolizarse al menos parcialmente (Linde, 1984).

Los PGs son moléculas grandes consistentes en una proteína central a la cual se unen varias cadenas laterales de carbohidratos (GAGs), que pueden estar sulfatadas. Estos grupos sulfatados junto con los grupos carboxílicos del ácido urónico confieren a los PGs una alta densidad de cargas negativas, lo que hace que iones cargados positivamente, como el calcio, sean atraídos

electrostáticamente a las cadenas laterales de los GAGs. Takagi y col. (1990) plantean que los PGs pueden interactuar con el calcio y mantener fosfato de calcio en un estado coloidal estable, ejerciendo un efecto inhibitorio de la mineralización del espacio periodontoblástico y de la predentina. Este efecto podría ser abolido por la disociación de los agregados de PGs por acción enzimática con remoción de GAGs. La degradación de estas grandes moléculas podría, además, proveer espacio para el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita en el frente de mineralización. La función de la fracción de PG que es incorporada rápidamente a la dentina, está menos comprendida y podría ser que estos PGs estén involucrados en la regulación del tamaño de los cristales o en alguna función relacionada.

Se ha informado que las características y contenido de PGs entre predentina y dentina difieren y también hay evidencia de la pérdida de PGs durante la mineralización, lo que podría sugerir un metabolismo de dichos componentes en el frente de mineralización.

La presencia de condroitin sulfato en dentina fue demostrado por primera vez por Pincus (1950), Stack (1951) y Hess (1952). Varios estudios histoquímicos a microscopía óptica, empleando tinciones tales como azul de toluidina, Alcian Blue y otros métodos con fierro, han descrito la presencia de GAGs en las zonas de odontoblastos, predentina y en dentina. Los PGs también han sido

estudiados a nivel ultraestructural en predentina y dentina (Goldberg, 1978) y la captación de ^{35}S -SO₄ dentro de los ésteres de azufre ha sido empleado radioautográficamente para seguir la vía de síntesis y secreción de GAGs dentro de la predentina y la dentina (Weinstock y Young, 1972).

Para el presente seminario de tesis se utilizó la técnica radioautográfica con el isótopo ^{35}S -SO₄ para marcar los componentes sulfatados de la predentina de incisivos de rata, que consisten principalmente en proteoglicanos.

El incisivo de rata es un diente de crecimiento continuo por lo que puede utilizarse como un modelo experimental para el estudio del proceso de formación dentinaria. Tiene la ventaja de poseer poblaciones celulares en distintos estados de desarrollo y maduración con sus matrices extracelulares, las que pueden ser seguidas secuencialmente a lo largo de la misma estructura (Smith y Nanci, 1989).

Se determinaron dos tiempos experimentales para procesar los animales. El primer grupo de ratas fue sacrificado a las 4 horas, tiempo en que se ha observado que los gránulos secretores que contienen colágeno y proteoglicanos son descargados en la predentina (Weinstock y Leblond, 1974; Inage y Toda, 1988). Weinstock y Young (1972) observaron la aparición de una doble banda de incorporación de ^{35}S -SO₄ a los 2 días. Sin embargo, en el grupo de 24 horas no fue posible identificar indicios de dicho hallazgo.

En cuanto a la caracterización de espesores de predentina las mediciones siguen una tendencia que confirma lo hallado en premolares humanos en desarrollo por Couve (1987). Los resultados de esta tesis muestran una disminución en el espesor de predentina en función del tiempo de un 57,8% de la región D respecto de la A; este resultado difiere en magnitud de los informados por Couve y col.(1987) en incisivos de rata, donde la disminución fue de un 84%. Esta discrepancia podría explicarse por la metodología empleada. Pensamos que los métodos morfométricos realizados a través de video análisis son más precisos que las mediciones efectuadas con ocular micrométrico directamente sobre la serie de preparaciones a microscopía óptica.

Para fines estadísticos se analizaron la totalidad de las ratas en cuanto a su respuesta de incorporación de $^{35}\text{-S04}$ a predentina y de este modo lograr pesquisar la existencia de un comportamiento grupal en relación a los tiempos de 4 y 24 horas. El primer dendograma para las 9 ratas muestra que los animales de experimentación no se agrupan en la forma esperada. Esto podría deberse a factores individuales de los animales, a diferencias en el metabolismo del radioisótopo y a pequeñas variaciones en el procesamiento de cada animal, inherentes al operador. Sin embargo, el segundo dendograma para las 4 regiones del incisivo (A, B, C y D) muestra una correspondencia ordenada entre éstas, evidenciándose que el comportamiento

de la incorporación de 35-SO4 en predentina sufre una reducción hacia la región D, dentinogénicamente terminal, en ambos tiempos experimentales. Esto se aprecia más fácilmente en la Fig. 14, donde las curvas de las 4 y 24 horas siguen un comportamiento muy parecido.

En relación a la incorporación de 35-SO4 los resultados indican que hay una disminución en la incorporación total del radioisótopo en el incisivo de rata desde la región A hacia la región D, a las 4 horas postinyección. La región A representa una zona de dentinogénesis inicial y D una zona donde la dentinogénesis primaria ha finalizado. Esto podría concordar con lo encontrado por Linde (1985), planteando una disminución considerable de GAGs a medida que se completa la dentinogénesis primaria.

Sin embargo, lo hallado a las 24 horas muestra un comportamiento no esperado, ya que la cantidad total de granos no sigue un comportamiento decreciente hacia la región D, sino por el contrario se visualiza un incremento en el número de granos en esta región con respecto a las anteriores. La cantidad de granos encontrados en odontoblastos y predentina mantiene una tendencia similar con respecto a lo hallado en el grupo de las 4 horas, no así en dentina, en donde se produjo un incremento en la marcación. Esto podría sugerir que algunos compuestos sulfatados son retenidos en la dentina en etapas terminales de la dentinogénesis y la mineralización estaría produciéndose más rápidamente en dicha región.

Dentro del análisis de los datos obtenidos se postularon dos formas de presentación de resultados.

La primera consistió en un conteo de granos abarcando 30 μm de base para cada región (A, B, C y D). En la segunda, se obtuvo el área de preentina (base por espesor de cada región), para luego proceder a calcular el número de granos en 100 μm^2 . Se planteó esta segunda forma para lograr comparar de mejor manera las regiones entre sí.

Luego del análisis de los datos obtenidos utilizando estas dos alternativas de medición, se pueden verificar diferencias notorias en el comportamiento de la incorporación de 35-S04.

Es así como el gráfico de la Fig. 15 (4 horas) muestra que la densidad de granos es mayor en A, disminuye hacia B, pero luego se estabiliza sin grandes variaciones en C y D. En el la Fig. 16 (24 horas) se observa una disminución de densidad desde la región A a C y un aumento en la región D.

Esto contrasta con los datos obtenidos en el conteo por base, donde existe disminución de la incorporación de 35-S04 desde la región A hacia D en ambos tiempos.

Al realizar el conteo de granos, ya sea por base o calculando densidad, se debe tener presente la existencia de diferencias anatómicas y funcionales para establecer comparaciones entre las regiones. Es así como en la base estudiada, difieren entre cada una de las regiones, la cantidad de odontoblastos, su estado de maduración, el

espesor de predentina, el estado de maduración dentinario, el grado de mineralización y la configuración del frente de mineralización.

Dentro de los objetivos planteados en el presente seminario, se pretendió correlacionar espesores de predentina con incorporación de $^{35}\text{S04}$ para distintos estados de desarrollo. Para ello se graficó espesor predentinario versus incorporación del radioisótopo para ambos tiempos experimentales (Fig. 17 y Fig. 18).

Ambos gráficos nos indican una disminución del espesor conjuntamente con un descenso en la incorporación de $^{35}\text{S04}$ desde la región A hacia D.

La correlación existente entre espesor e incorporación de compuestos sulfatados a los PGs en predentina podría explicarse en relación a los roles que se le han atribuido a éstos dentro de la matriz extracelular.

El mayor espesor de la región A conjuntamente con una mayor cantidad de incorporación de PGs, podría deberse a la propiedad polianiónica de estos compuestos, la que permite una mejor y mayor hidratación de la matriz. Esto generaría en A un mayor volumen a diferencia de lo que ocurre en D, donde el volumen y por lo tanto, el espesor es menor, acompañándose de una disminución de la cantidad de GAGs. Además podría relacionarse con una fibrillogénesis del colágeno más acelerada en la región D y esto unido a la disminución de los PGs, permitiría la existencia de un sustrato estructural más rápidamente mineralizable y por lo tanto un menor espesor predentinario.

ESPESOR/INCORPORACION

(4 HORAS)

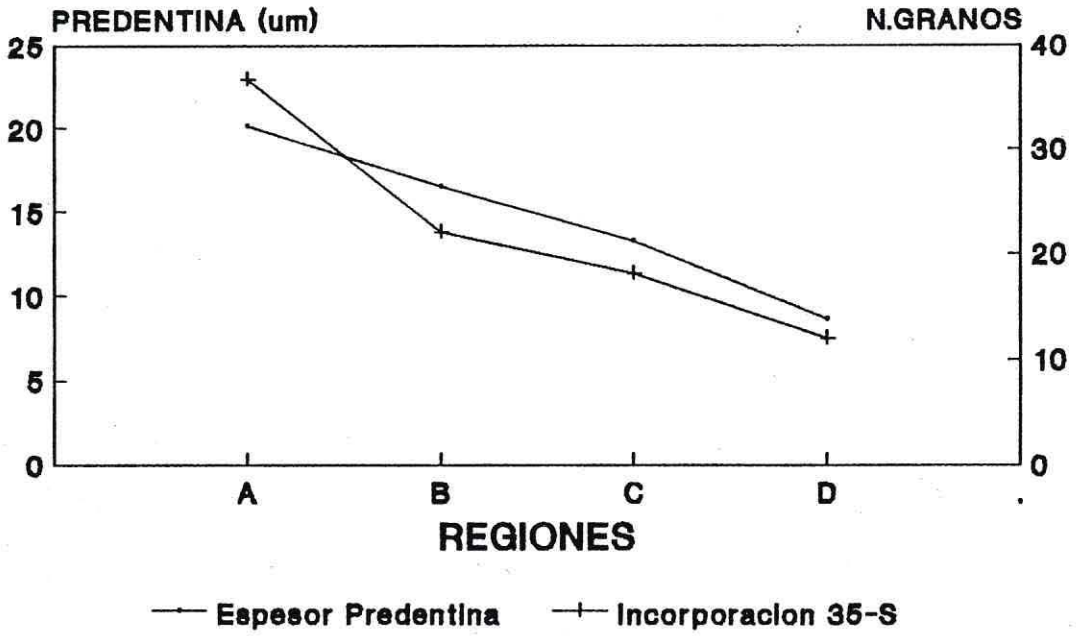


Figura 17

ESPESOR/INCORPORACION

(24 HORAS)

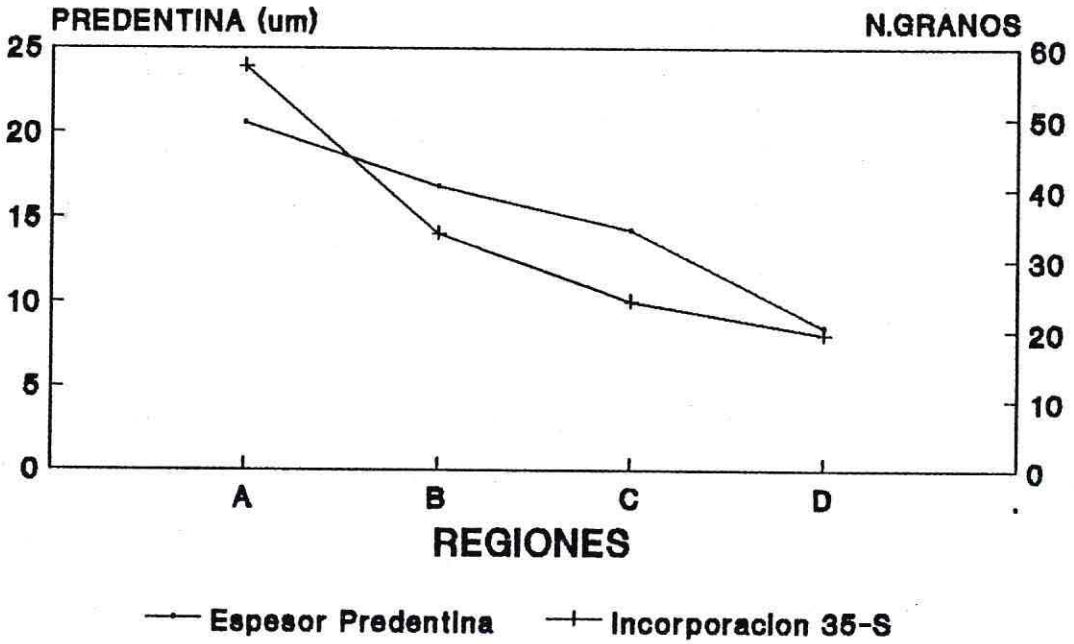


Figura 18

Beertsen y Niehof (1986) han relacionado diferencias de espesores en predentina con un cambio en la morfología de gránulos secretores entre la zona vestibular y lingual del incisivo de rata. Los gránulos de secreción en el lado lingual presentan una menor cantidad de PGs y el espesor de predentina es menor. Además se sugiere que en este lado del incisivo, la conversión de predentina a dentina podría ser más rápida y esto se relacionaría con una variación del contenido de componentes matriciales, ya sea por presencia de sustancias promotoras de mineralización, disminución de factores inhibitorios o combinación de ambos. Estas observaciones podrían ser homologables a lo que sucede en la región D, sin embargo son necesarios estudios ultraestructurales para poder caracterizar cambios en los gránulos secretores en las distintas regiones del incisivo.

En el presente estudio, se analizó la dinámica de los compuestos sulfatados en predentina y su correlación con el proceso de dentinogénesis. La variación en la incorporación de éstos en función de estado de desarrollo dentinogénico, podría indicar cambios en los estados de secreción celular.

Los múltiples roles que se le atribuyen a los PGs en relación a su influencia en la migración y diferenciación celular, mantención de estados polarizados, filtración y mineralización, entre otros, han abierto un vasto campo de investigación en el área biológica de matrices extracelulares.

CONCLUSIONES

De acuerdo a la metodología experimental empleada en el presente seminario de tesis podemos concluir que:

1.- A medida que se concreta la dentinogénesis primaria los componentes no colágenos sulfatados de predentina disminuyen. Dicho descenso podría estar representando un metabolismo más rápido de estos componentes en las zonas terminales de dentinogénesis, cambios en los gránulos secretores en las diferentes regiones del incisivo, y diferencias en el estado secretor de los odontoblastos.

2.- El espesor de predentina de incisivos de rata disminuye hacia las regiones de dentinogénesis terminal y conjuntamente decrece la incorporación de $^{35}\text{S-O}_4$. Esto podría tener relación con las funciones atribuidas a los proteoglicanos sulfatados dentro de la matriz extracelular, en cuanto a hidratación, influencia en fibrilogénesis del colágeno y en la mineralización.

3.- La dinámica en la incorporación de componentes no colágenos sulfatados a predentina, sigue un comportamiento similar en los tiempos estudiados, 4 y 24 horas, evidenciándose disminución en la marcación hacia la región incisal.

4.- Las regiones que fueron comparadas en el presente estudio tienen diferencias anatómicas y funcionales. Es así como la cantidad de células, su estado de desarrollo y de maduración, el espesor de predentina, estado de maduración dentinario y configuración del frente de mineralización, varían desde la zona apical a incisal. Por esto se requieren estudios que contemplen lo que ocurre con cada uno de ellos en forma integrada, para lograr una mejor comprensión en el proceso de la dentinogénesis.

5.- La influencia de los proteoglicanos en la diferenciación de células mesenquimáticas pulpares y su capacidad de estimular la síntesis de proteínas involucradas en la mineralización, podría utilizarse para orientar estudios experimentales en vías de crear una base cavitaria de acción biológica para recubrimiento pulpar, que hiciera posible un proceso de reparación tisular más fisiológico.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS y col. 1984. La célula (Ed. Omega) pgs. 742 - 764.
- BARTOLD, P.M. 1990. A biochemical and inmunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. J. Dent. Res. 69 (I): 7 - 19.
- BEERTSEN, W. y NIEHOF, A. 1986 Root analogue versus crown-analogue dentin: a radioautographic and ultrastructural investigation of the mouse incisor. Anat. Record. 215 : 106 - 118.
- BOSKEY, A. 1989 Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. Bone and Mineral. 6: 111 - 123.
- BOUVIER, M. , JOFFRE, A. y MAGLOIRE, H. 1990 In vitro mineralization of a three - dimensional collagen matrix by human dental pulp cells in the presence of condroitin sulphate. Archs. oral Biol. 35 : 301 - 309.
- CAMPBELL, J.H. y TERRANOVA, V.P. 1988 Laminin: molecular organization and biological function. J. Oral Pathol. 17: 309-323.
- COUVE, E. 1986 Ultraestructural changes during the life cycle of human odontoblasts. Archs. oral Biol. 31 : 643 - 651.

- COUVE, E. 1987 Changes in the predentin thickness and mineralization front configuration in developing human premolars. *Acta Anat.* 130 : 324 - 328.
- COUVE, E., GOMEZ C. y MIRANDA G. 1987 Análisis cuantitativo de los espesores de predentina como un indicador de la actividad funcional de odontoblastos en incisivos de rata. Seminario tesis. Facultad de odontología. Universidad de Valparaíso.
- CHAN, L., y WONG, Y.C., 1989 Cytochemical characterization of cuprolinic blue-stained proteoglycans in the epithelial stromal interface of the guinea pig lateral prostate. *Prostate* 14 : 133 - 145. (Medline- Abstr.).
- CHARDIN, H., SEPTIER, D. y GOLDBERG, M. 1990 Visualization of glycosaminoglycans in rat incisor predentin and dentin with cetylpyridinium chloride-glutaraldehyde as fixative. *J. Histochem. Cytochem.* 38 : 885 - 894.
- GOLDBERG, M., GENOTELLE-SEPTIER, D. y WEILL, R. 1978 Glycoprotéines et protéoglycanes dans la matrice prédentinaire et dentinaire chez le rat: une étude ultrastructurale. *Jour. Biol. Buccale.* 6 : 75 - 90.
- HAY, D. E. 1981 Extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* 91 : 205 - 220.

- HEINEGARD, D. y OLDBERG, A. 1989 Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *Faseb J.* 3 : 2042 -2051.
- HEREMANS, A., CASSIMAN, J.J., VAN-DEN-BERGHE, H. y DAVID, G. 1988 Heparan sulfate proteoglycan from the extracellular matrix of human lung fibroblasts. Isolation, purification and core protein characterization. *J. Biol. Chem.* 263: 4731 - 4739. (Medline-Abstr.).
- INAGE, T. y TODA, Y. 1988 Phosphoprotein synthesis and secretion by odontoblasts in rat incisors as revealed by electron microscopic radioautography. *Am. J. of Anat.* 182: 369 - 380.
- ITO, A., SHUDO, K., KOIDE, S., TAKAGI, J., AKAMA, H., HIRAI, J., HIRAMA, T., SAGAMI, Y., SHIMADA, T., KOBAYASHI, M. y SHIBUYA, H. 1987 Light microscopic autoradiography and ultrastructural cytochemistry of sulfated proteoglycans in degenerated chondrocytes of rat epiphyseal cartilage. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 29: 253 - 261.
- KOGAYA, Y., y FURUHASHI, K., 1987 Ultrastructural distribution of sulfated glycosaminoglycans in epithelial-mesenchymal interface of developing rat tooth germs. *J. of Histochem Cytochem.* 35 : 585 - 593. (Medline-Abstr.).

- KOGAYA, Y., y FURUHASHI, K., 1988 Ultrastructural localization of calcium in matrix vesicles and preodontoblast of developing rat molar tooth germs during initial dentinogenesis. Acta Anat. (Basel) 132: 100 - 108. (Medline-Abstr.).
- LEBLOND, C.P., 1989 Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. Anat. Record. 224 : 123- 138.
- LELONGT, B., MAKINO, H., DALECKI, T.M. y KANWAR, Y.S. 1988 Role of proteoglycans in renal development. Dev. Biol. 128 : 256 - 276. (Medline-Abstr.).
- LINDE, A. 1984 Noncollagenous proteins and proteoglycans in dentinogenesis. In : Dentin and dentinogenesis. Volume II. Linde, A., ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 56 - 92.
- LINDE, A. 1985 The extracellular matrix of dental pulp and dentin. J. Dent. Res. 64 : 523 - 529.
- LINDE, A. 1989 Dentin matrix proteins : composition and possible functions in calcification. Anat. Rec. 224 : 154 - 166.
- LORMEE, P., LECOLLE, S., SEPTIER, D., LE-DENMAT, D., y GOLDBERG, M., 1989 Autometallography for histochemical visualization of rat incisor polyanions with cuprolinic blue. J. Histochem Cytochem. 37 : 203 -208. (Medline-Abstr.).

- RABIE, A.M. y VEIS, A. 1991 An immunocytochemical study of the rocete of secretion of phosphophoryn in odontoblasts. J. Dent Res. 70 : 380 (Abstr. 918A).
- RAHEMTULLA, F., PRINCE Ch. W., BUTLER W. T., 1984 Isolation and partial characterization of proteoglycans from rat incisors. Biochem. J., 218 : 877 - 885.
- RAHIMA, M., TSAY, T.G., ANDUJAR, M., VEIS, A. 1988 Localization of phosphophoryn in rat incisor dentin using immunocytochemical techniques. J. Histochem Cytochem. 36 : 153 - 157. (Medline-Abstr.)
- RAMIREZ, F. Y DI LIBERTO M. 1990 Complex and diversified regulatory programs control the expression of vertebrate collagen genes. FASEB J. 4: 1616-1623.
- SAUREN, Y., MIEREMENT, R., GROOT, C. y SCHERFT, J. 1989 An electron microscopical study on the presence of proteoglycans in the calcified bone matrix by use of cuprolinic blue. Bone 10 : 287 - 294.
- SMITH, C. y NANJI A. 1989 A method for sampling the stages of amelogenesis on mandibular rat incisors using the molars as a reference for dissection. Anat. Rec. 225 : 257 - 266.
- SUNDSTRÖM, B. 1971 News aspects of the utilization of inorganic sulphate during dentin formation. Histochemie, 26 - 61.

- TAKAGI, M., HISHIKAWA, Y., KAGAMI, A. y RAHEMTULLA, F.
1990 Immunohistochemical localization of
glycosaminoglycans and proteoglycans in predentin and
dentin of rat incisors. J. Histochem Cytochem. 38 : 319
- 324.
- TAKUMA, S. y NAGAI, N. 1971 Ultrastructure of rat
odontoblasts in various stages of their development
and maturation. Archs oral Biol. 16 : 993 - 1011.
- TAWARA, A., VARNER, H.H. y HOLLYFIELD, J.G. 1988
Proteoglycans in the mouse interphotoreceptor matrix.
I. Histochemical studies using cuproinic blue. Exp.
Eye Res. 46 : 689 - 704. (Medline-Abstr.).
- TEN CATE, A. R. 1986 Dentinogénesis. Histologia oral,
desarrollo, estructura y función : 171 - 190.
- TZIAFAS, D., AMAR S., STAUBLI A., MEYER JM. y RUCH JV.
1988 Arch Oral Biol 33 : 735 - 740.
- VELASCO, A., HIDALGO, J., PEREZ-VILAR, J., GARCIA-
HERDUGO, G., NAVAS, P. 1988 Detection of
glycosaminoglycans in the Golgi complex of
condrcytes. Eur. J. Cell Biol. 47 : 241 - 250.
(Medline-Abstr.).
- VOLKER, W., SCHMIDT, A. y BUDDECKE, E. 1989 Cytochemical
changes in a human arterial proteoglycan related to
atherosclerosis. Atherosclerosis 77 : 117 - 130.
(Medline-Abstr.).

WEINREB, M., STEIGMAN, S., ZAJICEK, G. y MICHAELI, Y. 1985
Odontoblast turnover in the impeded and unimpeded rat
incisor derived from computerized histomorphometry.
Anat. Record. 211 : 218 - 225.

WEINSTOCK, A., WEINSTOCK, M. y LEBLOND, C. 1972
Autoradiographic detection of 3H-fucose incorporation
into glycoprotein by odontoblasts and its deposition
at the site of the calcification front in dentin.
Calc. Tiss. Res. 8 : 181 - 189.

WEINSTOCK, M. y LEBLOND, C. P. 1973 Radioautographics
visualization of the deposition of a phosphoprotein at
the mineralization front in the dentin of the rat
incisor. J. Cell. Biol. 56 : 838 - 845.

WEINSTOCK, M. y LEBLOND, C. P. 1974 Synthesis, migration,
and release of precursor collagen by odontoblasts as
visualized by radioautography after 3H - proline
administration. J. Cell. Biol. 60 : 92 - 127.

WEINSTOCK, A. y YOUNG, R. 1972 Sulphate - 35S uptake by
the golgi apparatus of odontoblasts and the migration
of label to the mineralization front of dentin. J.
Cell. Biol. 55 : (Abstr.).

YOUNG, H., YOUNG, V. y CAPLAN, A. 1989 Comparison of
fixatives for maximal retention of radiolabeled
glycoconjugates for autoradiography including use of

sodium sulfate to release unincorporated 35S - Sulfate.

J. of Histochem Cytochem. 37 : 223 - 228.

YURCHENCO, P. y SCHITTNY, J. 1990 Molecular architecture
of basement membranes. Faseb J. 4 : 1577 - 1590.

