



UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA DEGRADACIÓN
ENZIMÁTICA DE LOS PROTEOGLICANOS INTRATUBULARES EN
LA ADHESIÓN DENTINARIA**

MAITE CAROLINA ROJAS CONTRERAS
TANIA ALEJANDRA SANZANA ORTIZ

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

Profesor Guía: Dr. Alejandro Oyarzún Droguett
Profesor Colaborador: Dr. Carlos Ferreccio Damacela

Santiago, Chile
2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos dar las gracias a Dios por guiarnos a lo largo de nuestra carrera, por darnos esperanza y fortaleza en los momentos más difíciles.

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a nuestras familias que siempre han estado a nuestro lado, entregándonos su apoyo incondicional y amor. A nuestras mascotas quienes nos brindaron el apoyo emocional en este proceso.

Nuestros amigos que fueron también nuestros compañeros de clínica, por su constante motivación para poder aprobar exitosamente los ramos académicos.

A los docentes que año tras año han aportado en nuestro desarrollo profesional, en diferentes ámbitos relacionados a nuestra carrera.

En especial a nuestro gran docente guía el Dr. Alejandro Oyarzún, por su apoyo y paciencia a lo largo de todo este proceso. Su amplio conocimiento, su pensamiento crítico, su capacidad de resolución de problemas, su compromiso por la docencia y su sentido del humor, fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

De la misma forma, al Dr. Carlos Ferreccio por entregarnos de su conocimiento en el ámbito rehabilitador, quien nos ha dado distintas herramientas para realizar fortalecer nuestra práctica clínica.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y MÉTODO.....	13
1. Selección de muestras.....	13
2. Procesamiento histológico y técnica adhesiva	13
3. Técnica histológica e histoquímica de proteoglicanos.....	14
4. Técnica inmunohistoquímica de proteoglicanos.....	14
5. Microscopía y Fotografía.....	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIÓN.....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMEN

Introducción: La dentina está formada principalmente por colágeno tipo I, proteínas no colágenas, proteoglicanos (PGs) y lípidos, que desempeñan un papel crucial en sus propiedades físicas y la mineralización. En odontología adhesiva, no se conoce con exactitud el rol de estas macromoléculas.

Objetivos: Evaluar la difusión lateral de los sistemas adhesivos en el compartimento intratubular luego de la eliminación enzimática de los PGs de la dentina.

Metodología: En 30 molares sanos se expuso la dentina circumpulpar mediante desgaste. 10 especímenes fueron desmineralizados con ácido fórmico al 10%. 10 especímenes fueron acondicionados con ácido ortofosfórico al 37% para luego ser incubados con tripsina al 0,1%. Se utilizó la técnica adhesiva "wet bonding" con Adper Single Bond 2. En cortes histológicos se detectó inmunohistoquímicamente la presencia de condroitín sulfato usando anticuerpo monoclonal (CS-56). Los cortes fueron contrastados posteriormente con azul de toluidina o safranina O-fast green.

Resultados: En cortes histológicos de especímenes desmineralizados e incubados en TRY, se observó que el adhesivo infiltró irregularmente la dentina intertubular, formando una zona híbrida difusa con baja afinidad por los colorantes. Además, penetró los túbulos dentinarios, creando tags de resina cilíndricos que ocupan todo el lumen tubular. Lateralmente el adhesivo formó una zona híbrida intratubular.

Conclusión: Los PGs de la dentina intratubular determinan la morfología infundibuliforme de los tags de resina. Su remoción permite la hibridación de las paredes del túbulo.

ABSTRACT

Introduction: Dentin consists mainly of type I collagen, noncollagenous proteins, proteoglycans (PGs) and lipids, which play a crucial role in its physical properties and mineralization. In adhesive dentistry, the exact role of these macromolecules is not known.

Objective: To evaluate the lateral diffusion of adhesive systems in the intratubular compartment after enzymatic removal of PGs from dentin.

Methodology: In 30 healthy molars, the circumpulpal dentin was exposed by attrition. Ten specimens were demineralized with 10% formic acid. Ten specimens were conditioned with 37% orthophosphoric acid and then incubated with 0.1% trypsin. The adhesive wet bonding technique was used with Adper Single Bond 2. The presence of chondroitin sulfate was detected immunohistochemically in histological sections using monoclonal antibody (CS-56). The sections were subsequently contrasted with toluidine blue or safranin O fast green.

Results: In histological sections of demineralized specimens incubated in TRY, it was observed that the adhesive irregularly infiltrated the intertubular dentin, forming a diffuse hybrid zone with low affinity for the dyes. In addition, it penetrated the dentinal tubules, creating cylindrical resin tags that occupy the entire tubular lumen. Laterally, the adhesive formed an intratubular hybrid zone.

Conclusion: Intratubular dentin PGs determine the infundibuliform morphology of resin tags. Their removal allows hybridization of the tubule walls.

INTRODUCCIÓN

La matriz orgánica de la dentina con colágeno tipo I como componente principal, queda expuesta después de la desmineralización en la caries dentinaria, la erosión o el acondicionamiento ácido durante el tratamiento restaurador adhesivo con composite. La desmineralización de la dentina que deja expuesta la matriz dentinaria podría ser perjudicial para el tejido si no se protege adecuadamente. En odontología adhesiva, la desmineralización parcial o completa es un prerrequisito para una unión exitosa con los adhesivos contemporáneos ⁽¹⁾.

La dentina puede describirse como un compuesto reforzado nanocristalino, el 90% de la matriz orgánica es colágeno tipo I y el 10% restante consiste en proteínas no colágenas (NCP), proteoglicanos (PGs) y lípidos (<2%). Las NCP son un grupo heterogéneo de fosfoproteínas, glicoproteínas, proteínas séricas, enzimas y factores de crecimiento ⁽²⁾. Los PGs están compuestas por una proteína central con una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) unidos covalentemente. La estructura de los PGs en la dentina es similar a la que se encuentra en el cartílago, la piel y el hueso, estos desempeñan un papel fundamental en las propiedades físicas de la dentina, preservando la morfología de la matriz orgánica desmineralizada y promoviendo la mineralización de la dentina. La eliminación de los PGs puede reducir la resistencia de la unión al cizallamiento en la dentina ⁽³⁾.

Existen dentro de la matriz pequeños proteoglicanos que son ricos en leucina (SLRP) que regulan la formación de la dentina, la mineralización y el sistema de soporte mecánico hidráulico de la Matriz Extracelular (MEC). Los SLRP más abundantes que se encuentran en la dentina son la decorina (DCN) y el biglicano (BGN) que están formados por una proteína central con una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) ricos en condroitín/dermatán sulfato (CS/DS) unidos covalentemente y cargados negativamente ⁽⁴⁾.

La sulfatación de los aminoazúcares en las cadenas de GAGs confiere una carga altamente negativa a las moléculas de la cadena lineal, por lo tanto, los GAGs pueden contribuir a la capacidad de los PGs para unirse y organizar las moléculas de agua en la técnica de unión húmeda y desempeñar un papel importante en la regulación de la arquitectura de la matriz de dentina desmineralizada ⁽⁵⁾.

Se han realizado varios estudios para examinar el efecto de los PGs en la matriz de dentina desmineralizada sobre la fuerza de unión a la dentina. Estos estudios determinaron que las fuerzas de unión se vieron afectadas después de la eliminación enzimática con tripsina (TRY) de los PGs. Esta proteasa elimina selectivamente la proteína central de los PGs, se liberan las cadenas de GAGs y desaparecen durante el lavado antes de la aplicación del sistema adhesivo, mejorando la adhesión observándose un aumento de la fuerza de tracción. Esto da como hipótesis que, la eliminación de los proteoglicanos con la enzima TRY, afecta la capa híbrida del sistema adhesivo de lavado y grabado ⁽⁵⁾. Sin embargo, los autores no aportan evidencia morfológica que sustenten dicho enunciado.

Este estudio fue diseñado para responder el siguiente problema de investigación: “Qué evento morfológico observable macroscópicamente modifica el proceso de adhesión luego de la eliminación enzimática de los PGs de la dentina”.

Esta investigación contribuirá a conocer la biología de los PGs de los tejidos mineralizados en general y de la dentina en particular. Desde una perspectiva Odontológica nuestros resultados podrían explicar los mecanismos estructurales y moleculares de la adhesión de biomateriales sintéticos y su implicancia para la Odontología Adhesiva.

MATERIAL Y MÉTODO

La dentina humana está compuesta aproximadamente por un 70% en peso de material inorgánico, un 18% en peso de material orgánico y un 12% en peso de agua. Cuando se desmineraliza la dentina, la concentración de agua aumenta significativamente del 20% a aproximadamente el 50 - 70% en volumen, lo que constituye un cambio significativo en la composición que tiene profundas implicaciones en las propiedades mecánicas de la dentina y en todo el proceso adhesivo ⁽⁶⁾.

La dentina tiene una estructura tubular y cada túbulo tiene forma de cono invertido, con el diámetro mayor en el tercio interno cerca del límite con la pre dentina. Cerca de la pulpa, el área ocupada por túbulos dentinarios alcanza el 22% mientras que cerca del LAD representa solo el 1% de la superficie de la dentina. Los túbulos están rodeados internamente por dentina intratubular mineralizada, de ancho variable dependiendo de la zona observada a lo largo del túbulo. Teniendo en cuenta que la permeabilidad de la dentina ocurre principalmente a través de los túbulos dentinarios, las variaciones regionales en el calibre y la densidad de los túbulos provocan cambios significativos y proporcionales en cuanto a la permeabilidad de la dentina. Cuando la dentina se graba con ácido, las características de composición se modifican y ocurre un aumento significativo en la permeabilidad. Es así como las variaciones en la morfología y la permeabilidad de la dentina afectan directamente la unión ⁽⁶⁾.

Alrededor del 90% de la matriz orgánica dentinaria es colágeno, el componente principal del colágeno dentinario es el tipo I, donde la mayoría es un heteropolímero con dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(I)$. Los odontoblastos también sintetizan y secretan un homopolímero de colágeno tipo I que consta de tres cadenas $\alpha 1(I)$ y que comúnmente se denomina colágeno tipo I trimmer. Varios estudios han

encontrado que en la matriz dentinaria existe colágeno tipo III y este se localiza en el interior de los túbulos dentinarios ⁽⁷⁾.

Además del colágeno de tipo I, que aporta hasta el 90% del material orgánico, la matriz extracelular (MEC) de la dentina contiene varias proteínas y proteoglicanos (PGs), denominados colectivamente proteínas no colágenas (PNCs), que constituyen aproximadamente el 10% de la matriz ⁽⁸⁾.

Los proteoglicanos (PGs) de la dentina desempeñan papeles estructurales, metabólicos y funcionales en los tejidos blandos y calcificados, ya que también son componentes clave en el proceso de mineralización de la dentina y el hueso. Los PGs se componen de una molécula proteica central a la que se unen covalentemente glicosaminoglicanos (GAGs) como cadenas laterales. Los GAGs son polisacáridos lineales, sulfatados y cargados negativamente, que pueden dividirse en: glicosaminoglicanos sulfatados que comprenden condroitín 4/6 sulfato (CS), dermatán sulfato (DS), queratán sulfato (KS), heparina y heparán sulfato (HS) y glicosaminoglicanos no sulfatados como el ácido hialurónico (HA) ⁽⁸⁾.

Las cadenas de GAGs están formadas por unidades disacáridas repetidas que contienen aminoazúcares acetilados (N-acetil-galactosamina o N-acetil-glucosamina) y ácido urónico (ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico). Mientras que, los glicosaminoglicanos KS se basan en disacáridos repetidos que contienen galactosa (4-N-acetil-glucosamina- β 1, 3-galactosa- β 1) ⁽⁸⁾.

En la dentina, los GAGs se relacionan con cadenas polipeptídicas como parte de la familia de PGs pequeños ricos en leucina (SLRP) de clase I. Esta familia está formada por macromoléculas estructuralmente relacionadas, pero son distintas genéticamente. Una característica distintiva de estas moléculas es la presencia de entre 7 y 24 repeticiones en tándem de módulos ricos en leucina en la proteína del

núcleo. Se ha determinado que los SLRP dentinarios son predominantemente ricos en CS, con decorina (DCN) y biglicano (BGN) como componentes principales ⁽⁸⁾.

La DCN y el BGN están implicados en la dirección del crecimiento de cristales de hidroxiapatita y pueden unirse al procolágeno tipo I y al colágeno, regulando así la fibrillogénesis durante la dentinogénesis. La DCN suele llevar una cadena de GAGs, en la que predomina el CS en los tejidos duros y el DS en los tejidos blandos. El BGN lleva dos cadenas CS/DS de glicosaminoglicanos, predominando el CS en el tejido calcificado, de forma similar a la DCN. A pesar de su alto nivel de homología a nivel de aminoácidos, los patrones de expresión de DCN y BGN son diferentes. Las funciones propuestas para la DCN y la BGN incluyen: estabilización, potencial de fijación del calcio, fibrillogénesis del colágeno, interacción con la hidroxiapatita e inhibición del crecimiento de cristales ⁽⁸⁾.

Tanto los GAGs como los PGs, han sido identificados en predentina y dentina. Los GAGs condroitín-4-sulfato (C4S), condroitín-6-sulfato y queratán sulfato, han sido identificados en la predentina, y sólo el condroitín-4-sulfato se encuentra en los túbulos dentinarios rodeando los procesos odontoblásticos. Por otra parte, DCN ha sido detectada en la matriz dentinaria y predentinaria. En la predentina, se ha detectado la presencia de DCN, BGN y Lumican. En la dentina circumpulpar sólo se ha detectado la presencia del DCN en el interior de los túbulos dentinarios ⁽⁹⁾.

Desde un punto de vista estructural, los estudios han demostrado que después de la desmineralización y pérdida de la dentina intratubular, aparece dentro de los túbulos dentinarios una red de filamentos finos y gránulos electrodensos. Al teñir esta red con los colorantes Azul de Alcian, Azul Cuprolínico, Nitrato de Bismuto, Ácido Fosfotúngstico y Polietileneimina (PEI) y removerla por la acción de condroitinasa AC o hialuronidasa, se vio que esta red de filamentos y gránulos electrodensos presentan una naturaleza proteoglicánica ^(9, 10). Estudios inmunoultraestructurales, demostraron que la dentina intertubular presentó una

débil señal para la DCN, mientras que el proceso odontoblástico y la dentina intratubular desmineralizada presentó una inmunomarcación elevada ⁽¹¹⁾. Como la dentina contiene una gran cantidad de proteoglicanos, la degradación enzimática no los elimina por completo, sino solo a las cadenas de GAGs que los constituyen, mientras que la proteína central de estos aún permanece dentro de la matriz ⁽¹²⁾.

En el interior de todos los túbulos dentinarios desmineralizados se ha demostrado la existencia de una estructura tubular electrodensa denominada lámina limitans. Este concepto se propuso para nominar a una estructura tubular electrodensa que está presente en el cartílago y hueso mineralizado ⁽¹³⁾. Esta lámina limitans es sensible a la acción de la hialuronidasa, lo que sugirió que estaba compuesta por GAGs ^(14, 15). Recientemente, el análisis de la dentina humana con microscopía electrónica de barrido de alta resolución, después de digestiones enzimáticas con condroitinasa ABC o TRY, reveló que la red orgánica intratubular se origina a partir de la lámina limitans y que esta membrana tubular, que se encuentra en toda la longitud del túbulo, está compuesta principalmente por núcleos proteicos de PGs⁽¹⁶⁾.

La Odontología Operatoria, modifica la organización estructural de la dentina durante sus procedimientos con el objeto de obtener anclaje de materiales restauradores sintéticos a la superficie dentaria. La adhesión a dentina se relaciona con la infiltración y acoplamiento micromecánico de materiales restauradores a la matriz dentinaria acondicionada, para la formación de una capa intermedia de biomateriales adhesivos fotopolimerizados ⁽¹⁷⁾.

Los fundamentos estructurales de la adhesión de biomateriales a la dentina están determinados por la infiltración de agentes promotores de adhesión y adhesivos entre las fibrillas colágenas de la dentina intertubular acondicionada para formar la denominada capa híbrida. Otra estructura presente que acompaña a la formación

de esta capa híbrida son los tags de resina en el interior de los túbulos dentinarios (17, 18).

En la adhesión a la dentina se deben considerar tres variables del tejido: su hidrofiliidad, la baja energía superficial y la organización estructural de las fibrillas colágenas luego del grabado ácido. Es por esto, que en el proceso de adhesión dentinaria se hace necesario la utilización de un agente promotor de adhesión que sea capaz de humectar las fibrillas colágenas expuestas por el grabado ácido, además de desplazar la humedad dentinaria residual, transformando la superficie de hidrofílica a hidrofóbica, y permitiendo la entrada de los monómeros constituyentes del adhesivo dentro de la matriz dentinaria desmineralizada (18).

El agente promotor de adhesión 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y el bifendimetacrilato (BPDM) entre otros, está constituido por monómeros con dos grupos funcionales diferentes, uno hidrofílico que tiene mayor afinidad por el colágeno y la superficie dentinaria, y otro hidrofóbico que tiene mayor afinidad por el material restaurador. El HEMA es un derivado del metilmetacrilato, donde el grupo carboxilo es esterificado por etanol, haciendo que esta molécula sea muy hidrofílica (18).

El primer paso de la técnica adhesiva con biomateriales de grabado y lavado es la creación de vías para la infiltración de resina. Esto se logra tradicionalmente tratando la dentina con soluciones ácidas, con el fin de disolver el contenido mineral de los 5 a 8 μm superiores de la dentina, dejando una red porosa de colágeno tipo I altamente reticulado suspendido en agua (6).

El segundo paso es la infiltración del adhesivo compuesto por monómeros de resina, donde estos desplazan el agua dentro y alrededor de las fibrillas de colágeno sin reducir el tamaño de las porosidades creadas por la disolución de los

cristales de hidroxiapatita y así reemplazar el agua con la resina infiltrada. Una vez completado el proceso de infiltración, se aplica activación por luz para polimerizar la resina y generar la capa híbrida. Los sistemas adhesivos autograbantes comparten el mismo objetivo final al unirse a la dentina, pero combinan la creación de vías y la infiltración de resina en un solo paso ⁽⁶⁾.

La función de los PGs de la matriz dentinaria durante el proceso de adhesión es controvertida. Estudios preexistentes utilizando digestiones enzimáticas, microscopía electrónica de transmisión, inmunofluorescencia, microscopía confocal y pruebas de resistencia a la tracción, han entregado resultados opuestos.

El primer estudio publicado por Karina y cols, se demostró que la digestión con tripsina remueve eficientemente CSPGs de la matriz dentinaria. Además, demostró que después de la tripsinización la adhesión con el sistema adhesivo Single Bond (3M) aplicado según instrucción de fabricante, presentó menores niveles de resistencia a la tracción ⁽¹⁹⁾.

La remoción de CS 4/6 utilizando condroitinasa ABC y su efecto sobre la adhesión del sistema Scotchbond Multipropósito Plus y Prime and Bond NT fue estudiado por Mazzoni y cols, allí se demostró que con ambos sistemas adhesivos la remoción de los GAGs provoca un incremento de los niveles de resistencia a la tracción ⁽¹²⁾.

En un intento por demostrar el efecto de la digestión enzimática con tripsina sobre los mecanismos de adhesión, Lu y cols demostraron que existió un aumento significativo del grosor de la zona híbrida cuando se utilizaron los adhesivos Single Bond (3M) y Prime and Bond NT ⁽⁵⁾.

Adicionalmente, Farina y cols, demostraron que la remoción enzimática de los PGs de la matriz de la dentina utilizando protocolos de digestión enzimática con tripsina,

mejoró significativamente los valores de resistencia a la tracción de dos adhesivos experimentales que contenían HEMA al 6% y 18%. Sin embargo, los valores de resistencia a la tracción no fueron afectados por la digestión enzimática con TRY cuando se utilizó Single Bond 2 ⁽²⁰⁾.

Los estudios anteriores hipotetizan que cambios en la energía superficial de la dentina debido a la remoción de los PGs, mejora la adhesión probablemente debido a que el agua del tejido es reemplazada más eficientemente durante la infiltración de la resina y polimerización. Sin embargo, los estudios no entregan evidencia morfológica que permitan interpretar los resultados anteriores ⁽²⁰⁾.

HIPÓTESIS

La digestión enzimática de los PGs permite la difusión lateral de los sistemas adhesivos en el compartimiento intratubular.

OBJETIVOS

a) Objetivo General

1. Evaluar la difusión lateral de los sistemas adhesivos en el compartimiento intratubular luego de la eliminación enzimática de los PGs de la dentina.

b) Objetivos Específicos

1. Observar microscópicamente el comportamiento de los sistemas adhesivos en el compartimiento intratubular de la dentina modificada enzimáticamente.
2. Relacionar la inmunexpresión de los GAGs intratubulares con la difusión de los sistemas adhesivos en el compartimiento intratubular.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Selección de la muestra

Se seleccionaron 30 molares permanentes sanos, libres de caries, sin compromiso pulpar, con indicación de extracción terapéutica en la Asignatura de Medicina Estomatológica y Clínica del Dolor II, cuyo intervalo de edad fue entre 20 y 28 años.

Posteriormente del bloqueo anestésico, se realizaron las extracciones dentales y los especímenes fueron fijados inmediatamente en formaldehído al 10 %, pH 7,4. Algunos especímenes fueron mantenidos en suero fisiológico.

2. Procesamiento histológico y Técnica adhesiva

En todos los especímenes, la raíz fue eliminada a nivel del LAC mediante fresa cilíndrica de carbide de alta velocidad bajo refrigeración constante.

En todos los especímenes, la dentina circumpulpar del tercio oclusal externo fue expuesta desgastando el esmalte oclusal mediante discos diamantados metalúrgicos y refrigeración constante obteniéndose segmentos dentarios de 3 mm de grosor.

En 10 segmentos dentarios fueron desmineralizados en block con ácido fórmico al 10% durante 12 horas a 37° C. Los segmentos fueron incubados en Tripsina al 0,1 % en buffer fosfato pH 7,9 durante 4 horas a 37°C.

En 10 segmentos dentarios la dentina y esmalte periférico fueron acondicionados con ácido ortofosfórico al 37% (3M, St. Paul, MN, USA) durante 60 segundos.

Posteriormente los segmentos fueron incubados en Tripsina al 0,1 % en buffer fosfato pH 7,9 durante 4 horas a 37°C.

Se realizó técnica adhesiva (wet bonding technique) utilizando el adhesivo Adper Single Bond 2 (3M St. Paul, MN, USA) de acuerdo con la instrucción del fabricante. Los 10 especímenes restantes sirvieron como control.

3. Técnica Histológica e Histoquímica de Proteoglicanos

Los especímenes de ambos grupos fueron desmineralizados totalmente con ácido fórmico al 10%, se deshidrataron en etanoles de concentración ascendente, se transparentaron en xilol y se incluyeron en parafina histológica a 60° C.

Se realizaron cortes de 6 µm de grosor, los que fueron montados sobre portaobjetos silanizados. Los cortes, luego de ser desparafinados se tiñeron histoquímicamente con una solución de Azul de Toluidina al 0,5 % o con una solución de Safranina O al 0,1% - Light Green SF al 0,1% para análisis topográficos.

4. Técnica Inmunohistoquímica de Proteoglicanos

La superficie de los cortes histológicos de 6 µm fue tratada con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Los sitios inespecíficos se bloquearon con suero de cabra no inmune al 5% durante 30 minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-Condroitín Sulfato (Clon CS-56, Sigma.) diluido 1:200 en buffer fosfato salino (PBS) - albúmina de suero bovino (BSA) al 3%.

Los cortes 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% y peróxido de hidrógeno al 0,01%.

Como control, el anticuerpo primario fue reemplazado por suero de cabra no inmune.

5. Microscopía y Fotografía

Los tejidos teñidos histoquímicamente y los tejidos inmunomarcados fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiostar (Germany) y fotografiados con una cámara digital enfriada Qimaging Micropublisher. Las imágenes fueron almacenadas como archivos JPEG o TIFF.

RESULTADOS

Grupo Control.

La técnica adhesiva utilizada permitió observar en los cortes histológicos de los especímenes control, que el adhesivo infiltra la superficie de la dentina acondicionada para conformar una capa o zona híbrida bien diferenciada, regular, con afinidad tintorial marcada por los colorantes empleados. La infiltración del adhesivo en el interior de los túbulos dentinarios permitió detectar la formación de tags de resina infundibuliformes y de longitudes variables que ocupaban el lumen tubular sólo en zonas adyacentes a la capa híbrida. En zonas más profundas, los tags de resina no ocupaban el lumen total del túbulo dentinario calcificado, adelgazándose hacia la profundidad del tejido (Lámina 1).

La reacción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal empleado permitió detectar, en el grupo control, que los epítomos de condroitín sulfato se expresan como un precipitado de color café amarillento y se asocian para conformar estructuras tubulares que rodean la superficie externa de los tags de resina en toda su longitud. Las estructuras tubulares inmunoreactivas, continúan siendo detectadas en el interior de los túbulos dentinarios de zonas profundas de la dentina analizada. No se evidenció reacción inmunohistoquímica en el espesor de la zona híbrida como tampoco en la dentina intertubular (Lámina 1).

Digestión enzimática previa a la adhesión.

En los cortes histológicos provenientes de especímenes experimentales, en los cuales la superficie fue acondicionada con ácido fosfórico y luego incubada en TRY antes de la infiltración del adhesivo, fue posible observar que el adhesivo infiltra en la dentina intertubular en forma irregular generando una zona híbrida de límites difusos y con una menor afinidad tintorial por los colorantes utilizados. La infiltración del adhesivo en el interior de los túbulos dentinarios permitió detectar la formación

de tags de resina de forma cilíndrica especialmente en las áreas adyacentes a la capa híbrida, se observó que el adhesivo rellena completamente el lumen de los túbulos dentinarios. En zonas más profundas del tejido se pudo detectar que, el adhesivo utilizado adopta una forma infundibuliforme (Lámina 2).

La reacción inmunohistoquímica no fue detectada en la periferia de los tags cilíndricos de resina ni en las paredes del túbulo dentinario en el espesor de la dentina peritubular, fundamentalmente en la zona adyacente a la zona híbrida. En zonas profundas del tejido fue posible detectar la reacción inmunohistoquímica, con menor definición histológica que los grupos control y fue posible observar estructuras filamentosas y granulares aleatoriamente dispuestas en el lumen de los túbulos dentinarios (Lámina 2).

La observación anterior queda de manifiesto al observar túbulos cortados transversales en el espesor de la zona híbrida cerca de la superficie (Lámina 2).

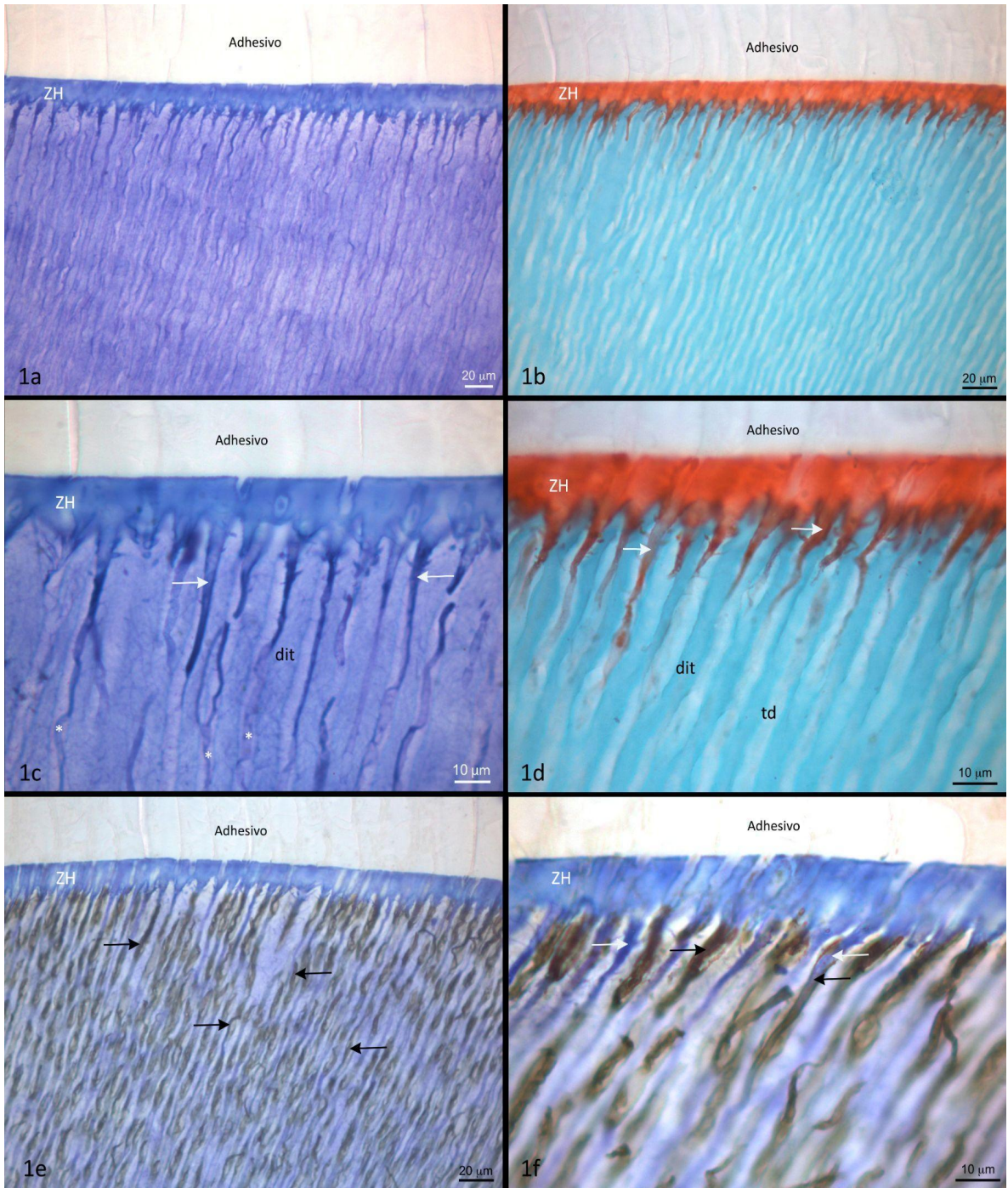
Digestión enzimática en especímenes previamente desmineralizados.

En los cortes histológicos provenientes de especímenes previamente desmineralizados y posteriormente incubados en TRY, fue posible observar que el adhesivo infiltra la dentina intertubular en forma irregular generando una zona híbrida de límites difusos y con una menor afinidad tintorial por los colorantes utilizados. La infiltración del adhesivo en el interior de los túbulos dentinarios permitió detectar la formación de tags de resina de forma cilíndrica de longitud indefinida y que difunden por el interior de los túbulos dentinarios hasta zonas distantes de la superficie del tejido.

Una observación destacable fue que el adhesivo infiltra las paredes laterales de los túbulos dentinarios conformados por dentina intertubular y que los tags cilindros de resina presentan poca afinidad tintorial por los colorantes (Lámina 3).

Inmunohistoquímicamente se demostró la ausencia total de inmunoreacción en aquellos tags que toman contacto con la pared de la dentina intertubular y en las zonas donde el adhesivo difunde lateralmente desde el interior de los túbulos dentinarios (Lámina 3).

Lámina 1



Leyenda de Figuras

Lámina 1

Figura 1a

Espécimen control. Azul de Toluidina.

En esta fotografía se observa un corte de un espécimen control (no incubado en TRY) y sin detección inmunohistoquímica. La zona híbrida (ZH) de color azul se diferencia con nitidez de la dentina profunda no hibridizada. Nótese la presencia de estructuras filamentosas en el interior de los túbulos dentinarios.

Figura 1b

Espécimen control. Safranina O-Light Green.

En esta fotografía se observa un corte de un espécimen control (no incubado en TRY) y sin detección inmunohistoquímica. La zona híbrida (ZH) de color rojo anaranjado se diferencia con nitidez de la dentina profunda no hibridizada de color verde.

Figura 1c

Espécimen control. Azul de Toluidina.

Con mayor aumento se detecta que el adhesivo infiltra la matriz dentinaria produciendo una zona híbrida de color azul bien definida (ZH) y la formación de tags de resina infundibuliformes de longitudes variables (flecha blanca) en el interior de los túbulos dentinarios. Nótese que bajo la zona híbrida estos tags de resina no toman contacto con la dentina intertubular. En el interior de los túbulos dentinarios

de zonas profundas se observan estructuras filamentosas. (asterisco). Dit: dentina intertubular. La interfase entre la ZH y el adhesivo polimerizado es bien definida y lineal.

Figura 1d

Espécimen control. Safranina O-Light Green.

Con mayor aumento de detecta que el adhesivo infiltra la matriz dentinaria produciendo una zona híbrida de color rojo anaranjado bien definida (ZH) y la formación de tags de resina infundibuliformes de longitudes variables (flecha blanca) en el interior de los túbulos dentinarios. Nótese que bajo la zona híbrida estos tags de resina no toman contacto con la dentina intertubular. La dentina intertubular (dit) se observa de color verde y los túbulos dentinarios (td) aparentemente vacíos.

Figura 1e

Espécimen Control. Anti - Condroitín Sulfato. Contraste: azul de toluidina.

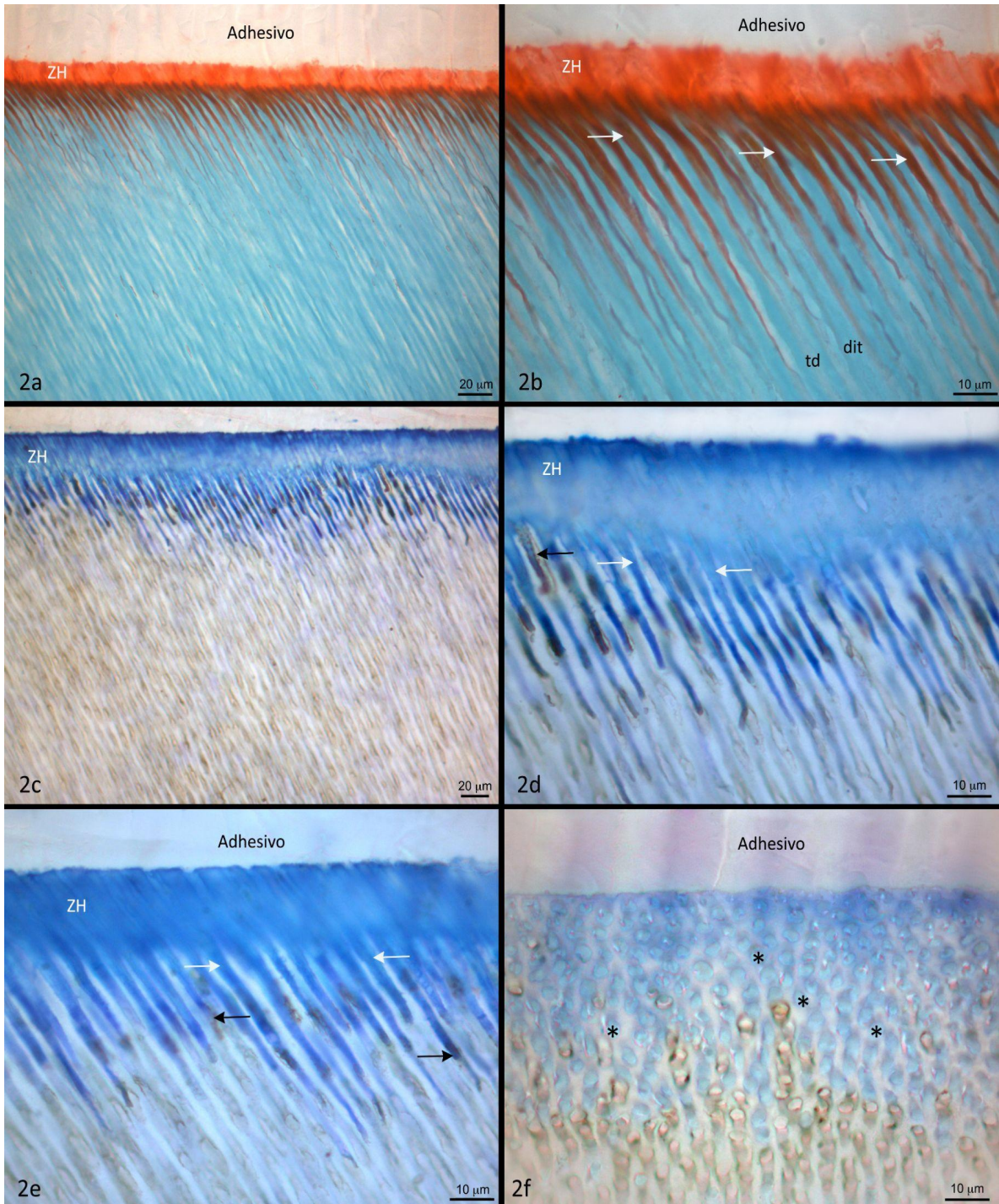
Obsérvese en el corte histológico del espécimen, la inmunoreacción positiva de color café amarillento asociada con los túbulos dentinarios cortados longitudinalmente (flechas negras). El adhesivo y la zona híbrida (ZH) permanecen negativos a la inmunotinción.

Figura 1f

Espécimen Control. Anti - Condroitín Sulfato. Contraste: azul de toluidina.

Con mayor aumento al mostrado en la fig. 1e, se observa con nitidez que la inmunoreacción de color café amarillento (flecha negra) se asocia evidentemente con la periferia de los tags de resina infundibuliformes (flecha blanca) y con material filamentososo y/o amorfo asociado a las paredes del túbulo dentinario desmineralizado. La zona híbrida (ZH) y el adhesivo permanecen negativos a la inmunotinción. En zonas profundas del tejido, se observaron estructuras filamentosas en el interior de los túbulos dentinarios que manifiestan positividad a la inmunoreacción.

Lámina 2



Leyenda de Figuras

Lámina 2

Figura 2a

Espécimen Experimental. (TRY) antes de adhesión. Safranina O-Light Green.

En esta fotografía la zona híbrida (ZH) y los tags de resina se aprecian teñidos de rojo anaranjado. La dentina intertubular de zonas profundas se detecta teñida de color verde.

Figura 2b

Espécimen Experimental. (TRY) antes de adhesión. Safranina O-Light Green.

Con un aumento mayor al mostrado en la fig. 2a, obsérvese como el adhesivo infiltra a la matriz dentinaria produciendo una zona híbrida en la cual la interfase con el adhesivo es irregular y festoneado. Los tags de resina ocupan todo el lumen del túbulo dentinario en las zonas adyacentes a la ZH tomando contacto con las paredes de dentina intertubular (flecha blanca). Zonas infundibuliformes del tag de detectan en la profundidad. dit: dentina intertubular.

Figura 2c

Espécimen Experimental. (TRY) antes de adhesión - anti Condroitín Sulfato. Contraste: azul de toluidina.

Obsérvese cómo el adhesivo infiltra a la matriz dentinaria produciendo una zona híbrida difusa, de profundidades variables, y con distintas afinidades tintoriales. Los tags de resina adyacentes a la ZH toman contacto con las paredes de dentina intertubular. La inmunoreacción se presenta como un precipitado de color café

amarillento poco organizado y difuso en el interior de los túbulos dentinarios de zonas profundas. La intensidad de la reacción de la peroxidasa aumenta en zonas aisladas de algunos tags de resina.

Figura 2d

Espécimen Experimental. (TRY) antes de adhesión - anti Condroitín Sulfato.
Contraste: azul de toluidina.

Con un aumento mayor se observa con nitidez cómo el adhesivo infiltra a la matriz dentinaria produciendo una zona híbrida difusa, de profundidades variables, y con distintas afinidades tintoriales. Los tags de resina adyacentes a la ZH toman contacto con las paredes de dentina intertubular. La inmunoreacción se presenta como un precipitado de color café amarillento poco organizado y difuso en el interior de los túbulos dentinarios de zonas profundas. La intensidad de la reacción de la peroxidasa aumenta en zonas aisladas de algunos tags de resina (flecha negra)

Figura 2e

Espécimen Experimental. (TRY) antes de adhesión - anti Condroitín Sulfato.
Contraste: azul de toluidina.

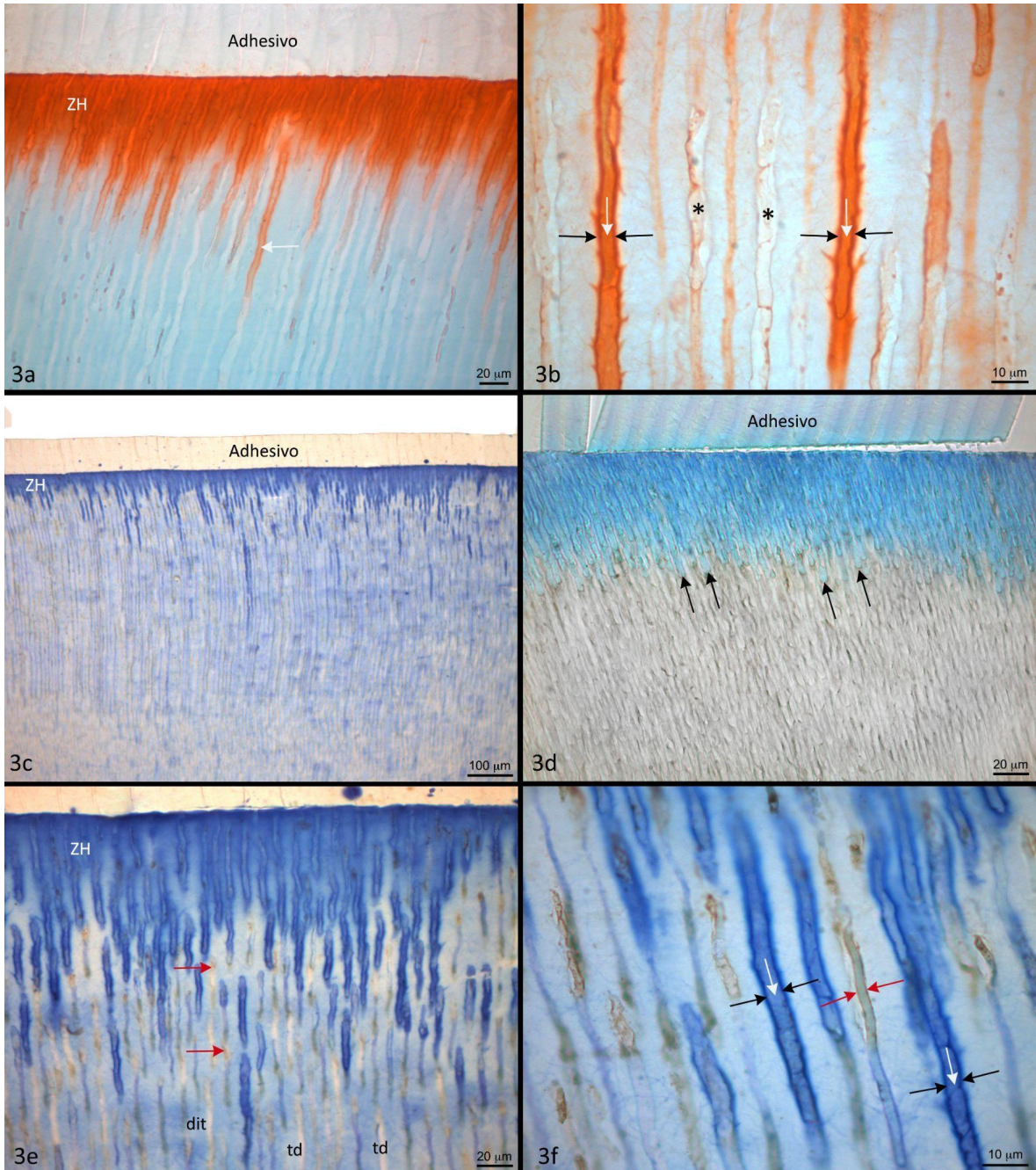
En esta fotografía se pone de manifiesto que los tags de resina toman contacto directo con la pared de los túbulos dentinarios (flecha blanca). La inmunoreacción es escasa y poco organizada en el interior de los túbulos dentinarios de zonas profundas. La intensidad de la reacción de la peroxidasa aumenta en zonas aisladas de algunos tags de resina (flecha negra).

Figura 2f

Espécimen Experimental. (TRY) antes de adhesión - anti Condroitín Sulfato.
Contraste: azul de toluidina.

Se observan en la fotografía túbulos dentinarios cortados transversalmente. Se demuestra el contacto directo del adhesivo con las paredes del túbulo dentinario (asterisco). Nótese que en los túbulos inmunomarcados no hay presencia de adhesivo polimerizado.

Lámina 3



Leyenda de Figuras

Lámina 3

Figura 3a

Espécimen Experimental. Desmineralización - (TRY) antes de adhesión. Safranina O-Light Green.

En esta fotografía la dentina intertubular de la zona híbrida (ZH) se observa de color rojo anaranjado. Se detecta que los tags de resina presentan menor afinidad por el colorante que la dentina intertubular. dit:dentina intertubular, td: túbulo dentinario.

Figura 3b

Espécimen Experimental. Desmineralización - (TRY) antes de adhesión. Safranina O-Light Green.

Los tags de resina ocupan todo el lumen del túbulo dentinario (flecha blanca). Se observa que la dentina intertubular que conforma el túbulo dentinario desmineralizado está infiltrada por adhesivo el que le confiere un color rojo anaranjado intenso (flecha negra). Nótese que los túbulos que no contienen adhesivo polimerizado se observa la lámina limitans (asterisco) que presenta afinidad tintorial por la safranina O.

Figura 3c

Espécimen Experimental. Desmineralización - (TRY) antes de adhesión - anti Condroitín Sulfato. Contraste: azul de toluidina.

Obsérvese cómo el adhesivo infiltra a la matriz dentinaria produciendo una zona híbrida difusa y de profundidades variables. La inmunoreacción es escasa y solo se detecta en algunos túbulos dentinarios. ZH: zona híbrida.

Figura 3d

Espécimen Experimental. Desmineralización - (TRY) antes de adhesión - anti Condroitín Sulfato. Contraste: azul de toluidina. Microscopía de Fase Contrastada.

En esta fotografía con mayor aumento, el contraste de fase permite visualizar nítidamente los tags de resina los cuales en la mayor parte de su trayecto presentan una forma cilíndrica y toma contacto con la pared dentinaria. En el extremo apical, los tags de resina presentan una forma redondeada.

Figura 3e

Espécimen Experimental. Desmineralización - (TRY) antes de adhesión - anti Condroitín Sulfato. Contraste: azul de toluidina.

Se observa que la infiltración del adhesivo para formar la zona híbrida (ZH) es difusa, generando una zona híbrida (ZH) difícil de identificar. La inmunoreacción es escasa (flechas rojas) y los túbulos dentinarios (td) pueden observarse vacíos y libre de inmunoreacción.

Figura 3f

Espécimen Experimental. Desmineralización - (TRY) antes de adhesión - anti Condroitín Sulfato. Contraste: azul de toluidina.

Con mayor aumento es posible visualizar que el interior de los túbulos los tags de resina llenan completamente el lumen tubular y presentan una baja afinidad tintorial por el colorante. Se observa al igual que en la figura 3b, que el adhesivo infiltra la dentina intertubular de las paredes del túbulo dentinario y un aumento evidente de la intensidad de la coloración producida por el azul de toluidina. Una observación destacable es que en los tubos dentinarios que no contactan la pared de dentina intertubular, se detecta inmunoreacción positiva para el epítipo estudiado (flechas rojas).

DISCUSIÓN

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

De los SLRP detectados en la dentina, solo Decorina y Biglican poseen cadenas laterales de condroitin sulfato ⁽²¹⁾.

Desde esta perspectiva, es importante considerar que las cadenas laterales de Condroitín Sulfato presentes en el proteoglicano Decorina que se encuentran el interior de túbulos dentinarios, corresponden a polímeros lineales de unidades disacáridas repetidas, compuestos principalmente por una hexosamina más un ácido urónico, con distintos grados de sulfatación, lo que le confiere a estas moléculas una carga eléctrica negativa ⁽²²⁾.

En el año 1995, Titley K. y cols., realizaron experimentos para estudiar la morfología y composición de los tags de resina en dentina acondicionada con ácido fosfórico para su posterior análisis con microscopía electrónica de barrido y tinción con el colorante policatiónico Alcian Blue. Se utilizó para este propósito el sistema adhesivo Scotchbond Multipropósito Plus. Los resultados de esta investigación sugieren que el grabado con ácido ortofosfórico induce que los túbulos dentinarios adopten una forma infundibuliforme y la aparición de la lámina limitans ⁽²³⁾.

La formación de los tags de resina en el interior de los túbulos dentinarios durante el proceso de adhesión a la dentina no está claramente comprendido. Sin embargo, es altamente probable que los PGs intratubulares tengan un rol destacado para

permitir el ingreso de los materiales adhesivos en el interior de los túbulos dentinarios descalcificados para formar estructuras filamentosas de longitudes variables ⁽²⁴⁾. Además, sugiere que los tags son una combinación de adhesivo más un material Alcian Blue positivo presumiblemente asociado con la lámina limitans ⁽²³⁾.

El Alcian Blue es un colorante policatiónico utilizado en histología para la detección histoquímica de GAGs en los tejidos. Nuestro estudio, utilizando los colorantes policatiónicos azul de toluidina y safranina O entrega evidencia adicional de la participación de los GAGs durante el proceso de adhesión ya que al igual que en estudios anteriores la morfología de los tags de resina están profundamente influenciados por la distribución de reacción histoquímica de color azul (azul de toluidina) o rojo anaranjado (safranina O) alrededor de los tags de resina infundibuliformes de adhesivo polimerizado.

Estudios experimentales anteriores en muestras bovinas, demostraron que la eliminación de los PGs dentinarios mediante digestión enzimática con TRY 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), sugiriendo así que la eliminación de los PGs de la matriz dentinaria tiene un efecto desfavorable para la adhesión de biomateriales poliméricos ⁽¹⁹⁾. En este estudio, Karina y cols. desmineralizaron sus especímenes de 2 mm³ en ácido fosfórico al 10% durante 6 horas, antes de ser incubados en TRY para luego ser estudiados con microscopía electrónica de transmisión. Esto permitió concluir que la TRY remueve drásticamente los PGs asociados con las fibrillas de colágeno de la dentina intertubular. Es sorprendente el hecho que los autores no analizan el contenido polianiónico asociado con los túbulos dentinarios de sus muestras experimentales y solo analizan la dentina intertubular en microfotografías con altos aumentos. Considerando lo anterior, asociar las modificaciones en el proceso de adhesión con

las técnicas empleadas sin analizar el compartimento intratubular es controversial. Por otra parte, en la técnica inmunohistoquímica realizada en este estudio, la digestión con TRY se realizó sobre cortes histológicos y no en segmentos de tejido.

Uno de los pasos importantes para el estudio morfológico de los tejidos duros es la desmineralización. Los agentes descalcificantes extraen componentes orgánicos de los tejidos, y la cantidad de material extraído depende de la solución descalcificante utilizada ⁽²⁵⁾. Para resolver este problema metodológico, que es importante en los estudios histoquímicos de PGs, se utiliza ácido fórmico al 10%, en lugar de EDTA u otros ácidos, ya que se ha demostrado que produce una pérdida mínima o nula de ácidos urónicos a partir de cortes de cartílago fijadas con formaldehído e incluidas en parafina, lo que no puede apreciarse por medios histoquímicos ⁽²⁶⁾.

En nuestro estudio, el análisis del comportamiento inmunohistoquímico de los PGs intratubulares se realizó en segmentos de tejidos previamente desmineralizados en ácido fórmico para minimizar la pérdida de PGs antes de realizar la inmunoreacción, por lo que la pérdida de estas moléculas no puede ser atribuída a un artefacto de técnica inducida por el agente descalcificante.

En 2008 Mazzoni y cols. propusieron que después de una digestión enzimática con condroitinasa ABC de la matriz de la dentina intertubular desaparecen los GAGs constitutivos ⁽¹²⁾. Observaron también que hay un aumento de la resistencia a la tracción y una disminución de la nanofiltración después de la incubación de la enzima. Con el propósito de discutir nuestros resultados con estas observaciones, es importante destacar que las conclusiones sugeridas fueron hechas en fotografías obtenidas con microscopía electrónica de barrido con altos aumentos, lo que dificulta reconocer la zona específica de la dentina en la que se hizo la observación. Este estudio se realizó en ausencia de un bloqueo de los sitios inespecíficos por lo que no podemos aseverar la especificidad de la reacción

inmune en los especímenes mostrados. Además, los autores no muestran microfotografías de los controles negativos.

En el año 2014, Lu y cols. demostraron con microscopía electrónica de barrido de alta resolución, que en los túbulos dentinarios de dentina humana el tratamiento con TRY remueve completamente todo el contenido orgánico de los túbulos acondicionados con ácido fosfórico gel al 37% durante 15 segundos. Además, reportaron un aumento en el perímetro del lumen tubular ⁽⁵⁾. Este estudio, demostró además que los PGs se localizan en el lumen de los túbulos dentinarios y en la dentina intratubular, disminuyendo su expresión después del tratamiento con TRY. Nuestras observaciones son coincidentes con este estudio, ya que utilizando el mismo anticuerpo anti-condroitín sulfato, el epítipo se localiza adherido a la pared de los túbulos dentinarios y en la lámina limitans. Un dato adicional fue que, en las muestras pretratadas con TRY, el grosor de la zona híbrida aumentó significativamente respecto del grupo control.

Farina y cols. en 2020 removieron los PGs de muestras de dentina de 1,5 mm³ utilizando 1mg/ml de TRY durante 24 horas, la microscopía electrónica de transmisión mostró la ausencia y/o fragmentación de los GAGs asociados con el colágeno de la dentina intertubular ⁽²⁰⁾. Por otra parte, la humectabilidad de la dentina y la resistencia a la tracción aumenta significativamente en los especímenes digeridos enzimáticamente respecto al grupo control.

En este estudio, la utilización de una técnica inmunohistoquímica combinada con técnicas histoquímicas permitió comprobar que la eliminación de los PGs intratubulares a través de la digestión enzimática con TRY modifica la formación de una zona híbrida clásica, ya que morfológicamente se observa de contornos irregulares y con afinidad tintorial no homogénea por los colorantes empleados.

Una observación destacable fue el hecho que en los especímenes desmineralizados el adhesivo penetra al interior de los túbulos dentinarios ocupando todo el volumen de estos, contactando microscópicamente con la pared de dentina intertubular. Esta observación no fue detectada en los grupos control y en el grupo en el cual la digestión enzimática se realizó previo a la adhesión, en los cuales los túbulos dentinarios mantenían una morfología infundibuliforme.

La ausencia de PGs intratubulares permitió que el adhesivo infiltre el colágeno de las paredes del túbulo conformada por dentina intertubular. Este hecho no fue reportado por los estudios preexistentes, los que utilizaron imágenes obtenidas con microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido de alta resolución, en muestras pequeñas que no excedían 2mm³ (12, 19, 20).

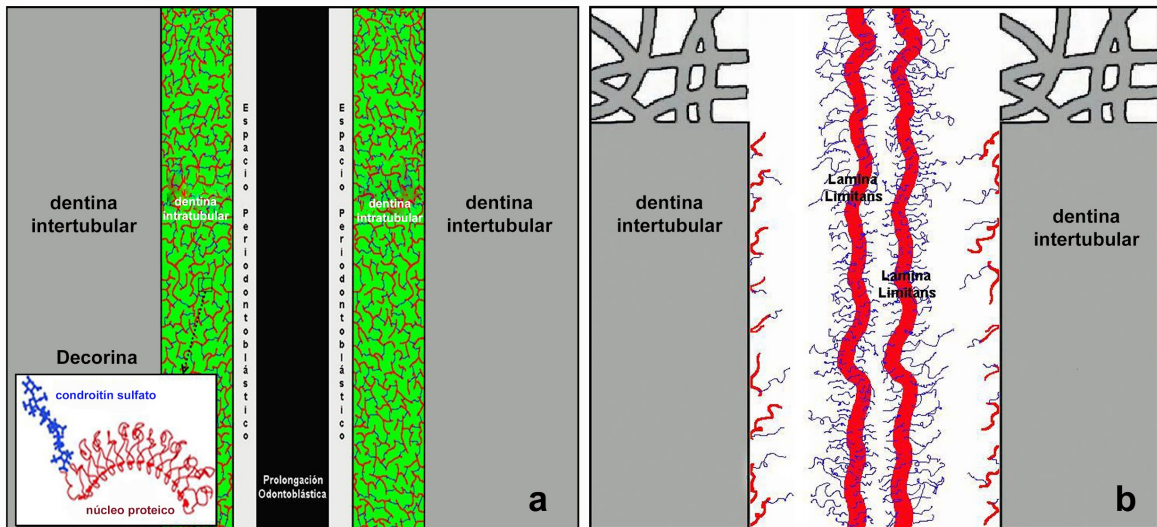
Nuestro estudio utilizó cortes histológicos consecutivos de especímenes cuya longitud mesio - distal es aproximadamente de 10 mm, por lo que, observamos zonas extensas de hibridización del adhesivo en todos los especímenes estudiados.

La infiltración del adhesivo en la pared de los túbulos dentinarios fue detectada en nuestras preparaciones como zonas de alto contraste (azul - morado o rojo - anaranjado) con el resto de tejido. El adhesivo polimerizado teñido en la pared del túbulo dentinario nos permite acuñar el término de Zona Híbrida Intratubular (ZHI). La existencia de esta Zona Híbrida Intratubular no documentada por los estudios anteriores permite explicar los aumentos en los valores de fuerza de tracción luego de la digestión enzimática de los PGs realizada en los estudios anteriores (5, 12, 20).

El descubrimiento y el reporte de una ZHI constituye un hecho que permite esclarecer el rol de la matriz extracelular en general y de los PGs intratubulares en particular, durante el proceso de adhesión dentinaria. La eliminación de las

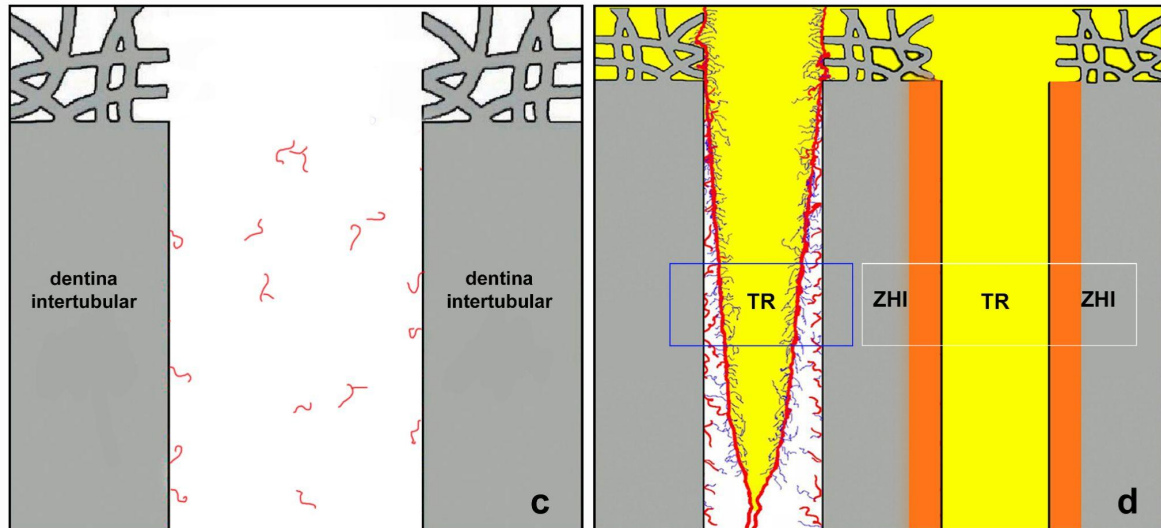
moléculas polianiónicas del lumen tubular es un hecho que la tecnología adhesiva debería considerar para mejorar la adhesión y longevidad de las restauraciones hechas sobre dentina.

Modelo teórico del efecto de la degradación enzimática de PGs en la adhesión a dentina



El esquema **a** muestra la organización del SLRP Decorina en la dentina intratubular de un espécimen control.

El esquema **b** muestra la organización del SLRP Decorina después del acondicionamiento ácido de la dentina y la eliminación de la hidroxiapatita del compartimento intratubular. Se observa la formación de la lámina limitans producto del colapso de la red tridimensional de los PGs.



En el esquema **c** se muestra la acción de la TRY sobre los PGs intratubulares después de la desmineralización total de la dentina. Se esquematiza la desaparición casi total de los PGs intratubulares.

En el rectángulo azul del esquema **d** se muestra un segmento de un tag de resina (TR) infundibuliforme rodeado por los PGs de la dentina intratubular expuestos después del grabado ácido de la superficie de la dentina. En el rectángulo blanco del esquema se esquematiza un segmento de un túbulo dentinario en el cual los PGs fueron digeridos enzimáticamente. El tag (TR) de resina ocupa completamente el lumen tubular tomando contacto con las paredes de la dentina intertubular. Se destaca la infiltración del adhesivo en las paredes tubulares para conformar una zona híbrida intratubular (ZHI).

CONCLUSIONES

1. Los PGs de la dentina intratubular determinan la morfología infundibuliforme de los tags de resina en los especímenes control.
2. La remoción enzimática de los PGs de la dentina intratubular permite la infiltración del adhesivo en las paredes laterales del túbulo dentinario generando una zona híbrida intratubular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tjäderhane L, Rabelo M, Carrilho C. Matrix Metalloproteinases and Other Matrix Proteinases in relation to Cariology: The Era of “Dentin Degradomics”. *Caries Res* 1 May 2015; 49 (3): 193-208.
2. Boukpepsi T, Menashi S, Camoin L, Tencate J.M, Goldberg, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. *Biomaterials* 29 (2008) 4367–4373.
3. Neng-Wu Jiang, Yi-ying Chen, Xiu-jiao Lin, Hao Yu. Impact of cathepsin K-induced proteoglycans degradation on dentin collagen. *Archives of Oral Biology*, volume 169, 2025.
4. Alania I, Creighton J, Trevelin L, Zamperini C, Bedran A. Regional contribution of proteoglycans to the fracture toughness of the dentin extracellular matrix. *Journal of Biomechanics*, volume 101, 2020.
5. Lu S, Zhao SJ, Gao Y, Sun Y, Li X, Chen JH. Proteoglycans affect monomer infiltration in the etch-and-rise bonding technique. *Dent Mater.* 2014 nov;30(11)e289-99.
6. Carvalho R, Tjäderhane L, Manso A, Carrilho M, Carvalho C. Dentin as a bonding substrate. *Endodontics Topics* 2012, 21, 62-88.
7. Tjäderhane L, Carrilho M, Breschi L, Tay FR, Pashley D. Dentin basic structure and composition-an overview. *Endodontics Topics* 2012, 20, 3-29.

8. Orsini G, Ruggeri Jr A, Mazzoni A, Nato F, et al. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 1: proteoglycans and glycoproteins. *Endodontics Topics* 2012, 21, 1-18.
9. Goldberg M, Takagi M. Dentine proteoglycans: composition, ultrastructure and functions. *Histochem J.* 1993 Nov;25(11):781-806.
10. Oyarzún A, Rathkamp H, Dreyer E. Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of the effects of phosphoric acid etching on dentin proteoglycans. *Eur J Oral Sci.* 2000;108:546-554.
11. Orsini G, Ruggeri A, Mazzoni A, Papa V, Mazzotti G, Di Lenarda R, et al. Immunohistochemical identification of decorin and biglycan in human dentin: a correlative field emission scanning electron microscopy/transmission electron microscopy study. *Calcif Tissue Int.* 2007 Jul;81(1):39-45.
12. Mazzoni A, Pashley D, Ruggeri A, Vita F, Falconi M, Di Lenarda R, Breschi L. Adhesion to Chondroitinase ABC Treated Dentin.
13. Scherft JP. The lamina limitans of the organic matrix of calcified cartilage and bone. *J Ultrastruct Res.* 1972 Feb;38(3):318-31.
14. Thomas HF. The lamina limitans of human dentinal tubules. *J Dent Res.* 1984 Aug;63(8):1064-6.
15. Weber DF, Zaki AE. Scanning and transmission electron microscopy of tubular structures presumed to be human odontoblast processes. *J Dent Res.* 1986 Jul;65(7):982-6.

16. Bertassoni LE, Stankoska K, Swain MV. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. *Micron*. 2012 Feb;43(2-3):229-36.
17. Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH, Robinson SJ. Current concepts on adhesion to dentin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(3):306-335.
18. Pashley DH, Tay F, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho R, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011 Jan;27(1):1-16.
19. Karina A, Russo B, Pereira P, Duarte W, Okuyama K, Yamauchi M. Removal of Dentin Matrix Proteoglycans by Trypsin Digestion and Its Effect on Dentin Bonding. Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 85B: 261-266; 2008.
20. Farina A, Cecchin D, Vidal C, Leme-Kraus A, Bedran-Russo A. Removal of water binding proteins from dentin increases the adhesion strength of low-hydrophilicity dental resins. *Dental Materials* 36(202) e302-e308.
21. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2001;12(4):331-349.
22. Iozzo R, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*. 2015 Mar;(42):11-55.
23. Titley K, Chernecky R, Chan A, Smith D. The composition and ultrastructure of resin tags in etched dentin. *Am J Dent*. 1995 Oct;8(5):224-30.

24. Giachetti L, Bertini F, Scaminaci Russo D. Investigation into the nature of dentin resin tags: a scanning electron microscopic morphological analysis of demineralized bonded dentin. *J Prosthet Dent.* 2004 Sep;92(3):233-8

25. Schajowicz F, Cabrini RL. The effect of acids (decalcifying solutions) and enzymes on the histochemical behavior of bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 1955; 33:122-129.

26. Ippolito E, La Velle S, Pedrini V. The effect of various decalcifying agents on cartilage proteoglycans. *Stain Technol* 1981; 56:367-372.