



UNIVERSIDAD
Finis Terrae

UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**Evaluación inmunomorfológica de los proteoglicanos de la
dentina cariada y su relación con el proceso de adhesión**

FRANCISCO JAVIER CALZADA ESCOBAR
MARIA PAZ CAVALLI BRAVO

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

Profesor Guía: Dr. Alejandro Oyarzún Droguett

Santiago, Chile

2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a nuestras familias pilar importantísimo de esto, también a nuestros amigos y profesores por el apoyo, contención en momentos difíciles, incentivo a seguir adelante y no darnos por vencidos durante este camino de vida universitaria, también por los buenos momentos que sin duda han sido necesarios para llegar a este punto.

Agradecer en especial a nuestro tutor el Dr. Alejandro Oyarzun D. quien nos recibió y accedió para ser nuestro guía en esta tesis y no solo eso sino que desde el primer año que ingresamos a esta facultad nos dio a conocer su mirada sobre la odontología e incentivo a la investigación científica, información basada en la evidencia y tener una conexión y buen trato con los pacientes, por último también un profesor del cual no solo se puede hablar de materia sino que temas de la vida cotidiana y eso nos ayudó a ser los profesionales en los que nos convertiremos.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	8
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	12
Objetivos Específicos.....	12
MATERIAL Y MÉTODO	
1. Muestra.....	13
2. Técnica adhesiva y procesamiento histológico	13
3. Localización inmunohistoquímica de los proteoglicano.....	14
4. Análisis microscópico y procesamiento de imágenes.....	15
5. Controles.....	15
6. Análisis Microscópico y Procesamiento de Imágenes.....	15
7. Análisis densitométrico y procesamiento de datos.....	16
RESULTADOS	
Análisis Histopatológico	17
Localización inmunohistoquímica de Proteoglicanos.....	18
Análisis morfológico de la formación de la interacción adhesivo-sustrato..	19
Microscopía de epifluorescencia	20
Figuras.....	21-33
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMEN

La caries dental es una enfermedad que compromete la organización molecular y estructural de los tejidos dentarios. Se ha determinado que la fuerza adhesiva de biomateriales a la dentina cariada es menor respecto de la dentina sana, afectándose la calidad y la longevidad de las restauraciones. Se ha descubierto que la denaturación de las proteínas colágenas ocurre en la zona superficial de la dentina cariada. Sin embargo, no se conoce con precisión si esta condición es la causa principal de la menor adhesión de polímeros a la superficie de dentina modificada por el avance del proceso carioso. Es por esto que con el fin de buscar otras variables que afecten a la adhesión y el óptimo funcionamiento de la capa híbrida se analiza la función y afección de los proteoglicanos de la matriz y su interacción con la capa híbrida.

Objetivos: Demostrar que la disminución de los proteoglicanos dentinarios modifica la expresión morfológica de la capa híbrida en la dentina cariada

Metodología: 20 molares portadores de caries severas activas fueron cortados mesiodistalmente obteniéndose dos segmentos, uno vestibular y uno palatino/lingual. La superficie de corte fue acondicionada para una técnica de adhesión de grabado y lavado (Adper Single Bond 2). Los segmentos fueron procesados histológicamente e incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 6 μm de grosor de cada espécimen. Los proteoglicanos fueron detectados utilizando un anticuerpo monoclonal anti-condroitin sulfato y el sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa.

Las preparaciones fueron observadas utilizando un microscopía estereoscópica, de transiluminación y epifluorescencia, capturando imágenes mediante una cámara digital enfriada y guardadas como archivos TIFF para su análisis.

Resultados: Se observó en los cortes de todos los especímenes una inmunorreactividad positiva para condroitin sulfato en los túbulos dentinarios de la zona profunda no infectada y en la dentina sana. En la zona superficial infectada no se evidenció el epitopo en los túbulos dentinarios ni en la dentina intertubular. Morfológicamente, se detectó la formación de capa híbrida en la zona profunda y en la dentina sana. En la zona superficial infectada no se observó la formación de esta entidad morfológica.

Conclusión: La disminución o pérdida del condroitin sulfato en la dentina intratubular se relaciona con la falta de formación de una capa híbrida y tags de resina en la dentina cariada con la técnica inmunomorfológica empleada.

Palabras claves: caries dentinaria, proteoglicanos, condroitin sulfato, adhesión dental, capa híbrida.

INTRODUCCIÓN

La caries dental se define como una patología crónica, compleja y de carácter multifactorial, la que a nivel global tiene una alta tasa de prevalencia. La caries es un proceso donde existe una disolución química localizada en el diente causada por efectos metabólicos del biofilm sobre una superficie específica del diente. La destrucción puede afectar el esmalte, dentina y cemento dentario. (1)

La dentina cariada presenta dos zonas identificables desde una perspectiva morfológica, bacteriológica y bioquímica. Una zona superficial o externa cuya matriz está infectada y el colágeno está denaturado y no es remineralizable. La zona profunda está desmineralizada y las proteínas colágenas no están denaturadas y son remineralizables. (2,3).

La dentina es un tejido mineralizado complejo, constituido por la interacción de macromoléculas extracelulares que se biomineralizan durante el desarrollo. Es así como proteínas colágenas, fosfoproteínas y proteoglicanos son los constituyentes principales de la matriz dentinaria. (4).

Los proteoglicanos son un grupo de macromoléculas presentes en la superficie celular y la matriz extracelular que están compuestas por un núcleo proteico, al cual se le unen covalentemente una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) (5). Los PGs regulan la adhesión celular, el crecimiento celular y la formación de la matriz de tejido conectivo. Tanto los GAGs como los PGs, han sido identificados en predentina y dentina. Los PGs ricos en leucina (decorina, biglican y lumican) han sido detectados en predentina. Además, en dentina encontramos decorina en el interior de los túbulos dentinarios. (6)

Actualmente, el tratamiento de la caries está poniendo mucho énfasis en la adhesión a dentina cariada mediante biomateriales poliméricos, la que está siendo documentada profusamente en la literatura odontológica, sin embargo, la calidad de la adhesión es inferior a la realizada en dentina sana. (7)

Pregunta de investigación: ¿Cómo afecta la modificación de los proteoglicanos de la dentina cariada a la expresión morfológica del proceso de adhesión?

Abordaremos esta incógnita debido a que la adhesión en dentina cariada no ha sido estudiada en profundidad desde la perspectiva de la organización de la matriz extracelular. Esta investigación contribuirá a conocer la biología de los proteoglicanos de la matriz extracelular en la caries dental y otorgaría conocimientos adicionales para un futuro tratamiento restaurador de esta patología.

MARCO TEÓRICO

La caries dental es una enfermedad multifactorial provocada por la interacción entre la superficie dental, un biofilm, y las azúcares provenientes de la dieta. Las bacterias metabolizan los carbohidratos fermentables produciendo ácidos, los cuales afectan la integridad del esmalte induciendo su desmineralización. (1). Al no realizar intervenciones preventivas y/o quirúrgicas en las primeras etapas de la caries dental, estas progresan a lesiones que implicarán una mayor pérdida de la integridad dental, dolor pulpar, lesiones apicales e incluso la pérdida de la pieza. (8, 9).

La dentina es una estructura compleja, la cual se mineraliza durante el ciclo de vida de una pieza dental. La dentina está compuesta por un 70% de su volumen por mineral, 20% de su volumen por una matriz orgánica y un 10% de su volumen por agua. A la vez la fase mineral se distribuirá entre un 40-45% del volumen total, la fase orgánica es un 30% y la fase acuosa en un 30-25% del volumen total. (10, 11).

El estudio topográfico de la dentina ha permitido la identificación de 3 diferentes tipos de matrices dentinarias: la dentina de la zona más externa es conocida como dentina del manto, y está relacionada con el límite amelodentinario y cementodentinario, esta es principalmente una zona, que tiene túbulos delgados y curvos. A continuación, se encuentra la dentina circumpulpar, la cual es la zona de mayor volumen y se relaciona con la pulpa a través de la predentina. La matriz dentinaria circumpulpar está recorrida en su totalidad por túbulos dentinarios los que compartimentalizan al tejido en dentina intertubular e intratubular. Finalmente, encontramos a la predentina, la cual es la matriz orgánica no mineralizada de la dentina, situada entre la capa de odontoblastos y la dentina circumpulpar. Desde una perspectiva embriológica e histogenética, la dentina puede clasificarse en dentina primaria, dentina secundaria y dentina terciaria. La dentina terciaria se forma como respuesta al inicio y progresión de la caries dental (4,10)

Dentro de la matriz orgánica dentinaria podemos encontrar, proteínas colágenas (principalmente colágeno tipo I) y proteínas no colágenas. Una categoría de las proteínas

no colágenas se denomina familia SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein), que incluye osteopontina, sialoproteína ósea, proteína de matriz de dentina-1, sialofosfoproteína dentinaria y fosfoglicoproteína de la matriz extracelular. Otro grupo de macromoléculas polianiónicas no colágenas presentes en la matriz de dentina son los proteoglicanos (PGs) (12, 13, 14)

Los proteoglicanos (PGs) son un grupo de macromoléculas presentes en la superficie celular y en la matriz extracelular, que están compuestos por un núcleo proteico, al cual se le unen covalentemente una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs son polímeros lineales de unidades disacáridas repetidas, compuestos principalmente por un ácido urónico y una hexosamina, y son los principales hidratos de carbono que componen los PGs. Estas cadenas de GAGs unidas a un núcleo proteico son importantes en la determinación de las características funcionales que presentan los diferentes PGs (5,6).

Los PGs regulan la adhesión celular, el crecimiento celular y la formación de la matriz de tejido conectivo. Por otra parte, pueden regular el paso y difusión de macromoléculas a través del tejido conectivo. Debido a los grupos carboxilos y sulfatos presentes en las cadenas de GAGs, los PGs son moléculas altamente polianiónicas, ácidas e hidrofílicas, lo que les permite atraer agua y materiales catiónicos a los tejidos. Tanto los GAGs como los PGs, han sido identificados en predentina y dentina. Los PGs ricos en leucina (decorina, biglican y lumican) han sido detectados en predentina. Además, en dentina encontramos decorina en el interior de los túbulos dentinarios. (5,6).

La semiología de la caries dental se puede categorizar según su progresión (rápida o lenta) y según su actividad (activa o detenida). Histológicamente en la caries rápidamente progresiva o activa se puede observar una invasión bacteriana de la matriz dentinaria intra e intertubular produciendo cambios morfológicos que se pueden apreciar clínicamente como un tejido de consistencia blanda, fácilmente deformable a la presión y de apariencia blanca amarillenta (15). Por el contrario, una lesión inactiva o lentamente progresiva, se presenta clínicamente de un color café oscuro o negro y dura (16).

La zona superficial es la que presenta mayor grado de desmineralización, está infectada y fisiológicamente no es remineralizable debido a que desaparecen los enlaces covalentes cruzados inter e intramoleculares, lo que es indicativo de una denaturación de forma irreversible de la molécula de colágeno. En relación con la capa interna o profunda donde se observa en ésta una desmineralización de forma parcial que a nivel fisiológico es remineralizable, presentando fibrillas de colágeno indemnes y que no están infectadas (2,17).

Aunque muchos estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos han demostrado el contenido de GAG y PG en dentina normal; existe escasa información sobre el comportamiento de estas moléculas extracelulares ante condiciones patológicas, como la caries dental. Un informe preliminar mostró que los mucopolisacáridos ácidos, teñidos con azul alcian, desaparecen de las áreas más avanzadas de la lesión cariosa (18). Además, observaciones realizadas en cortes longitudinales de dentina cariada, teñidas con azul de toluidina, mostraron metacromasia en la zona cariada interna, mientras que la zona cariada externa el colorante no reaccionó con la matriz dentinaria (19). A nivel ultraestructural, Golberg y cols. (20) utilizando un colorante catiónico no específico como el azul alcian, demostraron que los gránulos de mucopolisacáridos se reducen en tamaño y número en la dentina intertubular, en la dentina esclerótica y en la zona externa de la dentina cariada. Estas observaciones sugieren que la modificación o degradación de los sitios polianiónicos de la matriz podría ser un factor importante en la patogénesis de la caries dentinaria.

El objetivo principal de la odontología restauradora adhesiva es reparar y reemplazar los tejidos dentarios dañados por el proceso carioso mediante la aplicación de materiales sintéticos con el objetivo de restablecer la forma y función de los dientes. Los procedimientos de restauración actuales generalmente dependen de la formación de una unión adhesiva entre los materiales dentales poliméricos y el sustrato del diente. Esto significa que los polímeros sintéticos adhesivos deben interactuar con los distintos niveles de la organización supramolecular de las proteínas extracelulares del diente (21).

El acondicionamiento de la dentina mineralizada por ácidos para modificar la estructura de la dentina intertubular e intratubular es una etapa fundamental de la tecnología

adhesiva. La infiltración de biomateriales adhesivos en la matriz intertubular y en los túbulos dentinarios acondicionados forma la capa híbrida y los tags de resina (22). Luego de la fotopolimerización del adhesivo, la capa híbrida forma una interfaz con alto contenido orgánico y relativamente hidrofóbica. La degradación hidrolítica de los componentes de la capa híbrida, la matriz de colágeno y la resina adhesiva, afectan la integridad de la interfaz y la longevidad de la restauración a largo plazo (23).

La progresión de la caries dental al reducir la fase mineral aumenta el grado de porosidad y modifica la estructura de la molécula de colágeno y otras proteínas no colágenas, reduciendo de forma significativa las propiedades mecánicas del tejido dentinario como dureza, módulo de elasticidad y resistencia a la tracción (24, 25).

En relación con la fuerza de unión de adhesivos a la dentina cariada, esta es menor que la presentada en dentina sana, independientemente del tipo del sistema adhesivo empleado. Las capas híbridas poseen un espesor menor en dentina sana respecto de la dentina cariada. Sin embargo, el mayor grosor de la capa híbrida en la dentina cariada no es indicativo de que haya una mayor fuerza tensil.(26, 27). Cabe destacar que las propiedades mecánicas y adhesivas que se encuentran en dentina cariada son mucho menores a las encontradas en dentina sana.

Estudiar el comportamiento de los PG y GAGs en la dentina cariada nos permitiría conocer la función de estas moléculas polianiónicas durante el proceso de adhesión y así poder explicar las fallas adhesivas y cohesivas en la interfase superficie dentinaria/adhesivo.

HIPÓTESIS

La disminución de los proteoglicanos dentinarios modifica la expresión morfológica de la capa híbrida en la dentina cariada.

OBJETIVOS

a) Objetivo General

1. Determinar cambios en la expresión morfológica de la zona híbrida producto de la disminución de los proteoglicanos en la dentina cariada

b) Objetivos Específicos

1. Identificar los cambios en la expresión morfológica de la capa híbrida en la dentina cariada.

2. Detectar cambios en la inmunexpresión de los proteoglicanos de la dentina cariada y su relación con el proceso de adhesión.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Muestra

La muestra estuvo constituida por 20 molares extraídos en el policlínico de exodoncia de la asignatura de Medicina Estomatológica y Clínica del Dolor II durante el año 2022 de la Universidad Finis Terrae.

Se incluyeron en la muestra todos aquellos especímenes portadores de pulpitis irreversible sintomática y que hayan generado una Urgencia Odontológica Ambulatoria. Los especímenes tuvieron un diagnóstico ICDAS-ICCMS 5-6, lesiones severas activas. Los especímenes tuvieron código 0 y 1 de acuerdo con el Examen Periodontal Básico.

Se excluyeron piezas dentarias que tengan un diagnóstico ICDAS-ICCMS inferior a 5 y lesiones detenidas. Además, se excluyeron los molares categorizados con los códigos 2, 3, 4 y * de acuerdo con el Examen Periodontal Básico.

2. Técnica adhesiva y procesamiento histológico

Todos los especímenes de la muestra incluidos en metil-metacrilato se cortaron mesiodistalmente mediante una cuchilla de diamante refrigerada con agua en una máquina cortadora de tejidos mineralizados (Isomet 1000 Buhler). De esta manera, se obtuvieron dos segmentos de cada espécimen, uno vestibular y uno lingual o palatino. En ambos segmentos de cada espécimen, la superficie total de corte fue acondicionada con ácido ortofosfórico gel al 37% durante 15 segundos y se realizó la técnica adhesiva (wet bonding technique) utilizando el adhesivo Adper

Single Bond 2 (3M St.Paul,MN,USA) marcado con rodamina B (Sigma-Aldrich,USA) en una concentración de 1 mg/ml.

Los especímenes fueron fijados en formaldehído buffer pH 7.4, se desmineralizaron con ácido fórmico al 10% durante dos semanas a temperatura ambiente, se deshidrataron en etanoles de concentración ascendente, se transparentaron en xilol y se incluyeron en parafina histológica a 60 °C. De cada taco histológico se obtuvieron cortes de 6 µm los que fueron montados sobre portaobjetos silanizados. Los cortes se desparafinaron mediante 3 baños de xilol de 15 min cada uno y se hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 50%, agua).

Los cortes de cada espécimen fueron teñidos histoquímicamente mediante las coloraciones de Azul de Toluidina al 0,1%, Safranina O al 0,1% + Light Green al 0,1% o Rojo Sirio F3B al 0,1%.

3. Localización inmunohistoquímica de Proteoglicanos.

Los cortes fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos, para inactivar la acción de la peroxidasa endógena. Transcurrido este tiempo los cortes fueron lavados profusamente con buffer fosfato salino (PBS) e incubados en suero normal de cabra al 5% y PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 3%, durante 30 minutos a temperatura ambiente, para el bloqueo de los sitios inespecíficos.

Los cortes de cada espécimen se incubaron durante 12 horas a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-condroitin sulfato (Clon CS-56 Sigma.), diluido 1:500 en PBS-BSA al 3%. Como control negativo en algunos cortes se omitió el anticuerpo primario y se reemplazó por PBS-BSA.

La inmunorreacción fue detectada utilizando el sistema biotina–streptavidina – peroxidasa – diaminobenzidina (LSAB system HRP. DAKO®). Posteriormente, los cortes

fueron contrastados con tinción de Gram para la detección de bacterias, deshidratados en etanoles de concentración creciente, transparentados en xilol y cubiertos con medio de montaje sintético (Eukitt®)

4. Análisis Microscópico.

Los cortes fueron examinados 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.

Con el objeto de hacer una inspección topográfica todos los cortes fueron observados en un microscopio estéreo Nikon SMZ800 con sistema de epi-iluminación y trans-iluminación y fotografiados mediante una cámara digital DS-Fi1 Nikon manipulada a través del software NIS-Elements D 3.1 (Nikon). Las imágenes fueron guardadas como archivos JPEG y TIFF

5. Controles

Se utilizó dentina sana de especímenes libres de caries o las zonas de dentina sana de los especímenes experimentales.

El control de la inmunoreacción se realizó reemplazando los anticuerpos primarios por PBS-BSA. Como control positivo, se observó la dentina sana, predentina, cemento celular estratificado mixto y ligamento periodontal de los especímenes.

6. Análisis densitométrico y procesamiento de datos

Las fotografías RGB provenientes de los cortes inmunomarcados y los controles negativos fueron transformadas en imágenes en escala de grises. En cada imagen se seleccionaron 6 regiones de interés (ROI) de 50 μm^2 . La intensidad de la reacción de cada ROI fue medida utilizando el software ImageJ versión 1.53n. Se

registró la mediana del histograma de cada ROI. Estas fueron analizadas estadísticamente mediante la prueba de ANOVA para mediciones repetidas utilizando el programa PRISM versión 8.1.2 (277), considerando un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Análisis Histopatológico

La observación histopatológica de todos los especímenes de la muestra, demostró la presencia de lesiones de caries dentinarias severas activas de color blanco amarillento a café claro, de consistencia blanda en la superficie, y firme o dura en las zonas profundas. (Fig 1 y 3).

La tinción de Gram realizada sobre las superficies de las hemisecciones de cada espécimen permitió detectar Gram positividad en la zona superficial de la matriz dentinaria cariada. Las zonas profundas adyacentes a la pulpa dental permanecieron no reactivas a la coloración de Gram. (Fig 1a, 1b, 3a y 3b). La Gram positividad, se expresó como áreas de color morado oscuro distribuidas en el límite amelo dentinario, en la dentina del manto y dentina circumpulpar. En todos los especímenes en las áreas teñidas se observa una distorsión de la morfología dentinaria. Además, se observaron grupos de túbulos dentinarios y túbulos dentinarios individuales que en su interior presentan tinción de Gram. (Fig 1a, 1b, 3a y 3b).

Localización Inmunohistoquímica de PG-GAGs

La reacción antígeno-anticuerpo se observa como un precipitado de color café amarillento en el interior de los túbulos dentinarios de la dentina sana y en zonas profundas de la dentina cariada. Los túbulos dentinarios de la dentina superficial adyacentes a zonas de infección microbiana se observaron negativos a la inmunorreacción. La dentina intertubular no se observa reactiva a la reacción antígeno-anticuerpo. (Fig 1c y 3c).

En los cortes control negativo no se observó inmunorreacción. La predentina, ligamento periodontal, pulpa dental y cementocitos, manifiestan positividad a la reacción inmunohistoquímica (controles positivos). (Fig 1b y 3b).

Análisis morfológico de la formación de la interacción adhesivo-sustrato

Observaciones realizadas mediante microscopía estereoscópica y microscopía de transiluminación con bajos aumentos, permitieron evidenciar una banda de adhesivo polimerizado en contacto con la dentina. En todos los especímenes esta banda de adhesivo polimerizado permanece sobre la superficie del corte solo en las áreas de dentina que expresan inmunorreacción positiva en el interior de los túbulos dentinarios.(Fig 2e y 4e).

En las zonas de dentina cariada superficial, esta banda de adhesivo polimerizado se observó en contacto con el tejido fue irregular e interrumpida. Es así como extensas zonas de dentina no presentaban adhesivo en la superficie (Fig. 4a.) y otras zonas presentaban segmentos interrumpidos de adhesivo polimerizado.(Fig 2a, 2c, 4c.).

La microscopía por transiluminación no permitió observar con claridad la formación de la zona híbrida en ninguna de las superficies de dentina estudiada. Sin embargo, utilizando altos aumentos, fue posible detectar que los túbulos dentinarios y la dentina intertubular de la superficie del corte se observaron difusos (Fig 5a y 5c.), en comparación con zonas más profundas del corte en donde se detecta una definición morfológica adecuada (Fig 5e.).

Microscopía de epifluorescencia

Utilizando bajos aumentos fue posible observar el adhesivo polimerizado como una banda de color rojo intenso que toma contacto con la superficie del tejido (Fig.1d y 3d.), siguiendo los mismos patrones morfológicos descritos anteriormente. Utilizando mayores aumentos se pudo detectar que en las zonas de dentina positivas a la inmunoreacción, existe una banda fluorescente que infiltra la matriz de la dentina intertubular en la superficie del corte bajo el adhesivo fotopolimerizado (Fig 2f, 4f y 5f). Cuando la inmunoreacción comienza a desaparecer del interior de los túbulos dentinarios. Esta banda nítida de fluorescencia en la zona superficial del corte, comienza a desvanecerse y tiende a desaparecer (Fig 2b, 4b y 5b). Este hecho es coincidente con la separación del adhesivo polimerizado de la superficie de la dentina. En zona de dentina superficial cariada no se observa la penetración del adhesivo fluorescente de la dentina superficial.

Figura 1

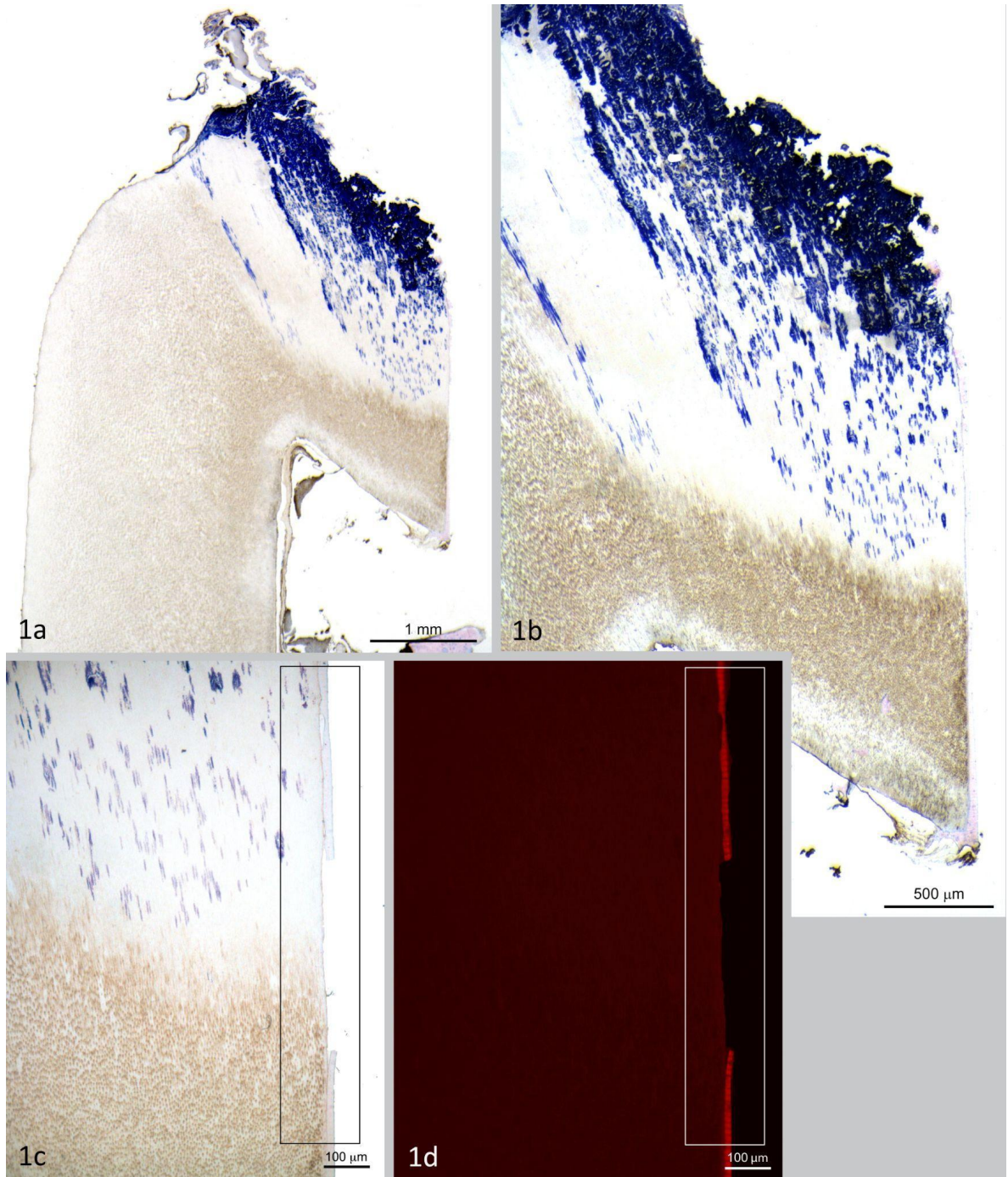


Figura 1.

Figura 1a: Microfotografía estereoscópica de corte longitudinal de hemi segmento de molar cariado. Inmuno peroxidasa-Tinción de Gram.

Se observa una caries rápidamente progresiva cuya matriz se encuentra colonizada por bacterias Gram positivas en la zona superficial. La inmunoreacción de color café-amarillento se detecta en zonas de dentina profunda y dentina sana.

Figura 1b: Corresponde a una zona de mayor aumento de la figura 1a. Nótese la pérdida de la inmunoreacción en la zona superficial infectada respecto de la zona de dentina profunda.

Figura 1c: Corresponde a una zona con mayor aumento de la zona superficial y zona profunda de la dentina cariada mostrada en la figura 1b. En la zona señalada por el rectángulo se observa que una capa de adhesivo polimerizado toma contacto con la dentina superficial infectada y con la zona profunda no infectada.

Figura 1d: Corresponde a la misma zona de tejido mostrada en la figura 1c y observada con microscopía de epifluorescencia. En la zona señalada por el rectángulo blanco se observa que una capa de adhesivo polimerizado de color rojo toma contacto con la dentina superficial infectada y con la zona profunda no infectada.

Figura 2

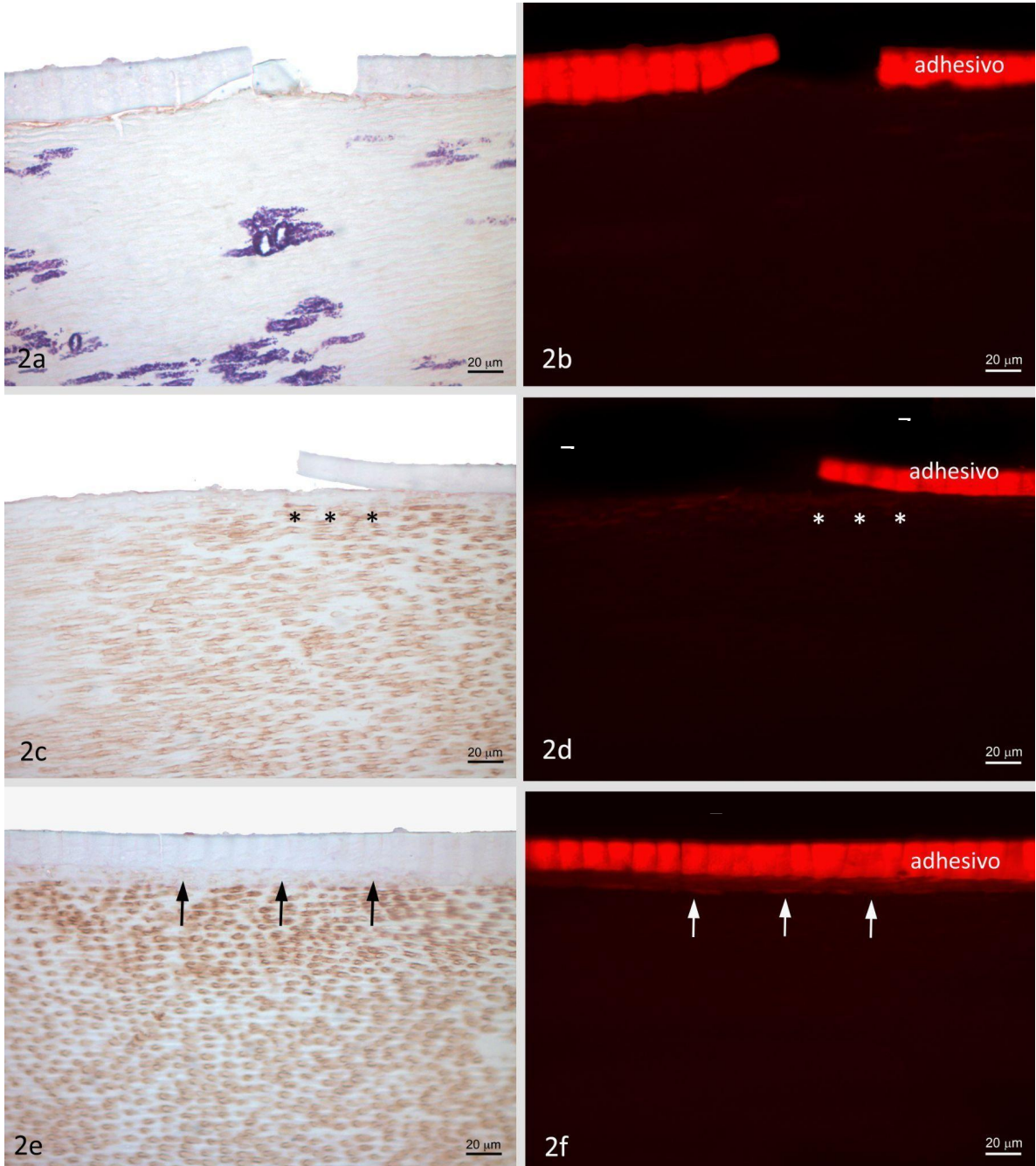


Figura 2

Figura 2a: Imagen con mayor aumento de la zona superficial de la dentina cariada. Inmunoperoxidasa - tinción de Gram.

Obsérvese que el adhesivo toma contacto con la dentina cariada de la zona superficial infectada, en la cual se observan túbulos dentinarios infectados y áreas de dentina intertubular desorganizada por la infiltración de bacterias Gram positivas. Los túbulos dentinarios en esta zona no presentan inmunoreacción. Se observa adhesivo polimerizado en contacto con la superficie, con zonas de separación en la interfase con la dentina.

Figura 2b: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura 2a. Observada con microscopía de epifluorescencia.

Obsérvese el adhesivo polimerizado de un color rojo anaranjado que toma contacto con la superficie irregular de dentina cariada. No se detecta la formación de una zona híbrida.

Figura 2c: Imagen con mayor aumento de dentina no infectada próxima a la zona superficial infectada.

Obsérvese un aumento paulatino de la inmunoreacción en el interior de los túbulos dentinarios hacia zonas profundas. Se muestra un segmento de adhesivo polimerizado despegado de la matriz dentinaria (asteriscos) a partir del cual el biomaterial toma contacto íntimo con el tejido.

Figura 2d: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura. 2c observada con microscopía de epifluorescencia.

Obsérvese que en la zona marcada con asteriscos existe un aumento de la intensidad de la fluorescencia de color rojo, respecto del fondo y esta fluorescencia comienza a organizarse morfológicamente como una zona híbrida.

Figura 2e: Zona con mayor aumento de la dentina profunda.

Nótese que a la inspección visual, existe un aumento evidente de la inmunoreacción en todos los túbulos dentinarios del corte de tejido. El adhesivo toma contacto estrecho con la superficie de la dentina. En la zona señalada con flechas se detecta una inmunoreacción difusa.

Figura 2f: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura. 2e observada con microscopía de epifluorescencia.

Obsérvese que la zona indicada con flechas blancas corresponde a la misma zona señalada con flechas negras en la figura 2e. En esta zona, la microscopía de epifluorescencia permite evidenciar la presencia de una zona híbrida de color rojo de menor intensidad al adhesivo polimerizado en la superficie.

Figura 3

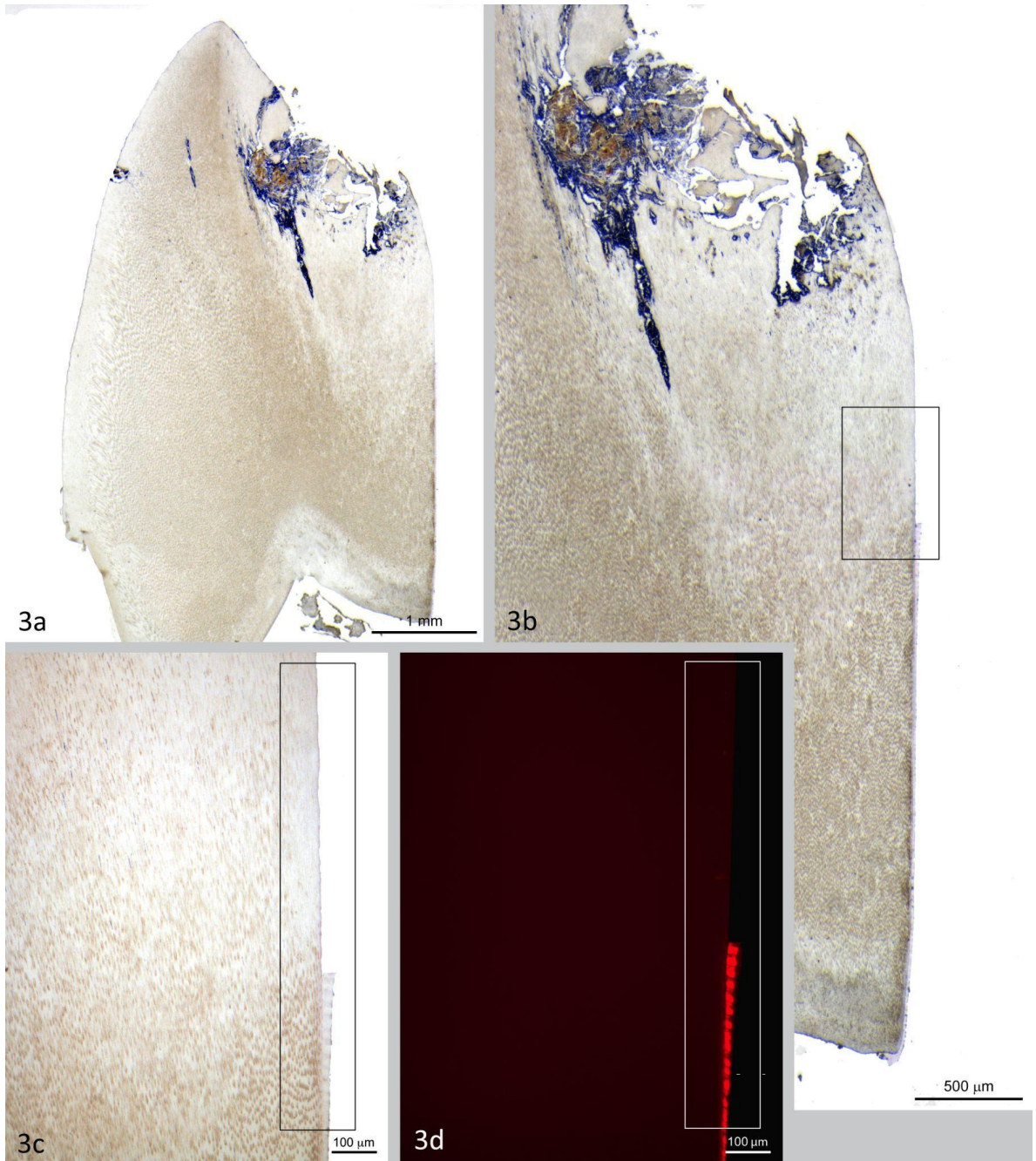


Figura 3

Figura 3a: Microfotografía estereoscópica de corte longitudinal de hemi segmento de molar cariado. Inmuno peroxidasa-Tinción de Gram.

Observamos una lesión de caries rápidamente progresiva cuya zona superficial se encuentra colonizada por bacterias Gram positivas. La inmunoreacción de color café-amarillento se detecta en zonas de dentina profunda y dentina sana.

Figura 3b: Corresponde a una zona de mayor aumento de la figura 3a. Nótese la pérdida de la inmunoreacción en la zona superficial infectada respecto de la zona de dentina profunda.

Figura 3c: Corresponde a una zona con mayor aumento de las zonas superficial y zona profunda de la figura 3b.

Observamos la presencia de adhesivo polimerizado en la matriz dentinaria en la zona superficial, además de la zona profunda, esto se encuentra marcado con el rectángulo.

Figura 3d: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura 3c observada con microscopía fluorescente. Obsérvese la presencia de una placa de adhesivo de color rojo que toma contacto con la dentina superficial infectada y con la zona profunda no infectada.

Figura 4

Figura 4a: Imagen con mayor aumento de la zona superficial de la dentina cariada. Inmunoperoxidasa - tinción de Gram.

Obsérvese inmunopositividad en la zona superficial de la dentina cariada y la desorganización de la matriz dentinaria infectada por bacterias Gram positivas, las cuales alteran la histología normal. No se detecta presencia de adhesivo polimerizado en contacto con la superficie del corte ni zona híbrida.

Figura 4b: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura. 4a observada con microscopía de epifluorescencia.

Figura 4c: Microfotografía de la interfase entre zona superficial y zona profunda de la dentina cariada. Reacción inmunoperoxidasa - tinción de Gram.

Obsérvese un aumento paulatino de la inmunoreacción en el interior de los túbulos dentinarios hacia zonas profundas. Se muestra un segmento de adhesivo polimerizado despegado de la matriz dentinaria (asteriscos) a partir del cual el biomaterial toma contacto íntimo con el tejido

Figura 4d: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura 4c. observada con microscopía de epifluorescencia.

Obsérvese el adhesivo polimerizado de un color rojo anaranjado en contacto con la dentina cariada. En la zona marcada con asteriscos existe un aumento de la intensidad de la fluorescencia de color rojo, respecto del fondo y esta fluorescencia comienza a organizarse morfológicamente como una zona híbrida.

Figura 4e: Microfotografía de una zona con mayor aumento de la dentina profunda. (flechas). Reacción inmunoperoxidasa - tinción de Gram.

Se observa que existe un aumento evidente de la inmunoreacción en todos los túbulos dentinarios del corte de tejido. El adhesivo toma contacto estrecho con la superficie de la dentina. En la zona señalada con flechas se detecta una inmunoreacción difusa.

Figura 4f: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura. 4e. Observada con microscopía de epifluorescencia.

Obsérvese que la zona indicada con flechas blancas corresponde a la misma zona señalada con flechas negras en la figura 4e. En esta zona, la microscopía de epifluorescencia permite evidenciar la presencia de una zona híbrida de color rojo de menor intensidad al adhesivo polimerizado en la superficie.

Nótese una infiltración progresiva del adhesivo desde la zona izquierda hacia la zona derecha de la fotografía para formar una zona híbrida establecida.

Figura 5

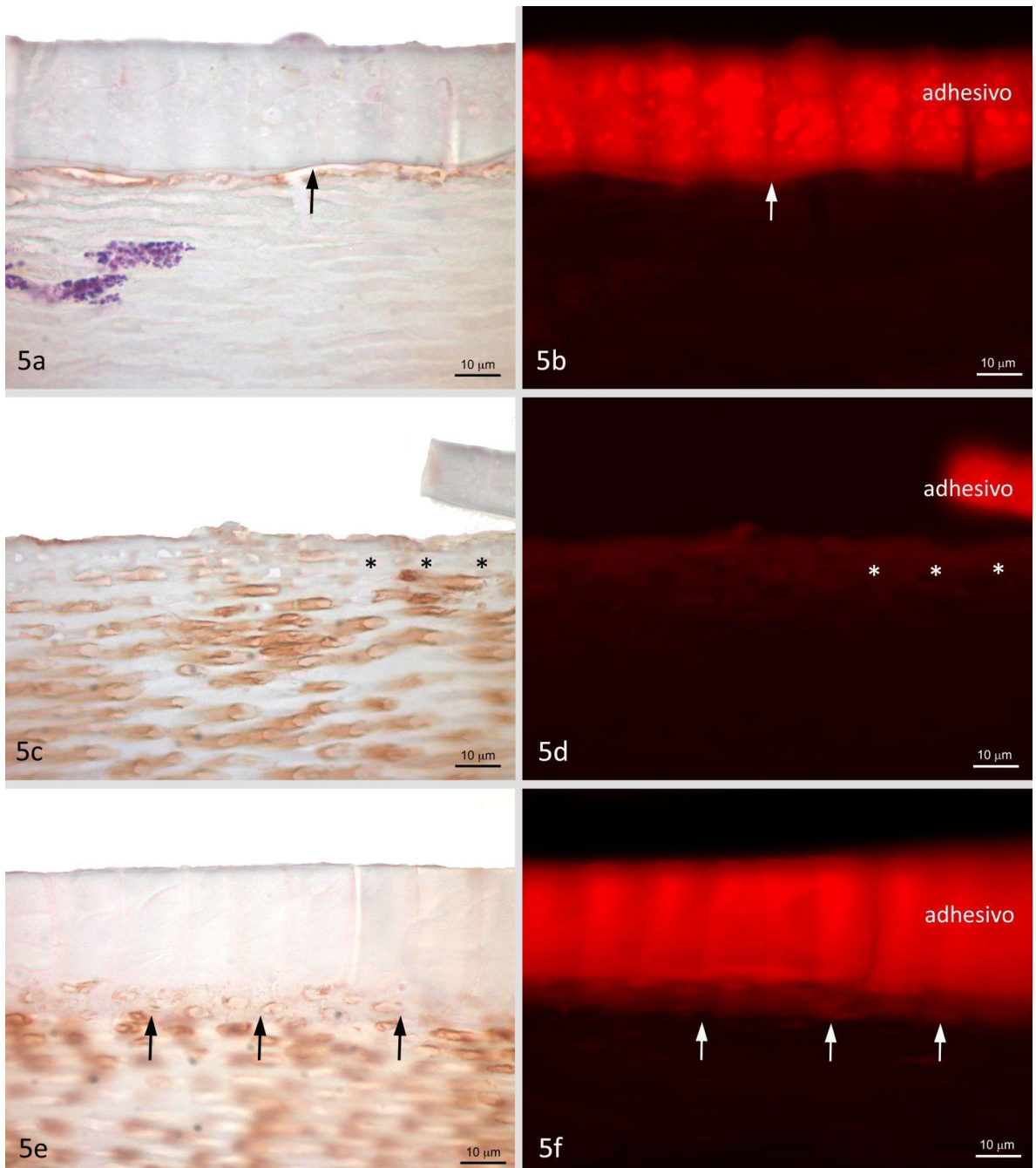


Figura 5

Figura 5a: Microfotografía tomada con alto aumento de dentina cariada superficial infectada. Reacción inmunoperoxidasa - tinción de Gram.

Obsérvese la ausencia de inmunoreacción en el interior de los túbulos dentinarios. El contacto del adhesivo polimerizado es irregular y se encuentra interrumpido en zonas de longitud variable (flecha).

Figura 5b: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura 5a. Observada con epifluorescencia

Notese el adhesivo de color rojo anaranjado y la ausencia de formación de una zona híbrida.

Figura 5c: Microfotografía con alto aumento de dentina no infectada próxima a la zona superficial infectada. Reacción inmunoperoxidasa - tinción de Gram.

Se muestra un segmento de adhesivo polimerizado despegado de la matriz dentinaria (asteriscos) a partir del cual el biomaterial toma contacto íntimo con el tejido. Se aprecia con nitidez que la inmunoreacción se localiza en el interior de los túbulos dentinarios.

Figura 5d: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura 5c. Observada con epifluorescencia.

Obsérvese que en la zona marcada con asteriscos existe un aumento de la intensidad de la fluorescencia de color rojo, respecto del fondo y esta fluorescencia comienza a organizarse morfológicamente como una zona híbrida.

Figura 5e: Microfotografía de la zona profunda de la dentina cariada. Reacción inmunoperoxidasa - tinción de Gram.

El adhesivo toma contacto estrecho con la superficie de la dentina. En la zona señalada con flechas se detecta una inmunoreacción difusa en contacto con el adhesivo superficial.

Figura 5f: Corresponde a la misma zona mostrada en la figura 5e. Observada con epifluorescencia.

Nótese el adhesivo de color rojo anaranjado en contacto con la dentina acondicionada y la formación de una zona híbrida (flechas) nítida y fluorescente.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se realizó una evaluación inmunomorfológica de la matriz extracelular de la dentina cariada y su relación con el proceso de adhesión en dientes permanentes humanos, con el objeto de determinar que la disminución de los proteoglicanos intratubulares de la matriz dentinaria cariada modifica el proceso de adhesión.

Estudios preliminares han determinado que la caries dentinaria severa activa, se caracteriza semiológicamente por presentar una consistencia blanda, fácilmente deformable y de un color blanco amarillento (28). En este trabajo de investigación, todos los especímenes de la muestra presentaron lesiones cariosa extensas, con destrucción del esmalte oclusal, con dentina blanda y deformable de color blanco amarillento.

En los especímenes de la muestra analizados histológicamente podemos confirmar la presencia de bacterias Gram positivas en la zona infectada de la caries dentinaria, las que provocan la distorsión en los túbulos dentinarios. Esto nos confirma la presencia de caries dentinarias activas clínicas e histológicas, en los especímenes utilizados, de acuerdo con lo documentado por Mckay previamente (29)

Estudios microscópicos previos, utilizando reactivos catiónicos no específicos, localizaron GAGs en la caries de la dentina. Desde este punto de vista, los túbulos vacíos no infectados en áreas avanzadas de la lesión cariosa fueron despojados de su contenido polianiónico (18,19). Además, las preparaciones teñidas con azul de toluidina revelaron que los GAGs se detectaron sólo en la zona interna de las lesiones cariosas y en la dentina sana (20). Este estudio, en el que

se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-condroitín sulfato, confirma que en las lesiones activas el contenido de GAGs de la matriz dentinaria intratubular se ve afectado. Nuestro enfoque inmunohistoquímico es coincidente con los ensayos histoquímicos previos, ya que detectamos una pérdida evidente de la inmunotinción en el interior de de túbulos dentinarios infectados y no infectados en la zona superficial de la dentina cariada.

La falta de inmunotinción podría interpretarse como un artefacto técnico relacionado con el acceso de los inmunoreactivos a los túbulos seccionados longitudinalmente. Sin embargo, este hecho no se observó en la dentina sana ya que tanto los túbulos longitudinales como los transversales se tiñeron en forma intensa y homogénea.

La contratinción de nuestras preparaciones inmunohistoquímicas con la técnica de Gram demuestra que el patrón de pérdida de la inmunoreacción ocurre en lesiones activas profundamente infectadas (29). Además, este procedimiento técnico proporciona nueva información no reportada por otros, ya que en un mismo corte se pudo colocalizar la morfología bacteriana con la detección inmunohistoquímica de los epitopos.

La detección inmunohistoquímica y la distribución de PGs y GAGs en dentina cariada no ha sido estudiada suficientemente por los expertos en cariología. En el año 2016, Stankoska y cols. abordan esta problemática analizando dientes humanos cariados, sin una caracterización clínica de la actividad de las lesiones de los especímenes de la muestra. En este estudio se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-core proteico de Biglican humano, anti-core proteico de Fibromodulina humana y anti-core proteico de Lumican humano (30). Los resultados demostraron que en los especímenes control con dentina sana, los PGs estudiados se expresan en el interior de los túbulos dentinarios. En la dentina cariada, los

túbulos dentinarios de zonas degradadas sin morfología discernible, los PGs no fueron detectados. Los túbulos dentinarios periféricos a estas zonas degradadas, presentan una inmunorreactividad intensa (30).

Las observaciones realizadas en nuestro estudio coinciden parcialmente con lo anterior. En la dentina cariada de nuestros especímenes, la pérdida de inmunotinción es evidente en toda la dentina circumpulpar cariada e infectada y no detectamos positividad en los túbulos dentinarios adyacentes a zonas de infección o degradación profusa. Estas observaciones se explican por la naturaleza de los anticuerpos utilizados en ambos estudios. Nosotros utilizamos un anticuerpo monoclonal anti-condroitin sulfato humano, el que detecta las cadenas laterales de este GAG asociadas al core proteico de los SLRP.

De los SLRP detectados en la dentina, solo Decorina y Biglican poseen cadenas laterales de condroitin sulfato. Los PGs Fibromodulina y Lumican presentan cadenas laterales de queratán sulfato (6,10) Lo anterior significa, que nuestras observaciones sólo pueden contrastarse y compararse con el anticuerpo Biglican usado en el estudio de Stankoska y cols. (30).

Con respecto de las interacciones adhesivo/ superficie dentinaria/inmunoreacción, los resultados obtenidos, evidenciaron que la banda de adhesivo polimerizado se adhirió en áreas profundas, donde existe dentina con inmunoreacción positiva al interior de los túbulos dentinarios. Contrariamente con lo anterior, en zonas de dentina cariada superficial, no inmunoreactiva, se detectan fallas adhesivas entre el material polimerizado y la matriz dentinaria.

En el presente estudio, la microscopía de epifluorescencia permitió detectar, con altos aumentos, que en aquellas zonas donde existe inmunoreacción positiva se forma una banda fluorescente que infiltra la dentina intertubular en zonas

adyacentes al adhesivo polimerizado. Por otra parte, se observa que esta capa de fluorescencia comienza a desaparecer en aquellas zonas de dentina cariada negativas a la inmunorreacción y el adhesivo polimerizado presentó fallas adhesivas.

La eliminación de los PGs dentinarios en dentina bovina mediante digestión enzimática y su posterior tratamiento con Single Bond 2 permitió comprobar que en los especímenes experimentales (sin PGs) la fuerza de unión del adhesivo disminuye significativamente respecto de los especímenes control (con PGs). Este estudio sugiere que la eliminación de los GAGs de la matriz dentinaria tiene un efecto favorable para la adhesión de biomateriales poliméricos (31).

Coincidentemente con lo anterior, otro estudio inmunohistoquímico previo demostró que la eliminación de los GAGs de la matriz de la dentina sana y su posterior adhesión con el sistema Single Bond 2 generó capas híbridas de mayor profundidad (5,97 μm) respecto del control (3,43 μm) sugiriendo que el condroitín sulfato en el interior de los túbulos dentinarios impide la infiltración de monómeros adhesivos. Lo anterior permite deducir que la eliminación de los GAGs dentinarios incrementa el grosor de la capa híbrida para estas condiciones experimentales. (32).

Coincidentemente con lo anterior, Massoni y cols. reportaron que la eliminación enzimática de los GAGs de dentina sana produjo un aumento significativo de la fuerza de unión de los adhesivos Scotchbond Multipropósito (29%) y Prime and Bond NT (92%). Por otra parte, la nanofiltración fue reducida para ambos adhesivos luego de la eliminación de los GAGs de la matriz dentinaria. Este estudio sugiere que la eliminación de los GAGs dentinarios mejora la calidad de la adhesión de biomateriales poliméricos (33).

Por otra parte, la eliminación química de los PGs de la dentinaria induce un descenso significativo del módulo de elasticidad del tejido modificando la malla colágena. Se concluye que la modificación de los PGs dentinarios induce un cambio en la matriz colágena, lo que explica la alteración del módulo de elasticidad. (34)

Es importante mencionar que todos los estudios reportados en los que se relaciona el contenido de PGs y GAGs dentinarios con la naturaleza del proceso de adhesión se han realizado en dentina bovina o en dentina humana sana y no en dentina cariada. Lo anterior nos permite enunciar el valor limitado de estos reportes para contrastarlos con nuestras observaciones las que se realizaron en dentina cariada humana.

La literatura odontológica ha mostrado que la fuerza de adhesión a la dentina sana es significativamente mayor que a la zona superficial infectada y a la zona profunda no infectada de la caries dentinaria. Sin embargo, el grosor de la capa híbrida fue mayor en la zona profunda no infectada que en la dentina sana. Además la capa híbrida formada en dentina cariada es más porosa (35).

Se ha demostrado que la fuerza de adhesión de los adhesivos a la dentina cariada es inversamente proporcional al grado de progresión de la caries, siendo la dentina infectada por la caries la que presenta la menor fuerza de adhesión. El grosor de la capa híbrida está directamente correlacionado con el grado de progresión de la caries. La dentina infectada por la caries, presenta capas híbridas más gruesas, seguida por la dentina cariada no infectada y por la dentina sana. Al igual que en la dentina sana, las capas híbridas de la dentina afectada por la caries son más gruesas si se utilizan adhesivos de grabado y lavado en comparación con los adhesivos de autograbado. El grosor de esta capa híbrida es debido al aumento de la porosidad de la dentina intertubular, la cual favorece la difusión de los monómeros de resina (23).

La explicación de una menor fuerza de unión en dentina infectada, se debería a una mayor permeabilidad de los túbulos dentinarios producto de un menor contenido mineral, lo que reduciría la generación de zonas híbridas más gruesas, pero con menor fuerza de unión al sustrato dentinario, produciéndose fallas cohesivas más que adhesivas. Esto se propuso analizando microfotografías obtenidas mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (36, 37).

Las evaluaciones de las interacciones de materiales adhesivos con la dentina cariada se realizaron principalmente midiendo la fuerza de adhesión usando pruebas de tracción y su respectiva correlación con microscopía electrónica de barrido, esto se observa en el estudio histomorfológico realizado por Haj-Ali y cols. en el año 2006. En este trabajo, se utilizaron molares humanos, en los cuales las lesiones de caries dentinaria fueron inducidas experimentalmente, sobre estos se analizó la interfaz del sistema adhesivo de grabado total, tanto en dentina cariada como no cariada. En el estudio se evaluó la penetración del adhesivo cualitativamente con microfotografías y concluyeron que la interfase formada entre el adhesivo con la dentina cariada era de carácter irregular, con una profundidad de 8,6 μm y menos consistente que la encontrada en dentina no cariada, observando ampliamente zonas de colágeno expuestas. La profundidad de la zona híbrida en la dentina sana fue de 6 μm . (38).

Nuestro estudio se realizó en lesiones cariosas activas, las cuales progresaron naturalmente. Por lo anterior, no puede ser comparado con la evidencia aportada por modelos *in vitro*.

El modelo utilizado en este estudio, no reportado en la literatura, utiliza cortes longitudinales de molares cariados, lo que permite estudiar en un solo corte todos los sustratos posibles sobre los cuales puede interaccionar un adhesivo. Es evidente

que en la dentina superficial infectada la formación de capa híbrida no fue detectada por la técnica usada y el biomaterial presentó fallas adhesivas. Este estudio no permite demostrar si el adhesivo penetró o no la matriz de la dentina infectada. Una posibilidad es que el adhesivo difundió muy profundamente en la dentina reblandecida y porosa, diluyéndose en el espesor del tejido lo que impidió ser detectado por la microscopía de epifluorescencia. Esta fluorescencia aumenta progresivamente hasta establecerse una capa híbrida en desde la zona profunda de la caries hasta la dentina sana.

Este estudio muestra en forma evidente la pérdida de los GAGs intratubulares en la dentina superficial infectada y relaciona morfológicamente este hecho con la falta de formación de capa híbrida. La metodología empleada no permite concluir que la ausencia de PGs y GAGs es la responsable directa de esta falla en el proceso de adhesión. Probablemente, la modificación de la matriz extracelular dentinaria en su totalidad esté involucrada en este hecho. El estudio de la dinámica molecular de las proteínas colágenas, fosfoproteínas y PGs entregaría en el futuro datos relevantes para resolver este problema clínico para la Odontología Restauradora.

La hipótesis planteada originalmente en este estudio se confirma, ya que la disminución de los PGs-GAGs dentinarios se relaciona con la modificación de la capa híbrida en el proceso de adhesión en dentina cariada

CONCLUSIONES

1. La disminución de los PGs-GAGs dentinarios afecta la formación morfológica de la capa híbrida en la dentina cariada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2017;3:17030. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
2. Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. *J Dent Res* [Internet]. 1977;56(10):1233–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/00220345770560102301>
3. Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater* [Internet]. 2010;26(2):e24-37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.149>
4. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition-an overview: Overview of dentin structure. *Endod Topics* [Internet]. 2009;20(1):3–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x>
5. Oyarzún A, Rathkamp H, Dreyer E. Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of the effects of phosphoric acid etching on dentin proteoglycans: Effects of phosphoric acid on dentin proteoglycans. *Eur J Oral Sci* 2000;108(6):546–54.
6. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2001;12(4):331-349. doi:[10.1177/10454411010120040401](https://doi.org/10.1177/10454411010120040401)

7. Isolani CP, Sarkis-Onofre R, Lima GS, Moraes RR. Bonding to Sound and Caries-Affected Dentin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adhes Dent*. 2018;20(1):7–18.
8. Pitts N, Mazevet M, Mayne C, Hinrichs S, Boulding H, Grant J. Towards a Cavity Free Future: How do we accelerate a policy shift towards increased resource allocation for caries prevention and control? The Policy Institute at King's, 2017. 16 p. <https://doi.org/10.18742/pub01-015>
9. Pitts N, Zero D. Caries Prevention Partnership Making prevention a priority White Paper on Dental Caries Prevention and Management.
10. Goldberg M. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)* [Internet]. 2011;E3(2):711–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2741/e281>
11. Listik E, Azevedo Marques Gaschler J, Matias M, Neuppmann Feres MF, Toma L, Raphaelli Nahás-Scocate AC. Proteoglycans and dental biology: the first review. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2019;225(115199):115199. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115199>
12. Qin C, Baba O, Butler WT. Post-Translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(3):126–36.
13. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* [Internet]. 2004;15(1):13–27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/154411130401500103>
14. Goldberg M, Takagi M. Dentine proteoglycans: composition, ultrastructure and functions. *Histochem J*. 1993;25(11):781–806.

15. Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-Karim. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J* [Internet]. 2019;52(7):923–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.13080>
16. Sarnat H, Massler M. Microstructure of active and arrested dentinal caries. *J Dent Res* [Internet]. 1965;44(6):1389–401. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/00220345650440064601>
17. Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, et al. Dentin caries zones: Mineral, structure, and properties. *Journal of Dental Research*. 2009;88(1):71–6.
18. Symons NBB. A histochemical and microradiographic study of the early carious lesion in dentine. *Odont Revy* 1966; 18:113-118.
19. Shimizu C, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. Carious change of dentin observed on longspan ultrathin sections: Carious change of dentin observed on longspan ultrathin sections. *J Dent Res* [Internet]. 1981;60(11):1826–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/00220345810600110101>
20. Goldberg M, Triller M, Weill R. Electron microscope histochemical investigation on carious dentin. *Caries Res* 1977; 11:133.
- 21 Bertassoni LE, Orgel JPR, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater* [Internet]. 2012;8(7):2419–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.02.022>

22. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater* [Internet]. 2000;16(6):406–11. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0109-5641\(00\)00035-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0109-5641(00)00035-x)
23. Tjäderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent* [Internet]. 2015;40(1):4–18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2341/14-095-BL>
24. Bedran-Russo AK, Karol S, Pashley DH, Viana G. Site specific properties of carious dentin matrices biomodified with collagen cross-linkers. *Am J Dent*. 2013;26(5):244–8.
25. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dental Materials*. 2014 Jan;30(1):77–96.
26. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res* [Internet]. 2015;94(2):241–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/0022034514562833>
27. Ito S, Saito T, Tay FR, Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley DH. Water content and apparent stiffness of non-caries versus caries-affected human dentin. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2005 Jan 15;72(1):109–16.
28. Miller WA, Massler M. (1962) Permeability and staining of active and arrested lesions in dentin. *Br Dent J* 112: 187-197.

29. McKay GS. The histology and microbiology of acute occlusal dentine lesions in human permanent molar teeth. *Arch Oral Biol* 1976; 21:51-58.
30. Stankoska K, Sarram L, Smith S, Bedran-Russo AK, Little CB, Swain MV, et al. Immunolocalization and distribution of proteoglycans in carious dentine. *Aust Dent J* [Internet]. 2016;61(3):288–97. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/adj.12376>
31. Bedran-Russo AKB, Pereira PNR, Duarte WR, Okuyama K, Yamauchi M. Removal of dentin matrix proteoglycans by trypsin digestion and its effect on dentin bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* [Internet]. 2008;85(1):261–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.30944>
32. Lu S, Zhao S-J, Gao Y, Sun Y, Li X, Chen J-H. Proteoglycans affect monomer infiltration in the etch-and-rinse bonding technique. *Dent Mater* [Internet]. 2014;30(11):e289-99. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014.05.015>
33. Mazzoni A, Pashley DH, Ruggeri A Jr, Vita F, Falconi M, Di Lenarda R, et al. Adhesion to chondroitinase ABC treated dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* [Internet]. 2008;86(1):228–36. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.31010>
34. Farina AP, Vidal CMP, Cecchin D, Aguiar TR, Bedran-Russo AK. Structural and biomechanical changes to dentin extracellular matrix following chemical removal of proteoglycans. *Odontology* [Internet]. 2019;107(3):316–23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10266-018-00408-0>

35. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res*. 2002;81(8):556–60.
36. Shibata S, Vieira LC, Baratieri LN, Fu J, Hoshika S, Matsuda Y, Sano H. Evaluation of microtensile bond strength of self-etching adhesives on normal and caries-affected dentin. *Dent Mater J*. 2016;35(2):166-73.
37. Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiporn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentin. *Jpn Dent Sci Rev [Internet]*. 2011;47(2):102–14. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1882761611000299>
38. Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont*. 2006 Mar-Apr;15(2):82-8.

