



UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

INMUNOLocalización de Inmunoglobulina G Durante el Proceso de Adhesión Dentinaria

VANESSA ANDREA AEDO ALTAMIRANO

Tesis presentada a la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae, para
optar al título de Cirujano Dentista.

Profesor Guía: Dr. Prof. Alejandro Oyarzún Droguett

Santiago, Chile

2016

AGRADECIMIENTOS

Conforme culmina este proceso, y quisiera agradecer a todas las personas que colaboraron e hicieron posible llegar hasta esta etapa.

- A Dios por darme la oportunidad de estudiar una carrera del área de la salud y poder poner mis conocimientos al servicio de la comunidad.
- A mi madre, familia y seres queridos, por el apoyo incondicional, confianza y cariño.
- A mi querido pololo Fernando Allendes U. por creer en mí, ayudarme y apoyarme en todo momento.
- De forma especial a mi querido profesor guía Dr. Prof. Alejandro Oyarzún Droguett, por su entrega, dedicación, humildad, verdadera vocación docente, calidad humana, paciencia y compromiso para llevar cabo este proyecto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
MATERIAL Y MÉTODO.....	6
1. Selección de la muestra y procedimientos clínicos.....	6
2. Inmunodetección de IgG.....	7
3. Técnica adhesiva e histológica.....	7
RESULTADOS.....	9
DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIÓN.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	20
ANEXO I.....	25

RESUMEN

Antecedentes: La odontología adhesiva se fundamenta en la infiltración de resinas hidrofílicas entre las proteínas colágenas dentinarias para la formación de la zona híbrida y tags de resina intratubulares. Sin embargo, la interacción entre las inmunoglobulinas del fluido dentinario y los sistemas de adhesión no ha sido investigada.

Objetivo: Probar la hipótesis que existe asociación morfológica entre las inmunoglobulinas intratubulares con la superficie dentaria acondicionada “*in vivo*” y con los adhesivos dentinarios durante el proceso de hibridación de la dentina.

Materiales y métodos: Bajo consentimiento informado, se seleccionaron 10 terceros molares superiores o premolares sanos con indicación terapéutica de extracción. Luego del bloqueo anestésico, se realizaron cavidades oclusales de 3mm de profundidad, 3mm de extensión mesio-distal y 2mm de extensión vestibulo-palatino, mediante instrumental rotatorio de alta velocidad y refrigeración constante. Utilizando aislamiento relativa del campo operatorio, la dentina cavitaria se acondicionó con ácido ortofosfórico gel al 37% durante 15 segundos y se lavó con agua corriente. El exceso de humedad fue retirado mediante discos de papel filtro estéril. Luego de 5 minutos de espera, se realizaron las extracciones y los especímenes fueron fijados en metacarnoy. La dentina de cada cavidad se incubó con un anticuerpo policlonal anti-Inmunoglobulina G (IgG) humana. La reacción antígeno-anticuerpo se evidenció mediante el Sistema Biotina-Streptavidina-Peroxidasa-Diaminobencidina. Las cavidades operatorias inmunomarcadas se observaron y fotografiaron mediante microscopia estereoscópica. Posteriormente, se realizó técnica adhesiva utilizando Adper Single Bond 2 (3M) y como marcador el fluorocromo Rodamina B. Los especímenes se desmineralizaron y se incluyeron en parafina histológica. Se realizaron cortes de 6 μm de grosor los cuales fueron observados mediante microscopía de campo claro y epifluorescencia utilizando un microscopio Zeiss AxioStar.

Resultados: Se observó inmunoreacción positiva en la superficie de la dentina de la pared pulpar y paredes laterales de las cavidades operatorias. El análisis histológico demostró que la inmunoreacción se detecta en la matriz intertubular superficial y en la entrada de los túbulos dentinarios acondicionados por el ácido. Se detectó que la inmunoreacción superficial para IgG queda inmersa en el espesor del adhesivo polimerizado que conforma la zona híbrida y se asocia con la formación de tags de resina intratubulares.

Conclusión: La IgG presente en el fluido dentinario que humecta las superficies dentinarias cortadas durante los procedimientos operatorios "*in vivo*" se mantiene adherida a la matriz dentinaria acondicionada, incorporándose a la formación de la zona híbrida modulando la formación de los tags intratubulares.

Palabras clave: Inmunoglobulina G, Adhesión, Dentina, Inmunohistoquímica.

INTRODUCCIÓN

La adhesión corresponde a la atracción entre los átomos y/o moléculas de las superficies contactantes de distintos materiales. Ésta puede ser de tipo química, física, o mecánica. ⁽¹⁾ Para que dos superficies de estructuras sólidas e irregulares entren en íntimo contacto es necesario usar un material intermediario llamado adhesivo. ⁽²⁾

La adhesión dental se refiere a la unión de un material restaurador a los tejidos dentarios. En el caso de la adhesión de resinas compuestas a las superficies dentarias se hace necesario el uso de un adhesivo. ^(1, 3)

Los adhesivos dentales forman parte de Sistemas de Adhesión que involucran a un acondicionador ácido y a un agente imprimante o promotor de adhesión. ^(1, 4) Estos sistemas deben cumplir ciertos requisitos como biocompatibilidad, alta fuerza de unión, de fácil manipulación, entre otros. ⁽¹⁾

Los Sistemas Adhesivos se pueden clasificar según su estrategia de adhesión en adhesivos de grabado y lavado y adhesivos de autograbado. Los adhesivos de grabado y lavado, utilizan un ácido como acondicionador, el que es lavado, seguido por la aplicación del agente imprimante y del adhesivo de resina, resultando en una técnica de tres etapas. Estas etapas pueden simplificarse en dos, según la combinación del imprimante y el adhesivo en un solo frasco. Los adhesivos de autograbado no realizan el lavado del acondicionador, ya que es aplicado conjunto al agente imprimante. ^(1, 5, 6)

Los agentes promotores de adhesión son biomateriales compuestos por monómeros con grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que permiten la entrada y mejor difusión de los monómeros hidrofóbicos constituyentes del adhesivo dentro de la matriz dentinaria desmineralizada. ^(1,4) El agente promotor de adhesión 2-hidroximetilmetacrilato (HEMA) es la molécula más utilizada y corresponde a un

derivado del metilmetacrilato donde el grupo carboxilo es esterificado por el etanol, haciéndolo una molécula muy hidrofílica mejorando la difusión en el sustrato dentinario aumentando los valores de fuerza de adhesión. ^(7, 8)

Los fundamentos estructurales de la adhesión de biomateriales a la dentina están determinados por la infiltración de agentes promotores de adhesión y adhesivos entre la fibrillas colágenas de la dentina intertubular para formar la denominada capa o zona híbrida.⁽³⁾ Una estructura adicional que acompaña la formación de esta zona híbrida son los tags de resina en el interior de los túbulos dentinarios. ^(1, 9)

La dentina es un tejido conectivo mineralizado, y está constituida por un 70% de fase mineral, 20% de fase orgánica y 10% de agua del total de la estructura dentinaria. ^(1, 10, 11) La matriz orgánica está formada principalmente por colágeno tipo I, también se han observado proteínas no colágenas tales como, osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea, fosfoproteína, sialoproteína dentinaria. El proteoglicano decorina y su cadena lateral del glicosaminoglicano condroitín-4-sulfato se expresa en el interior de los túbulos dentinarios de la dentina circumpulpar. ^(12,13)

La dentina morfológicamente está constituida por túbulos, los que delimitan la matriz intertubular. En el interior de éstos es posible observar áreas hipermineralizadas que disminuyen el diámetro tubular.⁽¹¹⁾ Esta área hipermineralizada corresponde a la dentina intratubular.^(10,11,14,15) Estos túbulos permiten mantener una íntima relación entre la dentina y la pulpa dental debido a la presencia de los procesos odontoblásticos, los que corresponden a proyecciones celulares provenientes de los odontoblastos pulpares.^(15,16)

Los túbulos dentinarios contienen un fluido que corresponde a un transudado proveniente de la pulpa dental,⁽¹⁷⁾ la que mantiene una leve pero constante presión sobre éste. Se estima que la presión intrapulpar es de 25 hasta 30mm Hg. ^(18,19)

En condiciones de normalidad, la composición del fluido está controlada por los odontoblastos, sin embargo, cuando ocurre alguna alteración puede cambiar la constitución del fluido, ⁽²⁰⁾ el que se hace más similar al plasma sanguíneo procedente de los vasos pulpares. ⁽²¹⁾ El desplazamiento de este fluido dentinario suele estar aumentado cuando los túbulos quedan expuestos por caries, fracturas, preparaciones cavitarias y grabado ácido. ⁽²²⁾

Al interior de los túbulos, el fluido dentinario tanto en condiciones normales como en tejido cariado, presenta electrolitos, albúmina, fibrinógeno e inmunoglobulinas (Igs) entre otras macromoléculas. ^(11, 23-26)

Las Igs son una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, sintetizadas por los linfocitos B y están presentes en el suero y fluidos tisulares. ⁽²⁷⁾ La unidad estructural básica está dada por un monómero glicoprotéico formado por cadenas H (heavy) y L (light). Dentro de su estructura destaca la región de unión a antígeno que le permite actuar como anticuerpo y participar de la respuesta inmune. ^(27, 28)

Estudios han identificado el rol protector de las Igs en la dentina. Se ha descrito su presencia tanto en tejido sano como bajo lesiones cariosas, asumiendo una función defensiva. ^(23, 29, 30) En investigaciones con técnicas inmunohistológicas y microradiográficas se han detectado Igs en los túbulos dentinarios bajo la zona translúcida en caries dentinarias, mientras que la reacción fue mínima en dentina sana. ⁽³¹⁾ Otros autores señalan que las Igs junto a otras proteínas séricas se encuentran presentes en dentina no solo como respuesta a la caries dental, sino también como respuesta a otros estímulos nocivos como atrición y abrasión. ⁽²³⁾

Se ha sugerido que la distribución de las Igs es dinámica durante el avance de la lesión cariosa. En estado incipiente, aun no cavitado, se ubican en la zona odontoblástica de la pulpa. Luego se ubicarían en el tercio interno de los túbulos dentinarios. Una vez comprometida la integridad del diente, se localizan

inmediatamente bajo la lesión. ⁽³¹⁻³³⁾ En estados incipientes las Igs provendrían de la pulpa, sin embargo, en estados posteriores podrían ser aportadas también por la saliva. ^(30, 31, 34, 35)

La IgG, IgA, IgM, IgD e IgE son las inmunoglobulinas descritas en los mamíferos. ⁽²⁶⁾ En la pulpa dental y en la dentina se ha detectado la presencia de IgG, IgA e IgM. ^(23, 25, 36-39) Evaluando la concentración de proteínas séricas presentes en dentina; se encontró que la IgG era la proteína plasmática más abundante (0,790 µg/ 15 min). ⁽²⁵⁾

Los fundamentos estructurales de la odontología adhesiva en dentina, se basan en la infiltración de resinas hidrofílicas en la matriz orgánica intertubular desmineralizada, principalmente colágena, para conformar la zona híbrida. La penetración de los adhesivos en los túbulos dentinarios, determinan la formación de los tags de resina. ⁽¹⁻⁵⁾ En la literatura odontológica no existen estudio que evalúen la participación y los niveles de interacción de proteínas plasmáticas en la formación de la zona híbrida y tags de resina.

La investigación de la interacción a nivel morfológico de las Igs intratubulares con la dentina acondicionada *in vivo* y con la formación de la zona híbrida durante el proceso de adhesión permitirá aportar al conocimiento general del rol de la respuesta inmune humoral específica durante la realización de preparaciones cavitarias en odontología restauradora. Por otra parte, este conocimiento aportaría a esclarecer el rol de la respuesta inmune humoral específica durante la adhesión de biomateriales adhesivos a la superficie de la dentina acondicionada *in vivo*.

HIPÓTESIS

Existe asociación morfológica entre las inmunoglobulinas intratubulares con la superficie dentaria acondicionada *in vivo* y con los adhesivos dentinarios durante el proceso de hibridización de la dentina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar que existe asociación morfológica entre las inmunoglobulinas intratubulares con la superficie dentaria acondicionada *in vivo* y con los adhesivos dentinarios durante el proceso de hibridización de la dentina.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Detectar la presencia de IgG en la dentina circumpulpar superficial de preparaciones cavitarias realizadas y acondicionadas *in vivo*.
2. Identificar la presencia de IgG en relación con el adhesivo polimerizado, la formación de la zona híbrida y los tags intratubulares durante el proceso de hibridización de la dentina.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Selección de la muestra y procedimientos clínicos

Se seleccionaron 10 terceros molares superiores o premolares sanos, libres de caries, sin compromiso pulpar, con indicación terapéutica de extracción y evidencia radiográfica de formación radicular completa.

El intervalo de edad de los individuos será entre 18 y 21 años. Se solicitó el consentimiento informado estándar de cada uno de los pacientes (Anexo I).

Luego del bloqueo anestésico, se realizaron cavidades oclusales de 3mm de profundidad, 3 mm de extensión mesio-distal y 2mm de extensión vestibulo-palatino, mediante instrumental rotatorio de alta velocidad (NSK, Kyoto, Japan) y refrigeración constante con fresa redonda de diamante (nº 010 SS White, New Jersey, USA).

Utilizando aislación relativa del campo operatorio, la dentina cavitaria fue acondicionada con ácido ortofosfórico gel al 37% (3M, St Paul, MN, USA) durante 15 segundos y se lavó profusamente con agua corriente. El exceso de humedad fue retirado utilizando discos de papel filtro estéril (Whatman, London, England).

Luego de 5 minutos de espera, se realizaron las extracciones dentales y los especímenes fueron fijados inmediatamente en Metacarnoy (Merck, Darmstadt, Germany).

2. Inmunodetección de inmunoglobulina G.

La cavidad operatoria se trató con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 min para bloquear la peroxidasa endógena. Los sitios inespecíficos se bloquearon con suero de cabra no inmune al 5% durante 30 min. Posteriormente la dentina de cada cavidad se incubó con un anticuerpo policlonal anti-Inmunoglobulina G humana (A423 DAKO) (Glostrup, Denmark) diluido 1:100 en buffer fosfato salino (PBS) - albúmina de suero bovino (BSA) al 3%.

Las cavidades se lavaron profusamente con PBS y se incubaron en un anticuerpo secundario biotinilado (VECTASTAIN® Kit, Vector Burlingame, CA USA) durante 15 minutos. Posteriormente, luego de un profuso lavado en PBS los cortes se incubaron en estreptavidina conjugada con peroxidasa. La reacción antígeno-anticuerpo se evidenció morfológicamente con diaminobenzidina al 0,3% en peróxido de hidrógeno al 0,01%.

Como control, en dos cavidades operatorias el anticuerpo primario se reemplazó por suero de cabra no inmune.

La reacción antígeno-anticuerpo se observó macroscópicamente en las preparaciones cavitarias en un microscopio estéreo Nikon SMZ-800 y se fotografiaron mediante cámara digital Nikon DS-Fi1. Las imágenes se guardaron como archivo JPEG.

3. Técnica Adhesiva e Histológica.

Se realizó técnica adhesiva (wet bonding technique) ⁽⁵⁾ utilizando el adhesivo Adper Single Bond 2 (3M St. Paul, MN, USA) marcado con el fluorocromo Rodamina B (Sigma-Aldrich, USA) en una concentración de 1mg/ml.⁽⁴⁰⁾

Los especímenes se desmineralizaron en ácido fórmico al 10%, se deshidrataron en etanoles de concentración ascendente, se transparentaron en xilol y se incluyeron en parafina histológica a 60° centígrados.

Se realizaron cortes de 6 μm de grosor los que fueron montados sobre portaobjetos silanizados. Los cortes, luego de ser desparafinados se analizaron mediante microscopía de campo claro y epifluorescencia utilizando un microscopio Zeiss AxioStar (Zeiss, Jena, Germany). Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara digital enfriada QImaging Micropublisher 3.3 RTV.

Las imágenes obtenidas fueron procesadas digitalmente para estudio de colocalización de la inmunoreacción con el adhesivo dentinario utilizando el software Matrox Inspector 4.0 (Matrox Electronic Systems Ltd., Quebec, Canadá).

RESULTADOS

En los especímenes experimentales se observó macroscópicamente una inmunoreacción positiva, de color café en la superficie dentinaria de la pared pulpar y paredes laterales de las cavidades operatorias. (Figura 1a)

En los especímenes control no se evidencio inmunopositividad en las paredes dentinarias de las preparaciones operatorias. (Figura 1b)

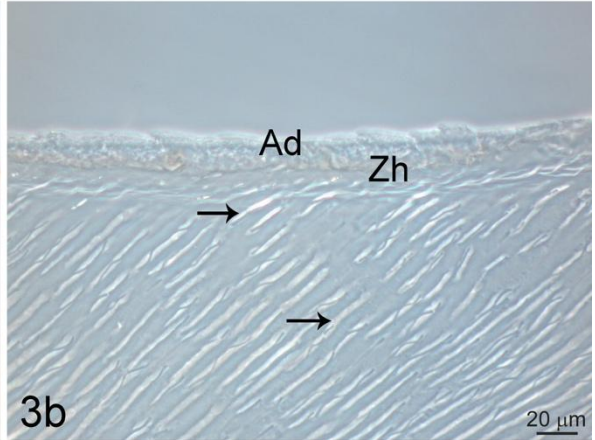
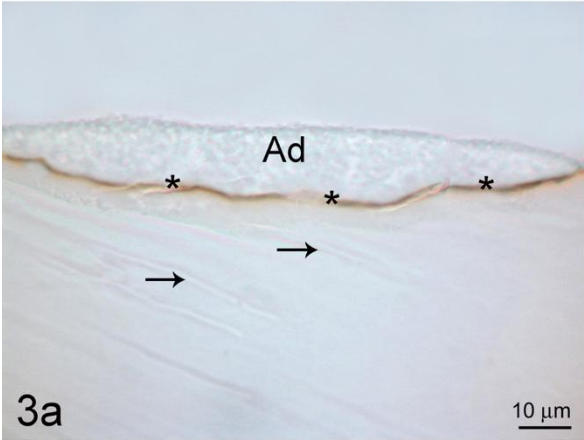
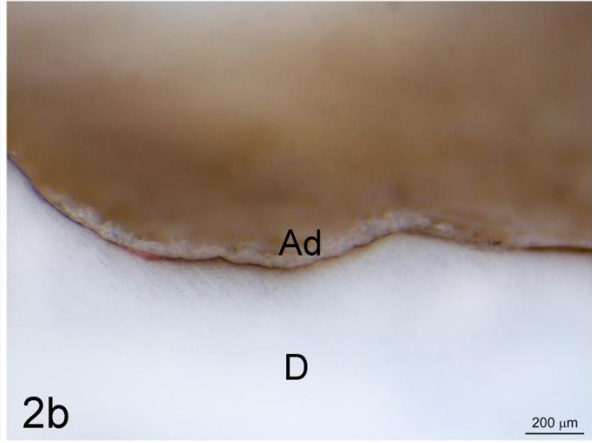
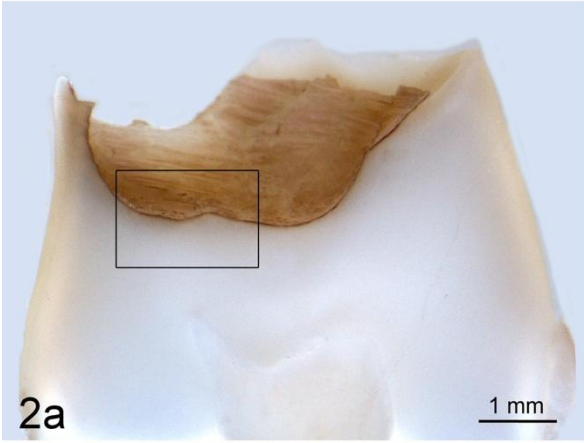
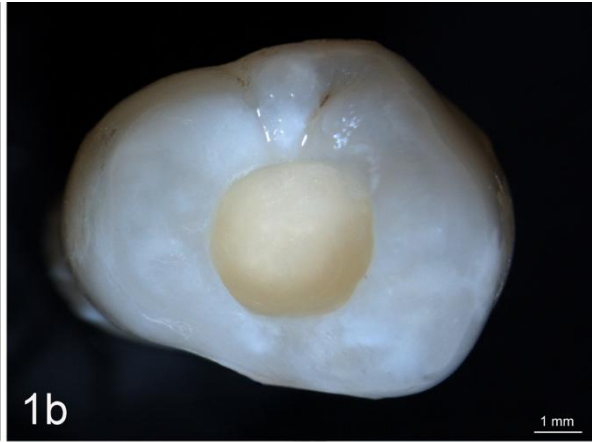
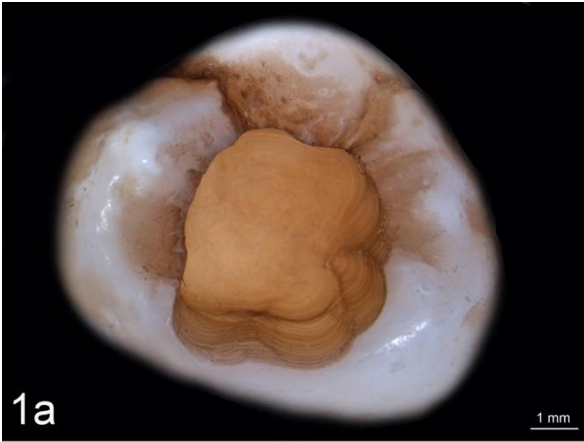
Macroscópicamente, se observó en cortes longitudinales de los especímenes desmineralizados, que la inmunoreacción positiva se circunscribe solo a la superficie externa de la dentina en contacto con el adhesivo polimerizado. (Figuras 2a y 2b)

El análisis histológico en cortes de 6 μm de espesor permite corroborar que la inmunoreacción positiva se relaciona con la matriz intertubular de la dentina expuesta y con la salida de los túbulos dentinarios. (Figuras 3a y 3b)

La colocación del adhesivo y la inmunoreacción nos permite observar con nitidez que las inmunoglobulinas dentinarias se asocian directamente con el adhesivo fotopolimerizado adherido a la superficie dentinaria. (Figuras 4a, 4b y 5a)

Cuando los cortes de 6 μm de especímenes experimentales y control se tiñen histoquímicamente mediante azul de toluidina se observa una zona híbrida regularmente estructurada y sobre esta se detecta la presencia de un material granular teñido intensamente en la interfase zona híbrida-adhesivo polimerizado. (Figura 5b)

En los especímenes control positivo se observa una evidente inmunoreacción en el interior de todos los túbulos dentinarios de la dentina circumpulpar y predentina y en las muestras control negativo, los tejidos mostrados no presentan inmunomarcación. (Figuras 6a y 6b)



Leyenda de Figuras

Lámina 1

Figura 1a

Espécimen experimental. Anti-inmunoglobulina G.

Nótese inmunoreacción positiva de color café en las paredes dentinarias de la cavidad operatoria y en algunas zonas del esmalte dental.

Figura 1b

Espécimen control. Suero no inmune.

En esta fotografía macroscópica no se detecta inmunomarcación para los anticuerpos utilizados ni en las paredes de dentina cavitaria, ni en el esmalte dental.

Figura 2a

Espécimen experimental. Anti-inmunoglobulina G.

Obsérvese en el espécimen experimental desmineralizado y cortado en el plano longitudinal la inmunoreacción positiva de color café en el plano de corte mostrado.

Figura 2b

Espécimen experimental. Anti-inmunoglobulina G.

Se observa en la fotografía un mayor aumento de la zona demarcada por un rectángulo en la figura 2a. Se destaca inmunoreacción positiva en la superficie dentinaria en contacto con el adhesivo. Ad: adhesivo; D: dentina.

Figura 3a

Espécimen experimental. Anti-inmunoglobulina G.

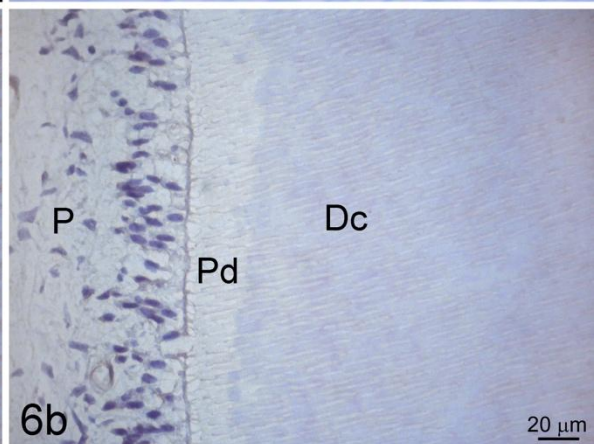
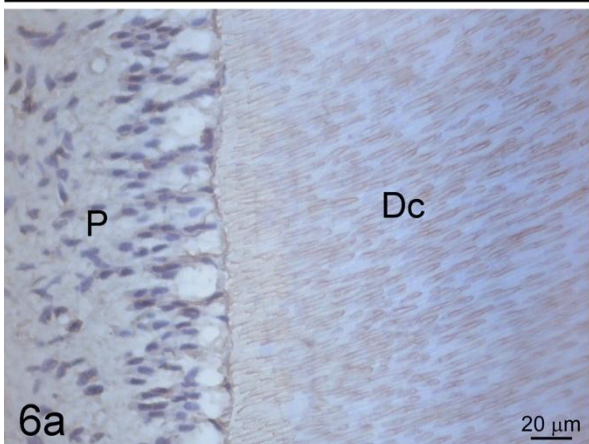
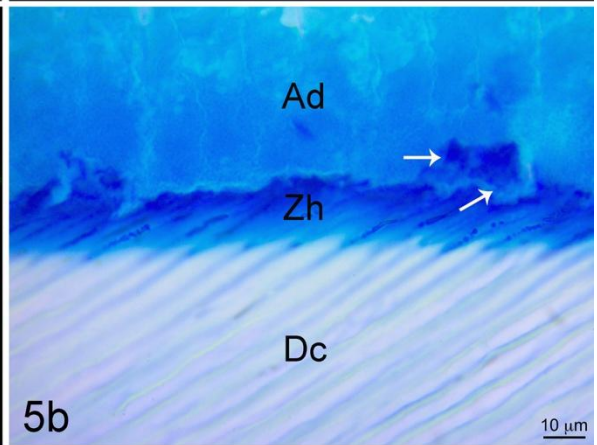
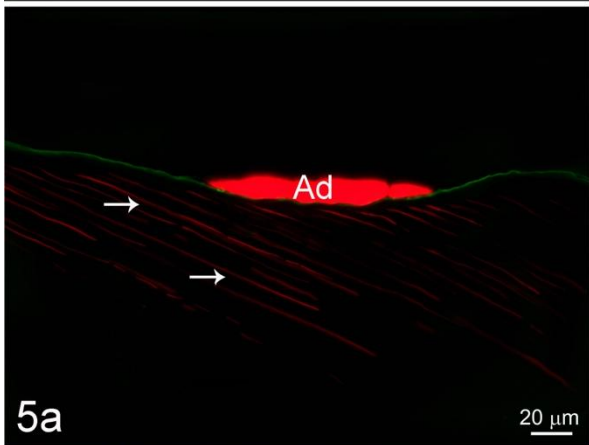
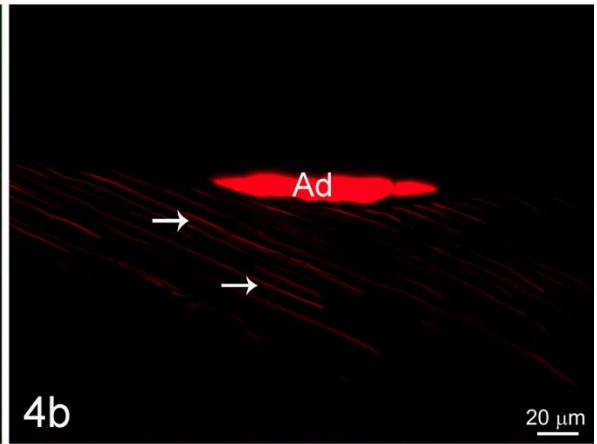
Con un aumento microscópico mayor se observa que las IgG (asteriscos) están depositadas sobre el piso cavitario de dentina circumpulpar. Obsérvese la presencia de túbulos dentinarios (flechas) negativos a la inmunoreacción. Ad:

adhesivo

Figura 3b

Espécimen experimental. Anti-inmunoglobulina G.

Mediante microscopia de contraste de fases se detecta la presencia de una inmunoreacción positiva en la interfase adhesivo (Ad) - Zona híbrida (Zh). Flechas: túbulos dentinarios.



Leyenda de Figuras

Lámina 2

Figura 4a

Espécimen experimental. Anti-inmunoglobulina G.

Se observa en esta fotografía obtenida con microscopia de fluorescencia una capa de IgG (flecha) de color verde localizada sobre el piso cavitario.

Figura 4b

Espécimen experimental. Anti-inmunoglobulina G.

Nótese el adhesivo de un color rojo intenso y como éste infiltra los túbulos dentinarios conformando tags de resina intratubulares (flechas). Ad: adhesivo.

Figura 5a

Espécimen experimental. Anti-inmunoglobulina G.

La sobreposición digital de imágenes permite observar como la IgG se relaciona directamente con el adhesivo fluorescente y con los tags de resina (flechas). Ad: adhesivo.

Figura 5b

Tinción Azul de Toluidina.

En esta fotografía con alto aumento se distingue que el adhesivo infiltra la dentina intertubular acondicionada para conformar la zona híbrida. Sobre la

superficie de la zona híbrida se detecta un material granular sin una forma definida y que en algunos sectores puede apreciarse desvinculado de la superficie dentinaria (flechas). Ad: adhesivo; Zh: zona híbrida; Dc: dentina circumpulpar.

Figura 6a

Control positivo.

Obsérvese la evidente inmunoreacción positiva de color café-amarillento en el interior de los túbulos dentinarios, en la predentina y en células de la pulpa dental. Dc: dentina circumpulpar; P: pulpa.

Figura 6b

Control negativo.

No se detecta inmunomarcación de la IgG en los tejidos mostrados. P: pulpa; Pd: predentina; Dc: dentina circumpulpar.

DISCUSIÓN

Este estudio se relaciona con la localización inmunohistoquímica de IgG, presente en el fluido dentinario, sobre la superficie de la dentina expuesta durante la realización de cavitarias operatorias.

El uso de preparaciones cavitarias para el estudio de la composición del fluido dentinario se ha documentado en varios estudios. Esta acción, ha permitido determinar que en la dentina expuesta *in vivo*, existe un flujo de fluido dentinario continuo que es liberado desde el tejido pulpar hacia la superficie. ^(25,41)

En el año 2004, Kerdvongbundit *y col.*⁽⁴¹⁾ localizaron morfológicamente mediante microscopia electrónica de barrido, gotas de fluido dentinario en la salida de cada túbulo dentinario cortado, las que tienden a coalescer. Para esto se realizaron cavidades operatorias en dientes sanos en donde la dentina expuesta se acondicionó con ácido fosfórico al 35%. Los especímenes mostraron que luego de 5 minutos se observa la acumulación de fluido sobre la dentina grabada. Esta evidencia entrega información precisa respecto a la acumulación de fluido dentinario en la superficie de cavidades operatorias acondicionadas.

Desde un punto de vista macroscópico, los factores importantes que afectan a la adsorción de proteínas son la estabilidad estructural de la proteína y las propiedades hidrófilas/hidrófobas de la superficie. ⁽⁴²⁾

Las proteínas con una estabilidad interna baja, las llamados proteínas "soft", tales como albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de suero humano (HSA), inmunoglobulina (IgG), en general tienden a adsorberse en todas las superficies independientemente de las interacciones electrostáticas. Por lo tanto, las proteína soft se adsorben incluso en una superficie electrostáticamente repelente. Tras la adsorción sobre las superficies hidrófobas, estas proteínas cambian su conformación tridimensional. ⁽⁴²⁾

Se ha descrito que las proteínas adsorbidas sobre superficies sólidas forman algunas configuraciones específicas a través de diversas interacciones, tales como interacciones hidrófobas y electrostáticas. Se han reportado interacciones hidrófobas para desempeñar un papel importante en la adsorción de proteínas, ya que contribuyen de manera significativa a las interacciones proteína/sustrato.⁽⁴²⁾

Las proteínas pueden tener pequeñas regiones peptídicas, que interactúan directamente con las superficies sólidas. La composición aminoácidica y/o secuencias de las regiones peptídicas pueden ser determinantes para el comportamiento de la adsorción de proteínas sobre superficies sólidas.⁽⁴²⁾

Los mecanismos por los cuales la IgG se adsorbe a la superficie de la dentina acondicionada por ácido ortofosfórico durante el proceso de adhesión no ha sido documentado.

En un estudio realizado en el año 1983, Pashley y *col.*⁽⁴³⁾ determinaron que la permeabilidad dentinaria era 5 veces mayor en cavidades acondicionadas *in vivo* con ácido cítrico al 6% por 2 minutos. Se demostró además que la dentina grabada con ácido fosfórico mostró un aumento significativo en la permeabilidad de fluido,⁽⁴⁴⁾ lo cual se manifiesta a nivel del piso cavitario como esferas en la salida de cada túbulo dentinario, mientras que en la dentina sin grabar se mostraban gotas de fluido de menor diámetro respecto a la dentina grabada.⁽⁴¹⁾

De todas las proteínas plasmáticas e inmunoglobulinas presentes en el fluido dentinario, la IgG es la más abundante, cuya concentración fluctúa entre 0,7 a 90 microgramos, los cuales emergen de una cavidad operatoria cada 15 minutos.⁽²⁵⁾

Utilizando este modelo, en este estudio se realizaron preparaciones cavitarias de acuerdo con protocolos clínicos establecidos para el estudio de la distribución de IgG de origen pulpar luego de acondicionar la dentina cavitaria *in vivo*.

Luego de la extracción de los especímenes y de la inmunolocalización de IgG *ex vivo* se determina que esta macromolécula se expresa inmunohistoquímicamente sobre las paredes pulpar y laterales de la cavidad operatoria.

La localización morfológica *ex vivo* de moléculas de fluido dentinario sobre la superficie de la dentina acondicionada *in vivo* no ha sido documentada. Esta situación no permite contrastar nuestros hallazgos con reportes preexistentes. Sin embargo, este trabajo coincide parcialmente con estudios inmunohistológicos anteriores ^(38, 39) en los cuales se determinó la presencia de IgG en el interior de los túbulos dentinarios en zonas de dentina sana, independientemente de la presencia de un sistema adhesivo.

Los fundamentos estructurales de la odontología adhesiva se basan en la infiltración de resinas hidrofílicas en la matriz orgánica colágena intertubular para la formación de la zona híbrida y la formación de tags de resina. ⁽¹⁻⁵⁾ Sin embargo, la participación de las Igs de los túbulos dentinarios en este proceso no había sido investigada. Este estudio constituye el primer reporte en el cual se relaciona la IgG con el proceso de adhesión.

Este estudio permite comprobar la hipótesis que existe asociación morfológica entre las inmunoglobulinas del fluido dentinario con la superficie dentaria acondicionada *in vivo* y con los adhesivos dentinarios durante el proceso de hibridización de la dentina. Ésta aseveración se sustenta en que las inmunoglobulinas se detectaron depositadas sobre la dentina acondicionada e interaccionan microscópicamente con el adhesivo dentinario y con la superficie de la zona híbrida.

CONCLUSIÓN

La IgG de origen pulpar se deposita sobre la superficie dentinaria acondicionada e interacciona morfológicamente con el adhesivo utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH, Robinson SJ. Current concepts on adhesion to dentin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(3):306-335.
2. Buonocore M. Principles of adhesive retention and adhesive restorative materials. *J Am Dent Assoc.* 1963 Sep; 67:382-391.
3. Ruyter IE. The chemistry of adhesives agents. *Oper Dent.* 1992; Supplement 5:32-43.
4. Pashley D, Horner J, Brewer P. Interaction of conditioners on the dentin surface. *Oper Dent.* 1992; Supplement 5:137-150.
5. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *J Dent Res.* 2005; 84(2):118-132.
6. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lectura "Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges". *Oper Dent.* 2003; 28(3):215-235.
7. Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater.* 1992 Mar; 8(2):125-130.
8. Doi J, Itota T, Tori Y, Nakabo S, Yoshima M. Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate pre-treatment on micro-tensile bond strength of resin composite to demineralized dentin. *J Oral Rehab.* 2004 Nov; 31(11):1061-1067.
9. Loguercio AD, Reis A, Bortoli G, Patzlaft R, Kenshima S, Rodrigues LE, et al. Influence of adhesive systems on interfacial dentin gap formation *in vitro*. *Oper*

- Dent. 2006; 31(4):431-441.
10. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(5):679728.
 11. Goldberg M, Septier D, Lecolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, et al. Dental mineralization. *Int J dev Biol.* 1995; 39:93-110.
 12. Emberyl G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(4):331-349.
 13. Yoshida N, Yoshida K, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of the small proteoglycan decorin in human teeth. *Archs Oral Biol.* 1996; 41(4):351-357.
 14. Thomas HF. The dentin-predentin complex and its permeability: Anatomical overview. *J Dent Res.* 1985; 64:507-612.
 15. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7(2):104-133.
 16. Thomas HF, Carella P. Correlation of scanning and transmission electron microscopy of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol.* 1984; 29:641-646.
 17. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(2):117-183.
 18. Bishop M.A. Extracellular fluid movement in the pulp; the Pulp/Dentin permeability barrier. *Proc Finn Dent Soc.* 1992; 88(1 Suppl):331–335.
 19. Terkla LG, Brown AC, Hainish AP, Mitchem JC. Testing sealing properties of restorative materials against moist dentin. *J Dent Res.* 1987; 66:1758-1764.

20. Turner DF, Marfurt CF, Sattelberg C. Demonstration of physiological barrier between pulpal odontoblasts and its perturbation following routine restorative procedures: A horseradish peroxidase tracing study in the rat. *J Dent Res.* 1989; 68: 262-1268.
21. Matita E, Simpson MD, Tao L, Pashley DH. Fluid and protein flux across the pulpodentine complex of the dog, *in vivo*. *Arch Oral Biol.* 1991; 36:103-110.
22. Trowbridge HO. Preventive Endodontics: Protecting the Pulp. In: Principles and Practice of Endodontics. Philadelphia: W.B. Saunders; 1989. pp. 337-339
23. Okamura K, Maeda M, Nishikawa T, Tsutsui M. Dentinal response against carious invasion: Localization of antibodies in odontoblastic body and process. *J Dent Res.* 1980; 59(8):1368-1273.
24. Okamura K, Tsubakimoto K, Uobe K, Nishida K, Tsutsui M. Serum proteins and secretory component in human carious dentin. *J Dent Res.* 1979; 58(3):1127-1133.
25. Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G. Determination of Plasma Proteins in Dentinal Fluid from Cavities Prepared in Healthy Young Human Teeth. *Arch Oral Biol.* 1994; 39:185-190.
26. Ozok AR, Wu MK, Ten Cate JM, Wesselink PR. Effect of Dentinal Fluid Composition on Dentin Demineralization *in vitro*. *J Dent Res.* 2004; 83(11):849-853.
27. Martin NH. The immunoglobulins: A review. *J Clin Pathol.* 1969; 22:117-131.
28. Porter RR. The structure of heavy chain of immunoglobulin and its

relevance to the nature of the antibody-combining site. The second CIBA Medical Lecture. *Biochem J.* 1967 Nov; 105(2):417-426.

29. Hahn CL, Overton B. The effects of immunoglobulins on the connective permeability of human dentine *in Vitro*. *Arch Oral Biol.* 1997; 42(2):835-843.
30. Love RM. The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17(1):32-37.
31. Okakura K. Histological study on the origin of dentinal immunoglobulins and the change in their localization during caries. *J Oral Path.* 1985;14(9):680-689.
32. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod.* 2007 Jun; 33(6):643-651.
33. Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res.* 2002 Aug; 36(4):223-232.
34. Sumitani M, Takeuchi H, Shimahara T, Tsubakimoto K, Tsutsui M. Salivary, serum and microbial component in human carious dentin. *J Dent Res.* 1972; 58(3):1127-1133.
35. Hahn CL, Best AM. The pulpal origin of immunoglobulins in dentin beneath caries: An immunohistochemical study. *J Endod.* 2006; 32(3):178-182.
36. Honjo H, Tsubakimoto K, Utsumi N, Tsutsui M. Localization of plasma proteins in the human dental pulp. *J Dent Res.* 1970; 49(4):888.
37. Pulver W, Taubman M, Smith D. Immune components in normal and inflamed human dental pulp. *Arch Oral Biol.* 1977; 22(2):103-111.

38. Thomas M, Leaver AG. Identificarion and estimation of plasma proteins in human dentine. Archs Oral Biol. 1975; 20:217-218.
39. Ackermans F, Klein JP, Krank RM. Ultrastructural localization of immunoglobulins in carious human dentine. Archs Oral Biol. 1981; 26:879-886.
40. Bitter K, Paris S, Martus P, Schartner R, Kielbassa AM. A confocal laser scanning microscope investigation of different dental adhesives bonded to root canal dentine. Int Endod J. 2004; 37(12):8-840.
41. Kerdvongbundit V, Thiradilok S, Vongsavan N, Matthews B. The use of the replica technique to record fluid emerging from exposed dentine. Arch Oral Biol. 2004 Jan 14; 49:613-619.
42. Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. J Biosci Bioeng. 2001 Jan 9; 91(3):233-244.
43. Pashley DH, Kepler EE, Williams EC, Okabe A. The effects of acid etching on the *in vivo* permeability of dentine in the dog. Archs Oral Biol. 1983; 28(7):555-559.
44. Banomyong D, Palamara JEA, Burrow MF, Messer HH. Effect of dentin conditioning on dentin permeability and micro-shear bond strength. Eur J Oral Sci. 2007; 115: 502-509.

ANEXO I

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del Estudio: “Inmunolocalización de Inmunoglobulina G durante el proceso de adhesión dentinaria”

Investigador Responsable: Vanessa Aedo Altamirano
e-mail: vane-alt@hotmail.com

Profesor Guía de la Tesis: Prof. Dr. Alejandro Oyarzún D.

Facultad:
Facultad de Odontología, Universidad FinisTerraе

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar o no en una investigación, y, para autorizar el uso de información personal.

Lea cuidadosamente este documento, puede hacer todas las preguntas que necesite al investigador y tomarse el tiempo necesario para decidir.

Usted ha sido invitado/a a participar de este proyecto de investigación que se realizará en la clínica odontológica de la Universidad Finis Terraе, el cual tiene una finalidad científica odontológica.

El objetivo de este estudio es ver la relación que existe entre proteínas normales de sus dientes con algunos materiales usados para hacer restauraciones dentales.

El procedimiento a llevar a cabo para esta investigación, consiste en lo siguiente:

Bajo indicación terapéutica de extracción de terceros molares superiores o premolares y tras ser anestesiado, se le realizará una cavidad oclusal que será acondicionada con ácido ortofosfórico gel al 37% durante 15 segundos y se lavará profusamente con agua corriente. Luego de 5 minutos de espera, se realizará la extracción.

Este procedimiento no implica costos ni riesgos de ningún tipo para usted, pudiendo negarse a la participación si así lo amerita conveniente.

Los datos obtenidos en esta investigación serán analizados e incluidos en la tesis de grado, para optar al título de Cirujano Dentista, resguardando su identidad y datos personales.

Usted no se beneficiará directamente por participar en esta investigación de salud, sin embargo, la información que se obtendrá gracias a su participación será de utilidad para conocer más acerca de las interacciones a nivel morfológico de las Igs intratubulares con la dentina acondicionada *in vivo* y con la formación de la zona híbrida durante el proceso de adhesión.

Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su identidad no será publicada.

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria.

Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento y retirarse de esta investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución y no se verá afectada la calidad de la atención de salud que merece.

Si usted retira su consentimiento, la información obtenida no será utilizada en esta investigación.

Si tiene preguntas acerca de esta investigación Odontológica puede contactar o llamar al Prof. Dr. Alejandro Oyarzún, Investigador Responsable del estudio, al teléfono 22 4207302.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad Finis Terrae. Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede escribir al correo electrónico: cec@uft.cl del Comité Ético Científico, para que el presidente, Dr. Patricio Ventura-Juncá lo derive a la persona más adecuada y de respuesta a sus requerimientos.

Declaración de consentimiento:

Se me ha explicado y comprendo el propósito de esta investigación, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee.

Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado/forzada a hacerlo.

No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.

Se me comunicará de toda nueva información relacionada con el estudio que surja durante la investigación y que pueda tener importancia directa para mí.

Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación en esta investigación según mi parecer y en cualquier momento que lo desee.

Firma Participante

Nombre:

Fecha:

Firma Investigador

Nombre:

Fecha:

Firma Director Institución

Nombre:

Fecha: