

**DEPARTAMENTO DE
MEDICINA LEGAL Y PSIQUIATRIA
FACULTAD DE MEDICINA**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA DENTINA HUMANA Y SU
APLICACIÓN EN ODONTOLOGÍA FORENSE**

Memoria que presenta la Licenciada en Medicina y en Odontología,

Stella Martín de las Heras,

para optar al grado de Doctora en Medicina por la

Universidad de Granada.

Granada, Junio de 1997

INDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	7
LA DENTINA COMO TEJIDO MINERAL Y TEJIDO ORGÁNICO	12
1. ESTRUCTURA DE LA DENTINA	14
1a. Morfología de la dentina	16
1b. Composición celular de la dentina	17
2. COMPOSICIÓN DE LA DENTINA	19
2a. La fase mineral	20
2b. La matriz orgánica	20
Colágeno	22
Macromoléculas no colágena	26
1.- Fosfoproteínas de la dentina	27
2. - Proteoglucanos	30
3.- Proteínas que contienen gamma-carboxiglutámico	33
4.- Otras proteínas no colágenas ácidas	35
5.- Factores de crecimiento	38
Metaloproteasas: la gelatinasa de 72 kDa	40
Lípidos	48
2c. Comentarios sobre los componentes bioquímicos de la matriz orgánica de la dentina	50
3. DENTINOGENESIS	51
3a. Iniciación de la dentinogénesis. Formación del manto de dentina	51
3b. Formación de la dentina circumpulpar	52
3c. Diferencias entre la predentina y dentina	55

CAMBIOS DEL TEJIDO MINERALIZADO HUMANO CON LA DATA Y LA EDAD	57
II. JUSTIFICACIÓN Y PLAN DE TRABAJO	70
III. MATERIAL Y MÉTODOS	74
MUESTRAS BIOLÓGICAS	75
METODOLOGÍA	79
1. PREPARACIÓN DEL TEJIDO DENTINARIO	79
2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA DENTINA HUMANA	79
2a. Primera extracción con solución de guanidina	80
2b. Desmineralización con solución de EDTA	81
2c. Segunda extracción con solución de guanidina	82
Reactivos y materiales	88
3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTÉICO DE LOS EXTRACTOS	89
Reactivos y materiales	90
4. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DENTINARIAS HUMANAS	91
4a. Electroforesis en geles de poliacrilamida	91
Reactivos y materiales	93

4b. Enzimografía	98
Reactivos y materiales	100
4c. Determinación cuantitativa de las cadenas de piridinolina	
del colágeno	101
Hidrólisis enzimática del colágeno	101
Cuantificación de la deoxipiridinolina	102
Reactivos y materiales	105
5. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES	
EN LOS EXTRACTOS EDTA	105
5a. Cromatografía en columna de intercambio iónico	105
Reactivos y materiales	107
5b. SDS-PAGE electroforesis	108
5c. Inmunoelectroforesis	108
Reactivos y materiales	109
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	110
IV. RESULTADOS	111
1. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS	
DE LA DENTINA HUMANA	112

2. PATRONES DE LAS PROTEÍNAS DE LA DENTINA HUMANA	114
2a. Dientes procedentes de exodoncias recientes	114
2b. Dientes procedentes de restos esqueletizados	124
3. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS CON EDTA	128
4. CAMBIOS DE LAS PROTEÍNAS DENTINARIAS CON EL ENVEJECIMIENTO	134
4a. Proteínas no-colagena presentes en los extractos de guanidina y EDTA	134
4b. Determinación de la deoxipiridinolina de la dentina humana	150
V. DISCUSIÓN	157
1. LAS METALOPROTEASAS EN LA DENTINA HUMANA	159
1a. Detección e identificación de metaloproteasas en la dentina humana	161
1b. Patrones de proteínas con actividad gelatinolítica con relación a la edad del individuo	164
2. PROTEÍNAS EXTRAÍDAS EN LA DESMINERALIZACIÓN CON EDTA DE LA DENTINA HUMANA	167
2a. Detección e identificación de las proteínas. Purificación y caracterización parcial	168

2b. Patrones de proteínas con relación a la edad	172
2c. La deoxipiridinolina de la dentina humana	173
VI. CONCLUSIONES	179
VII. BIBLIOGRAFÍA	182

I. INTRODUCCIÓN

Aunque los problemas médico-legales que se plantean ante unos restos óseos se han simplificado en la actualidad al permitir la investigación del ADN la individualización con bastante certeza, no por ello dejan de plantearse un sinnúmero de cuestiones que tienen su respuesta en distintos campos de las ciencias forenses. Cuando se solicita el estudio forense de unos restos humanos parcial o completamente esqueletizados, la problemática que le aborda al perito se puede resumir en tres aspectos: establecer de la forma más precisa la data de los restos; aportar todos los datos posibles que permitan la identificación del cadáver, y contribuir al esclarecimiento de la forma y mecanismo de muerte.

El primer problema se refiere al *establecimiento de la data de los restos*. El conocimiento preciso del momento en que ocurrió el fallecimiento de un individuo interesa como punto de partida en la investigación judicial y policial. Por otra parte, si se sospecha que el hallazgo de los restos humanos estuviera en relación con un hecho delictivo, resulta necesario conocer la data por si se hubiera o no extinguido la responsabilidad criminal del agresor (crf. artículo 131 del vigente Código Penal español). Por otra parte, en el artículo 33 del Código Civil se hace referencia a la exigencia de probar quién ha fallecido primero entre las personas que tienen que sucederse o heredarse, situación relativamente frecuente en casos de grandes catástrofes o accidentes en los que se pueden ver implicados varios miembros de una misma familia,

teniéndose que aclarar el orden de fallecimiento de las víctimas. En todo caso, el campo de interés de la Medicina Legal en el establecimiento de la data de cadáveres se limita a los casos de restos esqueletizados relativamente recientes (no más de 20 años), por lo que a lo largo de esta memoria, sólo nos vamos a referir a las técnicas y métodos de estimación de la data de restos óseos en esos casos de interés médico-legal. Prácticamente se puede decir que no hay publicaciones en la literatura científica médico-forense sobre las modificaciones del diente con relación al crono, por lo que, como justificaremos más adelante, este fue uno de los puntos de partida de nuestro trabajo.

La segunda cuestión que se nos plantea, es la aportación de la información necesaria que posibilite *la identificación de los restos cadavéricos*. No cabe duda de la existencia de razones de índole médico-legal en torno al establecimiento de la identidad del cadáver. De hecho, la labor pericial forense del establecimiento de la identidad de una persona es una práctica habitual en la investigación médico-legal que no se limita a los casos de restos esqueletizados. Si se desconoce la identidad de un cadáver, no se puede certificar su defunción, ésta no puede inscribirse en el Registro Civil, por lo que la persona fallecida no podría ser inhumada. Por otra parte, resulta imprescindible la certificación indubitada del fallecimiento de una persona para que ésta, o sus familiares, puedan o no ser objeto de derechos y obligaciones tanto desde el punto de vista civil como penal.

Pero, retomando el motivo de la pericia objeto de estudio, si estos restos humanos estuvieran alterados por los procesos putrefactivos e incluso si se hubiera llegado a un cierto grado de esqueletización, es frecuente que se disponga exclusivamente de restos óseos y dentarios, e incluso tan solo éstos últimos. En estos casos es adecuado realizar una *identificación reconstructiva*, es decir se procurará aportar el máximo posible de datos en relación a los

restos disponibles, determinándose el origen humano, el sexo, la talla, la edad del cadáver o de los restos, e incluso, si fuera posible, emitir un juicio sobre la identidad del sujeto. En este sentido la antropología forense contribuye al conocimiento de la raza, sexo, talla e incluso edad de los restos esqueléticos por la osteología y otros métodos relacionados. La odontología forense enriquece la información suministrada por el hueso, sobre todo porque el diente es la estructura más resistente del organismo y por tanto la que menos se afecta por los cambios externos.

Cuando el problema que se plantea se centra en la estimación de la edad cronológica del individuo, la aproximación más adecuada debe hacerse en base al cálculo de la edad biológica del sujeto, en la que el desarrollo óseo y dentario constituyen los elementos más útiles. De hecho, los cambios morfológicos que el diente sufre con el paso de los años se han empleado como métodos rutinarios de estimación de la edad cronológica, incluso en aquellas situaciones en las que el tejido óseo ya no puede aportar más información, es decir, en sujetos a partir de la segunda década de la vida. Sin embargo se ha prestado poca atención a los cambios bioquímicos que el tejido dentario sufre con la edad. Nuestro trabajo se propone también aportar nuevos datos para la solución de esta problemática.

En algunas ocasiones, como en los supuestos de grandes catástrofes, se ha de realizar un proceso de *identificación comparativa*, es decir la identificación se aborda por la comparación del material antemortem disponible con el postmortem. Hoy día se acepta que existen diversos métodos científicos en los que se debe fundamentar una identificación humana positiva. Estos métodos incluyen el reconocimiento visual, la comparación de huellas dactilares, el análisis de la huella genética (ADN), y los métodos de comparación médica y dental. La odontología forense, es decir el examen odonto-estomatológico del cadáver, se ha convertido

en uno de los elementos fundamentales en la identificación humana. Su gran valor se fundamenta en la extraordinaria resistencia de los dientes a los agentes putrefactivos y destructivos cadavéricos, además de la enorme variedad de características individualizadoras proporcionadas por las piezas dentarias (tratamientos dentales, posiciones de las piezas, tinciones, etc.), pudiéndose afirmar que no hay dos personas con la misma dentadura, por lo que este tipo de técnicas pueden aportar datos concluyentes para la identificación humana que no podrían obtenerse por medio de otro método científico.

Por último, en relación al esclarecimiento del *mecanismo de muerte*, de nuevo los tejidos mineralizados por su resistencia y durabilidad, pueden ser una fuente inestimable de información. Por ejemplo pueden contribuir al esclarecimiento de procesos patológicos que sufriera el sujeto en vida (enfermedades óseas, intoxicaciones, etc.), los cuales podrían haber sido la causa inmediata o fundamental de la muerte. Más interés podría tener el estudio de marcas o huellas de violencia (disparos por arma de fuego, arma blanca etc.) que afectaron el tejido óseo o dentario. Por otra parte, un tema crucial dentro del campo de la patología forense es el que se refiere al diagnóstico de vitalidad de las fracturas óseas. Sólo mediante la profundización en el conocimiento de la biología de los procesos de formación de los tejidos mineralizados, óseo y dentario, se podrá abordar este problema de una forma científica.

Por los motivos mencionados, nos propusimos profundizar en el conocimiento de la composición de la dentina humana y así aportar la información necesaria que pudiera contribuir a la resolución de ciertos problemas médico-legales cuando se tiene el diente como indicio biológico. Se presenta una revisión actualizada de la biología y bioquímica de la dentina por ser este el tejido dentario escogido para el estudio. Además, resultaba imprescindible

conocer los antecedentes del tema en lo que se refiere a las investigaciones llevadas a cabo sobre el diente con fines forenses.

LA DENTINA COMO TEJIDO MINERAL Y TEJIDO ORGÁNICO

La dentina, el tejido mineralizado más voluminoso del diente, puede ser considerado como un tejido conectivo cuya matriz extracelular se ha modificado para soportar una estructura mineralizada, la cual es imprescindible para cubrir los requerimientos funcionales del tejido. Por tanto, la matriz de dentina contiene macromoléculas presentes en muchos tejidos conectivos y, además, algunos componentes específicos de los tejidos mineralizados.

Debido a la íntima relación funcional de la dentina y la **pulpa dental**, clásicamente se han discutido ambos tejidos en conjunto en los libros de textos (TenCate, 1989), y aunque comparten un ancestro común, **la papila dental**, y en consecuencia el desarrollo de los dos está íntimamente relacionado, no hay similitudes estructurales directas entre la pulpa y la dentina, estando además formados por diferentes células; *fibroblastos* y *odontoblastos*, respectivamente.

Por otra parte, la composición química y la estructura de la dentina es parecida a otros tejidos conectivos mineralizados, como el hueso y el cemento celular. Osteogénesis, cementogénesis

y dentinogénesis presentan muchas coincidencias también. En todos estos procesos, a partir de una capa de células se forma una matriz orgánica de colágeno sobre la cual se deposita fosfato cálcico inorgánico en forma de cristales minerales.

No existen muchas analogías entre estos tejidos que derivan del mesodermo, por una parte y por otra, el **esmalte**, derivado del ectodermo. Durante la amelogénesis, el esmalte está desprovisto de cualquier componente fibroso, y la matriz protéica es bastante diferente de las matrices de la dentina, hueso o cemento. El esmalte completamente formado es un tejido fundamentalmente cristalino, sin ningún material orgánico. Carece de cualquier elemento celular, y los cristales minerales del esmalte son de un tamaño mucho mayor que los que existen en los tejidos antes mencionados.

Se han descrito diferencias sustanciales entre la estructura y composición química de la dentina de **distintas especies animales**. En función de la composición proteica de la matriz orgánica en diferentes especies, podemos agrupar la dentina en dos grupos principales; una categoría la formarían los dientes de roedores que están en continuo crecimiento, mientras que otra la constituirían los bovinos, porcinos y obviamente la dentina humana, en los que la dentinogénesis dura un período de tiempo limitado. La mayoría de los estudios existentes sobre la bioquímica de la dentina han sido llevados a cabo en la dentina bovina y de rata, mientras que poco se ha investigado sobre la bioquímica de la dentina humana. Debido a las diferencias fundamentales encontradas entre la composición y formación de la dentina, hay que ser muy cautos a la hora de extrapolar los hallazgos encontrados de una especie a otra.

La formación de los tejidos calcificados es un proceso altamente regulado y controlado, en el que están implicados muchos factores, celulares y extracelulares. La dentinogénesis ha sido

escogida como modelo de estudio experimental de mecanismos de biomineralización. Este sistema tiene muchas ventajas en comparación con el estudio de la formación del hueso. Por una parte, la morfología es distinta y no se producen procesos reabsortivos simultáneamente a la calcificación, es decir, la dentina no se remodela y por tanto, no participa en la homeostasis del calcio del organismo. Además, la contaminación con otros tejidos es mínima, y las células responsables de la formación del tejido, los odontoblastos, así como el tejido precursor no mineralizado, la predentina, pueden ser separado casi totalmente para su análisis.

1. ESTRUCTURA DE LA DENTINA

La dentina es una estructura compleja, compuesta de varios tipos de tejidos morfológicamente diferentes. La dentina primaria es aquella que se forma en su mayor parte durante la dentinogénesis, y constituye la mayor cantidad de la masa de dentina. La capa más periférica de esta dentina se llama **manto de dentina**. Es una zona de unos 20 μm de anchura, en íntimo contacto con el esmalte y donde se inició la mineralización de la dentina. El resto de la dentina primaria se la conoce usualmente como **dentina circumpulpar**. La matriz orgánica del manto de dentina es un poco más irregular en estructura y su composición química difiere de la dentina circumpulpar, presentando ambas diferencias en el mecanismo de formación mineral (Linde, 1989; Butler, 1992; Linde y Goldberg, 1993).

En la parte pulpar de la dentina, entre la dentina primaria y el tejido conectivo de la pulpa dental, se localiza una capa de **predentina**. Es una matriz orgánica no mineralizada y acelular, básicamente compuesta por colágeno. La predentina varía considerablemente en anchura, entre

10 a 30 μm , dependiendo de la localización anatómica. Está presente durante la dentinogénesis, pero también a lo largo de toda la vida del diente.

Tras la formación de la dentina circumpulpar, los odontoblastos entran en una fase quiescente en la que presentan una escasa capacidad de biosíntesis, sin embargo, después de completarse la formación de la raíz, estas células continúan formando dentina aunque a una velocidad mucho menor, es la llamada **dentina secundaria**, la cual se deposita sobre la parte pulpar de la dentina primaria. La morfología de la dentina secundaria no difiere sustancialmente de la dentina primaria, excepto por presentar los túbulos dentinarios una curvatura más acentuada.

Como respuesta a estímulos externos variados, tales como irritantes químicos, caries, tratamientos restaurativos, atricción u otros traumas, también se puede formar **dentina terciaria**. A menudo se le llama dentina reparativa o de irritación, pero el término de dentina terciaria tiene mayor aceptación actualmente. Está formada por aquellos odontoblastos directamente afectados por los estímulos nocivos, por tanto, se localiza en ciertas áreas de la interfase pulpa/dentina. El origen de la formación de esta dentina por los odontoblastos es todavía objeto de investigación y aparentemente difiere de los mecanismos que acontecen en la formación de la dentina circumpulpar (Butler, 1992). Parece ser que se produciría tanto por la activación de odontoblastos ya existentes, como por la diferenciación de nuevos odontoblastos. La cantidad de formación de dentina terciaria y su estructura varía de acuerdo con el tipo, intensidad y duración del estímulo. Por ejemplo, cuando un proceso carioso destruye la dentina, la dentina terciaria se deposita rápidamente, presentando un patrón de distribución de los túbulos más irregular y con inclusiones celulares en su interior.

1a. Morfología de la dentina

La dentina es un tejido altamente permeable, tanto para fluidos moleculares como para invasiones de microorganismos; esta cualidad es debida a los numerosos túbulos dentinarios que posee, los cuales parten de la pulpa dental y atraviesan la dentina en toda su extensión. Estos túbulos tienen de 1 a 3 μm de diámetro, describen una curvatura con forma de S y están densamente comprimidos. Los túbulos dentinarios desarrollan ramificaciones laterales así como terminales en la periferia de la dentina. En general, suele haber unos 30.000 túbulos por mm^2 en el tercio medio de la dentina humana, con una densidad incluso mayor en la dentina más cercana a la pulpa. Esto implica, de hecho, que un considerable volumen de la dentina esté constituido por la luz de los túbulos dentinarios. La capa más periférica de dentina, el manto de dentina, carece de estructuras tubulares.

La dentina circumpulpar puede ser dividida en **dentina intertubular** y **peritubular**. La dentina intertubular es el principal producto de secreción de los odontoblastos durante la dentinogénesis y constituye el volumen mayor de la dentina primaria. Microscópicamente se aprecia una red fibrosa de colágeno con cristales minerales asociados con y entre las fibras. La densidad de la dentina hace imposible establecer claramente si los cristales están también localizados en el interior de las fibras de colágeno. Estos cristales son de forma aplanada, de 2 a 3 nm de grosor y 60 nm de longitud.

La dentina peritubular forma una vaina bien delimitada y altamente mineralizada alrededor de los túbulos dentinarios, normalmente con menos de 1 μm de grosor. En realidad la dentina peritubular es **intratubular** ya que es depositada por los odontoblastos en la cara interna de la luz de los túbulos dentinarios. La matriz orgánica de la dentina peritubular está

prácticamente desprovista de estructuras fibrosas. En humanos, la dentina peritubular comienza a desarrollarse en el interior de los túbulos dentinarios a cierta distancia de la cámara pulpar. La formación de la dentina peritubular es un proceso continuo, produciendo una disminución progresiva de la luz del tubo, siendo a veces tan intensa que puede causar la obliteración de los túbulos dentinarios, formando la llamada **dentina esclerótica**. Este tipo de dentina, por tanto, aumenta con el paso de los años.

1b. Composición celular de la dentina

La dentina está formada por los **odontoblastos**, los cuales bordean o se alinean en la parte pulpar de la predentina, y permanecen a lo largo de la vida del diente. Estas células son las responsables de la formación de la dentina y de la producción de sus constituyentes, con la excepción de una pequeña proporción de proteínas derivadas del suero. Durante la dentinogénesis activa, los odontoblastos son columnares y tienen las características propias de células con actividad de síntesis y secreción, con un RER bien desarrollado, abundantes mitocondrias, un aparato de Golgi prominente, y numerosas vesículas de secreción. En estadios de desarrollo funcional más avanzado, estas células adquieren una apariencia quiescente, con una altura mucho más reducida y con menor densidad de sus organelas (Jones y Boyde, 1984).

Los odontoblastos se alinean en la superficie del tejido que ellos han formado, de la misma manera que los osteoblastos en el **hueso**. Por contra, mientras el hueso contiene células (osteocitos) inmersos en el tejido, la dentina es sólo celular en el sentido que los odontoblastos tienen prolongaciones que penetran en la predentina y dentina. Estas prolongaciones celulares son mantenidas en el interior de los túbulos dentinarios por la migración centripeta de los

odontoblastos en la producción de dentina. A las prolongaciones odontoblásticas le faltan la mayoría de las organelas pero contienen filamentos y microtúbulos en abundancia, presumiblemente para facilitar el transporte intracelular a través de ellos (Nishikawa y Kitamura, 1987). La cantidad de prolongaciones odontoblásticas y su extensión en los túbulos dentinarios de los dientes maduros es un aspecto aún controvertido. Algunos investigadores son de la opinión que las prolongaciones odontoblásticas de dientes humanos, gatos y ratas se limitan a la mitad pulpar de la dentina (Holland, 1976; Thomas, 1983). Por contra, se ha evidenciado por medio de estudios inmunocitoquímicos, la presencia de estructuras que contienen vimentina, tubulina y actina hasta la unión esmalte-dentina (Sigal y cols., 1984).

Los odontoblastos se unen unos a otros por complejos de unión, especialmente en el extremo distal del cuerpo celular próximo a la predentina. La presencia de uniones tipo "gap" o en hendidura entre los odontoblastos adyacentes tienen una gran trascendencia, pues se piensa tienen capacidad de establecer una comunicación intercelular al permitir el libre intercambio de iones y moléculas de bajo peso molecular entre sus membranas.

Próximo a la capa de cuerpos celulares de los odontoblastos están presentes células más pequeñas e indiferenciadas, son las llamadas células subodontoblásticas de Höl, las cuales muestran características estructurales que indican alguna capacidad específica en la dentinogénesis. El significado funcional de estas células, si existe alguno, no es conocido en la actualidad (Jones y Boyde, 1984; Avery, Cox y Chiego, 1984).

Los capilares sanguíneos y las estructuras nerviosas forman un plexo debajo de la capa de los odontoblastos. Es frecuente observar que los capilares se extiendan entre los cuerpos celulares de los odontoblastos. Especialmente en la porción coronal de la dentina, un pequeño número

de axones amielinizados pueden pasar entre los odontoblastos, extendiéndose a corta distancia en los procesos odontoblásticos.

2. COMPOSICIÓN DE LA DENTINA

De forma general, el **contenido mineral** de la dentina humana es más alto que el del hueso. La fase mineral constituye sobre el 70% del peso, mientras que el 20% es **material orgánico**, sin embargo, si analizamos en vez de los pesos los volúmenes en la dentina, un 50% lo constituiría el material inorgánico y un 30% el orgánico. Estos últimos datos nos dan una relación proporcional más relevante entre ambos.

Aunque proporcionalmente, su matriz orgánica sigue siendo menor que la del hueso, representa una proporción superior a la del esmalte, lo cual contribuye a la diferencia existente entre los dos tejidos. Esta composición particular de la dentina le confiere la flexibilidad necesaria para prevenir la fractura del esmalte.

Más del 90% de la matriz orgánica de la dentina está constituida por colágeno, siendo el resto proteínas no colágenas y proteoglicanos. Los constituyentes no se distribuyen por igual en el tejido; la estructura de la dentina varía microscópicamente de forma considerable. De hecho, hay también trabajos que han puesto de manifiesto diferencias en la composición de la dentina de las distintas partes del diente (Steinfort, van den Bos y Beertsen, 1989).

2a. La fase mineral

El componente mineral de la dentina es, como en el hueso, la **hidroxiapatita**, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$. El mineral contiene, sin embargo, pequeñas cantidades de carbonato y su cristalinidad queda lejos de ser perfecta. Los cristales minerales en la dentina están íntimamente asociados con la matriz de colágeno y se disponen longitudinalmente con sus ejes-c paralelos a las fibras de colágeno. Dichos cristales tienen un tamaño similar entre ellos y son diez veces más pequeños que los del esmalte.

2b. La matriz orgánica

Cuando se forman tejidos mineralizados, tales como el hueso y la dentina, es necesario el depósito de cristales minerales sobre una sustancia extracelular orgánica. Los constituyentes químicos de esta sustancia juegan un papel importante en la cantidad y características del tejido mineralizado formado. Debido a la función que ejerce tanto como red o malla, así como por su capacidad de regulación en la mineralización, se llama a dicha sustancia **matriz orgánica** (Linde, 1989 y 1992).

Durante la dentinogénesis, los odontoblastos primero sintetizan una trama de colágeno que representa el componente principal de la preentina, posteriormente, los cristales minerales son depositados por las células a cierta distancia. Por tanto, la preentina se transforma en dentina al tener lugar el proceso de mineralización en una zona más avanzada (el frente de mineralización). Este proceso de transformación no es meramente un depósito de los cristales de hidroxiapatita ya que incluso, las matrices orgánicas de la preentina y dentina difieren en su composición (Linde, 1989). De hecho, las fosfoproteínas, componente mayoritario de las

proteínas no colágenas, son secretadas directamente en el frente de mineralización, estando ausentes, por tanto, de la predentina e implicándose de alguna manera en los procesos de mineralización de dentina (Butler, 1992).

Existen suficientes datos para indicar que la matriz orgánica es determinante de la velocidad de la formación mineral, del tipo de mineral formado, así como de la localización exacta de los cristales minerales (Linde, 1985a). Más del 90% de la matriz orgánica de la dentina es colágeno, mientras que el resto consiste en proteínas no colágenas y proteoglicanos con un predominante carácter aniónico, presentando además algunos componentes lipídicos. La matriz orgánica de la dentina circumpulpar, con la excepción de un contenido mínimo de proteínas séricas, es producida enteramente por los odontoblastos.

Colágeno

El colágeno de la dentina, si lo comparamos con otros tejidos conectivos, tiene unas propiedades físicas y químicas características; estas propiedades son parecidas a las del colágeno del hueso, indicando una función similar en ambos. Como ya se ha mencionado anteriormente, este componente constituye tanto en la dentina como en el hueso, más del 90% de la matriz orgánica, y es fundamentalmente de tipo I, existiendo una pequeña cantidad de colágeno tipo V (Bronckers, Lyard y Woltgens, 1989). El colágeno tipo I también es predominante en muchos otros tejidos conectivos. Sin embargo, el colágeno tipo III es un constituyente destacado de los tejidos conectivos blandos, de tal forma que constituye una tercera parte o más del colágeno de la pulpa dental (Linde, 1985b; Tsuzaki, Yamauchi y Mechanic, 1990), estando ausente de la dentina.

El colágeno tipo I dentinario tiene la siguiente composición $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ (Butler, 1984; Miller y Gay, 1987) y está formado por tres cadenas alfa, de las cuales dos de ellas son idénticas. Cada cadena está constituida aproximadamente por unos 1000 residuos de aminoácidos. La porción central, alrededor del 95% del total de la molécula de colágeno, es una estructura de triple hélice. En esta parte de la molécula, las cadenas individuales alfa tienen una secuencia de aminoácidos con la glicina en cada tercera posición, un requisito previo para la formación de la triple hélice. Otra característica es que los imino ácidos, prolina e hidroxiprolina, juntos constituyen aproximadamente una cuarta parte de los residuos y colaboran en la estabilización de la conformación helicoidal de cada una de las cadenas.

Aunque el colágeno tipo V está presente en numerosos tejidos, en la dentina es un constituyente minoritario, representando el 3% del colágeno sintetizado (Sodek y Mandell,

1982). Las moléculas del tipo V pueden ser homotriméricas o heterotriméricas, compuestas por tres cadenas alfa. La heterotrimérica $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ es la más prevalente y constituye el único colágeno tipo V del hueso (Miller y Gay, 1987). Ya hace una década, a través de estudios inmunohistoquímicos se puso de manifiesto la presencia de este tipo de colágeno en dentina de roedores (Bronckers y cols., 1986). Sin embargo, utilizando las mismas técnicas no pudo demostrarse su existencia en la dentina humana (Becker y cols., 1986).

El colágeno es sintetizado por los odontoblastos y secretado en la predentina, donde las moléculas de colágeno se disponen en fibras. La malla de colágena es menos densa en la zona adyacente a los cuerpos celulares, y alcanza la máxima densidad en la zona de interfase predentina/dentina, donde los cristales minerales serán depositados (Butler, 1984). En concreto, el colágeno se forma en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso de los odontoblastos, en forma de cadenas de procolágeno. Las cadenas de procolágeno tienen extensiones con residuos amino- y carboxiterminal que forman conjuntamente aproximadamente un tercio de la molécula. Las cadenas son modificadas postranslacionalmente por reacciones de hidroxilación y glucosilación; algunos de los residuos prolina y lisina son convertidos a hidroxiproliina e hidroxilisina, respectivamente.

Tres cadenas de procolágeno se unen para formar una molécula de procolágeno, con una estructura helicoidal triple en la parte central de la molécula. Las moléculas son empaquetadas en sáculos en la región de Golgi, transportadas en gránulos secretores y exocitadas en la predentina (Weinstock y Leblond, 1974). Por la acción de peptidasas específicas de la procolágena, los extremos amino y carboxilo son escindidos y las moléculas de procolágena se convierten en colágeno. Tras la secreción, las fibrillas de colágeno se forman por uniones espontáneas de las moléculas de una manera escalonada, es decir, las moléculas adyacentes se

encuentran desplazadas longitudinalmente casi un cuarto de su longitud. Esta disposición crea áreas espaciales alternantes de fibrillas con moléculas superpuestas (zonas de solapamiento) y con gaps (espacios vacíos), lo cual corresponde a la estriación cruzada que se ha visto en el microscopio electrónico. Una vez se han formado las fibrillas en el espacio extracelular, se refuerzan notablemente por la subsecuente formación de puentes covalentes cruzados entre los residuos de lisina.

Por tanto, para estabilizar la red de colágeno, existen **cadena cruzadas covalentes** entre sus moléculas (Eyre, 1987); dos de ellas son cadenas cruzadas reducibles, denominadas como dihidroxilisinonorleucina (DHLNL) e hidroxilisinonorleucina (HLNL). Durante el desarrollo del tejido conectivo, la primera representa la cadena cruzada mayoritaria en la dentina y hueso (Mechanic, Gallop y Tanzer, 1971). Sin embargo, en los tejidos conectivos maduros aparecen cadenas cruzadas no reducibles, de las cuales se sabe que la piridinolina está presente en mayor cantidad (Kuboki y cols., 1981); y además, la deoxipiridinolina, la otra cadena cruzada no reducible minoritaria, parece ser única en hueso y dentina (Eyre, Koob y Van Ness, 1984; Robins y Duncan, 1987). Estos hallazgos hicieron pensar que las cadenas piridínicas eran producto de maduración de las cadenas cruzadas reducibles (Eyre, 1980).

Por otra parte, la dentina bovina contiene aproximadamente una cadena cruzada reducible por molécula de colágeno, mientras que la dentina de incisivos de ratas contiene el doble de esta cantidad. En contraste, la dentina bovina contiene aproximadamente el doble de cadenas cruzadas piridínicas comparada con la de la rata, aproximadamente 0.2 por molécula de colágeno (Linde y Robins, 1988). Desde que se cree que las cadenas cruzadas piridínicas son productos de maduración de las cadenas cruzadas reducibles, una posible interpretación de

estos hallazgos es que el colágeno de la dentina de la rata que está en continuo crecimiento, debe ser menos maduro que el de la dentina de los bovinos.

En la dentina humana mineralizada, se ha observado que la cantidad de cadenas cruzadas piridínicas se incrementa con la edad, existiendo un descenso concomitante de la cantidad de cadenas cruzadas reducibles (Walters y Eyre, 1983), hecho éste que estaría en concordancia con el proceso de maduración propuesto para el colágeno. Fueron estos hallazgos los que nos indujeron a pensar en la utilidad de la determinación de estos marcadores en el establecimiento de la edad de un individuo y por tanto su aplicación en las ciencias forenses.

Macromoléculas no colágenas

El 10% del contenido protéico corresponde a las proteínas no colágenas, constituidas por las fosfoproteínas, proteínas que contienen gamma-carboxiglutámico (Gla) del tipo de la osteocalcina, proteína Gla de la matriz y proteoglicanos (PG). También podemos hallar en este tejido, aunque en una menor proporción, otras glucoproteínas ácidas y algunas proteínas séricas.

En las últimas dos décadas, este grupo proteico de la dentina y el hueso ha sido objeto de intensos estudios, debido a su supuesto papel de extrema importancia en el proceso de mineralización. De hecho, las fosfoproteínas se han propuesto como macromoléculas implicadas en dicho proceso. Además, las proteínas no colágenas y los PG de la dentina están tan fuertemente asociados con la fase mineral en el tejido que sólo son extraíbles tras la desmineralización (Linde, Bhowan y Butler, 1980). Fue quizá este dato, el que estuvieran tan íntimamente embebidas en la fase mineral del tejido dentinario, lo que nos hizo apostar por su mayor estabilidad y exclusión a los procesos putrefactivos y, consecuentemente, su posible utilidad para el establecimiento de la data. Además, se trataban de proteínas altamente específicas del tejido dentinario que podían verse afectadas por los cambios fisiológicos que ocurren en la dentina con el paso de los años y, de alguna manera, informar sobre el estado de madurez del diente.

1.- Fosfoproteínas de la dentina

La mayoría de los trabajos de investigación sobre este tipo de proteínas dentinarias se han llevado a cabo en la especie bovina y roedores, no existiendo prácticamente ninguna investigación que haya abordado el análisis en el humano. Las proteínas no colágenas más abundantes en la dentina de todas las especies animales son las fosfoproteínas. Existen en la dentina una variedad de estas proteínas con diferentes grados de fosforilación (Linde, Bhowm y Butler, 1980; Butler y cols., 1983; Linde, 1988), algunas de las cuales han sido previamente aisladas e identificadas en el hueso. Sin embargo, el término de fosfoproteínas en dentina, normalmente se refiere a aquellas que están altamente fosforiladas (PP-H), también calificadas por otros autores como fosforinas. En la dentina la fracción PP-H es predominante, y constituye la mitad o más de las proteínas no colágenas. Es digno de atención que no haya sido posible demostrar ninguna PP-H en el hueso, representando una diferencia inequívoca en la composición química entre el hueso y la dentina. Sin embargo, las fosfoproteínas con un bajo grado de fosforilación sí se han aislado en la dentina y el hueso, variando su concentración en las diferentes especies (Linde, 1988; Veis, 1985).

La PP-H es la proteína más ácida de la dentina, con un punto isoeléctrico de 1.1 para las PP-H de las ratas (Jonsson y cols., 1978). Ésto es debido al alto contenido de fosfato, 26% en ratas y 20% en bovinos, así como a su composición aminoacídica (Linde, 1988). La serina, incluyendo la fosfoserina, constituye alrededor del 50% de los residuos de aminoácidos y el aspártico aproximadamente un 40%. Por tanto, más del 80% de los residuos de aminoácidos tienen grupos carboxilos o fosfatos cargados negativamente.

Tras la desfosforilación de la proteína extraída de la dentina de incisivos de ratas, se han detectado dos moléculas de PP-H, mientras que sólo existe una en la dentina bovina (Linde, 1988; Linde, Bhowm y Butler, 1980). Así mismo, las PP-H bovinas tienen un menor contenido de fosfato y un mayor contenido de lisina. Los pesos moleculares de estas proteínas oscilan entre 30 kDa y 100 kDa para las PP-H de las ratas y entre 35 kDa y 158 kDa para las PP-H de los bovinos (Jontell, Pertoft y Linde, 1982; Jontell y Linde, 1983; Stetler-Stevenson y Veis, 1983; Stetler-Stevenson y Veis, 1983).

Estos resultados indican que las moléculas de PP-H de ratas y bovinos son diferentes en algunos aspectos, pero ya que sus características químicas generales son similares, se puede esperar que sus respectivas aptitudes funcionales sean idénticas.

Se cree que las fosfoproteínas están directamente implicadas en la cantidad y/o lugar de la mineralización de la dentina. Los estudios clásicos de Weinstock y Leblond (1973) indican que las fosfoproteínas son secretadas por los odontoblastos en el frente de mineralización, al contrario que el colágeno, el cual es secretado en la predentina. Recientes estudios de Rabie y Veis (1991) confirman estas conclusiones al demostrar el transporte de las fosfoproteínas a través de los procesos odontoblásticos directamente a la interfase predentina-dentina. Además estudios bioquímicos (Jontell y Linde, 1983) e inmunohistoquímicos (MacDougall, Zeichner-David y Slavkin, 1985; Nakamura y cols., 1985) indican que las PP-H están presentes en los procesos odontoblásticos así como en la dentina, pero que están ausentes de la predentina.

Por otra parte, estas proteínas se unen a las fibras de colágeno y ya que son muy polianiónicas, lo más probable es que exista una unión electrostática entre ellas. Esta idea fue demostrada por Stetler-Stevenson y Veis (1986). Sin embargo, aunque la mayoría de las proteínas no colágenas

de la dentina y el hueso son rápidamente solubilizadas durante o tras la desmineralización del tejido, una pequeña porción de esta proteína continúa asociada con el colágeno insoluble. Se ha debatido que esta pequeña fracción que está unida covalentemente al colágeno tenga una función específica en la formación mineral (Veis y cols., 1981).

Así mismo, las PP-H se unen a los iones de calcio con una fuerte afinidad (Zanetti y cols., 1981; Stetler-Stevenson y Veis, 1987). Este tipo de unión del ión calcio a una macromolécula de la matriz es a menudo interpretada como indicativo de un papel en la formación mineral (Zanetti y cols., 1981). Tras estudios con resonancia magnética, se demostró que la unión de las PP-H con el calcio no se localiza en sitios específicos, presentando dichos iones una movilidad alta en la superficie de la proteína (Cookson y cols., 1980). Posteriormente se observó que las PP-H a muy bajas concentraciones y cuando está inmovilizada por un soporte estable, puede inducir la formación de hidroxiapatita a partir de soluciones de fosfato cálcico en concentraciones fisiológicas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lussi, Crenshaw y Linde, 1988; Linde y Lussi, 1989; Lussi y Linde, 1993).

Un hallazgo interesante y presumiblemente con algún significado funcional, es que la dentina de la raíz de los bovinos contiene sólo la mitad de la cantidad de fosfoproteínas comparado con la dentina de la corona del mismo diente (Takagi, Nagai y Sasaki, 1988). Un resultado similar es el hallazgo de Steinfors y colaboradores (Steinfors, van den Bos y Beertsen, 1989), en relación a que el contenido de PP-H en la "dentina relacionada con el esmalte" de los incisivos de ratas fue aproximadamente cuatro veces más alto que en la "dentina relacionada con el cemento". El término "dentina relacionada con el esmalte" se refiere a la porción de la dentina en el lado convexo del incisivo, la cual está cubierta de esmalte. También estos autores encontraron diferencias en el contenido de otras proteínas no colágenas. Debería hacerse notar

que, en contraste al diente de los bovinos, donde la raíz es formada subsecuentemente a la corona, las porciones "relacionadas con el cemento" y "relacionadas con el esmalte" de la dentina de los incisivos de ratas son formados simultáneamente.

Por último, otro dato que implica a esta proteína en los procesos de mineralización es que se demostró por análisis bioquímicos de predentina disecada y por técnicas de inmunohistoquímica sobre dientes de diferentes especies, que la PP-H está ausente de la predentina (MacDougall, Zeichner-David y Slavkin, 1985; Nakamura y cols., 1985).

2.-Proteoglucanos

Los proteoglucanos (PG) constituyen una porción considerable de los componente no colágenos en la dentina. Son macromoléculas con un número de cadenas de carbohidratos unidas covalentemente a una proteína central o core. Las cadenas son **glucosaminoglucanos** (GAGs), los cuales están formados por unidades repetidas de disacáridos, consistentes en un ácido urónico y un N-acetil-hexosamina. Los diferentes GAGs, como el condroitín sulfato y el dermatán sulfato, se definen por la identidad de sus respectivos ácidos urónicos y residuos de hexosamina. La longitud de la proteína core, y el número, tamaño e identidad de las cadenas de GAGs varían entre los distintos tipos de PG. En los PG las cadenas de GAGs pueden estar sulfatadas; la localización del grupo sulfato en la hexosamina hace, por ejemplo, la diferencia entre condroitín-4-sulfato y el condroitín-6-sulfato. Los GAGs no sulfatados hialurónicos (ácido hialurónico) existe en los tejidos como una cadena de carbohidrato de alto peso molecular no unida a ninguna proteína central.

A diferencia de la mayoría de las especies de PG aisladas del cartilago, las cuales contienen muchas cadenas de GAG que tienen un peso molecular de un millón o más, los PG en la dentina y hueso mineralizado pertenecen a la clase de PG con sólo una o dos cadenas de GAGs y de bajo peso molecular, alrededor de 75 kDa (Rahemtulla, Prince y Butler, 1984). Las cadenas de los GAG en la dentina han sido identificados como galactosaminoglucanos, fundamentalmente **condroitín-4-sulfato** y **condroitín-6-sulfato**. El primero constituye sobre el 80 % de los GAGs del tejido dentinario humano, mientras que el segundo constituye el 14% (Hjerpe y cols., 1983). Además parece que también están presentes pequeñas cantidades de dermatán y queratán sulfato. Se ha demostrado, sin embargo, que el *pool* de PG asociado con la fase mineral de la dentina, definido como PG extraíble sólo tras la desmineralización, contendrá solamente condroitín-4-sulfato (Rahemtulla, Prince y Butler, 1984) aunque se ha encontrado evidencias de la presencia de pequeñas cantidades de queratán sulfato en la dentina mineralizada de los incisivos de ratas.

Los PG se localizan tanto en la predentina como en la dentina, siendo prácticamente los únicos macroconstituyentes de la predentina además del colágeno y se disponen ocupando los sitios que quedan libres entre las redes de colágeno. Sin embargo, las características de los PG en la predentina difieren de los PG de la dentina en que se pueden encontrar PG de diferentes tamaños. Por tanto, una parte de los PG en la predentina parece tener un tamaño molecular considerablemente más grande que aquellos PG de la dentina mineralizada y el hueso.

El tipo y distribución de GAGs específicos y PG en predentina y dentina de incisivos de ratas han sido revisados recientemente por estudios inmunohistoquímicos (Takagi y cols., 1991). En la predentina, se encontraron mayores cantidades de PG con condroitín-4-sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y condroitín no sulfatado, mientras que se hallaron cantidades

menores para los PG con condroitín-6-sulfato. En dentina sólo se pudieron identificar el condroitín-4-sulfato y pequeñas cantidades de dermatán sulfato. Además, se encontró que la distribución de PG en la dentina mineralizada era muy heterogénea; en la dentina peritubular se observó una reacción muy intensa, mientras que prácticamente no se tiñó la dentina intertubular.

Las funciones de los PG pueden variar considerablemente en los diferentes tejidos debido a la variada composición química que poseen. En general, las propiedades de los PG son determinadas por su elevada densidad de carga negativa, por su relativamente gran tamaño hidrodinámico y por la identidad de sus proteínas centrales. Un problema que surge cuando se discuten las supuestas funciones de los PG en la dentinogénesis, es que la mayoría de las investigaciones han usado PG aislado del cartilago, siendo estos PG diferentes en muchos aspectos a los del hueso y la dentina. Por tanto, los resultados de los estudios de PG de gran tamaño de cartilago hialino con condroitín sulfato y queratán sulfato, no pueden aplicarse a los PG pequeños de la dentina.

Se tiene conocimiento que se producen interacciones entre los PG y el colágeno con indudables implicaciones funcionales (Scott, 1988). Se ha postulado que los complejos colágeno-PG promueven la formación de las fibras de colágeno sirviendo como núcleo. También se ha demostrado que los PG estabilizan las fibras de colágeno (Snowden, 1982). Por tanto, una posible función para los PG durante la formación de la dentina puede ser controlar la organización de la red de colágeno en la predentina.

Los PG se unen electrostáticamente a cationes como el calcio, aunque no específicamente (Blumenthal, 1981). Esta unión al catión es una condición necesaria para la capacidad que

tienen los PG de la dentina de inducir la formación de hidroxiapatita, cuando están inmobilizados en un soporte estable, en condiciones iónicas y de pH fisiológicas *in vitro* (Linde, 1989), así como *in vivo* (Linde y Lussi, 1989). Por consiguiente, los PG podrían tener dos funciones dependiendo de su localización: en la predentina controlan la formación de la red de colágeno e inhiben la formación de hidroxiapatita, mientras que en la dentina facilitan la formación de los cristales.

3.- Proteínas que contienen gamma carboxiglutámico

En la dentina y hueso existe una cantidad de proteínas que contienen un aminoácido inusual, el gamma-carboxiglutamato (Gla). Este aminoácido está formado a partir de una reacción de carboxilación vitamina K dependiente de residuos de ácido glutámico. Alguna de las proteínas de la coagulación sanguínea contiene Gla pero estructuralmente no están relacionadas con las proteínas en los tejidos mineralizados. Cuando está presente en proteínas, el Gla puede unir cationes tales como el calcio. Debido a ésto, se piensa que esta proteína está íntimamente asociada con la fase mineral del hueso y la dentina (Hauschka y Wians, 1989). De hecho, niveles séricos de osteocalcina son a menudo utilizados como medida del intercambio metabólico del hueso en pacientes con enfermedades óseas.

Los dos grupos mayoritarios de proteínas que contienen gamma-carboxiglutámico están presentes en el hueso y la dentina, las proteínas Gla tipo osteocalcina y la proteína Gla de la matriz (MGP).

Las proteínas-Gla del tipo de la osteocalcina son componentes predominantes en el hueso de todas las especies estudiadas, así como en la dentina de los incisivos de ratas, y son fácilmente extraídas del tejido tras la desmineralización. Sin embargo, la proteína-Gla está virtualmente ausente de la dentina de dientes permanentes bovinos y gérmenes de dientes humanos (Linde, 1988). Las proteínas-Gla son pequeñas, contienen menos de 50 residuos de aminoácidos, dependiendo de las especies, con un peso molecular ligeramente inferior a 6 kDa. Poseen tres residuos de Gla y un puente disulfuro. Característicamente, las proteínas-Gla de la dentina y hueso también contienen un residuo de hidroxiprolina.

Se ha demostrado por técnicas inmunohistoquímicas que las proteínas-Gla son sintetizadas y secretadas por odontoblastos activos dentinogénicamente (Linde y Hansson, 1983). Las proteínas-Gla de la dentina aparentemente son sintetizadas por los odontoblastos previamente a la primera formación mineral (Bronckers y cols., 1987), lo cual contrasta con su aparición retardada en el desarrollo del hueso.

Además, por métodos bioquímicos (Jontell y Linde, 1983) e inmunohistoquímicos (Linde y Hansson, 1983; Bronckers y cols., 1985; Gorter de Vries y cols., 1987), se ha demostrado que las proteínas-Gla no están presentes en la predentina durante la dentinogénesis circumpulpar. Las proteínas-Gla pueden, de hecho, ser demostradas en el interior de vesículas intracelulares en los procesos odontoblásticos, sugiriendo un transporte directo intracelular al frente de mineralización de la dentina (Linde y Hansson, 1983).

Algunos trabajos han puesto de manifiesto el papel de la proteína-Gla en la formación del tejido óseo (Lian, Tassinari y Glowacki, 1984), pero esto no está en consonancia con el alto contenido de Gla-proteínas en la dentina de los incisivos de los roedores.

También las proteínas-Gla, teniendo primariamente un carácter aniónico, pueden influir en la formación mineral durante la dentinogénesis. Las proteínas-Gla se unen fuerte y reversiblemente a la hidroxiapatita, pero no al fosfatocálcico amorfo (Price y cols., 1976).

La existencia de la **proteína Gla de la matriz (MGP)** fue demostrada por primera vez hace más de una década (Price, Urist y Otawara, 1983), y aunque se detectó originariamente en la dentina, no existen estudios actuales que demuestren la expresión de la MGP por los odontoblastos (Butler, 1992). En contraste con la mayoría de los grupos de las proteínas-Gla, las cuales son fácilmente extraíbles de la dentina y el hueso tras la desmineralización, es característico que la MGP es insoluble en buffer y es extraíble de la matriz de colágeno sólo a través de la desnaturalización de agentes tales como la urea o el cloruro de guanidina.

LA MGP es una proteína de 15 kDa y con 79 residuos, conteniendo de 4 a 5 residuos de Gla y un puente disulfuro. En contraste con otras proteínas-Gla en hueso y dentina, no posee hidroxiprolina (Price y Williamson, 1985).

4.-Otras proteínas no colágenas ácidas.

Además de los constituyentes mayoritarios no colágenos descritos anteriormente, otros componentes proteicos han sido aislados y caracterizados. Muchos de éstos son ricos en ácido aspártico, ácido glutámico, ácido siálico, y carbohidrato y son incluidos bajo el término de **glucoproteínas ácidas**.

La *osteonectina*, el mayor componente de proteínas no colágeno del hueso, contiene cantidades relativamente altas de ácido aspártico y glutámico, un 10% de carbohidratos y un 0.5% de fosfatos orgánicos (Sato y cols., 1985), y con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa (Termine y cols., 1981; Romberg y cols., 1985). La *osteonectina* se une fuertemente a la hidroxiapatita (Romberg y cols., 1985), pero no tiene aparentemente ninguna unión específica al colágeno (Otsuka y cols., 1984). Se ha demostrado que la *osteonectina* está presente en la dentina bovina en cantidades considerables, del 4 al 6% del total de las proteínas extraíbles del tejido (Termine y cols., 1981). También está presente en la dentina porcina (Domenicucci y cols., 1988) y tras ser estudiada por técnicas de inmunohistoquímica se comprobó que en la predentina aparecía una tinción con mayor intensidad que en la dentina intertubular (Tung y cols., 1985). Por contra, la *osteonectina* parece estar ausente de la dentina de los incisivos de ratas (Sodek y cols., 1986).

La *osteonectina* no es específica de los tejidos mineralizados, y es difícil atribuirle un papel específico en los procesos de calcificación. Esta proteína es, de hecho, un componente amplio de la matriz extracelular en otros tejidos no calcificados aunque su concentración es más baja que en la dentina y el hueso.

Se ha demostrado que otra glucoproteína de 43 kDa, llamada SPARC e identificada primero como un componente de una membrana basal embriónica específica en ratones (Mason y cols., 1986), es idéntica a la *osteonectina*. Tras la secuenciación de ambas proteínas, se ha demostrado una secuencia homóloga en un 92% entre la *osteonectina* bovina y la SPARC de ratón, y pueden ser demostrados niveles altos de RNAm del SPARC en odontoblastos y osteoblastos por una técnica de hibridación *in situ* (Holland y cols., 1987). Todo ello son pruebas que indican que la *osteonectina* y la SPARC son idénticas, y que la expresión de este

gen no está confinada a los tejidos mineralizados.

La *osteopontina*, también llamada sialoproteína I del hueso o fosfoproteína 44 kDa del hueso, es una glicoproteína fosforilada notable en la matriz del hueso. Estudios recientes hacen hincapié en el papel de esta proteína en la unión de los osteoclastos durante la reabsorción del hueso. Resultados por técnicas de inmunohistoquímica indican que está presente en la predentina, aunque su presencia en la dentina no ha sido dilucidada completamente (Mark y cols., 1988).

Dos proteínas no colágenas, una *glucoproteína de 95 kDa* y otra *glucoproteína de 60 kDa*, han sido aisladas de la dentina de los incisivos de ratas y parcialmente caracterizadas (Butler y cols., 1985). Contienen 34% y 20% de carbohidratos respectivamente, y son ricas en aspártico, serina, glutámico, y glicina. La glucoproteína de 95 kDa contiene sobre un 10% de ácido siálico. La función de estas proteínas no es todavía conocida. En estudios preliminares, Bronckers y colaboradores (1989) encontraron una inmunotinción positiva para la glucoproteína de 95 kDa en los odontoblastos, en la dentina así como en la predentina. Hay datos que apuntan a un mayor contenido de la glucoproteína de 95 kDa en "la dentina relacionada con el cemento" de los incisivos de ratas, comparada con "la dentina relacionada con el esmalte" (Steinfort, van den Bos y Beertsen, 1989).

Se ha demostrado (Lesot y cols., 1988) que una *proteína de 68 kDa*, presente en la dentina de rata y conejo, pero también en hueso y esmalte, tiene unos determinantes antigénicos comunes con las queratinas, indicando una relación estructural entre esta proteína y las queratinas.

La dentina también contiene *proteínas séricas*. La albúmina es liberada de la dentina de rata sólo tras la desmineralización (Butler y cols., 1981). No está claro si está sintetizada por los odontoblastos, ya que se ha demostrado que la albúmina marcada radioactivamente inyectada intravenosamente en los conejos, se incorpora al interior de la dentina en desarrollo (Kinoshita, 1979). Se ha demostrado que la glucoproteína alfa₂-HS, una proteína plasmática de aproximadamente 50 kDa, está presente tanto en el hueso como en la dentina (Leaver, Thomas y Holbrook, 1977). Resultados inmunohistoquímicos de los dientes bovinos y humanos sugieren que la glucoproteína alfa₂-HS está presente principalmente en la dentina peritubular, mientras que se encontró que está virtualmente ausente de la dentina intertubular (Takagi y cols., 1990). El significado de la presencia de las proteínas séricas en la dentina no está completamente aclarado en la actualidad.

5.-Factores de crecimiento.

Además de las proteínas descritas anteriormente, la dentina contiene factores de crecimiento que tienen la capacidad de influir en procesos tales como el reclutamiento celular y la diferenciación, actividades sintéticas de amplificación celular y por tanto, potenciar el crecimiento y reparación del tejido.

Existen evidencias de que la matriz de la dentina, como la del hueso, contiene una proteína morfogenética del hueso (BMP), la cual induce la diferenciación de células formadoras de hueso nuevo cuando son implantadas en tejidos blandos (Bang, 1973). Se han hecho intentos para aislar este componente de las proteínas no colágenas de la dentina de rata (Conover y Urist, 1981), aunque aún no se ha conseguido la caracterización de esta proteína en la dentina.

El hueso es un reservorio de factores polipeptídicos de crecimiento, muchos de los cuales son sintetizados por los osteoblastos, y esto ha permitido el análisis de estos factores también en la dentina. Se ha demostrado que extractos de proteínas no colágenas de la dentina humana estimulan la proliferación de células del hueso *in vitro*, habiéndose puesto de manifiesto en dichos extractos, la presencia de factor de crecimiento beta transformante (TGF- β), factor de crecimiento I tipo insulina (IGF-I), y factor de crecimiento II tipo insulina (IGF-II) (Conover y Urist, 1981). Estos tres factores de crecimiento estaban presentes en concentraciones más bajas que en el hueso humano.

Metaloproteasas: la gelatinasa de 72 kDa

Las metaloproteasas son un grupo de proteasas metalo-dependientes que requieren la presencia del ión zinc para su activación. Son enzimas capaces de degradar la matriz extracelular y, aunque muchas otras proteasas pueden realizar esta función, se cree que las metaloproteasas son los mediadores fisiológicos más importantes en la degradación de la matriz. Una de las razones en las que se basan es que estas proteínas son secretadas en los lugares adecuados para la degradación de la matriz, y además, porque su actividad enzimática es más potente en valores de pH próximos a la neutralidad (Matrisian, 1992). Aunque se han descrito diferentes vías de degradación de la matriz extracelular y, a pesar de que no existe un conocimiento preciso de estos mecanismos, se sabe que en tejidos mineralizados como el hueso o el diente, enzimas del tipo de las metaloproteasas (Vaes, Delaisse y Eeckhout, 1992) desempeñan un papel importante. Las metaloproteasas son secretadas por células propias de cada tejido, células inflamatorias y células tumorales. Esta secreción enzimática se realiza en su forma latente y tras su activación son capaces de degradar muchos de los componentes del tejido conectivo. La actividad extracelular de dichas proteínas la controla una familia específica de inhibidores de las metaloproteasas. Tanto la activación como su completa regulación son procesos complejos y no del todo conocidos, en el que también participan factores del crecimiento, hormonas, citoquinas y oncogenes.

Se han descrito nueve tipos de metaloproteasas, clasificadas en tres grupos principales: las colagenasas, las gelatinasas (una de 72 kDa y otra de 92 kDa) y las estromelisininas (Overall, 1991; Birkedal-Hansen y cols., 1993; Overall, 1994). Todas han sido clonadas y secuenciadas excepto una (la estromelisinina tipo 3). Del estudio secuencial de sus aminoácidos se demostró que estas proteínas presentan características estructurales y funcionales muy similares

(Matrisian, 1990; Woessner, 1991), aunque difieren en la especificidad del sustrato en el que actúan. Por tanto, todas ellas presentan los siguientes componentes estructurales:

a.- Estructura propeptídica amino terminal

Está formada por 80 residuos de aminoácidos, presentando dentro de esta secuencia un residuo de cisteína no pareado. Se piensa que en la enzima latente, es decir, en la forma no activa, la cisteína se une con el Zn en el lugar de activación, de tal manera, que bloquea la actividad catalítica de la enzima (Springman y cols., 1990; Van Wart y Birkedal-Hansen, 1990). La estructura propéptida es eliminada cuando las enzimas se activan.

b.- Estructura catalítica de unión al ión metálico

Las metaloproteasas requieren la presencia del ión zinc para desarrollar su actividad catalítica, e iones calcio para dar estabilidad así como para la completa actividad de la enzima. Por tanto, en esta estructura existe una zona de unión con el ión zinc, el cual forma un complejo con tres residuos de aminoácidos y con una molécula de agua, la cual es esencial para la actividad catalítica.

c.-Estructura carboxiterminal tipo hemopexina

Parece ser que esta estructura le confiere a la enzima la especificidad al sustrato en el que actúa, y además es la zona de unión de los inhibidores de las metaloproteasas.

Esta zona C-terminal tiene una secuencia similar (en un 20%) con la proteína sérica hemopexina.

d.-Estructura tipo matriz extracelular

Las gelatinasas de 72 y 92 kDa se diferencian del resto de las metaloproteasas por la presencia de una secuencia aminoacídica extra que se encuentra adyacente a la estructura catalítica (Collier y cols., 1988; Wilhelm y cols., 1989). Ambas gelatinasas contienen tres copias de una secuencia de aminoácidos, de 58 residuos cada una, de colágeno tipo II tipo-fibronectina. Se piensa que debido a la existencia de esta región, este tipo de metaloproteasas tienen una alta afinidad por la gelatina, es decir por las cadenas alfa del colágeno desnaturalizado.

Además la gelatinasa de 92 kDa, pero no la de 72 kDa, contiene una secuencia de 53 aminoácidos rica en prolina. Esta región es un 42% idéntica a la cadena alfa 2 del colágeno tipo V. La gelatinasa de 92 kDa tiene una importante actividad colagenolítica tipo V, la cual puede venir desempeñada por esa zona de la molécula.

1. Regulación y activación de las metaloproteasas

La activación biológica de las metaloproteasas es un proceso aún desconocido. Este vacío en el conocimiento representa quizás, el obstáculo más importante para comprender cómo las células utilizan estas enzimas para degradar la matriz extracelular.

Las metaloproteasas son secretadas como proenzimas latentes inactivas, las cuales deben activarse para tener capacidad catalítica. La latencia de la proteína se mantiene debido a la unión del Zn con la cisteína (residuo aminoacídico no apareado que se encuentra en la zona de activación) (Springman y cols., 1990; Van Wart y Birkedal-Hansen, 1990), desplazando una molécula de agua, la cual es necesaria para la activación. El residuo de cisteína continúa oculto en la forma latente de la enzima, pero es expuesto durante la activación como resultado de un

cambio conformacional (Lyons y cols., 1991). Se han descrito diferentes agentes que pueden activar las metaloproteasas como compuestos órganomercuriales (Springman y cols., 1990; Sellers, Reynolds y Meikle, 1978; Stricklin y cols., 1983), plasmina y tripsina (Okada y cols., 1988), y detergentes (Birkedal-Hansen y Taylor, 1982), entre otros. Estas sustancias presumiblemente reaccionan con el residuo de cisteína para cambiar el equilibrio desde la forma latente hacia la activada. Una vez estabilizada en su forma activa o abierta, las enzimas catalizan varias reacciones autolíticas para completar el proceso (Nagase y cols., 1990; Suzuki y cols., 1990), de esta manera ocurre el desamblaje de la forma propéptida amino terminal. En la mayoría de las metaloproteasas, se produce una disminución de aproximadamente 10 kDa del peso molecular desde la forma latente a la forma activa, por la activación de la enzima, y por tanto, la pérdida de la estructura propéptida,

2. Inhibidores de las metaloproteasas

Las metaloproteasas activadas son inhibidas por un número de inhibidores llamados TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases). Existen dos tipos conocidos de TIMP, el TIMP-1 y el TIMP-2. El primero es una glicoproteína de 28 kDa (Stricklin y Welgus, 1983; Carmichael y cols., 1986) y el segundo es más pequeño, de 20 kDa (DeClerk y cols., 1989). Esta diferencia es debida principalmente a la falta de glucosilación de los TIMP-2. Los TIMP son sintetizados por células de muchos tejidos (Overall, 1994) y han sido aislados del fluido amniótico (Welgus y Stricklin, 1983), del suero (Welgus y Stricklin, 1983), y de la saliva (Drouin, Overall y Sodek, 1988).

Los TIMP bloquean la actividad de todas las metaloproteasas de manera específica, al formar un complejo esencialmente irreversible con la metaloproteasa activada (Cawston y cols., 1981).

De hecho, forman un complejo 1:1 con la forma activa de las metaloproteasas, e inhiben su actividad proteolítica por un mecanismo que no es completamente conocido. Una característica sorprendente de los TIMP-2 es que además de inhibir la gelatinasa activa de 72 kDa, forman complejos no covalentes con la gelatinasa de 72 kDa latente (Stetler-Stevenson y cols., 1989; Goldberg y cols., 1989; Moore y cols., 1992). Aunque se sabía que los TIMP-1 no formaban complejos con las colagenasas latentes, se ha demostrado actualmente que los TIMP-1 forman complejos con la gelatinasa de 92 kDa latente (Wilhelm y cols., 1989; Goldberg y cols., 1989; Howard, Bullen y Banda, 1991). La función y el significado fisiológico de la unión de los TIMP-1 y TIMP-2 a las gelatinasas en su forma latente no es conocido. Sin embargo, en ambientes en los que no existe TIMP-2, tales como los que se consiguen en cultivos de fibroblastos humanos estimulados con concanavalina A, se produce una forma activada de gelatinasa de 72 kDa con un peso molecular más bajo (59 kDa) y con una actividad específica alta. Esto indica que la unión del TIMP-2 a la enzima latente reduce la actividad enzimática (Overall y Sodek, 1990).

El complejo inactivo de la forma activada se produce por la unión de pequeños péptidos inhibidores que bloquean las zonas activas de las metaloproteasas (Lelievre y cols., 1990). Pero cuando se unen a las formas latentes de ambas gelatinasas, aparentemente no está implicada la zona activa porque pueden ser completamente activadas por compuestos órganomercuriales mientras que siguen unidas al inhibidor (Goldberg y cols., 1989; Howard, Bullen y Banda, 1991).

3. Funciones de las metaloproteasas

La alta frecuencia con la que encontramos a las metaloproteasas o sus inhibidores en células, tejidos y fluidos intersticiales, sugiere que estas enzimas juegan un papel importante en la remodelación de la matriz extracelular, aunque hay todavía pocas evidencias directas del papel específico de estas proteínas en estos procesos biológicos.

El crecimiento y desarrollo siempre están asociados con movimientos celulares rápidos y con la reestructuración de la matriz extracelular. Muchos estudios han puesto en evidencia el papel de las metaloproteasas y sus inhibidores en la regulación del desarrollo de determinados tejidos (Werb, Alexander y Adler, 1992), incluyendo el crecimiento embriológico y la diferenciación (Brenner y cols., 1989; Nomura y cols., 1989), el crecimiento y remodelación ósea (Fleniken y Williams, 1990), el desarrollo de órganos incluyendo las glándulas salivares (Hayakawa, Kishi y Nakanishi, 1992) y en gérmenes dentarios (Nomura y cols., 1989).

Por otra parte, la invasión de los tumores primarios y las metástasis dependen de la destrucción y remodelación que se produzca en el estroma, evidenciándose en estas situaciones la expresión de una o más metaloproteasas (Pajouh y cols., 1991).

4. Las gelatinasas: un tipo especial de metaloproteasas

Las gelatinasas de 72 kDa y de 92 kDa son dos enzimas que pertenecen a la familia de las metaloproteasas. Ambas proteínas degradan eficientemente y de forma específica las cadenas alfa del colágeno desnaturalizado (gelatina), aunque también se ha descrito que actúan sobre

el colágeno tipo IV en su forma nativa. La gelatinasa de 72 kDa es secretada por células del tejido conjuntivo y por células tumorales (Collier y cols., 1988; Murphy, Cawston y Reynolds, 1981). La gelatinasa de 92 kDa es secretada por leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos (Murphy y cols., 1982; Mainardi y cols., 1984) y por algunas células transformantes (Wilhelm y cols., 1989). Aunque las gelatinasas de 72 y 92 kDa son inmunológicamente distintas, son similares en que ambas contienen una estructura de unión al colágeno tipo-fibronectina, hecho que puede significar la causa de su especificidad a su sustrato, es decir una alta afinidad de ambas por la gelatina y que justifica su determinación en nuestro trabajo. A diferencia de la gelatinasa de 72 kDa, la de 92 kDa es glicosilada y contiene una secuencia de 53 aminoácidos que muestra algunas similitudes con un segmento de la cadena alfa 2 del colágeno tipoV (Collier y cols., 1988; Wilhelm y cols., 1989).

La expresión de las gelatinasas de 72 y 92 kDa está a menudo asociada con tumores invasivos y metastásicos (Bernhard, Muschel y Hughes, 1990). La observación que las gelatinasas degradan el colágeno tipo IV soluble (Salo, Liotta y Tryggvason, 1983; Salo, Turpeenniemi-Hujanen y Tryggvason, 1985) apoya la cuestión de que estas enzimas juegan un papel biológico en la degradación de la membrana basal y por tanto, dotan a las células de propiedades invasivas. Es como si las metaloproteasas constituyeran una de las herramientas de las células tumorales para remodelar la matriz extracelular como un paso necesario en la expansión, invasión y metástasis del tumor.

En relación al diente, se han realizado estudios que relacionan las gelatinasas con el desarrollo dentario, de hecho, se ha comprobado la existencia de ambas gelatinasas (72 y 92 kDa) en los gérmenes dentarios, lo cual es factible con la importancia de la degradación de la membrana basal dental en el desarrollo del diente (Heikinheimo y Salo, 1995). Por otra parte, también

se ha analizado el papel de las metaloproteinasas en los procesos de mineralización dentaria, evidenciándose enzimas con actividad gelatinolítica en dentina porcina (Fukae, Kaneko y Shimizu, 1991; Fukae, Tanabe y Yamada, 1994), así como en el esmalte porcino (Ishiguro y cols., 1994). En dentina humana sólo ha sido identificado el TIMP-1. Estudios preliminares realizados recientemente en dentina humana (Martín de las Heras, Valenzuela, Villanueva, Overall, 1997) han puesto de manifiesto la presencia de esta enzima en dicho tejido. Estos indicios junto con el hecho del papel que puede jugar la gelatinasa en la degradación de la matriz extracelular e incluso en la mineralización dentinaria nos hizo incorporar a nuestro trabajo el estudio de este sistema enzimático, en la convicción de que el paso de los años podría producir alteraciones y cambios de interés en la presencia o capacidad enzimática de esta proteína en la dentina humana.

Lípidos

Los lípidos constituyen una parte cuantitativamente minoritaria de la fase orgánica de la matriz, representando menos del 2% de la masa orgánica. Se ha postulado que en la preentina, el contenido lipídico es más alto que en la dentina madura (Ellingson, Smith y Larson, 1977).

Fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos forman más del 90% del contenido total lipídico (Wuthier, 1984). De los fosfolípidos, la fosfatidilcolina constituye la mitad, seguido de la fosfatidiletanolamina, esfingomielina, y difosfatidilglicerol.

Alrededor de los dos tercios de los lípidos de la dentina se extraen antes de la desmineralización, mientras que un tercio están unidos estrechamente al componente mineral del tejido. Esta porción está constituida por fosfolípidos ácidos, tales como la fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y el ácido fosfatídico y son extraíbles únicamente tras la desmineralización del tejido.

La primera indicación de que los lípidos podían formar parte en los mecanismos de mineralización de la dentina, surgió a partir de los trabajos del grupo de Irving, quienes detectaron una intensa zona sudanófila, rica en lípidos, que correspondía al frente de mineralización preentina-dentina. Se demostró que esta sudanofilia era debida a un acúmulo de fosfolípidos ácidos (Shapiro, Wuthier y Irving, 1966).

La distribución de los lípidos durante la dentinogénesis ha sido investigada (Goldberg y Septier, 1985), demostrándose la presencia de gránulos y filamentos lipídicos entre las fibras de colágeno tanto en la dentina como en la preentina. Usando una técnica autoradiográfica,

no pudieron demostrar una acumulación lipídica en la interfase predentina/dentina al no tefirse de una manera especial esta zona tal y como podría esperarse tras los trabajos de Irving (Goldberg y Escaig, 1984). Habría que tener en cuenta si los lípidos que se determinan son unos componentes asociados a la membrana celular, más que constituyentes genuinos de la matriz.

Se han discutido varias funciones posibles de los fosfolípidos en la biomineralización. Los fosfolípidos se unen a los iones calcio con moderada afinidad y selectividad, y su unión se potencia por la presencia de iones fosfatos, resultando la formación de complejos de calcio-fosfato-fosfolípidos ácidos (Cotmore, Nichols y Wuthier, 1971). Dichos complejos pueden ser aislados de los tejidos calcificados pero no de los no calcificados (Boskey, 1978). Boskey y colaboradores (Boskey y Posner, 1977; Boskey, 1989) han demostrado que tales complejos son capaces de potenciar la formación mineral *in vitro*. También se ha demostrado que las lipoproteínas y los complejos fosfolípidos ácidos, son capaces de inducir la hidroxiapatita *in vivo* (Raggio, Boyan y Boskey, 1986).

Los estudios sobre las propiedades y posibles funciones de los componentes que contienen lípidos en los procesos de mineralización están todavía en los estadios iniciales en algunos aspectos, y se espera que futuras investigaciones proveerán de una visión más completa de su posible papel en la biomineralización.

2c. Comentarios sobre los componentes bioquímicos de la matriz orgánica de la dentina

De la descripción anteriormente expuesta, está claro que aunque la dentina está relacionada con el hueso y con tejidos conectivos en su composición general, la composición de la dentina en algunos aspectos es única. En la matriz de la dentina y predentina no están presente proteínas típicas de los tejidos conectivos blandos como la fibronectina y el colágeno tipo III.

Como el hueso, la dentina contiene macromoléculas que son características de tejidos mineralizados tales como el colágeno tipo I, PG, proteínas-Gla tipo osteocalcina, MGP y la osteonectina/SPARC. Sin embargo la PP-H es una molécula única de la dentina, que no existe en el tejido óseo, lo cual le confiere unas características especiales.

Es importante apreciar que existen diferencias químicas importantes entre la dentina de distintas especies. La PP-H es el componente proteico no colágeno mayoritario de la dentina de rata y bovina. Estas PP-H difieren claramente en su composición; la fracción de PP-H de los incisivos de ratas está formado por dos especies moleculares diferentes, mientras que sólo una puede ser identificada en la dentina bovina. Además, la proteína-Gla del tipo de la osteocalcina es una fracción mayoritaria en la dentina de los incisivos de ratas, pero está prácticamente ausente en la dentina bovina y humana. La osteonectina/SPARC parece ser un componente importante en la dentina bovina y porcina, pero está ausente de la dentina de los incisivos de ratas. Por otra parte, la proporción entre las cadenas cruzadas reducibles y no reducibles difieren en la dentina de rata y bovina.

Por todo lo anterior, se puede concluir que es peligroso extrapolar hallazgos químicos de la dentina de unas especies a otras. Sorprendentemente, existen pocos estudios de la matriz de

la dentina humana, y no se conoce prácticamente nada sobre los constituyentes de la dentina secundaria y terciaria.

3. DENTINOGENESIS

3a. Iniciación de la dentinogénesis. Formación el manto de dentina

El primer mineral formado llegará a ser el manto de dentina. En este estadio los odontoblastos no han alcanzado un grado completo de diferenciación y esta **mineralización de novo**, es decir, la que se produce cuando no hay previamente sustancia mineral en el tejido, parece que requiere mecanismos específicos que difieren del de la formación de la dentina circumpulpar. Pruebas ultraestructurales indican que cuando comienza la formación del manto de dentina, la cristalización inicial tiene lugar dentro o en la superficie de la membrana de las vesículas de la matriz que derivan de los odontoblastos. Sólo tras esta fase puede verse a la sustancia mineral en asociación con las fibras de colágeno en el tejido. Estas vesículas no se ven en estadios posteriores, es decir, durante la formación de la dentina circumpulpar. Mientras que las vesículas de la matriz se observan en muy poca cantidad durante la iniciación de la formación de la dentina y hueso, son muy abundantes durante la mineralización del cartilago.

Durante este periodo inicial de formación de dentina, parece que los constituyentes de la matriz tienen una importancia funcional limitada. Por medio de técnicas de inmunotinción para el **colágeno tipo I**, se demuestra que está presente en el manto de dentina de los roedores; también el **colágeno tipo V** está presente en los estadios iniciales. La **fibronectina** puede ser

demostrada en el manto de predentina de los incisivos de ratas, pero está ausente en el interior de la dentina intertubular tras la mineralización.

3b. Formación de la dentina circumpulpar

La dentinogénesis circumpulpar, como la osteogénesis, ocurre en dos procesos simultáneos: la formación de la predentina (red de colágeno fundamentalmente) y su subsecuente mineralización en el frente de mineralización. El intervalo de tiempo entre ambos procesos, morfológicamente representado como el ancho de la predentina, representa el tiempo necesario para que las moléculas de colágeno se conformen como una red fibrosa. Funcionalmente, la predentina puede considerarse como una zona para la formación y maduración de la red de colágeno de la matriz dentinal.

Esquemáticamente existen dos niveles de secreción, uno próximo a los cuerpos celulares de los odontoblastos, donde los constituyentes de la predentina son excitados, y otro distal, en el frente de mineralización, donde se sintetizan los componentes que presumiblemente tiene una función importante en la mineralización del tejido. En la Figura 1 se presenta un esquema de la región odontoblastos-predentina durante la dentinogénesis. Una vez formada la malla de colágeno se secretan una serie de proteínas como las PP-H, PG de pequeño tamaño y proteínas Gla. La mayoría de los trabajos indican que el colágeno por sí solo, no es suficiente para inducir la mineralización *in vivo*, y la mayoría de los autores parecen estar de acuerdo que durante la mineralización la matriz de colágeno funciona meramente como soporte estable y de orientación para los cristales de hidroxiapatita y las proteínas no colágenas. Así que el interés se ha centrado en el papel de los constituyentes no colágenos del tejido en la inducción

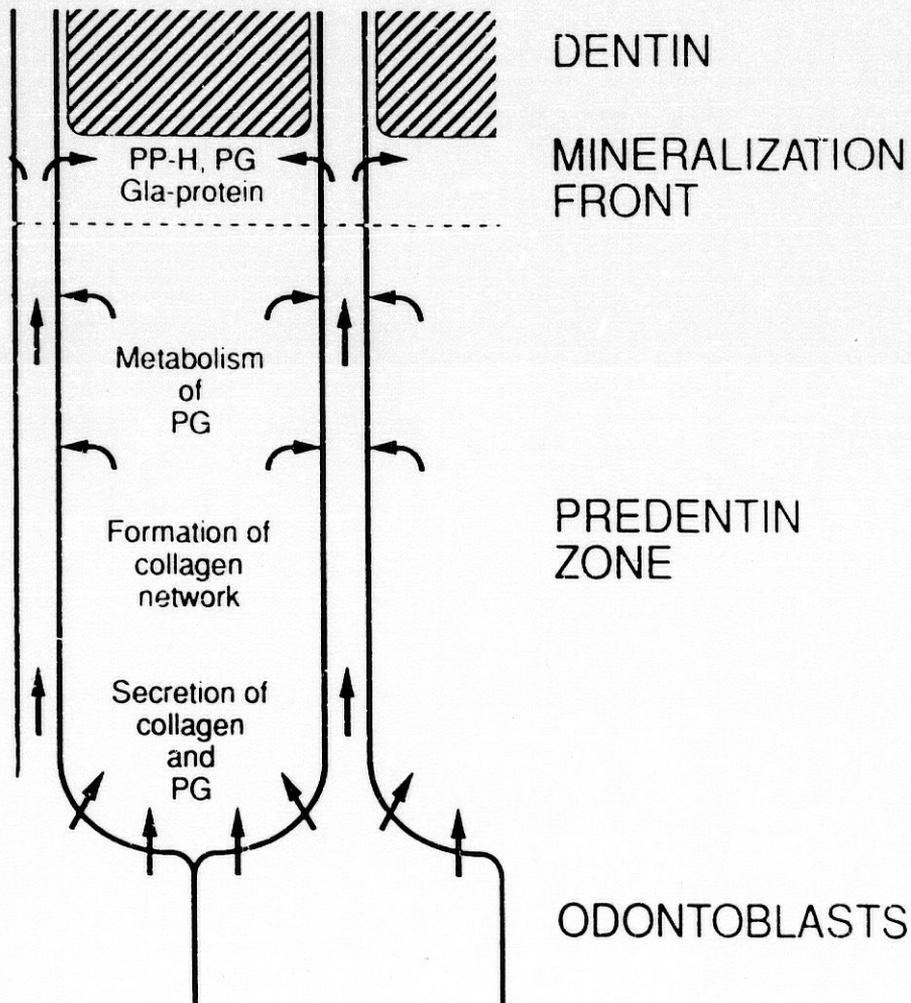


Figura 1.- Esquema de la región odontoblasto-predentina durante la dentinogénesis activa. Los constituyentes de la matriz orgánica son sintetizados por los odontoblastos. Algunas proteínas no colágenas son transportadas en el interior de los procesos odontoblásticos y son secretadas justamente en el frente de mineralización. (De Linde A., Anat Rec, 224:154, 1989).

y regulación de la formación mineral. El hecho de que estas proteínas no colágenas secretadas directamente en el frente de mineralización, tengan un carácter aniónico hace que tengan afinidad por cationes como el calcio y esta unión podría indicar que proteínas como las PP-H y los PG actúen como agentes nucleadores de la hidroxiapatita. Las proteínas Gla también están ausentes de la predentina, pero su ausencia de la dentina bovina en contraste con la dentina de roedores en la que sí se presentan, hace difícil imaginar cualquier papel específico de esta proteína en el proceso de mineralización.

Proteínas polianiónicas existen en los diversos sistemas calcificados de la naturaleza, tales como el hueso, dientes y en las conchas de moluscos. Es concebible que el uso de macromoléculas aniónicas sea un motivo, usado generalmente por la naturaleza para la inducción mineral durante la mineralización. Basado en estos hallazgos, se puede concluir que las proteínas no colágena polianiónicas, tales como las PP-H y los PG, pueden ser un instrumento en la nucleación mineral durante la dentinogénesis. Desde un punto de vista cuantitativo, la fracción menor de PP-H, fuertemente asociada al colágeno de la dentina, sería suficiente para este propósito. Puede ser también que la fracción mayor de PP-H (la que es fácilmente extraíble tras la desmineralización del tejido) esté inmovilizada suficientemente en la red del colágeno como para inducir la mineralización.

Se ha especulado que las proteínas no colágena en la dentina y el hueso tengan otras funciones además de la de nucleación mineral. Moléculas como la PP-H y los PG podrían también funcionar como reguladores en la cantidad de mineralización y en el tamaño del cristal. La PP-H que es primeramente liberada en la matriz podría promover la formación inicial de los cristales minerales, mientras que una acumulación posterior de PP-H podría participar en la regulación de la extensión de los cristales.

3c. Diferencias entre la preentina y dentina

De todo lo anteriormente expuesto, es evidente que existen diferencias tanto morfológicas como bioquímicas entre la dentina y la preentina. El análisis de estas diferencias nos permite esclarecer los mecanismos que se producen en la formación de la dentina mineralizada y por tanto, obtener un conocimiento más profundo de los cambios que surgen en estos tejidos.

La **preentina** contiene fundamentalmente colágeno tipo I y además PG, una pequeña cantidad de fosfoproteínas con un grado bajo de fosforilación y, posiblemente en algunas especies, osteonectina/SPARC. La PP-H está ausente de este tejido.

En relación al tipo y proporción de las cadenas cruzadas del colágeno, en la preentina bovina el contenido de cadenas cruzadas reducibles es dos veces mayor que en la dentina, mientras que la piridinolina y la deoxipiridinolina sólo puede ser encontrada en la dentina mineralizada.

Durante la dentinogénesis de los roedores, las proteínas-Gla del tipo de la osteocalcina no están presentes en la preentina, pero pueden ser demostradas en el interior de estructuras vesiculares en los procesos odontoblásticos, indicando un transporte intracelular directo al frente de mineralización de la dentina.

Se ha demostrado la existencia en la dentinogénesis de diversas fracciones de PG sulfatados con características metabólicas diferentes; un *pool* se incorpora rápidamente en la dentina mineralizada, mientras que el otro *pool* continúa en la preentina durante un periodo de tiempo extenso, presumiblemente se metaboliza allí ya que parte de los procesos odontoblásticos próximos a la dentina parecen tener una función reabsortiva. Ha sido demostrado la presencia

de enzimas degradadoras de los PG, tales como la catepsina D, en región predentina/odontoblasto. Se puede concluir que el contenido de PG de la predentina y dentina difiere considerablemente, siendo de tamaño heterogéneo en la predentina. Como comentamos anteriormente, se sabe que los PG pueden influir en la fibrilogénesis extracelular así como inhibir la formación mineral, y puede ser especulado que los PG de la predentina tiene alguna función reguladora en la formación de las fibras de colágeno, mientras que inhibe la formación mineral.

El hallazgo de que la PP-H está ausente de la predentina, sugiere que la PP-H recientemente sintetizada es transportada directamente por el interior de los procesos odontoblásticos a través de la zona de predentina y secretada en el frente de mineralización. Siendo un componente específico de la dentina mineralizada.

Una importante razón para el hecho de que la composición de la matriz de la dentina mineralizada sea diferente al de la predentina, es debida a que algunos componentes macromoleculares, tales como las Gla-proteínas, PP-H y PG, son añadidas en el frente de mineralización, presumiblemente subsecuente a un transporte intracelular a lo largo de los procesos odontoblásticos y cuyo papel ya hemos comentado en los procesos de mineralización.

CAMBIOS DEL TEJIDO MINERALIZADO HUMANO CON LA DATA Y LA EDAD

Como se ha expuesto anteriormente en esta memoria, los motivos y las circunstancias en las que se solicita la peritación sobre restos óseos y dentarios esqueletizados es variada, siendo la data de restos óseos y dentarios un problema médico-legal relativamente frecuente que no siempre tiene una fácil solución.

Aunque ya han quedado resaltadas las diferencias bioquímicas y estructurales que existen entre ambos tejidos mineralizados, el hueso y la dentina, parece oportuno recoger aquí los trabajos más relevantes en la investigación médico-forense que, tomando el hueso como tejido de trabajo, han supuesto una aportación al cronotanodiagnóstico. No creemos justificado extendernos demasiado en este apartado, pero sí parece necesario resumir las técnicas más útiles y de mayor aplicación en este campo.

Berg en 1963 publicó un trabajo de revisión que aunque se puede considerar dentro de los clásicos, sigue teniendo vigencia en la actualidad. Se describen los cambios morfológicos (macroscópicos y microscópicos) que sufre la estructura ósea, de tal forma que los huesos más antiguos son más ligeros y más frágiles que los más recientes. El hueso reciente presenta su estructura laminar intacta mientras que toda estructura organizada va desapareciendo en los huesos más viejos; sobreviniendo al final un proceso de mineralización. En cuanto a los cambios en la composición orgánica y mineral del hueso, este autor pudo establecer que la materia grasa del hueso permanece en él durante varias décadas para luego ir desapareciendo, de la misma forma que se detecta una disminución en la concentración de proteínas séricas.

Haynes (1968) propuso el método del C_{14} para la determinación de la data, pero sólo es útil para restos milenarios y por tanto carente de interés médico-legal. Knight (1969 y 1971) estudió la composición de la materia orgánica de los huesos y en concreto, realizó una determinación de los aminoácidos y del nitrógeno del hueso, concluyendo que en restos óseos más antiguos hay una disminución en el número de aminoácidos (siendo la prolina y la hidroxiprolina los dos aminoácidos más resistentes), y en el porcentaje de nitrógeno en relación a los huesos más recientes.

En 1976, la Profa. Castellano realiza en la Universidad de Granada un trabajo de investigación pionero en este campo. Tomando huesos de distintas datas conocidas, llevó a cabo el estudio del comportamiento del material orgánico e inorgánico en el proceso de envejecimiento de restos óseos con la intención de aplicar los resultados al establecimiento de la data. De sus conclusiones podemos resaltar que el hueso experimenta con el paso de los años una pérdida de materia orgánica y consecuentemente un enriquecimiento relativo en materia mineral. También describió una disminución de los lípidos (colesterol y triglicéridos) y un aumento de los ácidos grasos libres (Castellano y Villanueva, 1977 y 1978a,b). Las proteínas solubles del hueso experimentan igualmente un descenso con la data.

Villanueva, Girela y Castellano (1976) aplicaron por primera vez el análisis térmico diferencial y el análisis termogravimétrico para el establecimiento de la data de restos óseos demostrando su utilidad para distinguir restos recientes de los antiguos de más de 100 años.

Este mismo equipo (Castellano, Villanueva y von Frenckel, 1984) para proceder a la estimación de la data de restos óseos, realizó un estudio de regresión múltiple en los que incluyeron parámetros bioquímicos determinados en hueso. El modelo que ofreció los mejores resultados fue aquel suministrado por una ecuación de regresión múltiple en el que se incluían

las proteínas, los triglicéridos y el colesterol ajustándose a la siguiente ecuación de la recta: $y = 52.2032 - 7.8213 x_1 + 0.6355 x_2 - 3.4930 x_3$ (en donde x_1 = proteínas, x_2 = triglicéridos, y x_3 = colesterol).

Llama la atención que tras una revisión exhaustiva de la literatura médico-forense sobre la utilidad del hueso para el cronotanodiagnóstico, no existan prácticamente más trabajos que los anteriormente mencionados. No obstante, parece oportuno mencionar algunas investigaciones que puedan ser de utilidad a las ciencias forenses, aunque se hayan llevado a cabo con una finalidad diferente, bien para el dataje de restos arqueológicos o simplemente como una aportación al mejor conocimiento de la fisiopatología y metabolismo óseo. En huesos recientes se pueden encontrar tanto colágeno como proteínas no colágenas. Las proteínas no colágenas derivan del suero o son producidas por las células especializadas del tejido óseo. De hecho, se han aislado dos proteínas séricas, la albúmina y la glucoproteína alfa-2-HS, representando el 13% de las proteínas no colágenas de la matriz ósea extraída del hueso subperióstico de fetos humanos (Robey y cols, 1988). También se han aislado en el hueso reciente, aunque en menor proporción, otras proteínas derivadas del suero, como las transferrinas y las inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgE). Un paso importante en el mejor conocimiento de la biología ósea, fue la caracterización de otras proteínas no colágenas en el hueso, como la osteocalcina y osteonectina (Price y cols., 1976; Termine y cols., 1981), demostrándose posteriormente por técnicas de enzaimmunoanálisis, que disminuían con el intervalo postmortem (Turos y cols., 1989).

Cuando se trabaja con un tejido como el hueso, es quizás más importante el estudio de una amplia variedad de proteínas no colágenas, sin embargo, cuando analizamos la dentina hay

que tener en cuenta que más de la mitad de las proteínas no colágenas lo constituye un único producto, la PP-H (fosfoproteína altamente fosforilada).

En los casos en los que es posible llegar a la individualización de los restos óseos, el hueso tiene más información que aportar. Desde los trabajos clásicos de Lee y colaboradores (1989), en los que se tipificaron los grupos antigénicos ABH en tejido óseo, hasta los más actuales (Hochmeister y cols., 1991; Lee y cols., 1991), que han desarrollado técnicas de análisis de ADN en hueso, usando tanto el ADN nuclear como los marcadores mitocondriales. De hecho, tanto el hueso como el diente, son dos tejidos, en los que se han llevado a cabo con éxito el tipaje de ADN, aunque el diente es más resistente a los factores ambientales y el ADN que se obtiene es de una calidad más alta (Schwartz y cols., 1991; Smith y cols., 1993).

Hasta la actualidad, no se han desarrollado prácticamente investigaciones que relacionen cambios en el tejido dentinario con el cronotanodiagnóstico. Esta ausencia de información científica nos alentó en la posibilidad de aportar algunos datos en este campo.

Como ya se ha planteado anteriormente, otro punto de interés en la práctica de la Medicina Legal es la estimación de la edad biológica del cadáver. En el abordaje de esta cuestión, el estudio del diente representa un pilar fundamental, ya que el hueso nos puede aportar información prácticamente sólo hasta su completo desarrollo, a través del estudio de los núcleos de osificación y la soldadura de las epífisis. Transcurrida la segunda década de la vida, la edad ósea se estima en base a estudios morfológicos del hueso, tales como el análisis de la superficie articular del pubis o el cierre de las suturas craneales, métodos que se caracterizan por su amplio rango en años en la estimación de edad y su imprecisión.

La importancia del uso del diente en el cálculo de la edad, radica fundamentalmente en las características particulares de su desarrollo evolutivo, así como en los fenómenos que acontecen con el paso de los años en la estructura dentaria. Si además añadimos su singular resistencia a los agentes químicos, físicos y a la putrefacción, el diente puede considerarse un elemento diagnóstico de inestimable interés en el cálculo de la edad tanto en sujetos vivos como en cadáveres recientes y restos cadavéricos.

Cuando se analiza el grado de desarrollo del diente, se puede estimar la edad en sujetos de edades comprendidas entre 0 y 20 años, es decir, en sujetos que no han finalizado plenamente la formación de su dentición. En estos casos se estudian dos parámetros fundamentales: el grado de calcificación dentaria y la cronología y la secuencia de la erupción dentaria.

La calcificación dentaria es un proceso continuo y secuenciado, que comienza por la corona, continúa por la raíz y termina con el estrechamiento y cierre del ápice radicular. Esta cualidad nos permite su uso en el cálculo de la edad. Debido a que se inicia durante la época fetal, la edad dental puede ser ya estimada en estadios muy precoces, analizándose a través de estudios histológicos (Calonius, Lunin y Stout, 1970) y radiográficos el grado de calcificación y desarrollo de los gérmenes dentarios (Kraus y Jordon, 1965; van der Linden y Duterloo, 1976).

Durante la infancia y la adolescencia, disponemos del estudio de la cronología y secuencia de la erupción dentaria, además del estudio radiográfico de la calcificación dentaria. Ambos procesos se analizan siguiendo el mismo procedimiento, es decir, se fundamentan en un estudio comparativo entre el estadio radiográfico del sujeto en cuestión, y esquemas estandarizados que se han obtenido tras el estudio de poblaciones conocidas. Muchos autores han realizado

sus propios métodos basándose en el estudio del desarrollo del diente, proponiendo diferentes estadios evolutivos de la pieza dentaria y de la erupción (Schour y Massler, 1941; Nolla, 1960; Moorees, Fanning y Hunt, 1963; Demirjian, Goldstein y Tanner, 1973; Haaviko, 1974).

La dentición permanente termina su formación aproximadamente a los 14 años, momento en el cual el segundo molar permanente cierra su ápice radicular. Por lo tanto, entre los 15 y los 20 años de edad sólo disponemos de una pieza dentaria para el cálculo de la edad: el tercer molar. Existen trabajos que estudian el grado de calcificación de esta pieza, siendo de especial interés el desarrollado por van Herden (1985), el cual se basa en la medición de la longitud de la raíz mesial de dicho diente sobre una ortopantomografía.

Tras el desarrollo completo de la dentición, es decir, a partir de la segunda década de la vida, la edad dental se estima en base a los cambios que acontecen en la estructura dentaria con el paso de los años. Para tal tarea, se han descrito métodos morfológicos, histológicos y bioquímicos. Hay que tener en cuenta, que dichos métodos son menos precisos para el cálculo de la edad que el estudio del desarrollo de las piezas dentarias, además conllevan la aplicación de técnicas más complejas dificultando su realización rutinaria. Antes de especificar los diferentes métodos en la estimación de la edad dental, sería de interés realizar una descripción breve de los cambios relacionados con la edad descritos en el tejido dentario.

La *atricción dental* es una reducción de la sustancia dentaria por el contacto que se produce entre los dientes antagonistas, lo cual causa facetas de desgaste en las caras oclusales de los dientes. En antropología este parámetro ha sido tradicionalmente utilizado como complemento con otros métodos en la estimación dental. Hay que tener en cuenta que la atricción dental se

afecta fácilmente por factores culturales, como la dieta, o situaciones patológicas como el bruxismo y por tanto, nunca constituirá un método preciso para la estimación de la edad (Santini, Land y Raab, 1990).

El *oscurecimiento en el color* de los dientes, es otro factor que se produce con el paso de los años. La medición del color es un método muy subjetivo, dependiendo de la superficie donde se mida, el grado de hidratación de la pieza, el tipo de luz que se utiliza así como las guías de colores que se emplean para su comparación. La determinación del color sólo debe usarse en métodos de estimación de edad dental que a su vez empleen otros factores (Solheim, 1988).

El *límite cervical de las fibras periodontales* se retraen en sentido apical, avanzando a lo largo de la vida de las personas. Se piensa que este fenómeno puede ser debido a un mecanismo de compensación por la pérdida de tejido dental por la atricción. Nunca debe ser utilizado como parámetro aislado en el cálculo de la edad, ya que este factor se puede ver influenciado por inflamaciones crónicas periodontales (Papapanou y cols., 1991).

La *dentina transparente radicular* aparece a partir de la tercera década de la vida y progresa coronalmente desde el ápice radicular. Dicha dentina puede visualizarse colocando una luz detrás del tejido dentario, y es debida al incremento con el paso de los años del depósito de la dentina peritubular, es decir, aumenta una dentina más mineralizada, lo que hace que cambie el índice refractivo de la luz de la dentina de la raíz (Vasiliadis, Darling y Levers, 1989). La técnica más precisa para cuantificar la dentina transparente en el cálculo de la edad es la medida de la longitud de la zona transparente, constituyendo por sí solo o con otros factores, un método para la estimación de la edad dental (Bang y Ramm, 1970; Solheim, 1989; López-Nicolás, Morales y Luna, 1993).

La *dentina peritubular* es un depósito de tejido mineralizado alrededor del túbulo dentinario que aumenta con la edad. Realmente las capas de este tipo de dentina se depositan en la cara interna de los túbulos dentinarios, por tanto, el diámetro de los dichos túbulos se hace más pequeño en personas mayores. Esta reducción del diámetro de los túbulos dentinarios, está relacionada con la edad, pero no se ha podido demostrar que su medida constituya un método fiable en el cálculo de la edad dental (Traub, Altini y Hille, 1988; Kvaal, Koppang y Solheim, 1994).

La *dentina secundaria* es una dentina producida gradualmente por los odontoblastos tras la formación completa de la pieza dentaria, este hecho es responsable de la disminución del tamaño de la cavidad pulpar que ocurre con el paso de los años. Como la dentina secundaria es difícil de distinguir de la dentina primaria, la reducción de la cavidad pulpar se ha utilizado como un parámetro indirecto en el cálculo de la edad. Este parámetro sólo puede ser utilizado en combinación con otros en la estimación de la edad dental (Solheim, 1992).

La *reabsorción radicular* y el *incremento de la rugosidad de la superficie radicular* se ha relacionado con los cambios que sufre el diente con el paso de los años, sin embargo, la reabsorción de la raíz tiene una relación muy débil con la edad (Solheim y Kvaal, 1993).

El *grosor del cemento* se incrementa hasta tres veces entre los 16 y 76 años de edad, y por tanto se ha sugerido su utilización como un marcador para el cálculo de la edad, pero existe mucha variación entre los diferentes tipos de piezas y no presenta una correlación muy fuerte con la edad dental (Solheim, 1990).

Las *líneas incrementales del cemento* se encuentran en la mayoría de los mamíferos, incluido los seres humanos. La aposición del cemento tiene lugar en fases, por tanto, se van formando capas que tiene diferentes propiedades ópticas y de tinción cuando se observan al microscopio. Líneas estrechas que se tiñen oscuras con diversos colorantes (las líneas incrementales), se separan unas de otras por unas bandas más anchas y pálidas de cemento. La distancia de una línea a la siguiente en muchos animales representa el incremento que ocurre en un año, y durante tiempo fue un método que se empleaba de manera rutinaria en el cálculo de su edad. Los resultados que se han obtenido en los seres humanos es muy controvertido (Kvaal, Solheim y Bjerketvedt, en prensa).

Existen menos estudios sobre las *propiedades físicas y los componentes inorgánicos* del esmalte y la dentina. Se ha demostrado que el esmalte es menos permeable y más quebradizo con la edad, y las fracturas pueden ocurrir debido a la pérdida de agua que sufre o a la diferencia de elasticidad que existe entre la dentina y el esmalte. La dureza de la dentina parece que aumenta con la edad.

Hay un pequeño cambio relacionado con la edad en el contenido de fósforo del diente (Kosa, Antal y Farkas, 1990), aunque la proporción del Ca/P decrece con la edad en la dentina intertubular no ocurre lo mismo en la dentina peritubular. Además, con el paso de los años hay un aumento en el contenido absoluto de flúor, siendo más evidente en el esmalte. No hay que olvidar que el contenido del flúor en el diente se puede ver influenciado por factores externos como la ingestión de aguas fluoradas o el tratamiento tópico preventivo de flúor (Nakata, Stepnick y Zipkin, 1972).

Por otra parte, aunque el plomo (Bhussry y Emmel, 1955) y el nitrógeno (Wilkinson y Palmer, 1975) aparecen en menor concentración que el flúor, también se incrementan con la edad. De hecho, se ha llevado a cabo un estudio del contenido de plomo en el diente en una población española, reflejándose un aumento en su concentración con la edad, aunque en los adultos de más de 60 años las cifras del contenido de plomo no son mayores que en la de los adultos un poco más jóvenes (Gil y cols., 1994). Por otra parte, la concentración de cobre no cambia con la edad, pero el contenido de carbonato decrece.

Los *cambios fisiológicos que ocurren en la pulpa* con el paso de los años es difícil de distinguir de los cambios patológicos, excepto la reducción de tamaño de la cavidad pulpar que tiene lugar debido a la aposición de dentina secundaria. Además se incluyen otros cambios como el hallazgo de una pérdida del contenido celular con un aumento de las fibras, una reducción del aporte sanguíneo, así como un aumento de la calcificación distrófica (Bernick, 1987).

Los métodos morfológicos para la estimación de la edad dental, estudian estos parámetros dentarios que se modifican con el paso de los años, como la abrasión, la dentina secundaria, la dentina transparente, la aposición de cemento, la reabsorción radicular, el color, etc... El primer método científico para el cálculo de la edad dentaria fue el realizado por Gustafson (1950). A partir de él, han surgido muchos otros métodos que intentan ser más precisos en las mediciones de estos factores y más complejos en sus estudios estadísticos para conseguir mayor exactitud en la estimación de la edad dentaria (Dalitz, 1963; Bang y Ramm, 1970; Johansson, 1971). Tiene especial interés en este campo el método de cálculo de la edad dental desarrollado por el Dr. Solheim de la Universidad de Oslo (Solheim, 1993), presentando novedades en la forma de preparación de la pieza dentaria para su estudio (técnica del medio

diente), además de obtener tras un análisis de regresión múltiple, una fórmula para el cálculo de la edad en cada diente, las cuales están constituidas por aquellos factores que influyen con más fuerza en el cálculo de la edad para ese diente.

En este sentido, se debe destacar la aportación que el prof. Luna ha realizado en este campo. El estudio de los dientes seccionados, por técnicas de análisis de imágenes, ha permitido detectar los cambios morfológicos que sufren las distintas piezas dentarias de una forma más objetiva, suponiendo una contribución de interés al establecimiento de la edad dental del sujeto (López-Nicolás, Canteras y Luna, 1990; López-Nicolás, Morales y Luna, 1993; López-Nicolás, Morales y Luna, 1996).

A pesar de los avances obtenidos, es difícil obviar la subjetividad de estos métodos así como la influencia de la experiencia del ojo observador. Por tanto, aunque constituyen métodos de gran interés en la práctica diaria, sería necesaria la investigación en nuevos campos para evitar dichos obstáculos y de esta manera, se consiguiera una mayor exactitud en la estimación de la edad dentaria.

El análisis de los cambios histológicos del complejo dentino-pulpar pueden aportar datos en el cálculo de la edad. De hecho, como ya se ha expuesto, se ha demostrado una disminución de los elementos celulares de la pulpa, especialmente de los fibrocitos, así como un aumento en la cantidad de fibras de colágeno con el paso de los años (Bernick, 1987; Morse, 1991). Estos datos en ningún momento constituyen un método fiable para el cálculo de la edad a través del estudio dentario. En este punto, es necesario destacar los trabajos realizados para el cálculo de la edad que se basan en el análisis a microscopía electrónica de la dentina y estudian el estrechamiento e incluso obliteración de los túbulos dentinarios que acontecen con

el paso de los años (Garberoglio y Brannstrom, 1976; Traub, Altini y Hille, 1988; Kvaal, Koppang y Solheim, 1994).

En las últimas dos décadas, las investigaciones se han orientado hacia el estudio de los cambios que ocurren en los componentes bioquímicos del diente relacionados con la edad. Fruto de estas investigaciones fue la adaptación de un método que había sido usado para datar dentro de los campos de la geoquímica, geocronología y arqueología (Bada, Kvenvolden y Peterson, 1973): la racemización del ácido aspártico. Todos los aminoácidos que forman parte de las proteínas del organismo, pertenecen a la serie estereoquímica L; presentando actividad óptica debido a la existencia en su molécula de al menos un átomo de carbono asimétrico. En el tejido mineral dentario, con el paso de los años, ocurre un aumento progresivo de las formas D, hasta conseguir una mezcla equimolar de los enantiómeros D y L, constituyendo una forma óptica inactiva. A este proceso se le llama racemización. El aminoácido elegido para tal estudio es el ácido aspártico, debido a que la racemización ocurre de una manera más rápida que en otros aminoácidos.

Los autores Helfman y Bada (1975 y 1976) aplicaron este método para la estimación de la edad dental adaptándolo en el esmalte y dentina humana. La ventaja de la utilización de estos tejidos es que no presentan prácticamente remodelación de sus componentes, y la forma D se acumula en proteínas metabólicamente estables. Posteriormente, este método ha sido utilizado por otros autores (Ogino, Ogino y Nagy, 1985; Ritz, Schutz y Schwarzer, 1990; Ohtani y Yamamoto, 1990; Pfeiffer, Mörnstad y Teivens, 1995). Los resultados de estos trabajos muestran un error en la estimación de la edad de ± 4 años para algunos autores (Ogino, Ogino y Nagy, 1985) y de ± 5.69 años para otros (Ritz, Schutz y Schwarzer, 1990), sin embargo, la edad que estiman en estas investigaciones es la edad dentinaria y no la edad cronológica, basándose para su

cálculo en unos factores de corrección obtenidos previamente para cada diente tras la aplicación de un método morfológico para el cálculo de la edad.

Por todo lo anteriormente expuesto, sería necesario un conocimiento más profundo de los cambios fisiológicos que ocurren en los tejidos dentarios con relación a la edad y la data, y que de esta manera, nos permitieran avanzar en el establecimiento de métodos fiables, precisos y sencillos para estimar la edad dental y el intervalo postmortem de los cadáveres.

II. JUSTIFICACIÓN Y PLAN DE TRABAJO

La investigación forense sobre restos humanos esqueléticos plantea, tal y como ha quedado ampliamente expuesto en la Introducción de esta memoria, una amplia problemática que en algunos supuestos no es de fácil solución. Desde la perspectiva de la odontología forense, y con la finalidad de contribuir a la resolución de estas cuestiones, sería deseable la realización de nuevas investigaciones que permitieran obtener un conocimiento más profundo y exacto de los cambios bioquímicos que se producen en el diente durante la vida del sujeto. También resultaría necesario conocer las modificaciones a las que el diente se ve sometido después de la muerte.

El diente, fundamentalmente por la alta composición mineral que presenta el esmalte y la dentina, es la estructura más resistente del cuerpo humano. De estos dos tejidos, es la dentina el tejido que puede tener, a nuestro entender, un mayor interés forense. Y esto es así por una serie de motivos. De una parte, se encuentra prácticamente aislada del medio externo por estar recubierta de esmalte (tejido formado casi exclusivamente por material cristalino sin apenas materia orgánica). La propia composición mineral de la dentina (aproximadamente un 70%) le confiere a este tejido características de relativa resistencia y estabilidad, pudiéndose mantener con pocas modificaciones incluso después de la muerte. Por otra parte, el alto porcentaje de material orgánico (un 20 % del total de su peso), le convierte en un tejido que eventualmente puede modificarse por el envejecimiento.

Nuestra hipótesis de trabajo se fundamenta, por tanto, en los siguientes extremos:

1. La dentina por su resistencia, estructura y composición bioquímica, es un tejido del que se puede obtener información de interés en la práctica forense.

2. La dentina posee aproximadamente un 20 % de material orgánico. No se conoce con precisión la composición de este compartimento en la especie humana, por lo que resulta imprescindible un conocimiento más profundo de dicha estructura, tanto de la fracción colágena como la no-colágena de la dentina.

3. Por el componente mineralizado de la dentina, ésta debe ser relativamente estable a los procesos autolíticos y putrefactivos del cadáver. Es, por tanto, de interés forense el conocimiento de los cambios a los que se somete la dentina con la data.

4. La dentina es una estructura relativamente estática, que una vez formada prácticamente no se ve sometida a procesos reabsortivos o formativos. No obstante, se encuentra en íntima conexión con el tejido vascular del diente, la pulpa, por lo que los procesos de hipoxia e isquemia que acontecen por el envejecimiento en el tejido pulpar, y por tanto en el diente, pueden traducirse en modificaciones de la matriz extracelular del componente orgánico del tejido conectivo de la dentina.

En consecuencia nuestro plan de trabajo fue el siguiente:

1. Conocer la composición orgánica de la dentina humana y en concreto, describir los patrones protéicos en dicho tejido. Con esta finalidad fue necesaria la puesta a punto de una metodología para la extracción del componente orgánico del tejido dentinario. Tras un fraccionamiento secuencial de las proteínas colágena y no-colágena de la dentina, se procedió a la determinación de las proteínas dentinarias (proteínas con actividad gelatinolítica y proteínas extraídas con EDTA), y de las cadenas no-reducibles del colágeno (deoxipiridinolina).
2. Aplicar esta metodología a las situaciones reales que se presentan en la práctica pericial forense, es decir sobre dientes individuales. En este sentido, nos propusimos estudiar el comportamiento de las distintas fracciones protéicas extraídas de dientes individuales en piezas procedentes de extracciones recientes de sujetos de distintas edades.
3. Aportar un mejor conocimiento sobre los cambios postmortem de la matriz orgánica de la dentina. Se tomaron dientes procedentes de restos esqueletizados de personas que habían fallecido hacía 30 años y que durante ese tiempo estuvieron inhumadas en tierra.
4. Proponer una metodología de trabajo sobre manipulación y tratamiento de tejidos mineralizados que sea de utilidad a la resolución de cuestiones médico-legales cuya problemática radique en dichas estructuras. Problemas como el establecimiento de la edad cronológica del individuo, la data de los restos, o los cambios sufridos por el tejido mineralizado a consecuencia de ciertas agresiones, pueden ser algunos de los temas que puedan beneficiarse de este estudio.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS BIOLÓGICAS

El presente trabajo de investigación se planteó en dos fases, la primera fue necesaria para poner a punto la metodología, tanto en la adecuación de las técnicas a nuestro proyecto, como para establecer si la cantidad de proteínas de las que partíamos hacía viable nuestra investigación. En un paso posterior, se diseñó una serie experimental adaptándonos a las situaciones reales que se nos podían plantear en el campo de la odontología forense, es decir, trabajar a partir de un solo diente humano individualizado.

En todos los casos, seleccionamos dientes humanos obtenidos tras exodoncias realizadas por indicaciones periodontales, ortodónticas, así como por extracciones practicadas en los terceros molares. Rechazamos todas aquellas piezas dentarias que hubieran sufrido patología cariosa o tratamientos conservadores como obturaciones o endodoncias, debido a las alteraciones que pudiera sufrir el tejido dentinario ante estos estímulos externos.

Para la consecución de este trabajo, se usaron exclusivamente como piezas dentarias los molares, siendo la razón de esta elección, el mayor volumen de tejido dentinario que presentan

dichos dientes. Rehusamos cualquier pieza dentaria que estuviera totalmente incluida, así que las piezas estuvieron expuestas al ambiente oral antes de la extracción. Ocho casos de la totalidad de la muestra fueron terceros molares, así que tuvimos en cuenta que estuvieran total o parcialmente erupcionados.

Una vez extraídos los molares, fueron limpiados para eliminar el tejido blando u óseo adherido a la pieza, dejándolos secar a temperatura ambiente. Las piezas se almacenaron hasta su análisis a temperatura ambiente, en bolsas de plástico correctamente identificadas. En todos los casos, el tiempo transcurrido desde la extracción de la pieza hasta el inicio de su estudio fue de seis meses a un año.

a) Puesta a punto de la metodología

Con la finalidad de optimizar el método de extracción de las proteínas dentinarias humanas y las técnicas de determinación de las mismas, fue necesario partir de un *pool* de dientes. Se emplearon un total de nueve piezas dentarias de extracciones recientes eligidas al azar.

Además, se incluyó un segundo grupo constituido por dos tandas de seis dientes procedentes de restos humanos esqueletizados, procedentes de individuos con un rango de edad comprendido entre 22 y 73 años, que habían permanecido inhumados en tierra entre 25 y 30 años en el cementerio de Granada.

b) Serie experimental

Se diseñó una serie experimental con una muestra total de 24 molares procedentes de extracciones dentarias recientes de diferentes individuos. Fueron clasificados en cuatro grupos de edad, constituidos por seis piezas cada uno. El primer grupo (I) estaba formado por personas de edades comprendidas entre 0 y 20 años, el segundo entre 21 y 40 (II), el tercero entre 41 y 60 (III), y el cuarto (IV) los mayores de 61 años. El sexo se distribuyó en nuestra muestra de la siguiente manera; 15 mujeres frente a 9 hombres. La tabla 1 incluye las características de cada una de las muestras que utilizamos en nuestro estudio.

Tabla 1.- Características de las muestras de la serie experimenta

<i>Muestra (n°)</i>	<i>Pieza dentaria</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Grupo edad</i>	<i>Sexo</i>
1	46	15	I	♀
2	46	17	I	♀
3	46	36	II	♂
4	27	40	II	♀
5	27	41	III	♂
6	16	52	III	♀
7	46	61	IV	♂
8	36	61	IV	♂
9	17	52	III	♂
10	48	17	I	♀
11	47	69	IV	♀
12	18	31	II	♂
13	48	20	I	♀
14	28	19	I	♀
15	27	73	IV	♀
16	17	50	III	♀
17	48	36	II	♀
18	16	57	III	♂
19	47	64	IV	♀
20	18	27	II	♂
21	36	56	III	♀
22	36	61	IV	♀
23	48	17	I	♂
24	38	37	II	♀

La nomenclatura utilizada para designar las piezas dentarias es la sugerida por la Federación Dental Internacional (FDI)

METODOLOGÍA

1. PREPARACIÓN DEL TEJIDO DENTINARIO

En nuestra hipótesis de trabajo, partimos del estudio exclusivo de la dentina, para lo cual tuvimos que eliminar mecánicamente el resto de los tejidos dentarios. Por consiguiente, en todas las piezas dentarias se eliminó el esmalte y cemento con turbina y fresas de tallado de diamante, con refrigeración continua, hasta asegurarnos que el tejido que aparecía era la dentina. Para la remoción del tejido pulpar se realizaron las correspondientes aperturas camerales con turbina y fresas cilíndricas o troncocónicas de diamante, siempre bajo refrigeración, así como la limpieza de la cámara pulpar con cucharilla y de los conductos pulpares con fresas de Gates y limas K de endodoncia, arrastrando cualquier remanente de tejido pulpar con chorro de agua y aire a presión.

2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA DENTINA HUMANA

Las proteínas dentinarias humanas fueron extraídas de acuerdo a una combinación de los métodos de Rahima y Veis (1988), y Linde, Bhowm y Butler (1980) descritos para la extracción de proteínas de la dentina bovina y de rata. Además se adaptó la técnica de Nagata y cols., (1991) originalmente desarrollada para la extracción de proteínas óseas.

Las primeras extracciones se realizaron con *pool* de dientes frescos y de restos óseos de manera independiente. Para la extracción de las proteínas dentinarias de la totalidad de la

muestra de nuestra serie experimental, se llevaron a cabo tres extracciones seriadas de ocho dientes cada una, en las que se incluían representantes de todos los grupos de edad. En todos estos casos de dientes individuales, partimos de una cantidad media de tejido dentinario de 1.2 g.

Básicamente, el nuevo método propuesto para la extracción de las proteínas dentinarias consistió en el siguiente procedimiento:

Se colocaron los dientes en bolsas de plástico resistentes y se pulverizaron, hasta conseguir un polvo lo más fino posible, con un martillo metálico sobre una superficie también de metal, previamente ambos enfriados a -20°C . El diente pulverizado fue transferido a un tubo de cristal de 15 ml con tapón de rosca, adecuadamente identificado. Para la eliminación de la sangre y otros restos biológicos, los extractos de dentina pulverizada fueron lavados con 2 ml de una *solución de lavado* de ClNa 2.5 M más *inhibidores de proteasas* (PI) durante 24 horas, bajo agitación magnética constante y en cámara fría (4°C). Tras este día, se decantó cuidadosamente la solución de ClNa y se lavó dos veces el polvo dentinario con agua bidestilada fría.

2a. Primera extracción con solución de guanidina 4M, adicionada de inhibidores de las proteasas.

Se procedió a la extracción de proteínas dentinarias con una *solución de guanidina* con inhibidores de las proteasas, obteniéndose una fracción de proteínas no unidas covalentemente.

Se añadieron 2 ml de esta solución a cada tubo, siempre en cámara fría, bajo agitación magnética constante y durante 4 días, haciendo un cambio de la solución transcurridos los dos primeros días. Los dos sobrenadantes de guanidina recogidos se mezclaron, para posteriormente centrifugarlos a 3,500 r.p.m., durante 10 min.

El sobrenadante fue dializado frente a 2 litros de una *solución de diálisis* a un pH 7.4, con inhibidores de las proteasas, durante un total de 4 días, realizando dos cambios de la solución de diálisis, para finalmente enfrentarlos con agua bidestilada el último día. Se utilizaron membranas de diálisis con un punto de corte de peso molecular (MWCO) de 6,000 a 8,000 Da.

El volumen obtenido tras la diálisis fue anotado y almacenado en tubos eppendorf en alícuotas de 200 µl, los cuales fueron congelados a -20°C hasta su posterior liofilización. De esta manera, se obtuvo la primera fracción de proteínas que se definieron como EXTRACTOS G1.

El residuo de tejido dentinario se lavó tres veces con agua bidestilada fría para eliminar los restos de la solución de guanidina, y se sometió al siguiente paso en la extracción.

2b. Desmineralización con solución de EDTA 0.5 M, pH 7.4, adicionada de inhibidores de las proteasas.

El calcio del tejido dentinario fue quelado con una solución 0.5 M de EDTA, liberándose así las proteínas que se encuentran embebidas en la trama mineral.

Se añadieron 2 ml de la *solución de EDTA* a cada tubo en las mismas condiciones anteriores, es decir, bajo agitación magnética constante y en cámara fría. La extracción duró 12 días, realizando cambios de la solución cada 3 días. En cada cambio se retiraba el sobrenadante y se añadía el mismo volumen de la solución de EDTA. Transcurrido el tiempo referido, el tejido dentinario estaba blando al tacto. Los extractos consecutivos obtenidos de cada muestra (E1, E2, E3 y E4), no fueron mezclados y se centrifugaron independientemente a 3,500 r.p.m durante 10 min.

Los sobrenadantes fueron dializados en cámara fría frente a un *agua de diálisis* adicionada de inhibidores de proteasas durante 9 días, realizando dos cambios, para al final enfrentarlo a agua bidestilada el último día. Las membranas de diálisis utilizadas fueron de las mismas características que en la extracción anterior. El volumen del dializado fue anotado para cada muestra y se distribuyó en alícuotas de 400 μ l, para posteriormente congelarlos y liofilizarlos. De esta forma, se obtuvieron diversos extractos de proteínas que llamamos EXTRACTOS E1, E2, E3 y E4.

2c. Segunda extracción con solución de guanidina 4M, adicionada de inhibidores de las proteasas.

Los residuos de dentina fueron lavados de nuevo tres veces con agua bidestilada fría, tras lo que se añadieron 2 ml de la *solución de guanidina* a cada tubo. Se continuó bajo agitación magnética constante y en cámara fría. La extracción se mantuvo en estas condiciones durante 3 días.

Tanto el proceso de diálisis, como la centrifugación, el fraccionamiento en alícuotas y la liofilización, se realizaron en las mismas condiciones que en la primera extracción con guanidina.

Al finalizar este proceso, se obtuvo la tercera fracción de proteínas a los que se llamó EXTRACTOS G2.

En la figura 2 se resume el procedimiento de extracción de las proteínas de la dentina humana seguido en este trabajo. Los liofilizados de los extractos se almacenaron separados en varios alícuotas y almacenados a -20°C hasta su análisis posterior. Para una mayor claridad, en las figuras 3 a 5 se esquematizan las determinaciones realizadas en cada uno de los extractos proteicos.

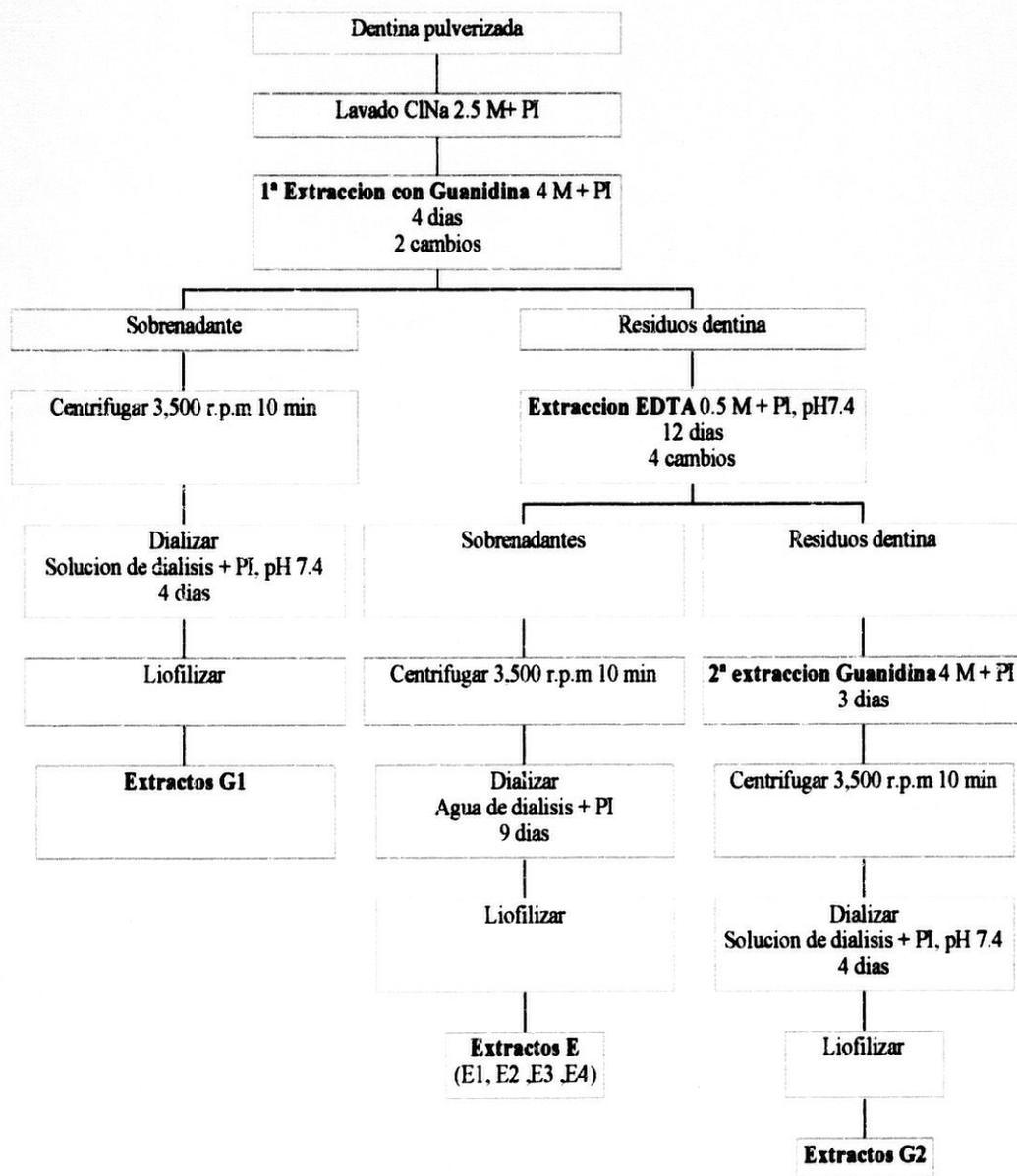


Fig. 2.- Resumen del procedimiento de extracción de las proteínas dentinarias humanas

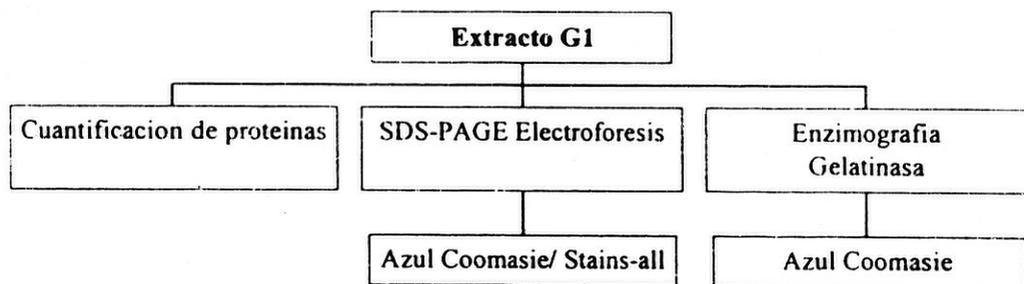


Figura 3.- Determinaciones realizadas en los extractos G1.

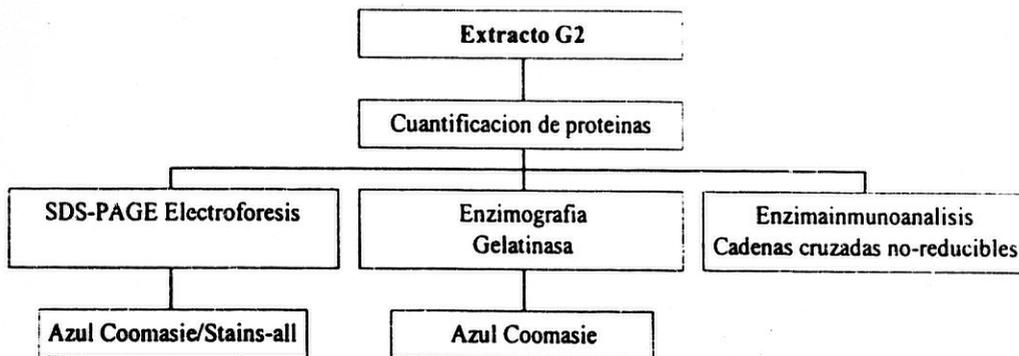


Figura 4.- Determinaciones realizadas en los extractos G2.

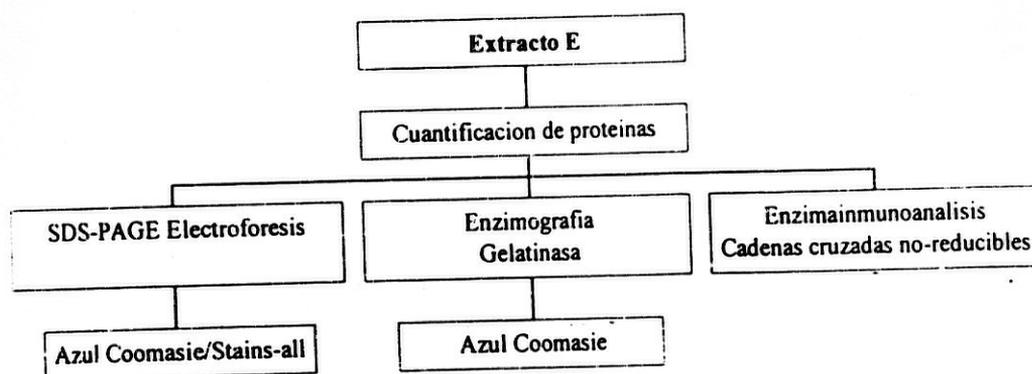


Figura 5.- Determinaciones realizadas en los extractos E.

Reactivos y materiales

Inhibidores de las proteasas (PI). Las concentraciones de los inhibidores de las proteasas fueron idénticas en todas las soluciones.

Reactivo o material	Concentración	Fabricante	Nº catálogo
Benzamidina	2.5 mM	Sigma	B-6506
Acido ϵ -amino-caproico	50 mM	Sigma	A-2504
N- etil-maleimida	0.5 mM	Sigma	E-3875
PMSF*	0.3 mM	Sigma	P-7626

*La concentración deseada de PMSF (Fenil metil sulfonil fluoruro) se consiguió añadiendo el volumen adecuado de una solución madre de PMSF de preparación extemporánea (solución madre: 0.1742 g en 10 ml de 2-propanol).

Solución de lavado ClNa 2.5 M con inhibidores de las proteasas

Reactivo o material	Concentración	Fabricante	Nº catálogo
ClNa	2,5 M	Merck p.a	K20860504
PI			

Solución de guanidina HCl 4 M con inhibidores de las proteasas

Reactivo o material	Concentración	Fabricante	Nº catálogo
Guanidina HCl	4 M	Sigma	G-4505
Trizma base	65 mM	Sigma	T-1503
PI			

Solución EDTA 0.5 M, pH 7.4, con inhibidores de las proteasas

Reactivo o material	Concentración	Fabricante	Nº catálogo
EDTA sal tetrasódica	0,5 M	Sigma	ED-4SS
PI			

Solución de diálisis, pH 7.4

Reactivo o material	Concentración	Fabricante	Nº catálogo
Trizma base	50 mM	Sigma	T-1503
PI			
Membrana diálisis Spectra/Por®1		Serva	A-44171

El agua de diálisis para los extractos de EDTA se preparó igual que la solución de diálisis pero sin incluir el Tris base.

3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTÉICO DE LOS EXTRACTOS

Para la determinación del contenido protéico de los diferentes extractos de cada muestra (G1, E1, E2, E3 y G2), empleamos el método de Lowry y cols. (1951). Utilizamos una curva patrón de albúmina sérica bovina, para la cual, realizamos una solución madre de 500 µg/ml en agua bidestilada y a partir de ella se prepararon soluciones de 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200 y 300 µg/ml.

Para ajustar dicho método a nuestras necesidades, partimos de volúmenes de 400 μ l tanto de estándares como de las muestras, así que tuvimos que añadir en los intervalos de tiempos establecidos 2 ml de la solución alcalina de cobre y 200 μ l de reactivo de fenoles. A los veinte minutos de esta última adición se llevó a cabo la lectura espectrofotométrica a 630 nm.

Con los resultados obtenidos en las distintas concentraciones de la solución estándar, se construye una curva patrón de albúmina, representando en el eje de ordenadas los incrementos de las densidades ópticas a 630 nm y en abscisas las concentraciones protéicas (μ g/ml) correspondientes. Para mayor exactitud en la construcción de la curva patrón se empleó el método de ajuste por mínimos cuadrados. La ecuación de la recta se utilizó sustituyendo en ella el valor de densidad óptica obtenida.

Reactivos y materiales

Solución alcalina de cobre (Solución de CO_3Na_2 /Solución de SO_4Cu ; 50/1)

Solución de CO_3Na_2

Reactivo o material	Peso-volumen
CO_3Na_2	20 g
NaOH	4 g
Agua bidestilada	c.s.p. 1 litro

Solución de SO₄Cu

Reactivo o material	Peso-volumen
Tartrato sódico. 2H ₂ O	1 g
SO ₄ Cu. 5H ₂ O	0.5 g
Agua bidestilada	c.s.p. 100 ml

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck p.a.). Se prepara diluyendo el reactivo en agua bidestilada en una proporción 1/1.

4. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DENTINARIAS HUMANAS

4a. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE electroforesis)

Para la separación de las proteínas dentinarias, se utilizó un sistema de electroforesis de desarrollo vertical con geles de poliacrilamida, siguiendo el procedimiento clásico de Laemmli (1970). Dichos geles fueron realizados en dos fases, primero se preparó el *gel de separación* con poliacrilamida al 10%. Para su elaboración, se partió de una *solución madre de acrilamida/bisacrilamida*, adicionado de un *buffer Tris pH 8.8*, y de las cantidades adecuadas de glicerol y SDS. La polimerización química del gel se consiguió con una solución de persulfato de amonio al 10% y con el reactivo TEMED. Para preservar de oxígeno al ambiente de polimerización, se añadió una capa de una *solución saturada de butanol* en la parte superior del gel. Transcurrido el tiempo de polimerización del gel, aproximadamente 45 min, se preparó

el *stacking gel* con poliacrilamida al 4%. En este caso, el gel se elaboró a partir de la misma solución madre de acrilamida/bisacrilamida, con un *buffer Tris pH 6.8*, glicerol y SDS. Además, se tuvo la precaución de añadir a los componentes una cantidad adecuada de azul de bromofenol para poder visualizar los pocillos y facilitar el proceso de aplicación de las muestras.

El tamaño completo de los geles era de 8.0 cm de ancho, 7.3 cm de alto y un grosor de 0.75 mm, conteniendo un total de 10 pocillos con una capacidad máxima de 27 μ l cada uno.

Las condiciones de las electroforesis fueron las siguientes: el voltaje constante, 100 volt. durante aproximadamente 20 min, es decir, hasta que se veía que el frente de proteínas había sobrepasado el *stacking gel*, para posteriormente aumentar el voltaje a 150 volt. hasta el final del desarrollo de la electroforesis. El tiempo total de duración de la electroforesis osciló entre 1 hora y hora y media.

Las muestras liofilizadas de los distintos extractos fueron resuspendidas en *buffer de muestra* según el procedimiento de Laemmli (1970), hasta conseguir la misma concentración de proteínas en cada una de ellas. Los geles se desarrollaron tras la aplicación de un rango de proteínas por muestra que osciló entre 30 y 60 μ g para los extractos de guanidina y de EDTA. Paralelamente a las muestras problemas, y con la finalidad de estimar el peso molecular de las proteínas presentes en las muestras, se colocó en cada gel estándares de proteínas de pesos moleculares conocidos. Los marcadores de peso molecular usados fueron: la miosina de músculo de conejo (205 kDa), la β -galactosidasa del *E. Coli* (116 kDa), la fosforilasa b de músculo de conejo (97 kDa), la albúmina bovina (66 kDa), la ovoalbúmina (45 kDa) y la anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa) (Sigma, SDS-6H).

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la fijación de las proteínas con una *solución fijadora* durante al menos 15 min, para posteriormente visualizarlas por un procedimiento de tinción con colorantes. Se utilizó una técnica de tinción mixta, comenzando con una tinción clásica con azul Coomassie, para posteriormente continuar con una tinción con stains-all (Green, Patewka y Peacock, 1973; Termine y cols., 1980). El hecho de elegir este último tipo de tinción es debido a la mayor afinidad de esta mezcla de colorantes, los stains-all, por los grupos ácidos de las proteínas, tiñéndose dichas proteínas de un color azul, frente al rojo púrpura del resto de las proteínas. De esta manera, los geles fueron teñidos en primer lugar con una *solución de azul Coomassie* durante 2 h. Tras esta tinción, se sumergieron en una *solución desteñidora* durante 10 a 20 min. Llegados a este punto, el proceso se continuó con la técnica de tinción stains-all. Las proteínas se volvieron a fijar con una solución de alcohol isopropílico al 25%, durante 45 min, realizando tres cambios de la solución durante este tiempo. Después fueron teñidos con una *solución de stains-all*, durante al menos 8 h en oscuridad. Los geles se destiñeron con agua bidestilada, durante 2 h aproximadamente. Posteriormente, se sumergieron en una solución de *desechado del gel* y se conservaron envueltos en papel celofán transparente sobre un soporte de cristal hasta su completa desecación.

Reactivos y materiales

Sistema de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad, nº catálogo 165-2991).

Elaboración del gel de separación:

Solución madre 30% acrilamida / 0.8% bisacrilamida (30% T; 2.62% C)

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Acrilamida	29.2 g	Bio-Rad	161-0100
Bisacrilamida	0.8 g	Bio-Rad	161-0201
Agua bidestilada	c.s.p. 100 ml		

La solución se filtra y se almacena en oscuridad a 4°C

Buffer del gel de separación [4x], Tris 1.5 M, pH 8.8

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Trizma base	18.15 g	Sigma	T-1503
Agua bidestilada	c.s.p. 100 ml		
Glicerol al 10%	4 ml	Panreac	131339
SDS al 10%	4 ml	Bio-Rad	127165A

Gel de separación (para un total de 13 geles)

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Solución madre acrilamida/bis	20 ml		
Buffer gel de separación [4x]	15 ml		
SDS al 10%	600 µl	Bio-Rad	127165A
Agua bidestilada	c.s.p. 60 ml		
Persulfato de amonio al 10%*	450 µl	Bio-Rad	161-0700
TEMED	15 µl	Bio-Rad	161-0801

* La solución de persulfato de amonio al 10% en agua bidestilada es de preparación extemporánea.

Solución saturada de butanol

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
N-butanol	50 ml	Panreac	211082
Agua bidestilada	5 ml		

Preparación del stacking gel:

Buffer del stacking gel [4x], Tris 0.5 M, pH 6.8

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Trizma base	6.1 g	Merck p.a	T-1513
Agua bidestilada	c.s.p. 100 ml		

Solución madre del stacking gel

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Solución madre acrilamida/bis	13.3 ml		
Buffer del stacking gel [4x]	25 ml		
Glicerol al 10%	1 ml	Panreac	131339
Solución madre azul bromofenol*	0.5 ml	Sigma	B-8026
Agua bidestilada	c.s.p. 98.25 ml		

* Solución madre de azul de bromofenol 0.5% en etanol al 10%.

La solución madre del stacking gel se almacena en oscuridad a 4°C.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

Solución saturada de butanol

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
N-butanol	50 ml	Panreac	211082
Agua bidestilada	5 ml		

Preparación del stacking gel:

Buffer del stacking gel [4x], Tris 0.5 M, pH 6.8

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Trizma base	6.1 g	Merck p.a	T-1513
Agua bidestilada	c.s.p. 100 ml		

Solución madre del stacking gel

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Solución madre acrilamida/bis	13.3 ml		
Buffer del stacking gel [4x]	25 ml		
Glicerol al 10%	1 ml	Panreac	131339
Solución madre azul bromofenol*	0.5 ml	Sigma	B-8026
Agua bidestilada	c.s.p. 98.25 ml		

* Solución madre de azul de bromofenol 0.5% en etanol al 10%.

La solución madre del stacking gel se almacena en oscuridad a 4°C.

Stacking gel (para un total de 13 geles)

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
SDS al 10%	400 µl	Bio-Rad	127165A
Solución madre stacking gel	40 ml		
Persulfato de amonio al 10%*	248 µl	Bio-Rad	161-0700
TEMED	32 µl	Bio-Rad	161-0801

* La solución de persulfato de amonio al 10% en agua bidestilada es de preparación extemporánea.

Preparación de los reactivos para el desarrollo electroforético:

Buffer de desarrollo electroforético [10x], pH 8.4

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Trizma base	30.2 g	Sigma	T-1503
Glicina	144 g	Sigma	G-7126
SDS	10 g	Bio-Rad	127165A
Agua bidestilada	c.s.p 1 litro		

Buffer de muestra

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Buffer Tris 0.5 M pH 6.8	1 ml		
SDS al 10%	1.6 ml	Bio-Rad	127165A
Glicerol	0.8 ml	Panreac	131339
Solución madre azul bromofenol	0.2 ml		
Agua bidestilada	4.4 ml		

Preparación de los reactivos para la tinción de los geles:

Solución fijadora

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Metanol	450 ml	Panreac	211091
Acido acético	100 ml	Panreac	211008
Agua bidestilada	c.s.ps 1 litro		

Solución de tinción con azul Coomasie

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Solución madre azul Coomasie*	62.5 ml	Merck	12553
Metanol	250 ml	Panreac	211091
Acido acético	50 ml	Panreac	211008
Agua bidestilada	c.s.ps 500 ml		

* La solución madre de azul Coomasie se preparó con azul Coomasie R-250 al 1%, agitándolo y filtrándolo.

Solución desteñidora

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Metanol	50 ml	Panreac	211091
Acido acético	75 ml	Panreac	211008
Agua bidestilada	c.s.ps 1 litro		

Solución de stains-all

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	N° catálogo
Alcohol isopropílico	50 ml	Probus	016220
Formamida	20 ml	Fisher	F-82
Tris-HCl, 3 M, pH 8.8	1 ml		
Stains-all	25 mg	Sigma	E-9379
Agua bidestilada	c.s.p 200 ml		

Solución de desecado del gel

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	N° catálogo
Metanol	250 ml	Panreac	211091
Glicerol	100 ml	Panreac	131339
Agua bidestilada	c.s.p 1 litro		

4b. Enzimografía

Para la determinación de la gelatinasa se ha empleado una técnica de separación de proteínas por electroforesis en combinación con una enzimografía (Overall y Limeback, 1988). La electroforesis se desarrolló en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero el *gel de separación* de poliacrilamida al 10% contenía 125 µg/ml de colágena tipo I desnaturalizada (gelatina). Por tanto, se introdujo en el gel el sustrato sobre el que actúa la enzima, de tal manera que se separaron las proteínas no sólo por su carga eléctrica y peso molecular, sino también por su actividad específica hacia el sustrato.

En cada gel se incluyeron muestras de estándares de la gelatinasa de 72 kDa, en su forma latente (66 kDa) y forma activada (59 kDa), obtenidos a partir de medios de cultivo de células de osteosarcoma de rata estimulados con 20 µg/ml de concanavalina A. Los estándares fueron suministrados por el Dr. Christopher Overall de la Universidad de la Columbia Británica (Vancouver, Canadá).

Tras el desarrollo electroforético, los geles se procesaron de acuerdo a la metodología descrita por Overall y Limeback (1988), tal y como se describe a continuación:

- 1.- Equilibrado de los geles con una solución de Tritón X-100 al 5% (v/v).

- 2.- Lavado de los geles (dos veces, durante 10 min cada una) en una solución de Tritón X-100 al 5% para eliminar el SDS.

- 3.- Incubación en *buffer de ensayo* de la enzima durante 20 h a 37°C.

- 4.- Tinción con azul Coomassie.

Una vez finalizado el proceso de incubación, las zonas de actividad gelatinolítica se visualizaron siguiendo el procedimiento clásico de tinción con azul Coomassie. Las proteínas se fijaron en la solución fijadora descrita previamente. Los geles se tiñeron con la solución de azul Coomassie durante 2 h, para posteriormente desteñirlos en la solución desteñidora hasta que aparecían las bandas claras correspondientes a las zonas de las proteínas con actividad gelatinolítica. El último paso consistió en colocar los geles en la solución de desecado del gel, para finalmente conservarlos de la forma especificada anteriormente.

Reactivos y materiales

Gel de separación (para un total de 13 geles)

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Solución madre acrilamida/bis	20 ml		
Buffer gel de separación [4x]	15 ml		
Gelatina al 1%	600 µl	Sigma	G-8150
SDS al 10%	600 µl	Bio-Rad	127165A
Agua bidestilada	c.s.p. 60 ml		
Persulfato de amonio al 10%	450 µl	Bio-Rad	161-700
TEMED	15 µl	Bio-Rad	161-0801

Buffer de ensayo [10x], pH 7.4

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Trizma base	60.6 g	Sigma	T-1503
NaCl	116.8 g	Merck p.a	106404
CaCl ₂	7.35 g	Merck p.a	102382
NaN ₃	2.0 g	Merck p.a	106688
Brij 35	16.6 ml	Sigma	430AG-6
Agua bidestilada	c.s.p. 1 litro		

4c. Determinación cuantitativa de las cadenas de piridinolina del colágeno

Hidrólisis enzimática del colágeno de la dentina humana

Para la determinación de las cadenas cruzadas del colágeno dentinario, es necesario en primer lugar, romper sus uniones con la trama mineral. Por lo tanto, debe ser analizado en extractos dentinarios en los que al menos se haya demineralizado el tejido, es decir en los extractos E y G2. En estos extractos se encuentra presente el colágeno en su forma insoluble, por lo que es imprescindible una hidrólisis de la molécula para su solubilización. Se adaptó el procedimiento de extracción del colágeno dentinario descrito por Kuboki y cols., (1993), realizándose una hidrólisis de la molécula a través de una digestión enzimática con tripsina.

El procedimiento de hidrólisis al que se sometieron los liofilizados de los extractos E y G2 fue el siguiente:

- 1.- Resuspensión de los alícuotas E y G2 en 50 μ l de *buffer Tris-HCl 0.05 M*, *adicionado de CaCl₂ 0.01M, pH 7.5*. El CaCl₂ permite eliminar las fosfoproteínas unidas al colágeno, al producir una precipitación selectiva de las fosfoproteínas con el ión calcio.
- 2.- Posteriormente, se calentaron las muestras en un baño a 60°C, en agitación, durante 1 h. Transcurrido este tiempo se enfriaron los extractos a temperatura ambiente.
- 3.- Primera digestión con tripsina. Se agrega a cada muestra un volumen adecuado de una *solución madre de tripsina*, hasta conseguir una concentración final del 25% de tripsina en relación a la concentración de proteínas de cada una. Las muestras, así preparadas, se

mantuvieron durante 15 h a 37°C.

4.- Transcurrido este tiempo, las muestras se volvieron a calentar en un baño a 60°C, durante 15 min, dejándolas enfriar posteriormente, a temperatura ambiente.

El proceso de calentamiento de las muestras antes y después de la digestión con tripsina aumenta la cantidad de colágeno soluble.

5.- Segunda digestión con tripsina. Tras adicionar en las muestras un volumen adecuado de tripsina (concentración final del 25% en relación a la cantidad de proteínas), se mantuvieron a 37°C, durante 3 h.

6.- Liofilización de las muestras.

Cuantificación de la deoxipiridinolina.

Una vez solubilizado el colágeno de los extractos, procedimos a la determinación de las cadenas cruzadas no-reducibles por un método de enzima inmunoanálisis. Se empleó un sistema de determinación de piridinolinas comercialmente disponible para la determinación de estos compuestos en orina humana (*Pyrilinks Kit Metra Biosystems Inc.*). Fue necesario adaptar el enzima inmunoanálisis al tipo de muestra que teníamos, es decir, extractos de proteínas de dientes y, sobre todo, a la baja concentración de proteínas a la que trabajábamos al partir de un solo diente.

De las cadenas cruzadas no-reducibles, piridinolina y deoxipiridinolina, la primera aparece en mayor cantidad, pero es la deoxipiridinolina la cadena cruzada no-reducible específica del hueso y la dentina. El sistema empleado es específico para la cuantificación de la deoxipiridinolina ya que utiliza un anticuerpo específico frente a la deoxipiridinolina humana, además de estándares y controles de deoxipiridinolina purificados a partir de orina humana. El anticuerpo se encuentra inmovilizado en cada pocillo. Las cadenas cruzadas no-reducibles, y presuntamente presentes en las muestras, también son añadidas al pocillo. Al mismo tiempo, se agrega una enzima (fosfatasa alcalina), conjugada a una molécula de deoxipiridinolina. Este último complejo compite con las cadenas de deoxipiridinolinas existentes en las muestras por su unión con el anticuerpo. La reacción antígeno-anticuerpo se puede visualizar al añadir un cromógeno sustrato de la fosfatasa alcalina, el p-nitrofenilfosfato, que genera un color amarillo, el cual puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 m.

Esquemáticamente, el procedimiento seguido para la determinación fue el siguiente:

- 1.- Dilución de los estándares y controles en buffer de ensayo (1/10), añadiendo 50 μ l de estas soluciones en los pocillos de la placa de enzima inmunoanálisis.
- 2.- Resuspensión de las muestras hidrolizadas y liofilizadas en 50 μ l de buffer de ensayo, y colocación en sus respectivos pocillos.
- 3.- Adicionar 100 μ l de la enzima conjugada en todos los pocillos. Las muestras se incuban durante 2h, en la oscuridad, a una temperatura de 2-8 °C.
- 4.- Transcurrido este tiempo, se vacían los pocillos y se lavan, añadiendo 300 μ l de buffer de

lavado a cada pocillo. Esta operación se repitió hasta un total de tres veces. Por último, se secaron en papel de toalla, volcándolos vigorosamente tras el último lavado.

5.- Añadir 150 μ l de la solución de cromógeno en cada pocillo, manteniéndose en incubación durante 1 h a temperatura ambiente.

6.- Una vez finalizado este tiempo, se para la reacción con 150 μ l de una solución 1 N de NaOH. Esta solución se adiciona con el mismo orden y a intervalos de tiempo similares que cuando se añadió el cromógeno.

7.- En los primeros 15 minutos, tras añadirle la solución anterior, se leyó la densidad óptica a 405 nm, empleando un sistema automatizado de lectura de placas de ELISA (Metertech 960).

A partir de las concentraciones de deoxipiridinolina de los estándares, y de sus respectivas densidades ópticas, se construyó una curva patrón. Se empleó para su ajuste el método de ajuste por cuatro puntos. La cantidad de deoxipiridinolina expresada en μ g, se obtuvo al sustituir las densidades ópticas obtenidas para cada muestra, en la ecuación de la recta. Mayores absorbancias se corresponden con menores concentraciones de deoxipiridinolina en las muestras.

Reactivos y materiales

Buffer Tris-HCl 0.05 M/ CaCl₂ 0.01 M, pH 7.5

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	N° catálogo
Trizma base	0.6 g	Sigma	T-1503
CaCl ₂	0.11 g	Merck p.a	102382
Agua bidestilada	c.s.p 100 ml		

Solución madre de tripsina

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	N° catálogo
Tripsina	0.001 g	Fluka	93630
Buffer Tris-HCl 0.05 M *	5 ml		

*Se empleó el mismo buffer que la solución anterior excepto el CaCl₂

**5. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS
EDTA**

5a. Cromatografía en columna de intercambio iónico

En un intento de conseguir en nuestro trabajo una caracterización parcial de las proteínas existentes en los extractos obtenidos tras la desmineralización, se procedió a la puesta a punto de una técnica de purificación de proteínas en cromatografía de intercambio iónico en columna,

así como al análisis posterior de las fracciones obtenidas. Se ha seguido el procedimiento original de Butler y cols (1981), con algunas modificaciones.

Dos tipos de muestras se sometieron al proceso de purificación, la primera estaba constituida por un *pool* de nueve dientes de extracciones recientes, y la segunda, por un *pool* de dientes de restos óseos de una población contemporánea. En ambos casos se partió de una cantidad suficiente de proteínas, que osciló entre 6 y 8 mg.

Las muestras fueron cromatografiadas a 4 °C en una columna C 16/20 (Pharmacia), rellena de DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia, nº catálogo 17-0710-01), la cual fue equilibrada con un *buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4*. Las muestras fueron resuspendidas en 2 ml de ese mismo buffer y entonces aplicadas a la columna. Para la elución de las proteínas, y tras varias pruebas, se utilizó el mismo buffer con un *gradiente lineal de 0.4 a 0.8 M de ClNa*, pasándose por la columna un volumen total de 200 ml. La elución se desarrolló con una velocidad de flujo de 30 ml/h, recogándose fracciones cada 6 min, con lo que se consiguió un volumen aproximado de 3 ml/tubo. El volumen eluido se monitorizó espectrofotométricamente a 280 nm (Monitor UV-1 Pharmacia-LKB).

Las fracciones de los elutos correspondientes a los picos obtenidos en el cromatograma, fueron dializados en tubos de diálisis, frente a agua bidestilada, durante 24 h, en cámara fría y realizando varios cambios del agua durante este tiempo.

Los dializados fueron recogidos y congelados en tubos eppendorf en alícuotas de 1.5 ml, para su posterior liofilización.

Reactivos y materiales

Buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Trizma base	2.4 g	Sigma	T-1503
Agua bidestilada	c.s.p 1 litro		

Solución 0.4 M CINA en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
CINa	2.34 g	Merck p.a	106404
Buffer Tris-HCl 20 mM*	c.s.p. 100 ml		

*Corresponde con el buffer de la solución anterior

Solución 0.8 M CINA en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
CINa	11.7 g	Merck p.a	106404
Buffer Tris-HCl 20 mM*	c.s.p. 100 ml		

*Corresponde con el buffer de la solución anterior

5b. SDS-PAGE electroforesis

Las fracciones proteicas fueron sometidas a una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Las características de los geles y las condiciones de la electroforesis fueron las mismas que las descritas con anterioridad. Para la visualización de las proteínas se emplearon las técnicas de tinción con azul Coomasie y stains-all.

5c. Inmunolectroforesis

Finalmente, cantidades suficientes de proteínas de muestras de los extractos E se sometieron a una inmunolectroforesis. Este tipo de prueba inmunológica combina las posibilidades de la electroforesis, al separar las distintas proteínas de una mezcla, y la difusión de las mismas en un gel de agarosa. En este caso las proteínas separadas tras la electroforesis se enfrentaron a un antisuero humano total para poder obtener conclusiones sobre la identidad sérica o no de las proteínas presentes en los extractos. En cualquier caso, alícuotas proteicas de extractos G fueron sometidos igualmente al ensayo.

La inmunolectroforesis se realizó en *geles de agarosa* al 0.8 % en el mismo *buffer de electroforesis TBE* que se empleó para su desarrollo. Las proporciones de los geles que se utilizaron eran de una longitud de 10 cm, una anchura de 7 cm y un grosor aproximado de 0.7 cm. Mediante el uso de un dispositivo especialmente diseñado al efecto, se realizaron los pocillos para la aplicación de las muestras y las ranuras requeridas para la colocación posterior del anticuerpo. Junto a muestras de extractos de dentina se desarrollaron muestras de suero humano que sirvieron de control. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema de desarrollo

para geles sumergidos (*Pharmacia GNA-100*) y se realizó a voltaje constante (150 v) durante un tiempo aproximado de 1 hora. Tras la finalización de la electroforesis, se colocó el anticuerpo, antisuero humano total (*Kallestad*, referencia nº 201), en cada una de las ranuras, dejándolo en cámara húmeda y temperatura ambiente el tiempo necesario para permitir la completa difusión y precipitación de las proteínas. El tiempo fue variable, haciéndose lecturas de las bandas de precipitación a distintos tiempos (6, 12, 24 h), hasta un máximo de 36 h. Los geles se lavaron abundantemente con solución salina para eliminar el exceso de proteínas y en concreto aquellas que no hubieran participado en la reacción antígeno-anticuerpo. Finalmente, los geles se colorearon con azul Coomassie y se destiñeron de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente en otro apartado de este mismo capítulo.

Reactivos y materiales

Buffer de electroforesis TBE, Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Trizma base	10.7 g	Sigma	T-1503
Ácido Bórico	5.5 g	Merck	165.1000
EDTA disódico dihidrato	0.07 g	Merck	372.24
Agua bidestilada	c.s.p 1 litro		

Agarosa 0.8%

Reactivo o material	Peso-volumen	Fabricante	Nº catálogo
Agarosa	0.8 g	Serva	11404
Buffer TBE	100 ml		

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos se sometieron a estudio estadístico. Los detalles de los distintos tratamientos estadísticos se encuentran compilados en Martín y Luna (1989).

Se utilizaron técnicas de regresión lineal para estudiar el grado de dependencia entre variables. Para la comparación de las medias entre sujetos de los distintos grupos de edad se realizaron análisis de la varianza (ANOVA I) y las comparaciones posteriores por parejas mediante el test de Tukey. Cuando fue necesario se estimó la sensibilidad y la especificidad de los métodos.

IV. RESULTADOS

1. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA DENTINA HUMANA

Siguiendo las técnicas descritas en el apartado de material y métodos, se procedió a la extracción de las proteínas de la dentina humana de dientes individuales procedentes de exodoncias recientes. En la tabla 2 se resumen las concentraciones medias de proteínas obtenidas en los distintos extractos o fracciones proteicas (extractos G1, G2 y E), así como los porcentajes de las proteínas extraídas en cada uno de los extractos calculados en relación al peso medio de dentina. Los cálculos se han hecho asumiendo el siguiente razonamiento: a) la media del peso de la dentina en todas las muestras fue de 1.2 g; b) aproximadamente el 20 % de ese peso corresponde a materia orgánica ; y c) prácticamente toda la materia orgánica de la dentina son proteínas. Por tanto, por término medio se partió de 0.24 g de proteínas de dentina y este valor se consideró el 100%.

Tabla 2.- Concentración de proteínas en μg ($\bar{x} \pm \text{DE}$) (n= 24) y porcentajes medios (%) de extracción en relación al total de proteínas dentinarias de partida (valor medio = 0.24 g), en los distintos extractos de la dentina humana.

Extracto	Concentración de proteínas	Porcentaje medio
G 1	724 \pm 170	23.3
E (E1 + E2+E3)	1610 \pm 549	53.6
G 2	657 \pm 315	23.1

Parecía interesante conocer si existía o no relación entre el peso de dentina de partida y la concentración de proteínas extraídas en cada uno de los extractos. Para ello se relacionaron estas variables entre sí (peso dentina / concentración de proteínas extraídas) empleando un análisis de regresión lineal. No se encontró una relación significativa entre la concentración de proteínas en los extractos G (G1 y G2) y el peso de la dentina. Sin embargo cuando se enfrentaron las variables concentración total de proteínas en el extracto E (variable x), y el peso de la dentina en gramos (variable y), se pudo comprobar que dichas variables se relacionaban significativamente entre sí, ajustándose a un modelo matemático lineal, cuya ecuación de la recta era $y = 0.7518 + 0.00003x$; y $r = 0.5974$ ($t_{\text{exp}} = 3.49$; 22 g.l., $p \leq 0.01$).

2. PATRONES DE LAS PROTEÍNAS DE LA DENTINA HUMANA

2a. Dientes procedentes de exodoncias recientes.

Una de las finalidades del presente trabajo era aportar datos sobre un mejor conocimiento de la composición proteica de la dentina humana. Nos propusimos separar las distintas proteínas de los extractos de la dentina humana en dientes procedentes de exodoncias recientes, empleando para ello un sistema convencional de separación de proteínas por electroforesis.

Los extractos de guanidina (G1 y G2) y los extractos de EDTA (E) se sometieron a desarrollos electroforéticos, en geles de poliacrilamida al 10 %, en las condiciones descritas con detalle en el apartado de material y métodos. Además, en todos los casos, se realizó una enzimografía de cada muestra adicionando los geles con gelatina, para así poder detectar la actividad gelatinolítica de las proteínas.

La figura 6 muestra los resultados encontrados tras el desarrollo electroforético de un gel de poliacrilamida en el que se analizaron las proteínas obtenidas en la primera fracción de los extractos EDTA (E1) de algunas de las muestras elegidas al azar. Tal y como se observa en dicha figura, destaca la presencia de una banda única de mayor intensidad en todas las muestras analizadas, a excepción de las muestras número 11 (calle 6). El peso molecular de esta proteína, estimado a partir de la migración electroforética de una mezcla de proteínas de peso moleculares conocidos (estándars de peso molecular), fue aproximadamente de 60 kDa. Tan sólo en una de las muestras (la número 12) se dibuja además una banda en el tercio superior del gel que puede corresponder a una proteína de mayor peso molecular (aproximadamente 205 kDa).

Igualmente se analizaron las diferencias entre las proteínas obtenidas tras la primera extracción con guanidina (G1) y la segunda extracción (G2) para cada pieza dentaria individual (Figura 7). En este caso, y a título de ejemplo, se muestran los resultados de dos muestras individuales (números 1 y 11) elegidas entre el total de la muestra en base a que los patrones protéicos que presentaban los extractos E de una y otra muestra eran diferentes entre sí. De hecho, mientras que en la muestra número 1 se detectó la banda de mayor intensidad a 60 kDa (como se comprobó en la figura 6), no ocurrió lo mismo con la muestra número 11, en la que no se detectó ninguna proteína en los extractos E. Los resultados obtenidos en los extractos G1 permiten apreciar la presencia de una proteína también de peso molecular aproximado de 60 kDa (Figura 7). Sin embargo, los extractos G2, obtenidos tras la desmineralización de la pieza, no presentan dicha proteína.

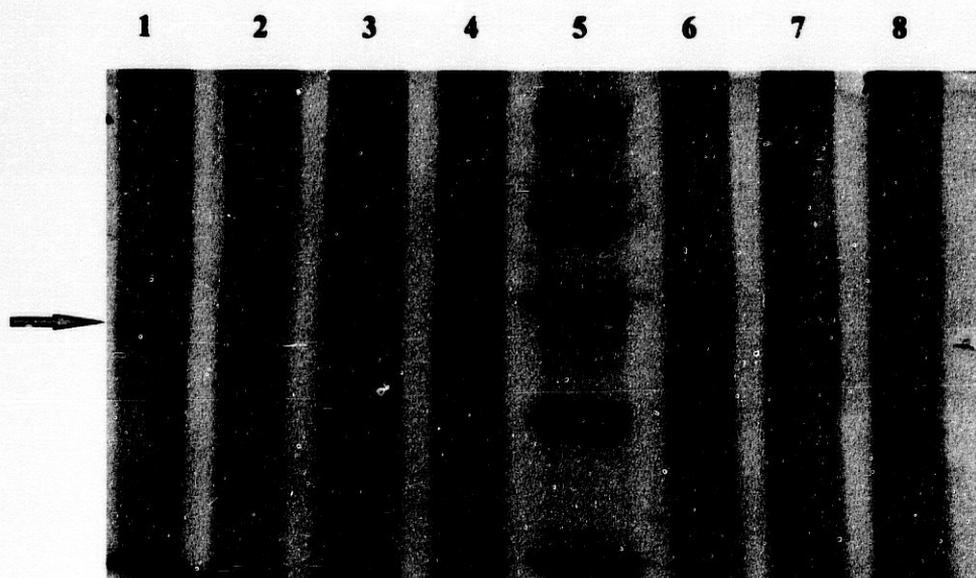


Figura 6.- SDS-PAGE electroforesis de los primeros alícuotas recogidos de los extractos EDTA (E1) de dientes individuales de exodoncias recientes. Los extractos E1 de las muestras n° 1, 10, 3 y 12 se desarrollaron en las calles 1, 2, 3 y 4 respectivamente; las muestras n° 11, 19 y 5 en las calles 6, 7 y 8. La calle 5 corresponde a los estándares de peso molecular. Las concentraciones de proteínas de los extractos E1 de las muestras fueron similares, oscilando entre 30 y 60 μg por pocillo. En esta y en las siguientes figuras los estándares de peso molecular fueron los siguientes: miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

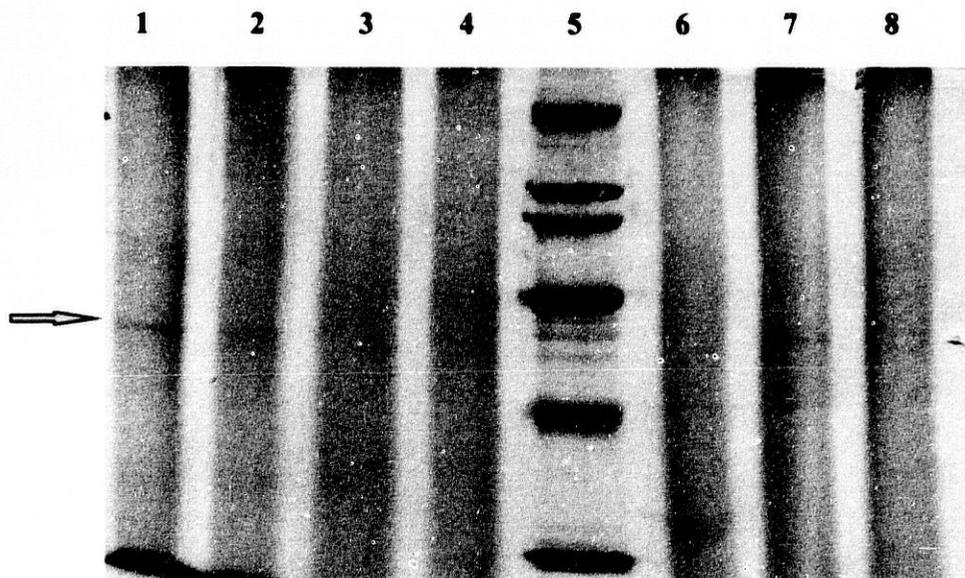


Figura 6.- SDS-PAGE electroforesis de los primeros alicuotas recogidos de los extractos EDTA (E1) de dientes individuales de exodoncias recientes. Los extractos E1 de las muestras n° 1, 10, 3 y 12 se desarrollaron en las calles 1, 2, 3 y 4 respectivamente; las muestras n° 11, 19 y 5 en las calles 6, 7 y 8. La calle 5 corresponde a los estándares de peso molecular. Las concentraciones de proteínas de los extractos E1 de las muestras fueron similares, oscilando entre 30 y 60 μg por pocillo. En esta y en las siguientes figuras los estándares de peso molecular fueron los siguientes: miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

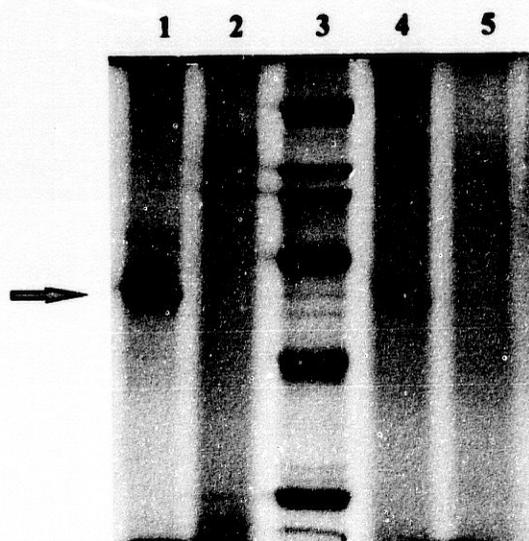


Figura 7.- SDS-PAGE electroforesis de extractos de guanidina (G) de dentina humana de dientes individuales de exodoncias recientes. La electroforesis se desarrolló en las condiciones descritas en el capítulo de material y métodos. En este caso el gel se tizó con la técnica de stains-all. Las calles 1 y 2 corresponden a los extractos G1 y G2 de la muestra n° 1, las calles 4 y 5 a los extractos G1 y G2 de la muestra n° 11 y la calle 3 a los estándares de peso molecular.

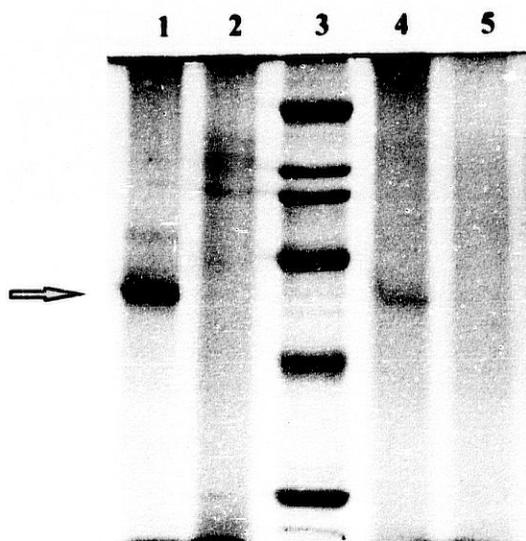


Figura 7.- SDS-PAGE electroforesis de extractos de guanidina (G) de dentina humana de dientes individuales de exodoncias recientes. La electroforesis se desarrolló en las condiciones descritas en el capítulo de material y métodos. En este caso el gel se tiñó con la técnica de stains-all. Las calles 1 y 2 corresponden a los extractos G1 y G2 de la muestra n° 1, las calles 4 y 5 a los extractos G1 y G2 de la muestra n° 11 y la calle 3 a los estándares de peso molecular.

Otra cuestión que debíamos de aclarar antes de continuar con el desarrollo analítico de todas las muestras era si las proteínas que se detectan en los distintos extractos E, es decir en los extractos E1, E2 y E3, eran similares para cada muestra. Así, en la figura 8, se puede comprobar que los patrones proteicos detectados en los extractos E1, E2 y E3 en una misma muestra, son idénticos entre sí, pudiéndose concluir que se pueden emplear indistintamente cualquiera de los extractos de una misma muestra para los análisis posteriores.

Por último, quisimos demostrar que no era relevante la cantidad de proteínas que se depositaban en cada pocillo del gel en los patrones proteicos detectados. Para ello, y una vez establecidas las concentraciones de proteínas que aseguraban la reproductividad de las determinaciones, se procedió a realizar una electroforesis (figura 9) en la que al menos se duplicó la concentración de proteínas de partida, en comparación con la cantidad de proteínas depositadas para las mismas muestras y desarrolladas previamente en el gel que se recoge en la figura 6. Con esta experiencia pudimos poner de manifiesto que no existían diferencias en los patrones de las proteínas en función de las cantidades de proteínas aplicadas en el ensayo, manteniéndose la ausencia de la banda principal pese al incremento de la concentración de proteínas.

A partir de todos estos ensayos previos y con la finalidad de poder comparar los resultados entre muestras de dientes individuales en todos los geles desarrollados, se partieron de concentraciones similares de proteínas (en extractos E y G) que osciló entre un mínimo de 30 μg y un máximo de 60 μg .

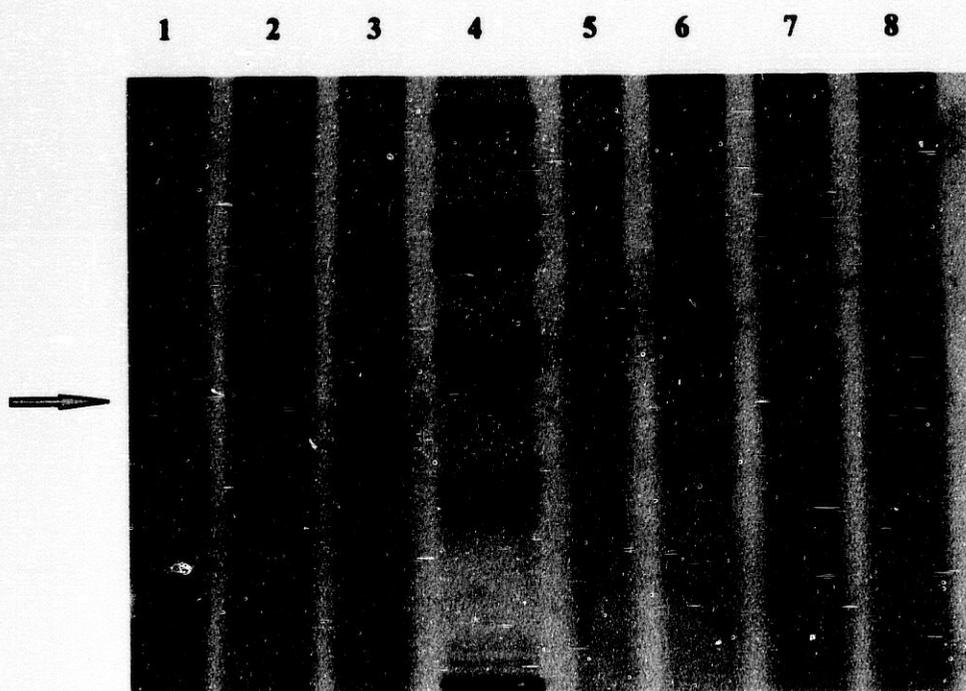


Figura 8.- SDS-PAGE electroforesis de los diferentes extractos EDTA (E1, E2 y E3) de la misma muestra. En esta ocasión, se desarrollaron los extractos E1, E2 y E3 de la muestra n° 18 en las calles 1, 2 y 3. Los extractos E2 y E3 de la muestra n° 10 en las calles 5 y 6, y los de la muestra n° 11 en las calles 7 y 8, respectivamente. Los extractos E1 de las muestras n° 10 y 11 se habían desarrollado en el gel anterior (figura 7). La calle 4 corresponde a los estándares de peso molecular.

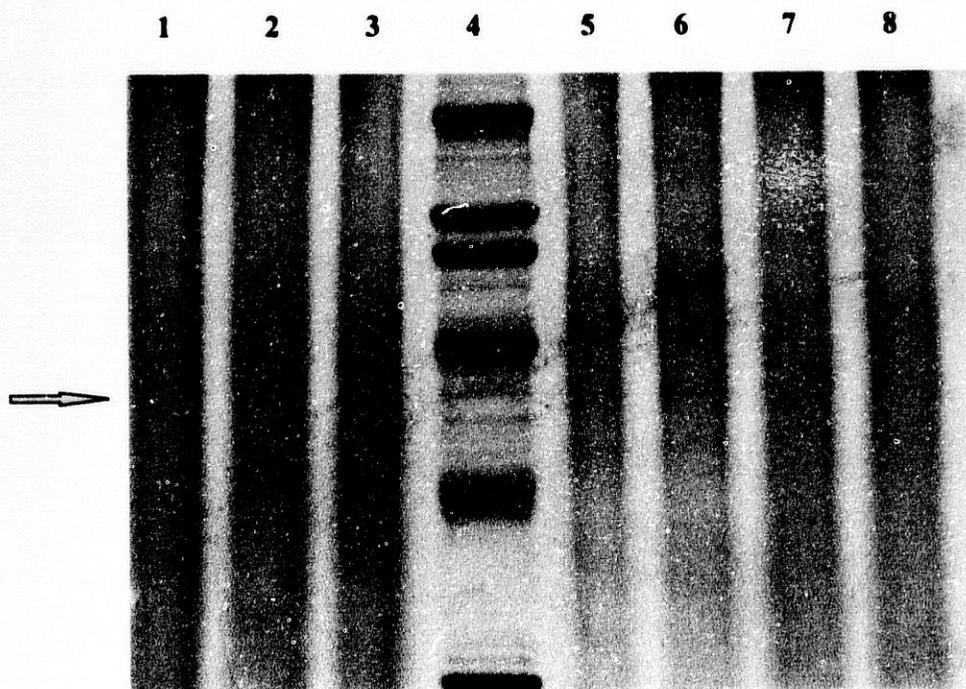


Figura 8.- SDS-PAGE electroforesis de los diferentes extractos EDTA (E1, E2 y E3) de la misma muestra. En esta ocasión, se desarrollaron los extractos E1, E2 y E3 de la muestra n° 18 en las calles 1, 2 y 3. Los extractos E2 y E3 de la muestra n° 10 en las calles 5 y 6, y los de la muestra n° 11 en las calles 7 y 8, respectivamente. Los extractos E1 de las muestras n° 10 y 11 se habían desarrollado en el gel anterior (figura 7). La calle 4 corresponde a los estándares de peso molecular.

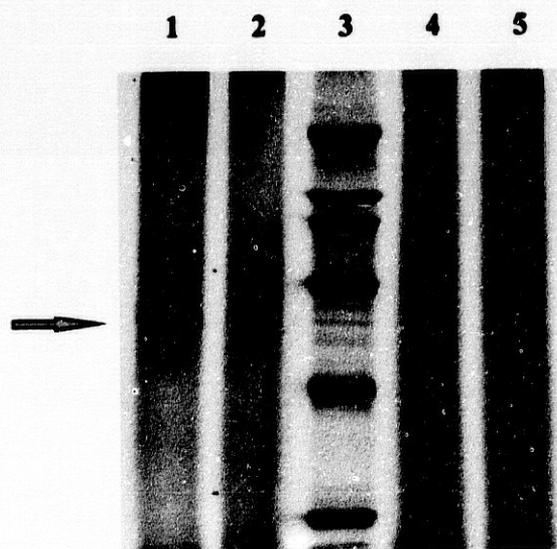


Figura 9.- SDS-PAGE electroforesis de extractos EDTA de muestras de dientes individuales de exodoncias recientes, a diferentes concentraciones. Las calles 1, 2, 4 y 5 corresponden a los extractos E de las muestras n° 1, 5, 11 y 19 respectivamente. En todas ellas se duplicó la cantidad de proteínas por pocillo en relación a ensayos previos. La calle 3 corresponde a los estándares de peso molecular.

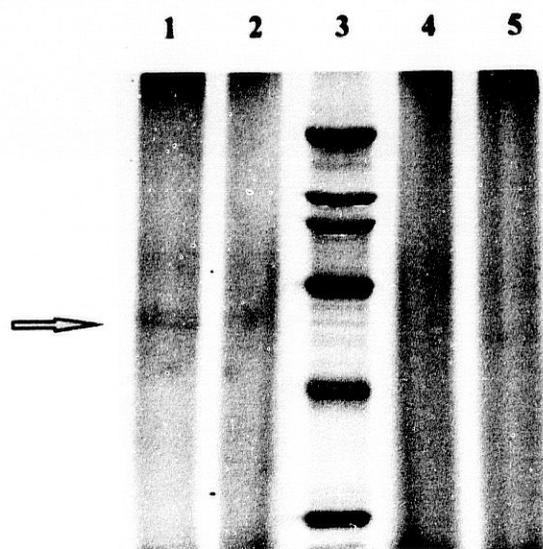


Figura 9.- SDS-PAGE electroforesis de extractos EDTA de muestras de dientes individuales de exodoncias recientes, a diferentes concentraciones. Las calles 1, 2, 4 y 5 corresponden a los extractos E de las muestras n° 1, 5, 11 y 19 respectivamente. En todas ellas se duplicó la cantidad de proteínas por pocillo en relación a ensayos previos. La calle 3 corresponde a los estándares de peso molecular.

Tras la separación de las proteínas de los extractos de la dentina, y con la finalidad de identificar las proteínas con actividad gelatinolítica se realizaron enzimogramas con alicuotas de los distintos extractos. En la figura 10 se presentan los resultados encontrados para los extractos G1 y G2 de dos piezas individuales (números 23 y 19). Además se ensayaron dos concentraciones de proteínas (una doble que la otra), demostrándose que no existen diferencias en los patrones de enzimas proteolíticas en relación a la concentración de proteínas aplicada en cada pocillo.

En último lugar, quedaba por demostrar si las proteínas detectadas en los extractos E (E1, E2 y E3) poseían o no actividad gelatinolítica. En la figura 11 se muestra el enzimograma de dos muestras (números 9 y 16), que habían sido sometidas previamente a desarrollos electroforéticos en geles sin gelatina, presentando un comportamiento diferente entre una y otra, en el sentido de que sólo se detectó la proteína mayoritaria de 60 kDa en la muestra 9. Ninguno de los extractos E de estas muestras ensayadas, tal y como se observa en la figura 11, presentó actividad gelatinolítica de ningún tipo.



Figura 10.- Enzimoograma de extractos de guanidina de dientes individuales de exodoncias recientes. En este gel se combinan diferentes concentraciones de extractos G1 y G2 de las mismas muestras. En las calles 1 y 2 se desarrolló el extracto G1 de la muestra 23 con distinto contenido proteico, siendo la calle 1 la de menor concentración (la mitad). La calle 3 corresponde al extracto G2 de la misma muestra. Lo mismo se hizo con la muestra n° 19; en la calle 4 y 5 se desarrolló el extracto G1 a diferente concentración y el extracto G2 en la calle 6. La calle 7 corresponde al estándar de gelatinasa de 72 kDa.

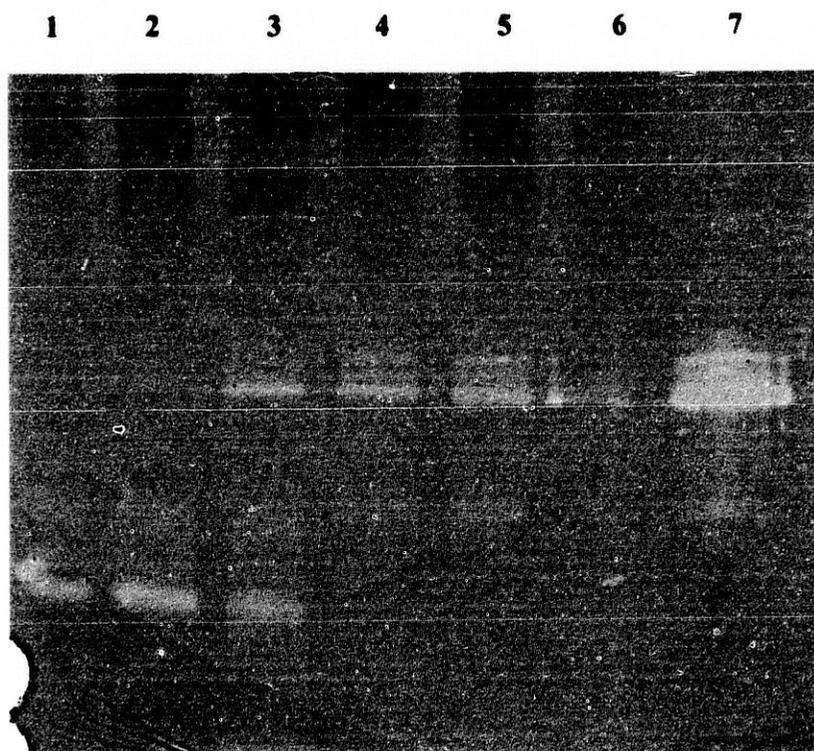


Figura 10.- Enzimograma de extractos de guanidina de dientes individuales de exodoncias recientes. En este gel se combinan diferentes concentraciones de extractos G1 y G2 de las mismas muestras. En las calles 1 y 2 se desarrolló el extracto G1 de la muestra 23 con distinto contenido proteico, siendo la calle 1 la de menor concentración (la mitad). La calle 3 corresponde al extracto G2 de la misma muestra. Lo mismo se hizo con la muestra n° 19; en la calle 4 y 5 se desarrolló el extracto G1 a diferente concentración y el extracto G2 en la calle 6. La calle 7 corresponde al estándar de gelatinasa de 72 kDa.

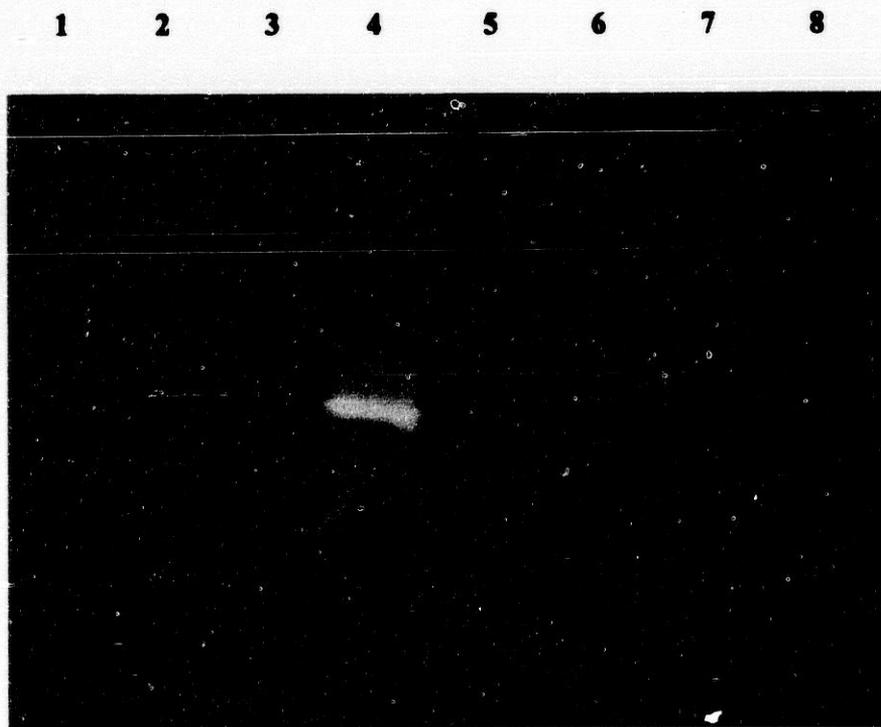


Figura 11.- Enzimograma de extractos EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. En este caso, se desarrollaron los extractos E1, E2 y E3 de la misma muestra para comprobar la actividad gelatinolítica en estos extractos. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a los extractos E1, E2 y E3 de la muestra n° 9, respectivamente. De igual manera se procedió con la muestra n° 16 en las calles 5, 6 y 7. El estándar de gelatinasa de 72 kDa se desarrolló en la calle 4.

1 2 3 4 5 6 7 8

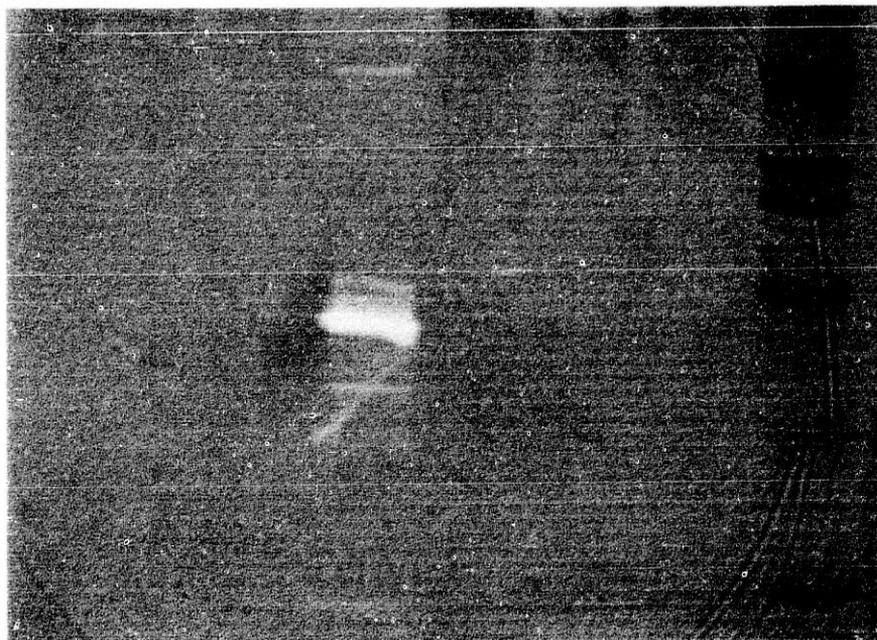


Figura 11.- Enzimograma de extractos EDTA de dientes individuales de exodoacias recientes. En este caso, se desarrollaron los extractos E1, E2 y E3 de la misma muestra para comprobar la actividad gelatinolítica en estos extractos. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a los extractos E1, E2 y E3 de la muestra n° 9, respectivamente. De igual manera se procedió con la muestra n° 16 en las calles 5, 6 y 7. El estándar de gelatinasa de 72 kDa se desarrolló en la calle 4.

2b. Dientes procedentes de restos esqueletizados

Para conocer los patrones de las proteínas de dientes procedentes de restos esqueletizados se empleó básicamente la misma metodología que en dientes procedentes de exodoncias recientes; es decir, en primer lugar se separaron las proteínas empleando un sistema de electroforesis convencional, y, en segundo lugar, se realizaron enzimogramas con gelatina para detectar la actividad gelatinolítica de las proteínas. Se realizaron dos extracciones independientes de proteínas de la dentina a partir de sendos *pools* de dientes, tal y como ha quedado descrito en el apartado de material y métodos.

Los resultados más significativos se presentan en las figuras 12 a 14. La figura 12 muestra los patrones difusos de las proteínas degradadas en los extractos G1. Este fue el mismo patrón que se presentó cuando se desarrollaron los extractos E, recogiendo en la figura 13 los patrones para los extractos E1 y E2 de la muestra. Cuando los extractos G de dichos restos dentarios se analizaron por enzimografía (figura 14), no se detectó actividad gelatinolítica de ningún tipo a excepción de una banda de poca intensidad que se visualizó en la zona de migración del frente.

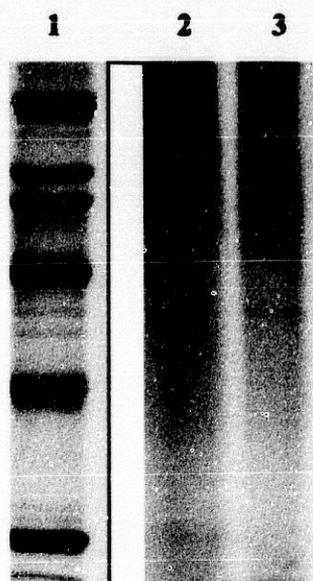


Figura 12.- SDS-PAGE electroforesis de extractos de guanidina de dientes procedentes de restos esqueletizados. En este gel se desarrollaron extractos G1 de las muestras procedentes de dos extracciones independientes realizadas paralelamente, de un *pool* de dientes de restos esqueletizados de una población contemporánea (calles 2 y 3). La calle 1 corresponde a los estándares de peso molecular.

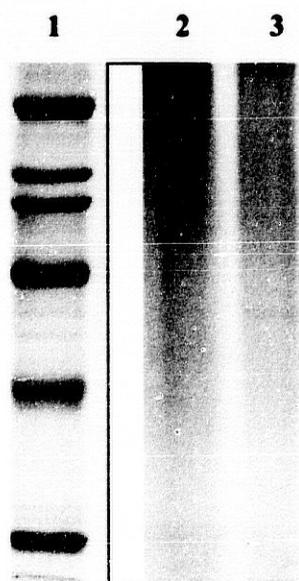


Figura 12.- SDS-PAGE electroforesis de extractos de guanidina de dientes procedentes de restos esqueletizados. En este gel se desarrollaron extractos G1 de las muestras procedentes de dos extracciones independientes realizadas paralelamente, de un *pool* de dientes de restos esqueletizados de una población contemporánea (calles 2 y 3). La calle 1 corresponde a los estándares de peso molecular.

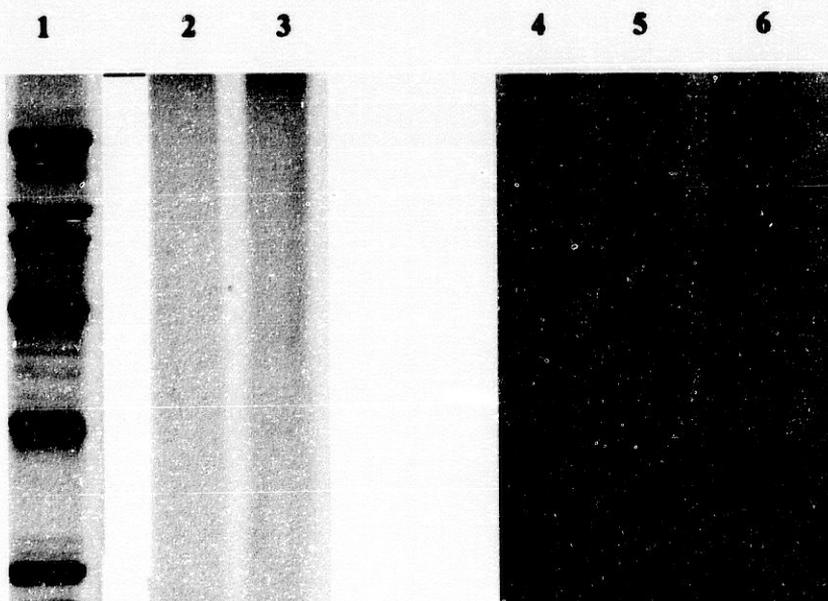


Figura 13.- SDS-PAGE electroforesis de extractos EDTA de dientes procedentes de restos esqueletizados. Las calles 2 y 3 corresponden a los extractos E2 de las muestras resultantes de dos extracciones de un *pool* de dientes de restos esqueletizados. Los extractos E1 de las mismas muestras se desarrollaron en las calles 4 y 5. Las calles 1 y 6 corresponden a los estándares de peso molecular.

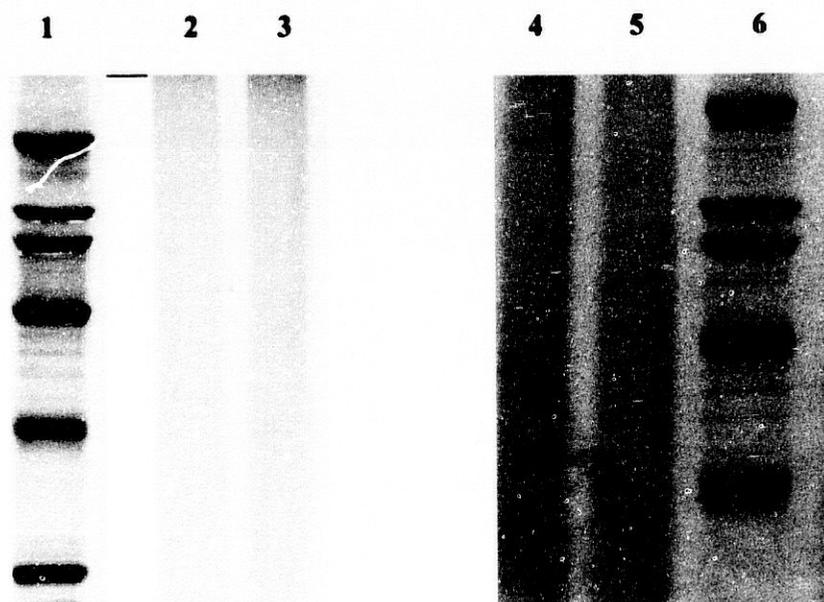


Figura 13.- SDS-PAGE electroforesis de extractos EDTA de dientes procedentes de restos esqueletizados. Las calles 2 y 3 corresponden a los extractos E2 de las muestras resultantes de dos extracciones de un *pool* de dientes de restos esqueletizados. Los extractos E1 de las mismas muestras se desarrollaron en las calles 4 y 5. Las calles 1 y 6 corresponden a los estándares de peso molecular.

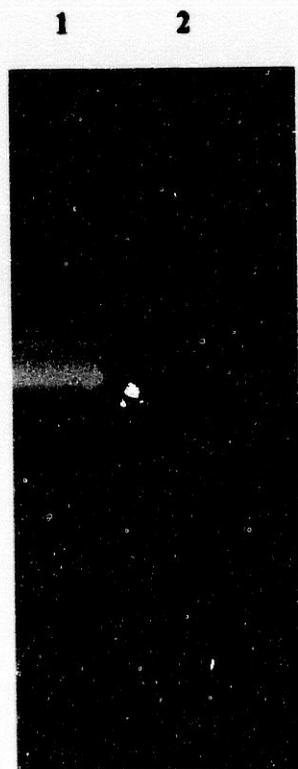


Figura 14.- Enzimografía de extractos de guanidina (G1) de dientes procedentes de restos esqueletizados (calle 2). La calle 1 corresponde al estándar de la gelatinasa de 72 kDa.

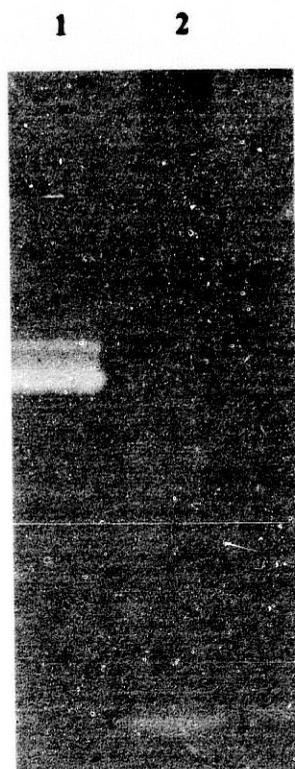


Figura 14.- Enzimografía de extractos de guanidina (G1) de dientes procedentes de restos esqueletizados (calle 2). La calle 1 corresponde al estándar de la gelatinasa de 72 kDa.

3. PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS CON EDTA

Los patrones proteicos de los extractos EDTA, tanto de dientes procedentes de extracciones recientes como de restos esqueletizados, mostraron bandas de proteínas en las que fue posible conocer el peso molecular por comparación con la migración electroforética de los estándares de peso molecular que fueron desarrollados en las mismas condiciones que las muestras. Pero además, interesaba la identificación, lo más precisa posible, de al menos la proteína mayoritaria de 60 kDa detectada en los extractos EDTA.

Con esta finalidad, se diseñó una experiencia en la que extractos crudos EDTA, obtenidos a partir de dientes de exodoncias recientes y de restos esqueletizados, se sometieron a un proceso de purificación parcial de las proteínas por cromatografía de intercambio iónico. Las condiciones de extracción de las proteínas, la cromatografía de los extractos, el fraccionamiento y las condiciones de electroforesis de los elutos, se han detallado en el capítulo de material y métodos.

La figura 15 muestra el fraccionamiento por cromatografía en columna de los extractos EDTA de un *pool* de dientes de exodoncias recientes. El cromatograma permitió separar cuatro picos mayoritarios, el primero de ellos eluyó antes de comenzar el gradiente lineal con ClNa. Al aumentar la carga iónica de la solución, se disminuye la interacción entre el intercambiador iónico y la muestra, consiguiéndose la elución seriada de los distintos componentes. Por tanto, el último pico eluido debe ser la proteína más ácida.

Una vez realizado el fraccionamiento, las distintas fracciones se sometieron a una electroforesis convencional, siendo los geles después teñidos con azul Coomassie y stains-all. En la siguiente figura (figura 16) se presenta una SDS-PAGE electroforesis de alícuotas procedentes del fraccionamiento proteico de los tres picos mayoritarios detectados en el cromatograma tras el inicio del gradiente con ClNa con una concentración de proteínas similares. Las calles 4 y 5 de la figura 16, corresponden a la última fracción eluida, pudiéndose identificar tan solo una proteína con un peso molecular aproximado de 60 kDa.

Un procedimiento similar se siguió en el caso de dientes de restos esqueléticos. La figura 17 muestra el cromatograma del fraccionamiento proteico de los extractos EDTA procedentes de dichas muestras y cromatografiados en las mismas condiciones que los dientes de exodoncias recientes. Se separaron dos picos mayoritarios, uno de ellos después del gradiente, que fueron posteriormente sometidos a electroforesis convencional y cuyos resultados se presentan en la figura 18. Las calles 1 a 3 corresponden a distintas fracciones eluidas después del gradiente, y en las que de nuevo, como ocurre con los dientes de exodoncias recientes, se detectó una banda proteica de aproximadamente 60 kDa de peso molecular.

Por último, en un intento de caracterizar las proteínas dentinarias extraídas, se sometieron a una inmunolectroforesis, enfrentándose con antisuero humano total. De esta manera, se podría conocer si alguna de las proteínas aisladas eran inmunológicamente compatible con las proteínas séricas, máxime porque el peso molecular de la proteína hallada en los extractos E era muy próximo al de la albúmina bovina. En ningún caso, tanto de los extractos G (G1 y G2) como de los E, se pudieron detectar bandas de precipitación con ninguna de las proteínas mayoritarias séricas presentes en el antisuero humano.

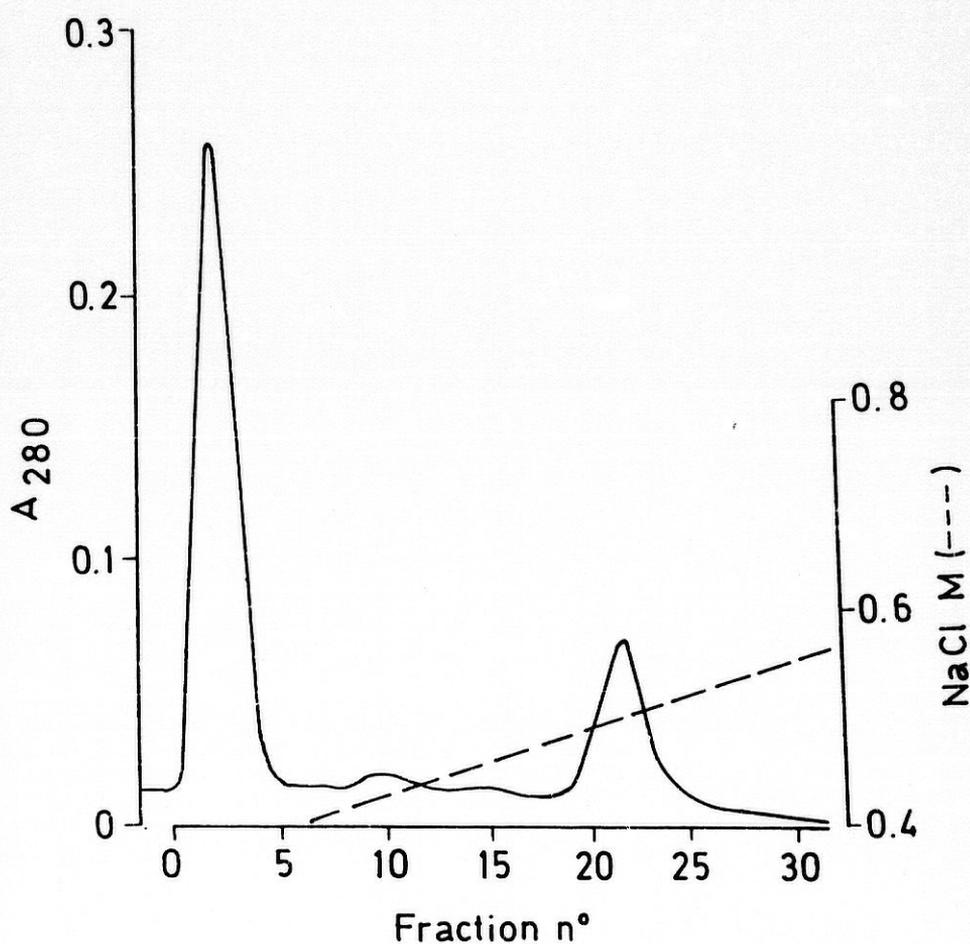


Figura 15.- Cromatograma correspondiente a los extractos EDTA de un *pool* de dientes de exodoncias recientes. Los extractos E se diluyeron en un buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7.4) y fueron cromatografiados en una columna de DEAE-Sepharose a 4°C. Tras la aplicación de la muestra, la columna se eluyó con un gradiente lineal de 0.4 a 0.8 M de ClNa en el mismo buffer (volumen total = 200 ml y un flujo de 30 ml/h). El cromatograma presenta 4 picos mayoritarios, apareciendo el primero antes de comenzar el gradiente lineal con ClNa.

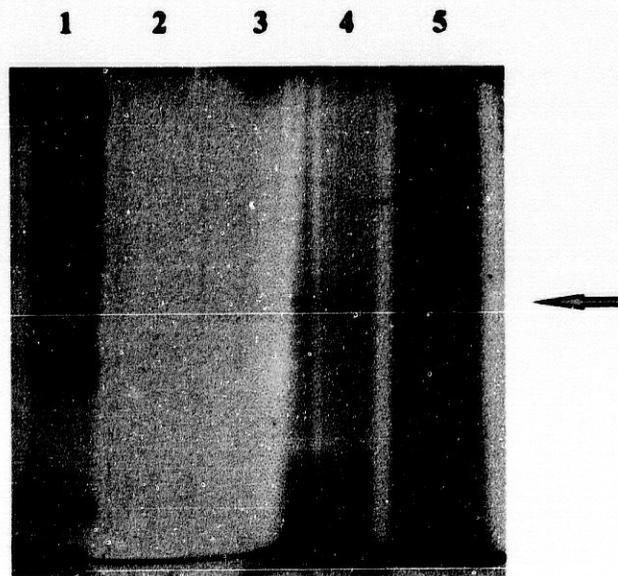


Figura 16.- SDS-PAGE electroforesis de las fracciones proteicas correspondientes a los picos mayoritarios tras la aplicación del gradiente lineal de CINA. En las calles 2 y 3 se desarrollaron las fracciones proteicas obtenidas en los dos primeros picos tras el gradiente. En la calle 4 y 5 se desarrolló el último y más predominante pico obtenido en el cromatograma. La calle 1 corresponde a los estándares de peso molecular.

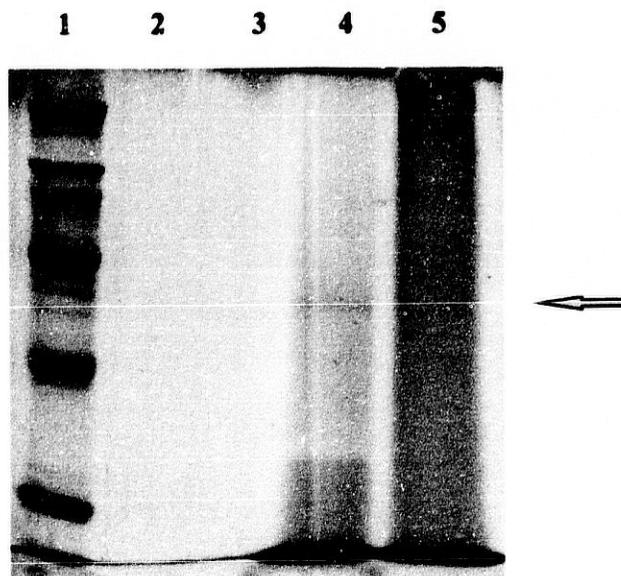


Figura 16.- SDS-PAGE electroforesis de las fracciones proteicas correspondientes a los picos mayoritarios tras la aplicación del gradiente lineal de CINA. En las calles 2 y 3 se desarrollaron las fracciones proteicas obtenidas en los dos primeros picos tras el gradiente. En la calle 4 y 5 se desarrolló el último y más predominante pico obtenido en el cromatograma. La calle 1 corresponde a los estándares de peso molecular.

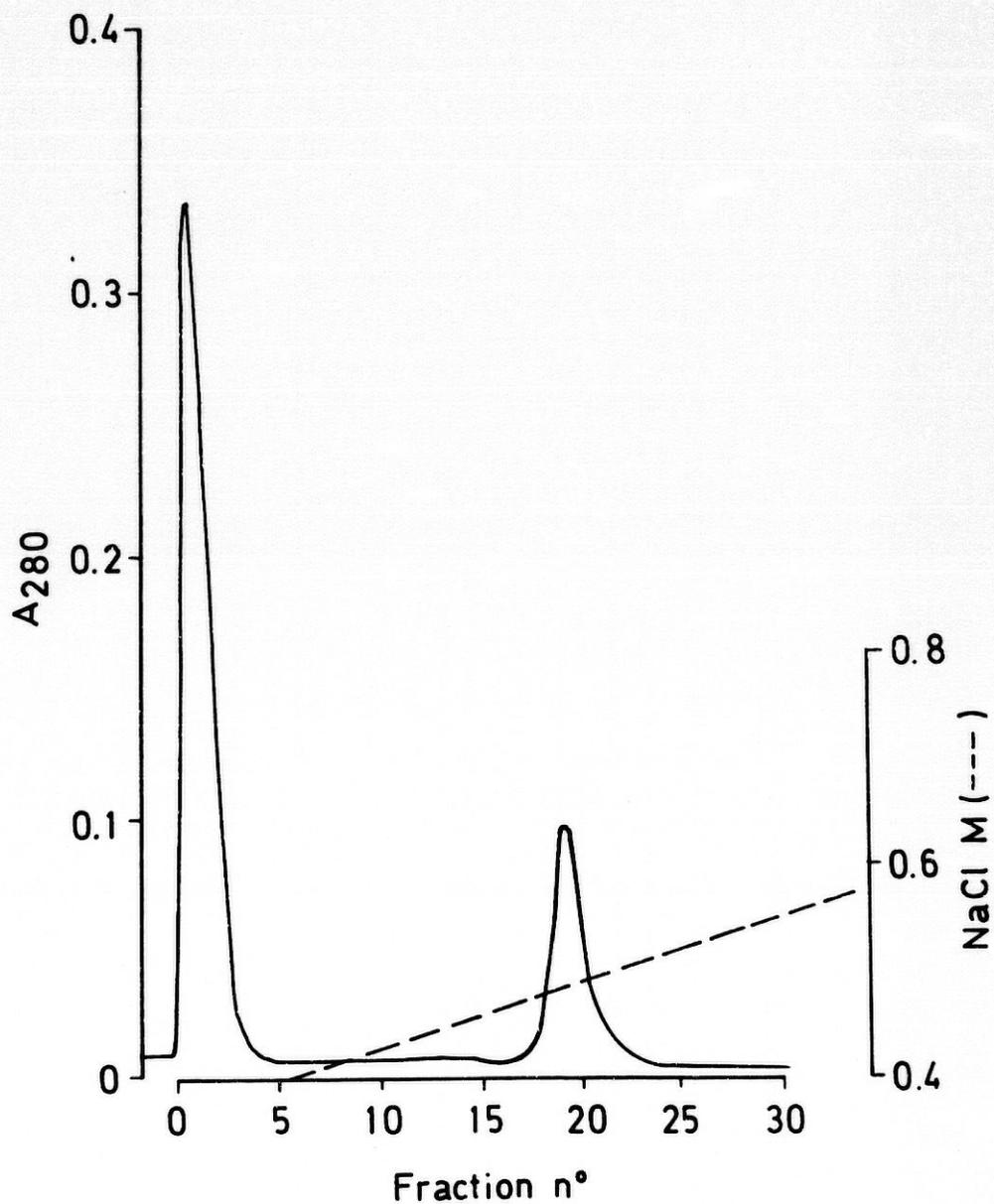


Figura 17.- Cromatograma correspondiente a los extractos de EDTA de un *pool* de dientes procedentes de restos esqueletizados. Las condiciones cromatográficas son las mismas que las descritas en la figura 15. En este caso, el cromatograma presenta dos picos mayoritario, habiéndose obtenido el primero antes de la aplicación del gradiente lineal de ClNa.

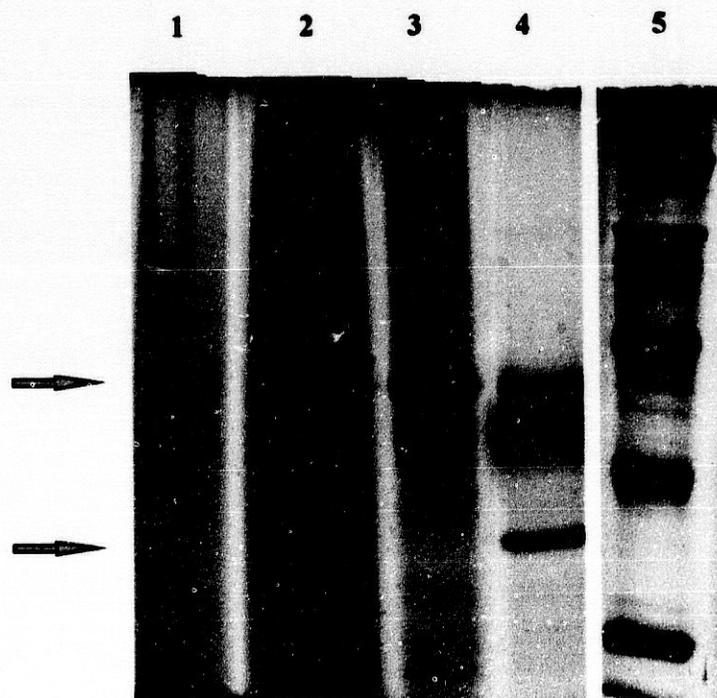


Figura 18.- SDS-PAGE electroforesis de las fracciones proteicas correspondientes a los dos picos mayoritarios obtenidos en el cromatograma. Las diferentes fracciones eluidas después del gradiente se desarrollaron en las calles 1, 2 y 3; y en la calle 4 la obtenida antes del inicio del gradiente. La calle 5 corresponde a los estándares de peso molecular.

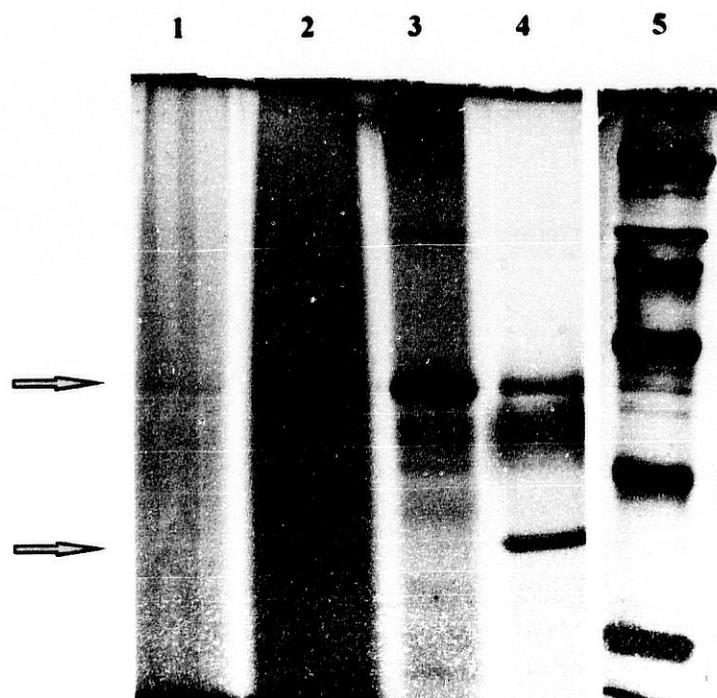


Figura 18.- SDS-PAGE electroforesis de las fracciones proteicas correspondientes a los dos picos mayoritarios obtenidos en el cromatograma. Las diferentes fracciones eluidas después del gradiente se desarrollaron en las calles 1, 2 y 3; y en la calle 4 la obtenida antes del inicio del gradiente. La calle 5 corresponde a los estándares de peso molecular.

4. CAMBIOS DE LAS PROTEÍNAS DENTINARIAS CON EL ENVEJECIMIENTO

4a. Proteínas no colágenas presentes en los extractos de guanidina y EDTA

Una vez optimizadas las condiciones experimentales y conocidos los patrones proteicos de los distintos extractos de dentina humana, nos propusimos analizar los cambios que las proteínas mayoritarias separadas por técnicas de electroforesis, sufrían con el envejecimiento.

La muestra consistió en 24 piezas dentarias individuales de diferentes sujetos, todos ellos molares, en el número y porcentaje que se presenta en la tabla siguiente:

Tabla 3. Distribución de frecuencias de las piezas dentarias de exodoncias recientes

Pieza número	Número casos	Porcentaje
16	3	12.5
17	2	8.3
18	2	8.3
26	0	0.0
27	3	12.5
28	1	4.2
36	3	12.5
37	0	0.0
38	1	4.2
46	3	12.5
47	2	8.3
48	4	16.7

Las muestras correspondían a sujetos de distintas edades, de tal forma que se organizaron en cuatro grupos, con 6 casos cada uno, tal y como se ha explicado con detalle en el capítulo de material y métodos. Por una parte, se procedió a la determinación de la gelatinasa y otras proteínas con actividad gelatinolítica en los extractos de guanidina (G1 y G2) de las piezas procedentes de los 24 individuos de distintas edades. Además de esta enzimografía, se desarrollaron electroforesis convencionales para estudiar las proteínas extraídas con EDTA.

Las figuras 19 a 22 recogen los enzimogramas de los extractos G1 de piezas dentarias individuales en los cuatro grupos de edad (Figura 19= Grupo I; Figura 20= Grupo II; Figura 21= Grupo III; Figura 22= Grupo IV). En el primer grupo de edad (sujetos con menos de 20 años de edad) tal y como se puede ver en la figura 19, se detectaron múltiples formas de enzimas gelatinolíticas. Las principales bandas de actividad proteolítica se detectaron a 66 y 59 kDa de peso molecular, siendo identificables por su peso molecular con las formas latente y activa de la gelatinasa, respectivamente. En algunas muestras aparecen bandas de actividad gelatinolítica de pesos moleculares más bajos (aproximadamente 30 kDa). Este tipo de patrón gelatinolítico se mantiene en el segundo grupo de edad (figura 20), para comenzar a cambiar parcialmente en el grupo III y mostrar algunos hallazgos diferenciales en el grupo IV, es decir, en sujetos de más de 61 años de edad. Como se aprecia en la figura 22, en las muestras 7 y 15, correspondientes a las calles 2 y 5, se encontró una banda con actividad proteolítica a aproximadamente 54 kDa, es decir, inmediatamente por debajo de la forma activa de la gelatinasa. Sólo en un caso del grupo III (figura 21, muestra nº 5, calle 2) se detectó la misma banda a ese peso molecular.

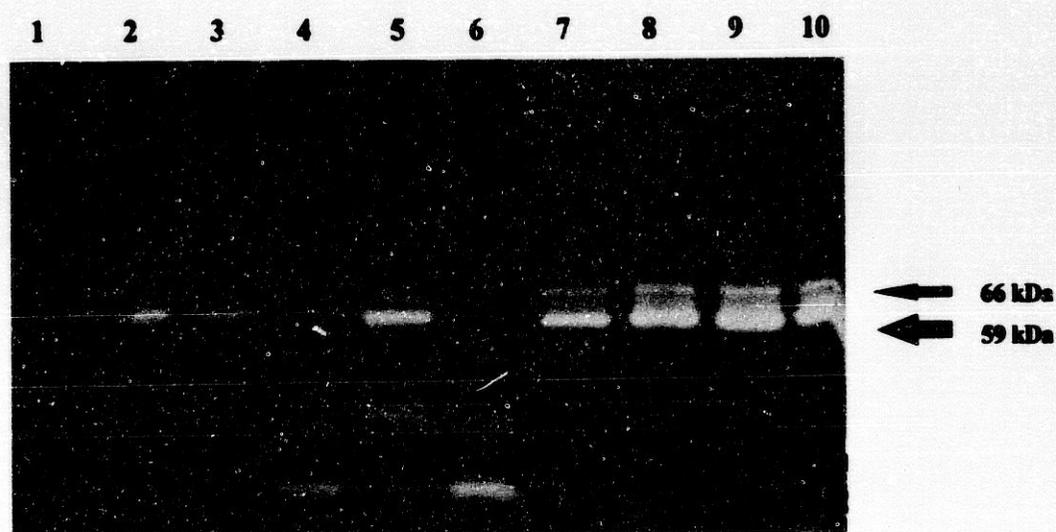


Figura 19.- Enzimograma de los extractos G1 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron en este gel corresponden a los sujetos pertenecientes al grupo I de edad, es decir, menores de 20 años. Las muestras n° 1, 2, 10, 14 y 23 se desarrollaron en las calles 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente. En las calles 7, 8, 9 y 10 se desarrolló el estándar de la gelatinasa de 72 kDa, de tal manera que en la calle 7 aparece la forma latente de la gelatinasa con un peso molecular de 66 kDa, representando aproximadamente el 5% del total de la actividad gelatinolítica. El 95% restante corresponde a la forma activa de la gelatinasa, de 59 kDa de peso molecular. En el resto de las calles se añadieron concentraciones crecientes del mismo estándar. La calle 1 corresponde a los estándares de peso molecular.

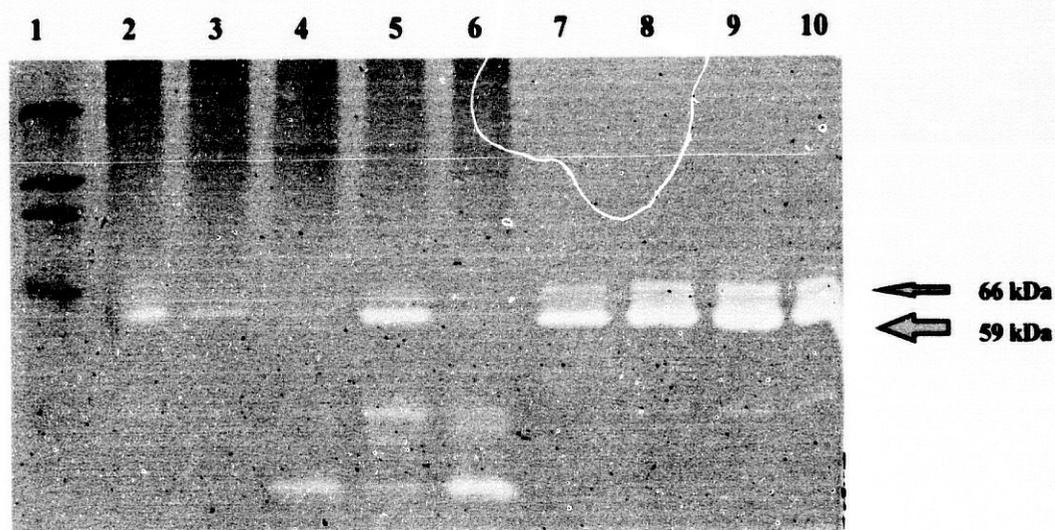


Figura 19.- Enzimograma de los extractos G1 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron en este gel corresponden a los sujetos pertenecientes al grupo I de edad, es decir, menores de 20 años. Las muestras n° 1, 2, 10, 14 y 23 se desarrollaron en las calles 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente. En las calles 7, 8, 9 y 10 se desarrolló el estándar de la gelatinasa de 72 kDa, de tal manera que en la calle 7 aparece la forma latente de la gelatinasa con un peso molecular de 66 kDa, representando aproximadamente el 5% del total de la actividad gelatinolítica. El 95% restante corresponde a la forma activa de la gelatinasa, de 59 kDa de peso molecular. En el resto de las calles se añadieron concentraciones crecientes del mismo estándar. La calle 1 corresponde a los estándares de peso molecular.

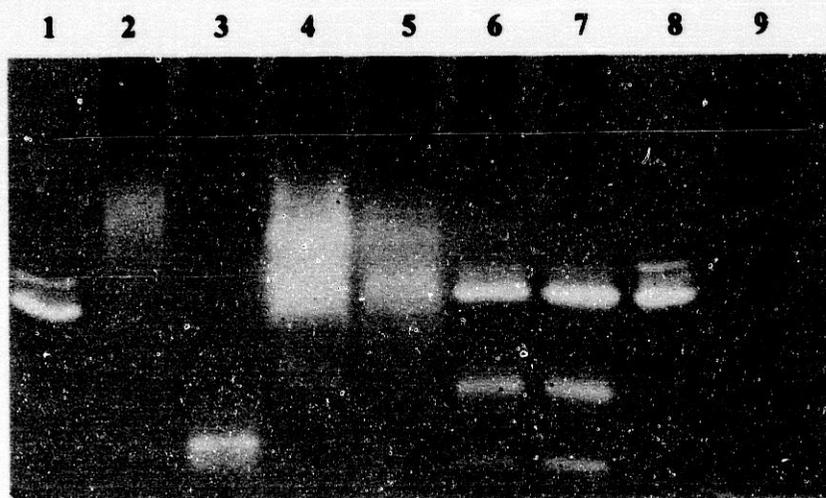


Figura 20.- Enzimograma de los extractos G1 de dientes procedentes de exodoncias recientes. Las muestras corresponden a los sujetos pertenecientes al grupo II de edad (21-40 años), excepto la n° 13 que pertenece al grupo I. Las muestras n° 3, 4, 12, 13, 17 y 20 se desarrollaron en las calles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. Las calles 1 y 8 corresponden al estándar de la gelatinasa de 72 kDa, y la 9 a los estándares de peso molecular.

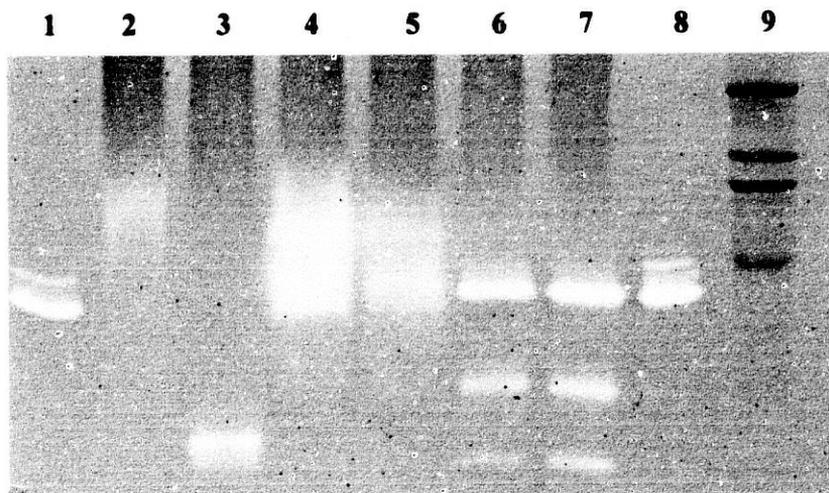


Figura 20.- Enzimograma de los extractos G1 de dientes procedentes de exodoncias recientes. Las muestras corresponden a los sujetos pertenecientes al grupo II de edad (21-40 años), excepto la n° 13 que pertenece al grupo I. Las muestras n° 3, 4, 12, 13, 17 y 20 se desarrollaron en las calles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. Las calles 1 y 8 corresponden al estándar de la gelatinasa de 72 kDa, y la 9 a los estándares de peso molecular.

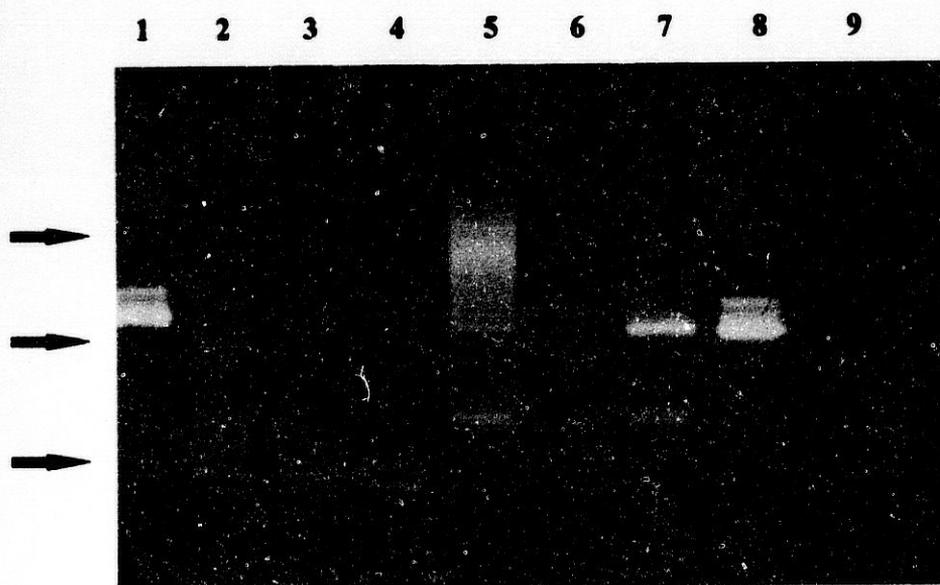


Figura 21.- Enzimograma de los extractos G1 de dientes de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron desde las calles 2 a la 7 corresponden a sujetos que pertenecen al grupo III de edad (41-60 años). Las calles 1 y 8 corresponden al estándar de la gelatinasa de 72 kDa, y la 9 a los estándares de peso molecular.

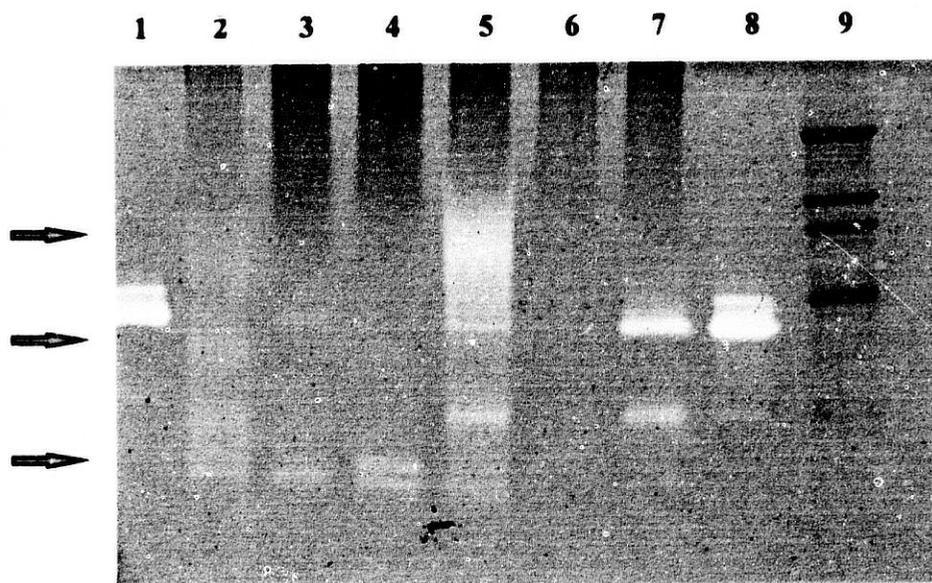


Figura 21.- Enzimograma de los extractos G1 de dientes de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron desde las calles 2 a la 7 corresponden a sujetos que pertenecen al grupo III de edad (41-60 años). Las calles 1 y 8 corresponden al estándar de la gelatinasa de 72 kDa, y la 9 a los estándares de peso molecular.

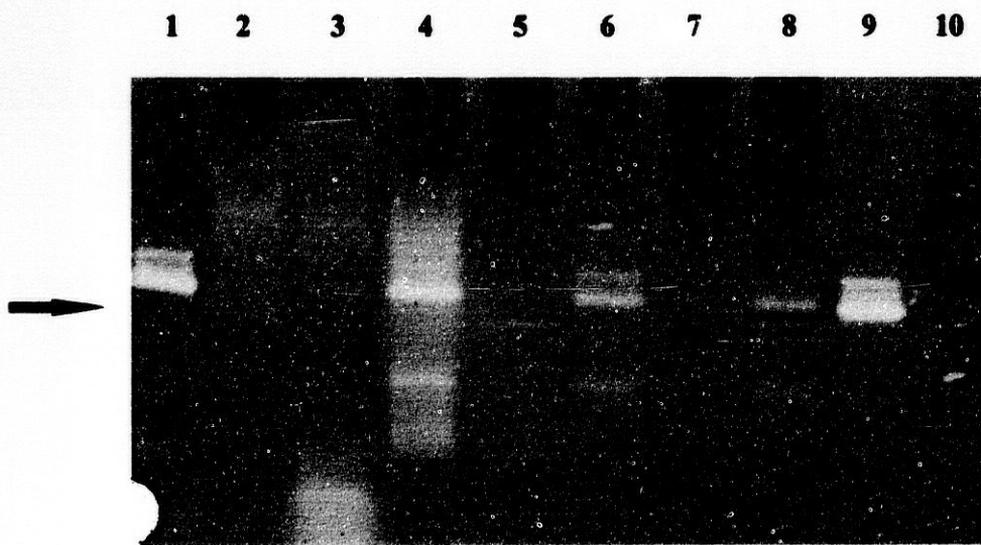


Figura 22.- Enzimograma de los extractos G1 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron en este gel desde las calles 2 a la 7, corresponden a los sujetos pertenecientes al grupo IV de edad, es decir, mayores de 66 años. La calle 1 corresponde al estándar de la gelatinasa de 72 kDa.

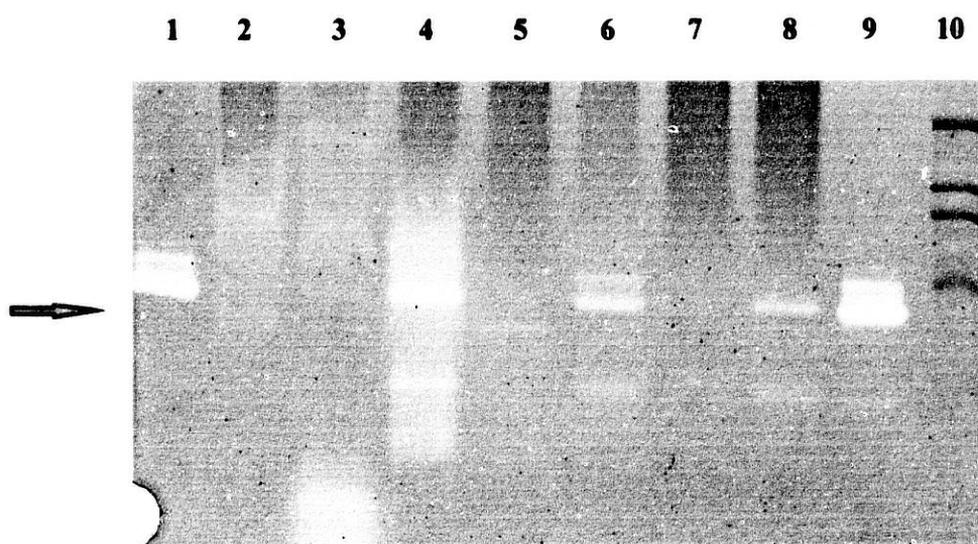


Figura 22.- Enzimograma de los extractos G1 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron en este gel desde las calles 2 a la 7, corresponden a los sujetos pertenecientes al grupo IV de edad, es decir, mayores de 60 años. La calle 1 corresponde al estándar de la gelatinasa de 72 kDa.

Posteriormente se analizaron los extractos G2 de las mismas muestras y en idénticas condiciones que los extractos G1. Las figuras 23 a 26 muestran los enzimogramas de los extractos G2 para los cuatro grupos de edad. En el grupo de menos de 20 años, se presentó un patrón de actividades gelatinolíticas bastante parecido al encontrado para las mismas muestras y los extractos G1 (figura 23). Sin embargo, conforme se avanza en la edad del sujeto, y sobre todo cuando se trata de sujetos de más de 61 años de edad, prácticamente no se detectó actividad proteolítica de ningún tipo como se puede ver en las figuras siguientes (figura 25 y 26).

1 2 3 4 5 6

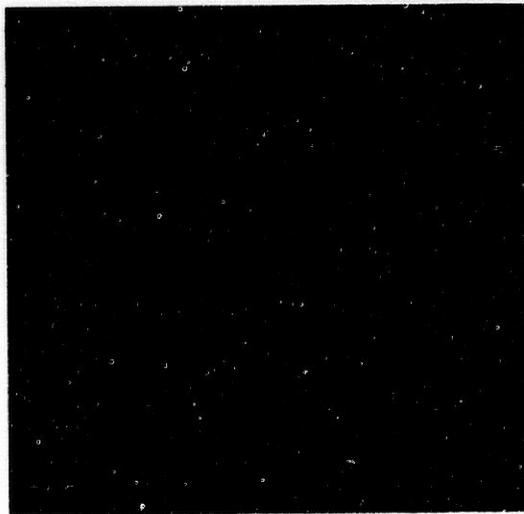


Figura 23.- Enzimograma de los extractos G2 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron desde la calle 1 a la 5 corresponden a sujetos pertenecientes al grupo I de edad (menores de 20 años). La calle 6 corresponde al estándar de la gelatinasa de 72 kDa.

1 2 3 4 5 6

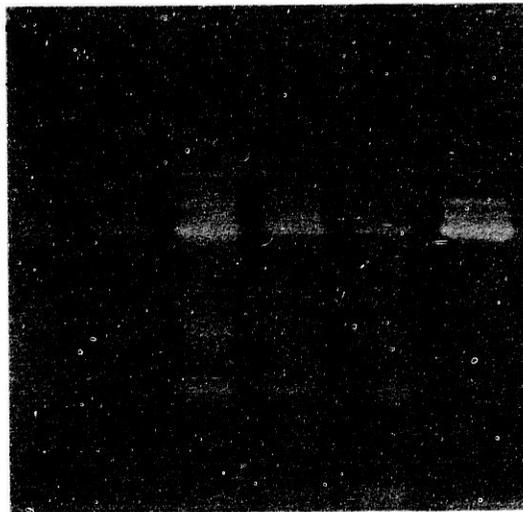


Figura 23.- Enzimograma de los extractos G2 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron desde la calle 1 a la 5 corresponden a sujetos pertenecientes al grupo I de edad (menores de 20 años). La calle 6 corresponde al estándar de la gelatinasa de 72 kDa.

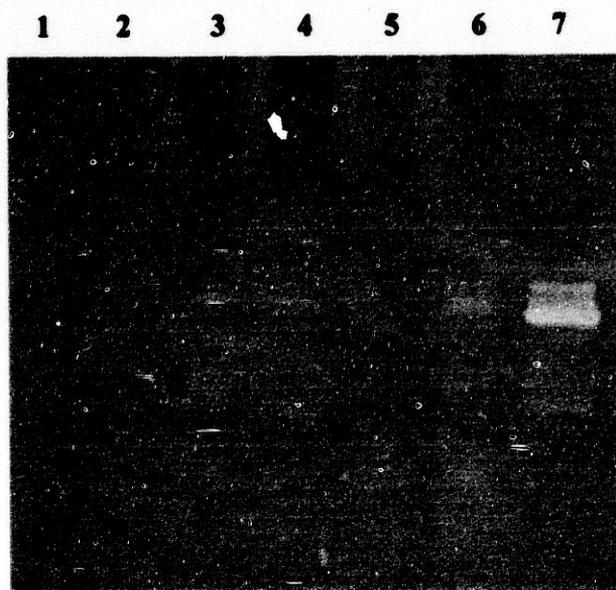


Figura 24.- Enzimograma de los extractos G2 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron desde las calles 1 a la 6 corresponden a sujetos pertenecientes al grupo II de edad (21-40 años). La calle 7 corresponde al estándar de gelatinasa de 72 kDa.

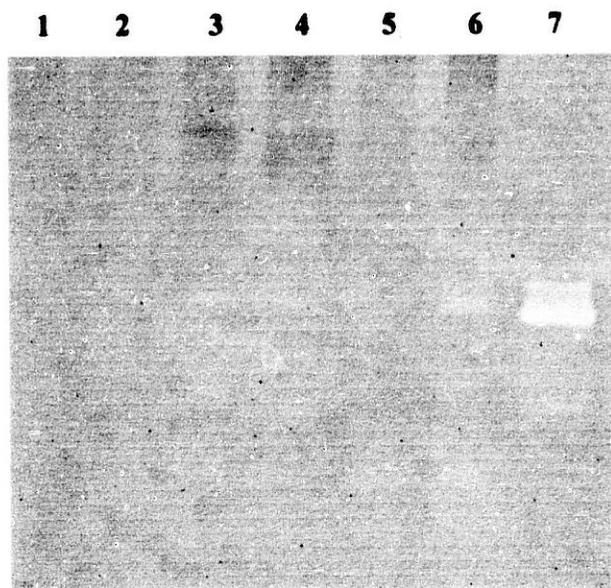


Figura 24.- Enzimograma de los extractos G2 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron desde las calles 1 a la 6 corresponden a sujetos pertenecientes al grupo II de edad (21-40 años). La calle 7 corresponde al estándar de gelatinasa de 72 kDa.

1 2 3 4 5 6

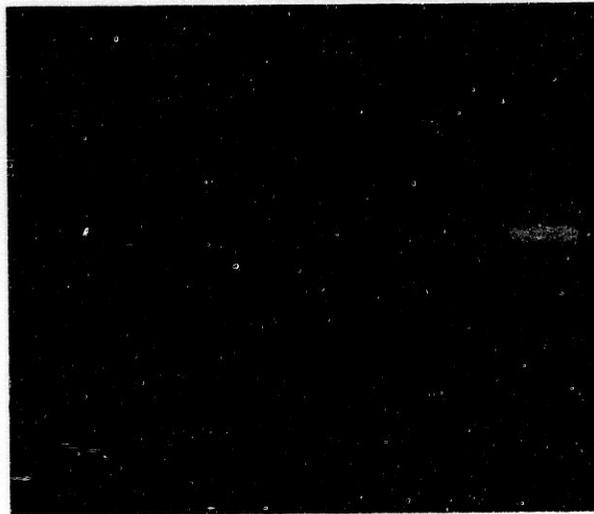


Figura 25.- Enzimograma de los extractos G2 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron en este gel desde las calles 1 a la 5 corresponden a sujetos pertenecientes al grupo III de edad (41-60 años). La calle 6 corresponde al estándar de la gelatinasa de 72 kDa.

1 2 3 4 5 6

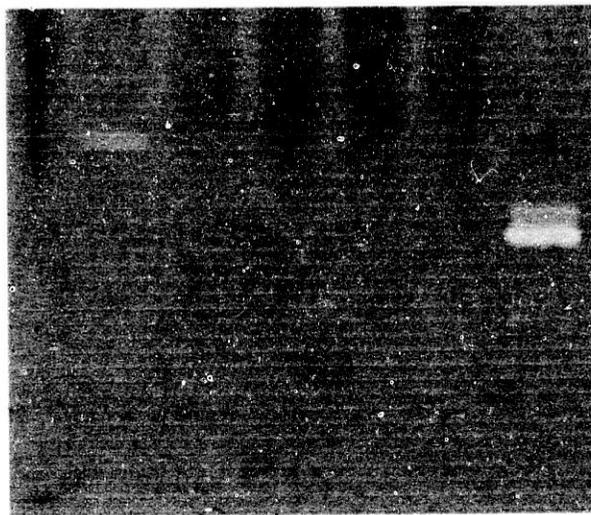


Figura 25.- Enzimograma de los extractos G2 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron en este gel desde las calles 1 a la 5 corresponden a sujetos pertenecientes al grupo III de edad (41-60 años). La calle 6 corresponde al estándar de la gelatinasa de 72 kDa.



Figura 26.- Enzimoograma de los extractos G2 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron en este gel, desde las calles 1 a la 6, corresponden a sujetos pertenecientes al grupo IV de edad, es decir, mayores de 60 años. En las calles 7 y 8 sólo se añadió buffer de muestra, y en la calle 9 el estándar de peso molecular.

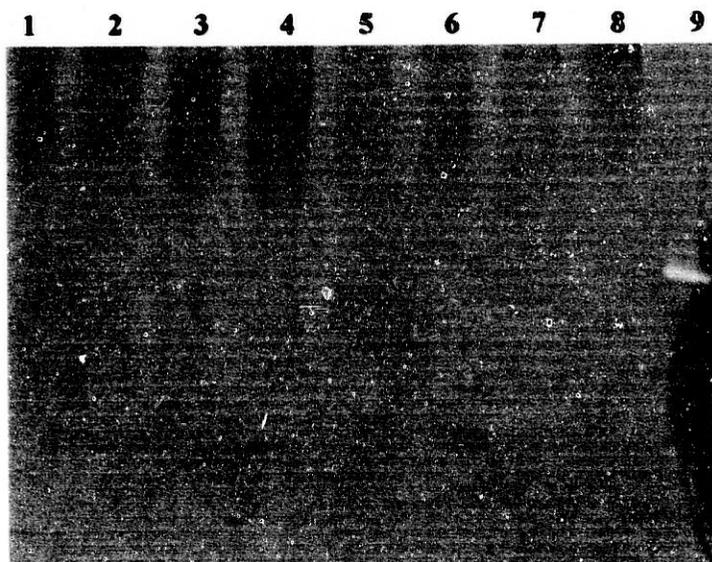


Figura 26.- Enzimograma de los extractos G2 de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras que se desarrollaron en este gel, desde las calles 1 a la 6, corresponden a sujetos pertenecientes al grupo IV de edad, es decir, mayores de 60 años. En las calles 7 y 8 sólo se añadió buffer de muestra, y en la calle 9 el estándar de peso molecular.

Por último, se realizaron desarrollos electroforéticos convencionales de los extractos E de todas las muestras individuales de sujetos de distintas edades. Las muestras se analizaron siguiendo el número de identificación y los resultados obtenidos se presentan en las figuras 27 a 30. Llama la atención la presencia, en la mayoría de las muestras de una banda más intensa y predominante de un peso molecular aproximado de 60 kDa, con una reacción positiva a los colorantes ácidos del tipo del stains-all.

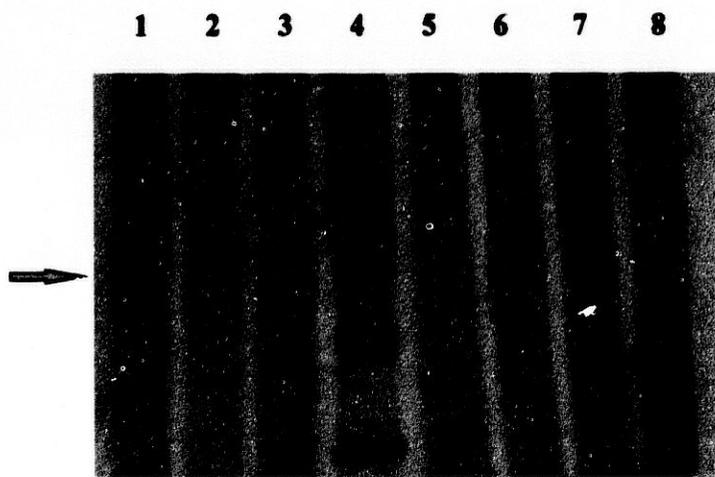


Figura 27.- SDS-PAGE electroforesis de los extractos de EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras de los extractos E1 que se desarrollaron en este gel se colocaron de manera consecutiva, es decir, las calles de la 1 a la 3 corresponden a las muestras n° 1, 2 y 3; y las calles de la 5 a la 8 a las muestras n° 4, 5, 6 y 7, respectivamente. La calle 4 corresponde a los estándares de peso molecular.

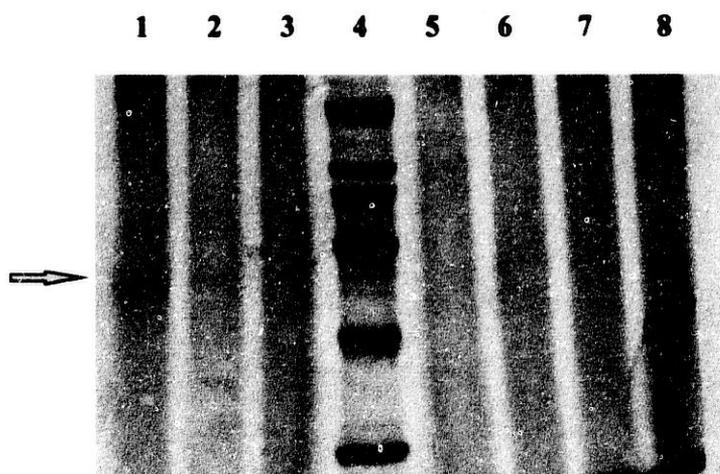


Figura 27.- SDS-PAGE electroforesis de los extractos de EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras de los extractos E1 que se desarrollaron en este gel se colocaron de manera consecutiva, es decir, las calles de la 1 a la 3 corresponden a las muestras n° 1, 2 y 3; y las calles de la 5 a la 8 a las muestras n° 4, 5, 6 y 7, respectivamente. La calle 4 corresponde a los estándares de peso molecular.

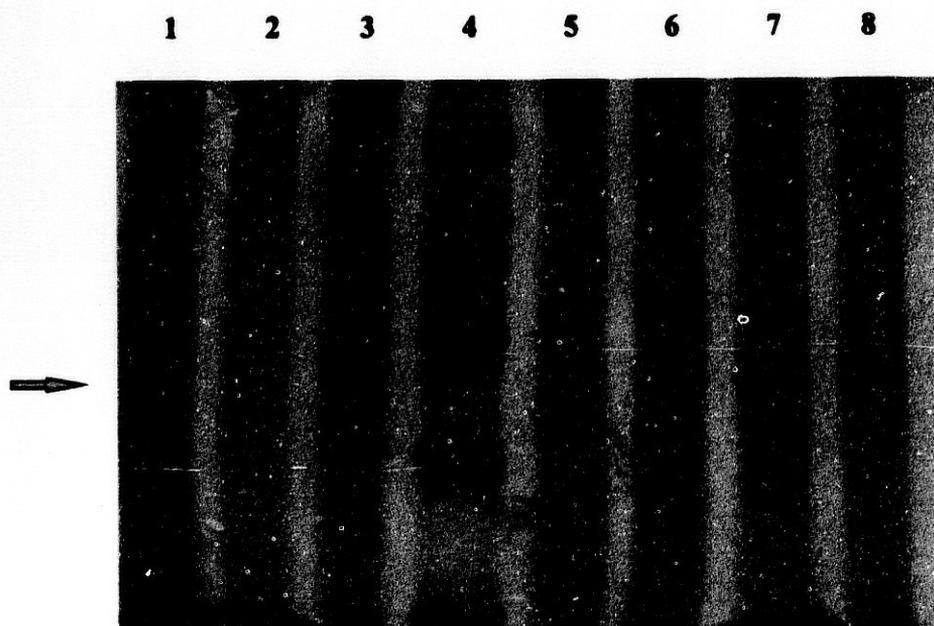


Figura 28.- SDS-PAGE electroforesis de los extractos EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras de los extractos E1 que se desarrollaron en este gel corresponden a las muestras n° 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, respectivamente. La calle 4 corresponde a los estándares de peso molecular.

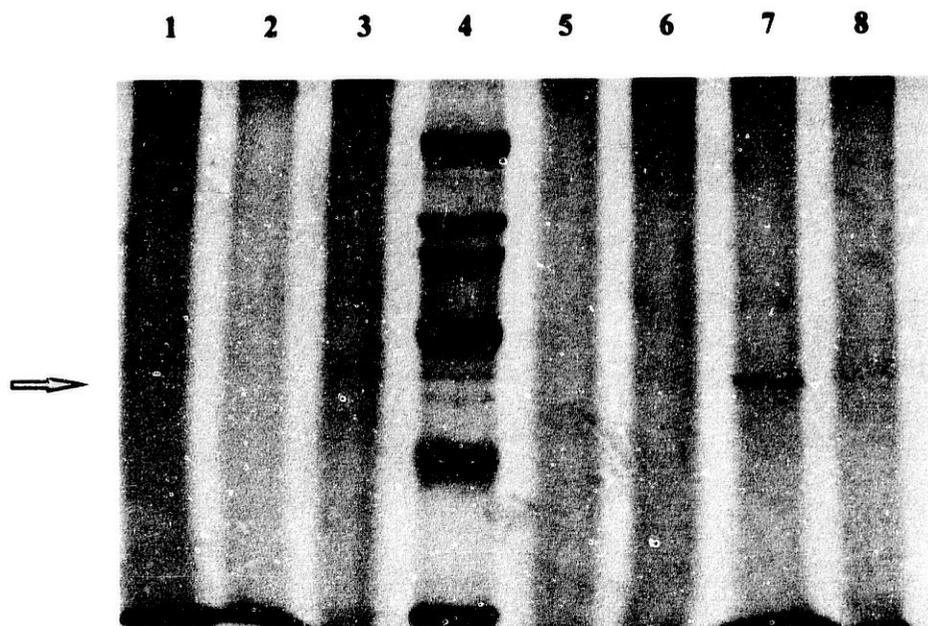


Figura 28.- SDS-PAGE electroforesis de los extractos EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. Las muestras de los extractos E1 que se desarrollaron en este gel corresponden a las muestras n° 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, respectivamente. La calle 4 corresponde a los estándares de peso molecular.

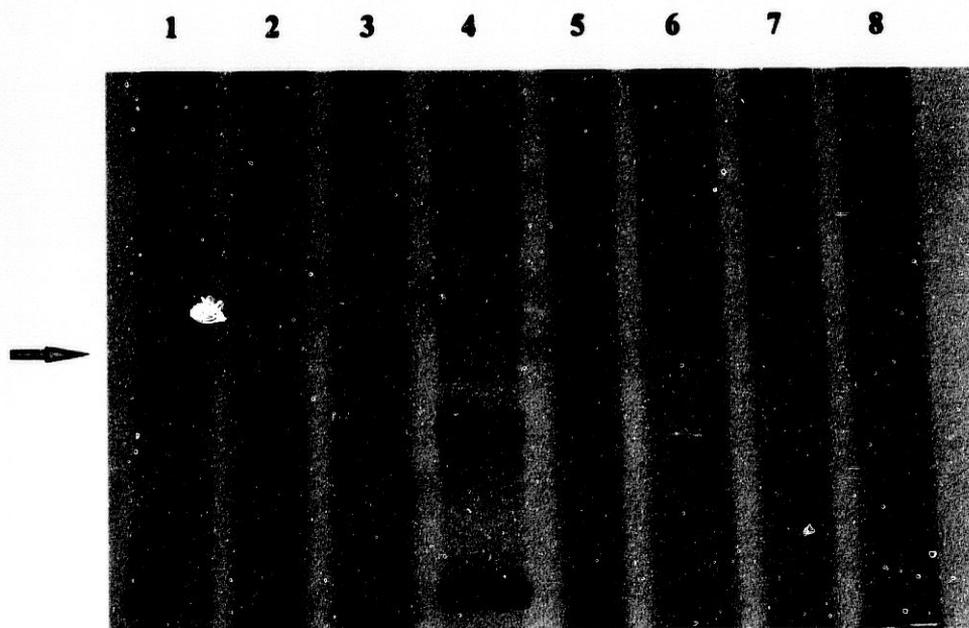


Figura 29.- SDS-PAGE electroforesis de los extractos EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. Los extracto E1 que se desarrollaron en este gel corresponden a las muestras n° 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21. La calle 4 corresponde a los estándares de peso molecular.

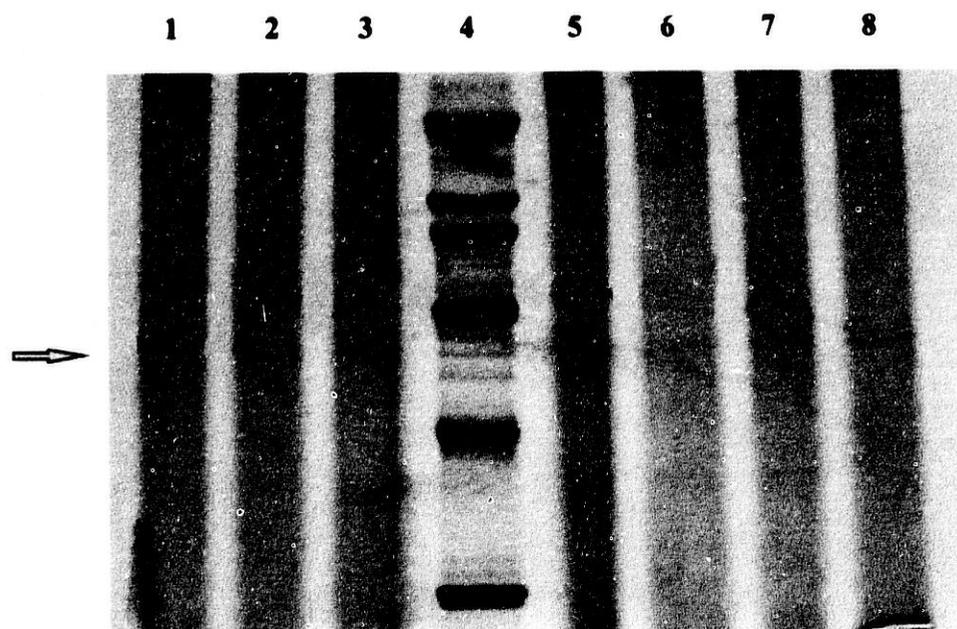


Figura 29.- SDS-PAGE electroforesis de los extractos EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. Los extracto E1 que se desarrollaron en este gel corresponden a las muestras n° 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21. La calle 4 corresponde a los estándares de peso molecular.

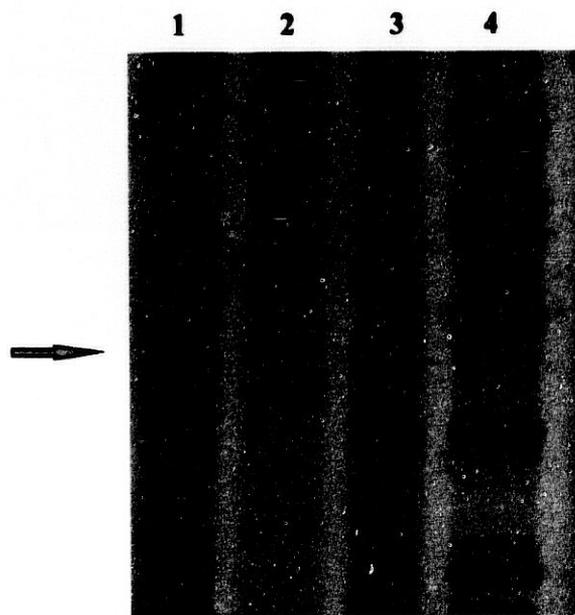


Figura 30.- SDS-PAGE electroforesis de los extractos EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a los extractos E1 de las muestras n° 22, 23 y 24. En la calle 4 se han desarrollado los estándares de peso molecular.

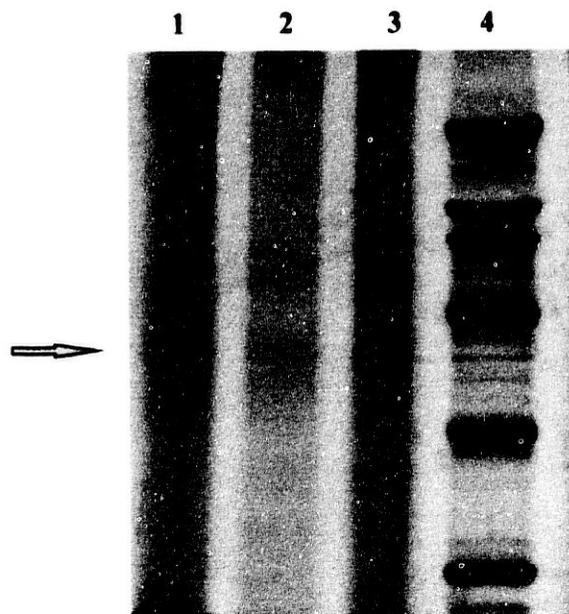


Figura 30.- SDS-PAGE electroforesis de los extractos EDTA de dientes individuales de exodoncias recientes. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a los extractos E1 de las muestras n° 22, 23 y 24. En la calle 4 se han desarrollado los estándares de peso molecular.

4b. Determinación de la deoxipiridinolina de la dentina humana

La cuantificación de la concentración de deoxipiridinolinas en dientes individuales a partir del tejido dentinario se llevó a cabo en los extractos E y en los extractos G2, de cada una de las piezas analizadas. El procedimiento ha sido descrito en la sección 4a del capítulo de material y métodos de la presente memoria. Los extractos fueron sometidos a un procedimiento de hidrólisis enzimática para la solubilización del colágeno y posteriormente se procedió a la cuantificación de las cadenas no reducibles del colágeno, en concreto la deoxipiridinolina, mediante un enzaimmunoanálisis.

Los valores medios de deoxipiridinolinas en $\mu\text{g/ml}$ en los extractos E y su porcentaje en relación al total de proteínas dentinarias en dichos extractos, se presentan en la tabla 4, mientras que la tabla siguiente (tabla 5) muestra los resultados para estos parámetros en el caso de los extractos G2 (extractos de guanidina tras la desmineralización de la dentina con EDTA). Como puede comprobarse, los valores absolutos de deoxipiridinolina son diferentes en uno y en otro extracto, resultando el doble en el extracto G2 en comparación con el E (\bar{x} en extractos E = 10.88 μg ; \bar{x} en extractos G2 = 27.92). Si los datos se expresan en función de la concentración de proteínas, el porcentaje de deoxipiridinolinas detectado es prácticamente del mismo orden en uno y otro extracto (\bar{x} de porcentajes en los extractos E = 11.32; \bar{x} de porcentajes en los extractos G2 = 9.16).

Tabla 4. Valores medios de deoxipiridinolina ($\mu\text{g/ml}$) y relación con las proteínas dentinarias totales en extractos E.

PARAMETRO	$\bar{x} \pm \text{DE}$
Deoxipiridinolina $\mu\text{g/ml}$ extracto E	10.88 \pm 3.76
% deoxipiridinolina/total proteínas extracto E	11.32 \pm 2.50

Tabla 5. Valores medios de deoxipiridinolina ($\mu\text{g/ml}$) y relación con las proteínas dentinarias totales en extractos G.

PARAMETRO	$\bar{x} \pm \text{DE}$
Deoxipiridinolina $\mu\text{g/ml}$ extracto G2	27.92 \pm 8.91
% deoxipiridinolina/total proteínas extracto G2	9.16 \pm 4.47

Además, las dos variables, la cantidad de deoxipiridinolina en los extractos E y en los extractos G2 para cada muestra, se relacionaron en un sentido positivo entre sí, de tal forma que una aumenta con relación a la otra, ajustándose significativamente a una línea recta, con un valor para $r = 0.7155$, significativo para $p \leq 0.01$ ($t_{\text{exp}} = 4.69$; 21 g.l.). La representación gráfica de dicha recta con su ecuación se presenta en la figura 31.

Para una mejor interpretación de los resultados, optamos por la realización de una serie de factores de relación de la deoxipiridinolina en los dos extractos analizados (E y G2), en

concreto se procedió a la suma y al cociente de dichos parámetros. Las medias y las desviaciones estándares de los cuatro factores de relación estudiados en el conjunto de la muestra se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Valores medios de los distintos factores de relación entre la deoxipiridinolina en los extractos E y extractos G de muestras individuales de dentina humana.

Parámetro	$\bar{x} \pm DE (n=23)$
Deoxi E+ Deoxi G2	10.02 \pm 3.01
Deoxi E/ Deoxi G2	0.81 \pm 0.21
% deoxi E*+% deoxi G2*	20.70 \pm 5.78
% deoxi E*/% deoxi G2*	1.51 \pm 0.72

* Los porcentajes de deoxipiridinolina se calcularon en relación al total de proteínas de los respectivos extractos.

En último lugar, se realizó un análisis de regresión lineal entre cada una de las variables analizadas y la edad del sujeto, para así poder conocer si existía o no relación entre ellas. Por su interés y trascendencia, se presentan los resultados significativos de las relaciones lineales entre las distintas variables, representándose las rectas de regresión y sus ecuaciones correspondientes en las figuras que siguen. La figura 32 representa la relación lineal positiva entre la deoxipiridinolina en μg en los extractos E y la edad del individuo ($r = 0.5306$, $t_{exp} = 2.93$ (22 g.l.) $p \leq 0.01$). La relación entre la suma de la cantidad de deoxipiridinolina en los extractos E y G2 con la edad se muestra en la figura 33 ($r = 0.4294$, $t_{exp} = 2.178$ (21 g.l.) $p \leq 0.05$). Por último las figuras 34 y 35 representan las rectas correspondientes a las relaciones entre los factores cocientes (valores absolutos de deoxipiridinolina en ambos extractos y los valores porcentuales con relación al total de proteínas) incluyéndose en las figuras las

ecuaciones de las rectas con unos valores de r que fueron significativos en ambos casos (Figura 34: $r = 0.4989$, $t_{exp} = 2.63$ (21 g.l.) $p \leq 0.05$; Figura 35: $r = 0.63005$, $t_{exp} = 3.71$ (21 g.l.) $p \leq 0.01$).

Además, se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA I) para la comparación de los factores de la deoxipiridinolina en los distintos extractos (E y G2) y los cuatro grupos de edad. Este tipo de análisis permite detectar las diferencias entre los valores medios, para una variable determinada y los distintos grupos de edad. En la tabla 7 se exponen los valores medios y las desviaciones estándares para los cuatro factores de relación de las variables y los grupos de edad. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los dos casos en los que se emplearon los valores porcentuales de la deoxipiridinolina en los extractos E y G2 con relación al total de las proteínas, cuando se estudiaron por grupos de edad. En estos dos casos se procedió a un análisis de las comparaciones entre grupos, pudiéndose demostrar en ambos que las diferencias significativas se encontraban al comparar el grupo I de edad con el grupo IV.

Tabla 7. Valores medios de distintos factores de relación entre la deoxipiridinolina en los extractos E y extractos G en distintos grupo de edad.

Parámetro	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
Deoxi E+ Deoxi G2	8.66 ± 1.64	9.09 ± 2.57	10.55 ± 3.56	11.91 ± 3.57
Deoxi E/ Deoxi G2	0.64 ± 0.13	0.85 ± 0.16	0.78 ± 0.25	0.96 ± 0.19
% deoxi E*+% deoxi G2*¹	26.28 ± 5.98	20.58 ± 4.48	17.32 ± 4.16	18.04 ± 4.49
% deoxi E*/% deoxi G2*²	1.06 ± 0.44	1.19 ± 0.18	1.78 ± 0.89	2.06 ± 0.80

* Los porcentajes de deoxipiridinolina se calcularon en relación al total de proteínas de los respectivos extractos. Todos los valores representan la media ± D.E., de 6 casos por cada grupo. Diferencias significativas entre grupos de edad: ¹ $F_{exp} = 4.0392$ (3, 19 g.l.) $p \leq 0.05$; y ² $F_{exp} = 3.3328$ (3, 19 g.l.) $p \leq 0.05$.

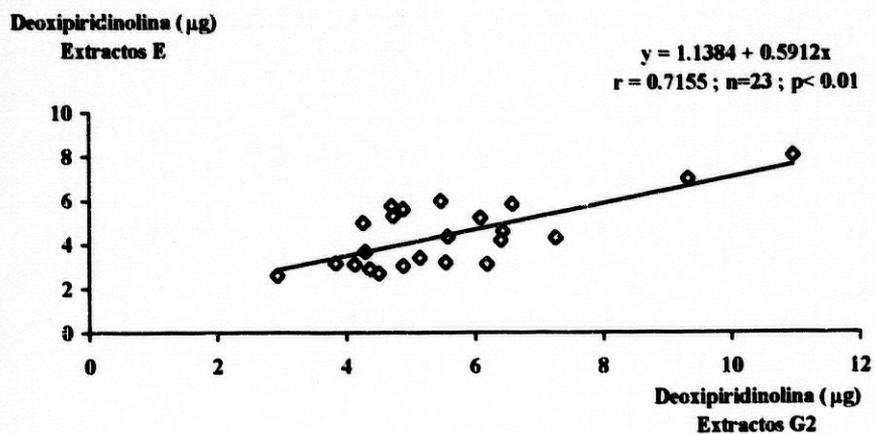


Figura 31.- Relación significativa entre la deoxipiridinolina en los extractos E (µg) y los extractos G2 (µg).

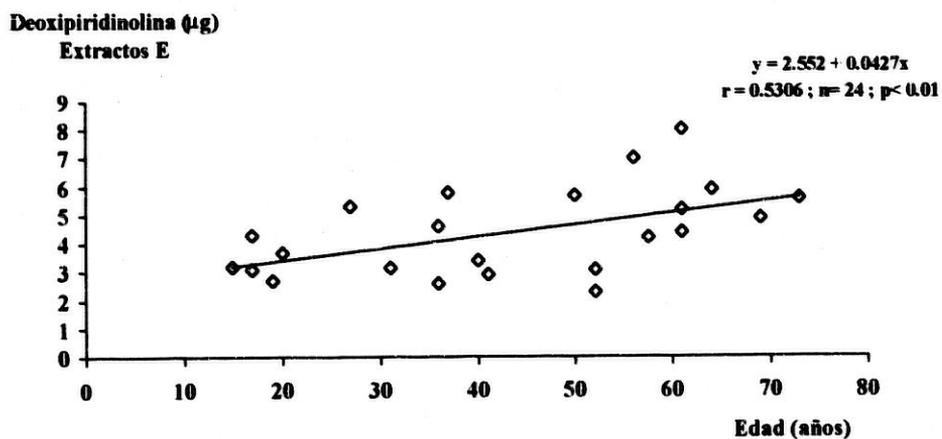


Figura 32.- Relación significativa entre la deoxipiridinolina en los extractos E y la edad del individuo.

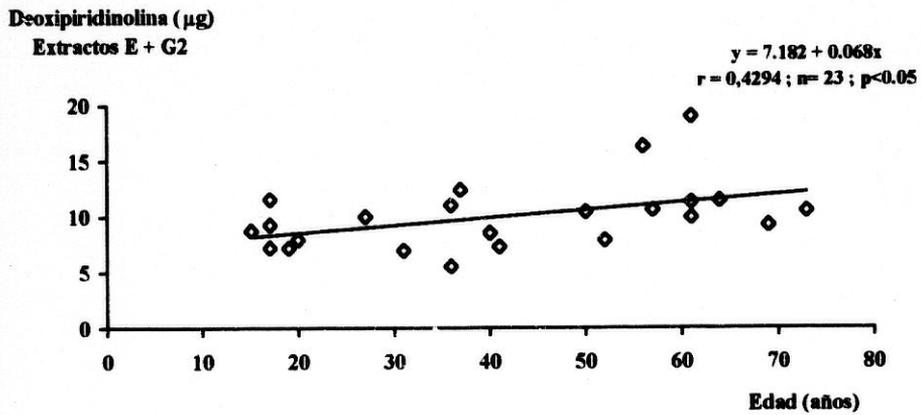


Figura 33.- Relación significativa entre la suma de la deoxipiridinolina (μg) en los extractos E y G2, y la edad del individuo.

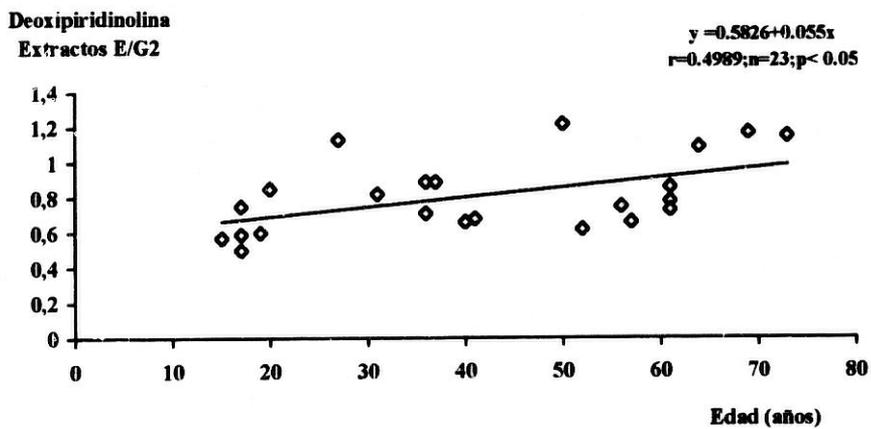


Figura 34.- Relación significativa entre el cociente de los valores absolutos de deoxipiridinolina en los extractos E y G2 y la edad del individuo.

% Deox E / % Deoxi G2

$$y = 0.5077 + 0.0241x$$

$r = 0.63005$; $n = 23$; $p < 0.01$

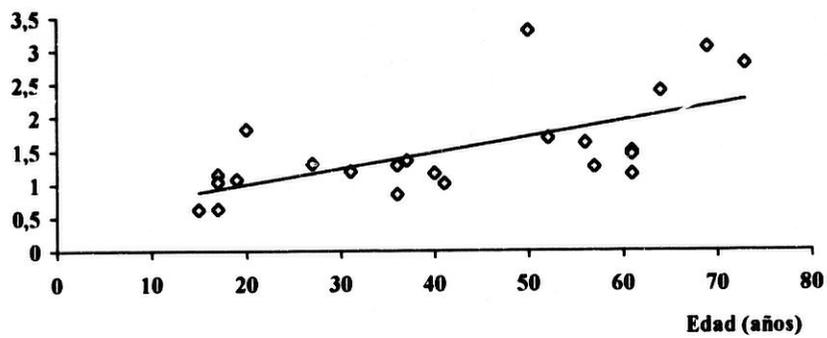


Figura 35.- Relación significativa entre el cociente de los porcentajes de deoxipiridinolina en los extractos E y G2 y la edad del individuo.

V. DISCUSIÓN

La estimación de la edad de un cadáver reciente, así como el establecimiento preciso de la data de restos óseos esqueléticos, son problemas de índole médico-legal que se complementan con el asesoramiento de otras ciencias como la antropología forense, la odontología forense o la biología forense.

Este trabajo aporta una contribución original al progreso de la odontología forense ya que se ha llevado a cabo por primera vez, un estudio de la biología y bioquímica de la dentina humana con aplicaciones forenses. Las particularidades de este tejido y su posible utilidad como indicio biológico han quedado ampliamente justificadas en la introducción de esta memoria. Los datos encontrados en la presente investigación, en lo que se refiere a las proteínas colágenas y no colágenas detectadas en la dentina humana deben someterse a una discusión, desde una perspectiva médico-legal, en la búsqueda de resultados útiles en la práctica forense.

Dos capítulos se desarrollan independientemente en la presente discusión. El primero hace referencia a los hallazgos originales de la presencia de metaloproteasas en la dentina humana y su utilidad en el establecimiento de la edad dentaria del sujeto. En el segundo se discuten los resultados en relación a otras proteínas que se obtienen tras la desmineralización de la pieza

dentaria. Se incluye igualmente la discusión de los datos obtenidos con la deoxipiridinolina, cadena no-reducible del colágeno, en la dentina humana y su utilidad para la estimación de la edad.

1. LAS METALOPROTEASAS EN LA DENTINA HUMANA

Las metaloproteasas son enzimas capaces de degradar la matriz extracelular, estando presentes en multitud de tejidos, de distintas especies animales, incluyendo la humana (Overall, 1991; Matrisian, 1992; Birkedal-Hansen y cols., 1993). Se han descrito nueve tipos de metaloproteasas, clasificadas en tres grupos principales: las colagenasas, las gelatinasas (una de 72 kDa y otra de 92 kDa) y las estromelisininas (Overall, 1991; Birkedal-Hansen y cols., 1993; Overall, 1994). De todas ellas quizá sean las gelatinasas, de 72 kDa y de 92 kDa, las que más se han estudiado. Ambas proteínas degradan de forma específica las cadenas alfa del colágeno desnaturalizado (gelatina), y hasta el momento presente se sabe que son secretadas por fibroblastos de la piel, queratinocitos, condrocitos, células endoteliales, monocitos y osteoblastos, entre otras células, tal y como ha sido ampliamente expuesto en la Introducción de esta memoria. También se ha descrito que las gelatinasas degradan el colágeno tipo IV soluble (Salo, Liotta y Tryggvason, 1983; Salo, Turpeenniemi-Hujanen y Tryggvason, 1985); observación que refuerza la hipótesis del papel de estas enzimas en la degradación de la membrana basal y por tanto, se ha relacionado con la capacidad expansiva, invasiva y metastásica de las células tumorales.

Las investigaciones llevadas a cabo sobre la presencia de metaloproteasas en el tejido

mineralizado humano se refieren sobre todo al hueso y a la posible función que desempeñan estas enzimas en el desarrollo y remodelación de la estructura ósea (Fleniken y Williams, 1990; Vaes, Delaisse y Eeckhout, 1992; Birkedal-Hansen y cols., 1993)

Con respecto a los tejidos dentarios, se han relacionado las gelatinasas con el desarrollo dentario, al comprobar la existencia de ambas gelatinasas (72 y 92 kDa) en los gérmenes dentarios humanos (Heikinheimo y Salo, 1995). Además, se ha propuesto que las metaloproteasas puedan estar implicadas en los procesos de mineralización dentaria, habiéndose detectado enzimas con actividad gelatinolítica en el esmalte bovino, porcino y de rata (DenBesten y Heffernan, 1989; Ishiguro y cols., 1994) así como en el humano (Overall y Limeback, 1988).

En la dentina porcina se han detectado proteínas con actividad gelatinolítica (Fukae, Kaneko y Shimizu, 1991; Fukae, Tanabe y Yamada, 1994), mientras que en la dentina humana no se ha podido aún establecer con absoluta certeza la presencia de metaloproteasas, existiendo tan solo los estudios preliminares realizados recientemente en dentina humana (Martín de las Heras, Valenzuela, Villanueva, Overall, 1997) en los que se sugiere la presencia de proteínas con actividad gelatinolítica.

La dentina a diferencia del hueso, es un tejido estable metabólicamente, que no se ve sometido prácticamente a procesos reabsortivos y formativos una vez concluido su desarrollo. Por consiguiente, una vez que la dentina se ha formado, las modificaciones que se producen en su matriz orgánica estarán relacionadas con otro tipo de factores entre los que quizás los vasculares sean los más importantes. La obliteración paulatina de la cámara pulpar por aposición y formación de dentina secundaria, producirá fenómenos de hipoxia/isquemia que

se traducirán en alteraciones de la matriz orgánica de la dentina. Este tipo de acontecimientos deben reflejar el envejecimiento de la pieza dentaria.

Debido a que una de las funciones principales de las metaloproteasas consiste en degradar algunos componentes de la matriz orgánica, parece justificado estudiar estas enzimas proteolíticas y sus cambios para el establecimiento de la edad.

1a. Detección e identificación de metaloproteasas en la dentina humana

En el presente trabajo tuvo que llevarse a cabo la adaptación de un procedimiento de extracción secuencial que nos permitiera obtener un fraccionamiento selectivo de las proteínas de la dentina humana. Tras el fraccionamiento proteico se modificó una técnica enzimográfica, que perseguía la detección e identificación de proteínas con actividad gelatinolítica en el tejido dentinario y que aún no habían sido descritas en la dentina humana.

El procedimiento de extracción empleado, modificación de los propuestos por Linde, Bhowm y Butler (1980), Rahima y Veis (1988) y Nagata y cols., (1991), permitía la obtención de tres extractos consecutivos de fracciones proteicas: extractos de guanidina (G1), extractos obtenidos en la desmineralización de las piezas dentaria con EDTA (E), y extractos de guanidina en las piezas desmineralizadas (G2).

Los resultados obtenidos en los enzimogramas nos permiten decir que se detectó actividad gelatinolítica en los extractos G1 y G2 de la dentina humana, mientras que no se encontró ninguna actividad en los extractos EDTA (Figuras 7 y 10). La ausencia de actividad

gelatinolítica en los extractos EDTA puede deberse a que los agentes quelantes interactúan con el zinc, y como éste es un elemento imprescindible para la activación de la enzima, se origina una potente inhibición de las metaloproteasas (Birkedal-Hansen y cols., 1993). Sin embargo, la adición de una solución 2 mM de $ZnSO_4$ en el medio de incubación de la gelatinasa para conseguir la reactivación de la enzima, no alteró este resultado (Overall, comunicación personal).

La siguiente cuestión que se nos planteó se refiere a la detección de enzimas con actividad gelatinolítica antes y después de la desmineralización de la pieza dentaria; extractos G1 y G2, respectivamente. En concreto, las enzimas presentes en los extractos G2 estarían inmersas en la trama mineral de la dentina y por tanto, se detectarían al solubilizar los extractos desmineralizados en un medio adecuado. El hecho de que se hayan detectado metaloproteasas en los extractos G2 de la dentina, nos induce a pensar que estas proteínas estén implicadas en los procesos de mineralización de la pieza dentaria.

La identificación de las enzimas con actividad gelatinolítica se llevó a cabo empleando una técnica de enzimografía que suponía la adición de gelatina en el gel, sustrato específico pero no exclusivo de las gelatinasas, ya que también actúan sobre ella otro tipo de metaloproteasas como las colagenasas y las estromelisin. Junto a la capacidad proteolítica sobre el sustrato, la identificación se puede hacer al conocer el peso molecular de la proteína. Con esta finalidad en cada enzimografía se incorporó una mezcla de proteínas (estándars) de pesos moleculares conocidos. Disponíamos además de un estándar para la gelatinasa de 72 kDa, facilitado por el Dr. Overall, de la Universidad de la Columbia Británica en Vancouver (Canadá). El estándar se obtuvo a partir de células de osteosarcoma de rata que habían sido cultivados en presencia de concanavalina A. El desarrollo por enzimografía de dicho estándar permite visualizar las dos

formas de la gelatinasa: la forma latente de un peso molecular aproximado de 66 kDa y la forma activa de la enzima de 59 kDa.

Nuestro estudio permitió la identificación indubitada de la gelatinasa de 72 kDa en la dentina humana. Aunque no fue posible la certeza absoluta en lo que se refiere a la identificación del resto de las metaloproteasas detectadas, estudiando su peso molecular hemos podido obtener una información suficiente sobre los patrones y tipos de estas proteínas gelatinolíticas en la dentina humana. Por el desarrollo conjunto de estándares de peso moleculares conocidos, hemos detectado bandas de actividad gelatinolítica con pesos moleculares compatibles con la gelatinasa de 92 kDa, la colagenasa intersticial de 53 kDa y la estromelina tipo I de 54 kDa, además de otras fracciones de pesos moleculares menores que podrían corresponder con productos de degradación de las gelatinasas. Estos estudios podrían complementarse en el futuro mediante la realización de técnicas enzimográficas en las que se incorporaran otro tipo de sustrato diferente a la gelatina como la caseína o la fibronectina, seleccionándose así las enzimas que actúan sobre estos compuestos. En unión a estas técnicas se podrían utilizar activadores o inhibidores específicos de las distintas metaloproteasas (Birkedal-Hansen y cols., 1993). Por último, la identificación se podría completar mediante el empleo de técnicas de *western-blot*, enfrentando las proteínas transferidas en membranas con anticuerpos específicos marcados para permitir así su visualización.

Todo lo anteriormente expuesto hace referencia a las proteínas obtenidas de dientes individuales de exodoncias recientes. Cuando se analizaron muestras procedentes de un *pool* de dientes de restos esqueléticos, los patrones de proteínas proteolíticas fueron diferentes. De hecho, no se detectó actividad gelatinolítica en los rangos de pesos moleculares

correspondientes a las metaloproteasas discutidas. Tan sólo pudo ser observada una banda con actividad gelatinolítica de poca intensidad en el frente de migración electroforética (figura 14).

1b. Patrones de proteínas con actividad gelatinolítica con relación a la edad del individuo

Los extractos de guanidina (G1) de muestras de dentina procedentes de piezas dentarias de exodoncias recientes de 24 individuos de distintas edades, fueron analizadas por enzimografía con gelatina. En las muestras de sujetos del grupo I, aquéllos que tenían menos de 20 años, se detectaron bandas de actividad gelatinolítica (figura 19) que se identificaron como gelatinasa de 72 kDa, siendo predominante la expresión en su forma activa (59 kDa). En algunas muestras, de este grupo, aparecen bandas de actividad gelatinolítica a pesos moleculares más bajos (aproximadamente 30 kDa), que son compatibles con fragmentos degradados de la gelatinasa.

En el grupo II, correspondiente a sujetos entre 21 y 40 años (figura 20), se puede apreciar en la mayoría de las muestras la forma activa de la gelatinasa de 72 kDa, más formas degradadas de la enzima a menores pesos moleculares. En este grupo aparece, sin embargo, en alguna de las muestras, una banda difuminada, poco nítida, que se puede estimar se encuentra a aproximadamente 90 kDa y que presumiblemente podría ser la gelatinasa de 92 kDa.

Este patrón proteolítico comienza a cambiar a partir del grupo III (sujetos entre 41 y 60 años de edad) tal y como se ve en la figura 21. En líneas generales, en este grupo de edad, la forma activa de la gelatinasa se ha detectado en un menor número de casos, en comparación con los

dientes de sujetos de menos de 40 años. Además, se detectó en un sólo caso una banda gelatinolítica de peso molecular aproximado de 54 kDa, que podría corresponder a la colagenasa (intersticial) o a la estromelisina tipo I, no habiendo aparecido en los grupos anteriores.

El último grupo (mayores de 61 años) presenta un patrón parecido al anterior en el que se detecta de forma más marcada y en mayor número de casos, la presencia de la banda gelatinolítica compatible con la colagenasa o la estromelisina (figura 22). También se pueden identificar en este grupo de edad, aunque con una intensidad menor, las formas de gelatinasa activa y latente, formas degradadas de la enzima, y por último, el patrón difuso a 90 kDa de peso molecular.

Estos patrones proteicos detectados en los extractos G1, no se reprodujeron en su totalidad cuando se analizaron los extractos G2, tanto para la gelatinasa de 72 kDa como para el resto de metaloproteasas. En el grupo I de edad la forma activa de la gelatinasa de 72 kDa se presentó de manera predominante en todas las muestras (figura 23) para ir reduciendo su presencia con la edad (figuras 24) y desaparecer cualquier tipo de actividad gelatinolítica en las muestras de sujetos mayores de 41 años (figuras 25 y 26). En ninguno de los grupos se detectaron bandas de actividad gelatinolítica de pesos moleculares compatibles con la colagenasa intersticial, estromelisina tipo I o gelatinasa de 92 kDa.

Tras el análisis de estos resultados se pueden plantear diversas cuestiones relacionadas con el patrón y localización de estas proteínas, con actividad gelatinolítica, en la dentina humana y el envejecimiento del sujeto. El hecho de encontrar patrones diferentes de actividad gelatinolítica en los extractos G1 y G2 de la pieza dentaria, sugiere una localización y posible implicación

funcional de estas proteínas en el tejido dentario. El conocimiento de los patrones proteicos obtenidos tras la desmineralización de la pieza (G2), nos aporta información sobre los cambios producidos en las proteínas implicadas en la trama mineral de dicho tejido. Dos son las conclusiones que se pueden obtener en este sentido; una de ellas es el predominio de la gelatinasa de 72 kDa en sujetos jóvenes y la otra, la ausencia de actividad de dicha enzima en sujetos mayores de 40 años. Por consiguiente, aunque se desconocen las funciones específicas de estas proteínas en este tejido, el hecho de que aparezca en gente joven nos induce a pensar la relación que debe existir entre esta proteína y la presencia de una matriz extracelular más extensa en estos sujetos. De hecho, los estudios morfológicos clásicos de piezas dentarias humanas corroboran el aumento de la trama mineral en sujetos mayores al incrementarse la formación de dentina secundaria y dentina transparente. Además, cabe destacar la ausencia en los extractos G2 de todas las muestras de proteínas con actividad gelatinolítica diferentes a la gelatinasa de 72 kDa.

La segunda aportación de interés para el conocimiento de los cambios ocurridos en los patrones de actividad gelatinolítica, se obtiene del análisis de los resultados de los extractos G1. La presencia mayoritaria de la forma activa de la gelatinasa de 72 kDa en el primer grupo de edad es indicativa de la mayor funcionalidad de esta enzima en sujetos jóvenes. Además, la aparición de otras formas de metaloproteasas como la colagenasa intersticial, estromelina tipo I y la gelatinasa de 92 kDa en individuos mayores de 40 años, es sugerente de la producción de cambios en los componentes de la matriz orgánica de la dentina humana con el paso de los años, posibilitando la aparición de nuevos sustratos específicos sobre los que actuarían estas enzimas. No existen datos en la literatura científica que nos permitan contrastar estos resultados.

Estos hallazgos tienen, a nuestro entender, una doble trascendencia. De una parte nos permite contribuir al conocimiento de la bioquímica de la dentina humana al haberse detectado enzimas proteolíticas, del tipo de las metaloproteasas, en este tejido, hecho que hasta el momento presente no había sido observado. Además, las modificaciones de los tipos y características de las metaloproteasas en la dentina humana con la edad del sujeto suponen una aportación indiscutible al establecimiento de la edad dental del sujeto y, en última instancia, a la edad cronológica del mismo.

2. PROTEÍNAS EXTRAÍDAS EN LA DESMINERALIZACIÓN CON EDTA DE LA DENTINA HUMANA

El proceso de extracción de las proteínas dentinarias implica la desmineralización del tejido con EDTA a alta concentración, de tal forma que el quelante se une con el calcio de la hidroxiapatita de la dentina liberándose así las proteínas que están unidas íntimamente a la trama mineral. Se perseguía obtener un extracto formado por proteínas que se encontraran en íntima relación con la fase mineral, y que estuviera presumiblemente compuesto de forma mayoritaria por la fosfoproteína altamente fosforilada.

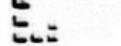
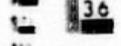
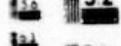
Las proteínas no colágenas más abundantes en la dentina de todas las especies animales son las fosfoproteínas. La mayoría de los trabajos de investigación sobre este tipo de proteínas dentinarias se han llevado a cabo en la especie bovina y en los roedores, no existiendo prácticamente ninguna investigación que haya abordado el análisis en el humano. Como ya ha quedado ampliamente descrito en la introducción, la fosfoproteína altamente fosforilada (PP-H)

es exclusiva del tejido dentario no habiéndose detectado en el hueso (Linde, 1988; Veis, 1985).

Se acepta que una función prioritaria de la fosfoproteína sea su participación en los procesos de mineralización de la dentina. De hecho, estas proteínas son transportadas a través de los procesos odontoblásticos y secretadas directamente en el frente de mineralización, es decir, en la interfase pre(entina-dentina (Jontell y Linde, 1983; MacDougall, Zeichner-David y Slavkin, 1985; Nakamura y cols., 1985; Rabie y Veis, 1991). Además, su intensa unión a los iones calcio es una prueba más del papel de esta proteína en la formación de la dentina (Zaneti y cols., 1981; Stetler-Stevenson y Veis, 1987).

2a. Detección e identificación de las proteínas. Purificación y caracterización parcial.

Hasta el momento presente ha sido posible la identificación de las PP-H de ciertas especies animales. En la dentina de incisivos de rata, tras la desfosforilación del enzima, se han detectado dos moléculas de PP-H, mientras que sólo existe una en la dentina bovina (Linde, 1988; Linde, Bhowan y Butler, 1980). También se conoce el peso molecular de estas proteínas, oscilando entre 30 kDa y 100 kDa para las PP-H de las ratas y entre 35 kDa y 158 kDa para las PP-H de los bovinos (Jontell, Pertoft y Linde, 1982; Jontell y Linde, 1983; Stetler-Stevenson y Veis, 1983; Stetler-Stevenson y Veis, 1983). Estas variaciones pueden deberse a la degradación de la proteína durante los procesos de extracción y/o al comportamiento irregular de estas proteínas en los desarrollos electroforéticos en geles de poliacrilamida (McDougall, Slavkin y Zeichner-David, 1992).



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

es exclusiva del tejido dentario no habiéndose detectado en el hueso (Linde, 1988; Veis, 1985).

Se acepta que una función prioritaria de la fosfoproteína sea su participación en los procesos de mineralización de la dentina. De hecho, estas proteínas son transportadas a través de los procesos odontoblásticos y secretadas directamente en el frente de mineralización, es decir, en la interfase predentina-dentina (Jontell y Linde, 1983; MacDougall, Zeichner-David y Slavkin, 1985; Nakamura y cols., 1985; Rabie y Veis, 1991). Además, su intensa unión a los iones calcio es una prueba más del papel de esta proteína en la formación de la dentina (Zaneti y cols., 1981; Stetler-Stevenson y Veis, 1987).

2a. Detección e identificación de las proteínas. Purificación y caracterización parcial.

Hasta el momento presente ha sido posible la identificación de las PP-H de ciertas especies animales. En la dentina de incisivos de rata, tras la desfosforilación del enzima, se han detectado dos moléculas de PP-H, mientras que sólo existe una en la dentina bovina (Linde, 1988; Linde, Bhowm y Butler, 1980). También se conoce el peso molecular de estas proteínas, oscilando entre 30 kDa y 100 kDa para las PP-H de las ratas y entre 35 kDa y 158 kDa para las PP-H de los bovinos (Jontell, Pertoft y Linde, 1982; Jontell y Linde, 1983; Stetler-Stevenson y Veis, 1983; Stetler-Stevenson y Veis, 1983). Estas variaciones pueden deberse a la degradación de la proteína durante los procesos de extracción y/o al comportamiento irregular de estas proteínas en los desarrollos electroforéticos en geles de poliacrilamida (McDougall, Slavkin y Zeichner-David, 1992).

La PP-H es la proteína más ácida de la dentina, demostrándose un punto isoelectrico de 1,1 para la fosfoproteína de la dentina de rata (Jonsson y cols., 1978).

A la vista de que no existían datos sobre la fosfoproteína en la dentina humana y por el indudable interés que podría tener su conocimiento para la odontología forense, nos propusimos proceder a una purificación parcial de la proteína y su posterior caracterización. Con esta finalidad, se adaptó un procedimiento de purificación de las fosfoproteínas por cromatografía de intercambio iónico, ideado para otras especies animales (Butler y cols., 1981). Por consiguiente, se utilizó una columna de DEAE-Sepharose de intercambio aniónico, de tal manera que se pudiera obtener un fraccionamiento proteico que permitiera la separación de una fracción ácida donde presumiblemente se localizarían las fosfoproteínas altamente fosforiladas. Los resultados obtenidos, aunque únicos y originales en la especie humana, pueden interpretarse a la luz de otros trabajos realizados en especie bovina, siendo éste el modelo de mineralización dentaria más parecido a nuestra especie. Los resultados de Linde (1988) obtenidos a partir del análisis de la dentina bovina empleando procedimientos similares tanto de extracción como de separación de las proteínas, son comparables a los nuestros. En nuestro caso, como paso previo a la obtención de fracciones purificadas de proteínas de la dentina humana, fue necesario la optimización de las condiciones cromatográficas, con especial énfasis al ajuste del gradiente lineal que permitiera la separación adecuada.

El fraccionamiento secuencial de proteínas de la dentina humana permitió la separación de 4 picos mayoritarios, tal y como se expone en la figura 15. El primer pico se obtuvo antes de iniciar el gradiente lineal con CINA, mientras que el último pico eluido tras el aumento de la carga iónica de la solución de elución, correspondería a las proteínas más ácidas de la muestra. Este cromatograma descrito es bastante similar al patrón encontrado por Linde (1988)

en la dentina bovina, excepto por la separación de proteoglucanos que no fue posible realizar en la dentina humana incluso empleando altas concentraciones de ClNa. A pesar de pequeñas diferencias entre ambos cromatogramas existen fuertes similitudes, destacándose la práctica coincidencia en la elución del pico mayoritario tras un gradiente lineal de ClNa a una molaridad de 0.33 M para la dentina bovina y de 0.5 M para la humana.

El desarrollo electroforético posterior de las fracciones correspondientes al pico mayoritario de nuestro cromatograma, puede observarse en la figura 16. Cabe destacar la presencia de una banda única e intensa de un peso molecular aproximado de 60 kDa. La reacción altamente positiva con una coloración azul de la banda tras la tinción con *stains-all* (Green, Pastewka y Peacock, 1973), reafirma que nos encontramos ante una proteína altamente ácida.

En un paso posterior, se realizó una caracterización inmunológica de las proteínas dentinarias extraídas, con la finalidad de conocer la compatibilidad inmunológica entre esta proteína y las principales constituyentes del suero humano. El ensayo basado en una inmunoelectroforesis permitió descartar la identidad sérica de esta proteína.

Se llevó a cabo, además, un procedimiento idéntico para la purificación de los extractos EDTA procedentes de restos esqueléticos. El patrón cromatográfico detectado (figura 17), fue muy similar al obtenido para dientes de exodoncias recientes. Sin embargo, fue evidente la ausencia de los dos picos minoritarios tras el gradiente, manteniéndose exclusivamente el pico correspondiente a la fracción proteica más ácida. La elución de este pico se consiguió a la misma molaridad de gradiente lineal con ClNa (0.5 M) que en el caso de dientes de exodoncias recientes.

La cuantificación de proteínas en cada uno de los picos en los dos ensayos experimentales (exodoncias recientes/restos esquelizados), nos permitió detectar algunas diferencias entre ellos. Partiendo de iguales cantidades de proteínas en ambos ensayos se recuperó tres veces menos cantidad para los dientes de restos óseos en comparación a los de exodoncias recientes. Y esto fue así tanto para el pico previo al gradiente como para el mayoritario posterior. Los resultados obtenidos coinciden con los estudios existentes sobre contenido proteico en restos óseos fosilizados (Tuross y cols., 1989), así como los que han sido llevados a cabo sobre tejido óseo humano de poblaciones contemporáneas (Castellano, 1976). Se ha detectado por tanto, una disminución en la cantidad de proteínas de la dentina que está relacionada con el intervalo postmortem.

Por último, se procedió a la práctica de un desarrollo electroforético de las fracciones eluidas correspondientes a los dos picos mayoritarios, el cual se presenta en la figura 18. La fracción proteica correspondiente al pico posterior al inicio del gradiente, presenta una banda principal del mismo peso molecular (60 kDa) a la encontrada con los dientes de exodoncias recientes, y que presumiblemente coincide con la misma proteína. Además presenta diversas bandas minoritarias que no han sido identificadas, pero que podría tratarse de proteoglucanos o de productos de degradación del colágeno. Estos resultados son compatibles con los obtenidos por otros autores en huesos humanos fosilizados (Tuross y cols., 1989; Tuross, 1991)

Por consiguiente, tanto en los extractos EDTA de dientes recientes como en los procedentes de restos esquelizados se aisló una proteína altamente ácida (compatible con la fosfoproteína altamente fosforilada), la última en eluir en la cromatografía. Dicha proteína presenta un peso molecular aproximado de 60 kDa, y no mostró identidad inmunológica con ninguna de las proteínas del suero humano.

2b. Patrones de proteínas con relación a la edad.

Una de las cuestiones que nos planteábamos en la hipótesis inicial del trabajo era si se producía o no un cambio en la fosfoproteína dentinaria con la edad del sujeto. Los extractos EDTA de todas las muestras procedentes de dientes individuales de sujetos de distintas edades se sometieron a desarrollos electroforéticos convencionales (figuras 27 a 30), observándose una banda más intensa y predominante de un peso molecular aproximado de 60 kDa.

En la tabla 8 se presentan los resultados de la presencia o ausencia de esta proteína en función de la edad. Mientras que en el grupo de gente joven se encontró dicha banda en el 100% de la muestra, este porcentaje descendió (66%) cuando se analizaron muestras de sujetos de más de 20 años.

Tabla 8. Presencia (+) o ausencia (-) y porcentajes de positividad de la proteína de 60 kDa en extractos EDTA procedentes de muestras individuales de dentina humana en los distintos grupos de edad

Muestras	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	+	-	-
4	+	+	+	-
5	+	+	-	+
6	+	+	+	+
Porcentaje	100 %	66 %	66 %	66 %

Sin embargo, no creemos que este sea un marcador adecuado para el establecimiento de la edad de un sujeto ya que se ha encontrado esta proteína en dentina humana de todos los grupos de edad quizá por su íntima unión con la matriz mineral de la dentina que le confiere una gran estabilidad.

2c. La deoxipiridinolina de la dentina humana.

El colágeno tipo I constituye el soporte o la matriz estructural del componente orgánico del tejido dentinario, representando más del 90% de su composición. Para estabilizar la red de colágeno existen **cadena cruzadas covalentes** entre sus moléculas (Eyre, 1987). Sin embargo, se aprecia variabilidad en los tipos de cadenas cruzadas dependiendo del grado de maduración del tejido dentario. Durante el desarrollo del tejido conectivo, la denominada dihidroxilisnonorleucina representa la cadena cruzada reducible mayoritaria en la dentina y hueso (Mechanic, Gallop y Tanzer, 1971). En los tejidos conectivos maduros aparecen cadenas cruzadas no reducibles, piridinolina y deoxipiridinolina. La primera se detecta en mayor cantidad (Kuboki y cols., 1981), mientras que la deoxipiridinolina parece ser exclusiva del hueso y dentina (Eyre, Koob y Van Ness, 1984; Robins y Duncan, 1987). Existen indicios razonables que permiten decir que las cadenas piridínicas son producto de maduración de las cadenas cruzadas reducibles (Eyre, 1980).

Walters y Eyre (1983) pusieron de manifiesto un aumento de las cadenas cruzadas piridínicas relacionado con la edad. Fueron estos hallazgos los que nos indujeron a pensar en la utilidad de la determinación de estos marcadores en el establecimiento de la edad de un individuo y por tanto su aplicación en las ciencias forenses.

Para la determinación de la cadena cruzada no reducible específica de la dentina, la deoxipiridinolina, fue necesario la adaptación de un procedimiento de solubilización adecuado del colágeno dentinario humano. La modificación de la metodología de Kuboki y colaboradores (1993), nos permitió obtener una fracción soluble del colágeno por hidrólisis enzimática con tripsina. La deoxipiridinolina de la dentina humana fue determinada en los hidrolizados por una adaptación y modificación de un sistema de enzaimmunoanálisis para la cuantificación de este compuesto en orina humana.

Se procedió a la determinación de la deoxipiridinolina de los extractos E y G2 de toda la muestra. La elección de estos extractos se realizó en base a la íntima relación del colágeno con la hidroxiapatita, siendo imprescindible al menos la desmineralización de las piezas para la solubilización de esta molécula. Hasta el momento presente, no se había logrado la determinación de estas cadenas cruzadas de la dentina humana, ni por el procedimiento de extracción que se propone en este trabajo, ni por la técnica de cuantificación aplicada.

Además, se tuvieron en consideración no sólo los valores absolutos de estas moléculas en los distintos extractos de dentina, sino que fue necesario relacionarlo con la cantidad de proteínas totales. De alguna forma, la concentración de la deoxipiridinolina en uno y otro extracto no deberían ser variables independientes. Es más, cuando se relacionaron estos dos parámetros entre sí, es decir, la cantidad de deoxipiridinolina en los extractos E de una pieza dentaria y el extracto G2 de la misma pieza, se apreció que ambas variables estaban significativamente relacionadas. La demostración de una interdependencia entre las variables, nos confirmó la conveniencia de expresar los valores en factores que relacionaran ambas.

Tras el análisis de las muestras, se han podido detectar cambios en la cantidad de deoxipiridinolina en relación a la edad del sujeto. De hecho, se han observado correlaciones significativas entre la edad (variable x) y las siguientes variables: deoxipiridinolina en los extractos E (figura 32); suma de la cantidad de deoxipiridinolina en los extractos E y G (figura 33); cociente entre los valores absolutos de deoxipiridinolina en ambos extractos (figuras 34); y cociente de los valores porcentuales de la deoxipiridinolina en ambos extractos con relación al total de proteínas (figura 35).

Del análisis conjunto de los modelos lineales que resultaron significativos, se puede deducir que todos ellos muestran una tendencia similar, con valores de coeficiente de correlación del mismo orden. La utilización de cualquiera de estos modelos es factible para la estimación de la edad dental en un supuesto práctico.

Para un conocimiento más profundo de la utilidad de estos marcadores en la estimación de la edad, se calcularon la especificidad y sensibilidad de este método. A título de ejemplo, en la figura 36 se muestran los valores del cociente de los porcentajes de deoxipiridinolina en los extractos E y G2 en relación a las proteínas totales, en función de la edad. Valores inferiores a 1.4 de dicho cociente, nos permitió obtener unos valores de sensibilidad del 92% y de especificidad del 80%, para clasificar a un sujeto como menor de 45 años.

% Deox E / % Deoxi G2

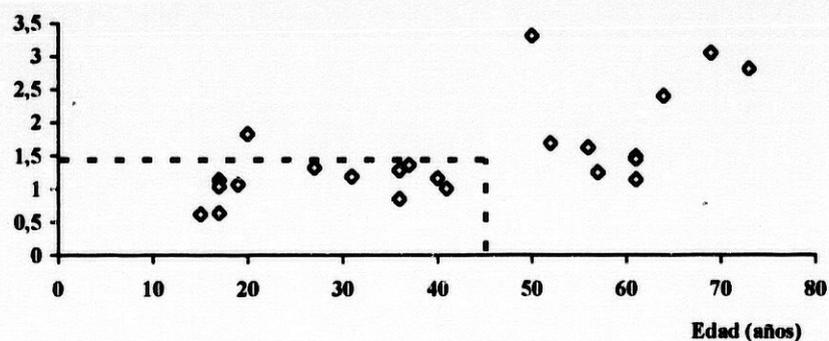


Figura 36.- Cociente de los porcentajes de deoxipiridinolina en los extractos E y G2 y la edad del individuo. La sensibilidad y la especificidad se han calculado a partir de los puntos de corte marcados en la gráfica (1.4 valor del cociente de deoxipiridinolina y 45 años).

Sensibilidad= verdaderos positivos/verdaderos positivos + falsos negativos= 12/13= 0.92.

Especificidad= verdaderos negativos/ verdaderos negativos+ falsos positivos= 8/10= 0.80.

Los datos encontrados al comparar los distintos valores de la deoxipiridinoína en grupos de diferentes edades son los esperados, ya que sólo se han detectado diferencias significativas en uno de los factores de corrección. Esto puede ser debido al hecho de que la edad de un sujeto es un proceso continuo en la que una agrupación discrecional de la muestra puede resultar incorrecta para un análisis adecuado.

Para finalizar, nos gustaría destacar que es la primera vez que se realiza un trabajo de investigación para el estudio de los componentes bioquímicos en la dentina humana con fines forenses. De hecho, los trabajos publicados a este respecto estudian los constituyentes de la matriz orgánica en otras especies animales, como la bovina o la rata, no existiendo ningún trabajo centrado de forma exclusiva en el estudio de la dentina humana. Además, pensando en la aplicación de los resultados en el campo de las ciencias forenses nos propusimos partir de un solo diente humano para lo que fue necesario adecuar los métodos de extracción de las proteínas dentinarias de otras especies animales en las que se partían de concentraciones más altas de proteínas. El proceso de extracción es complejo, largo y tedioso, sin embargo y tras los resultados presentados en esta investigación, se puede proponer un protocolo de extracción de proteínas simplificado, en el que se obtendría un único extracto EDTA, que representaría al resto, y continuaríamos la desmineralización para posteriormente finalizar con la segunda extracción con guanidina. Por otra parte, tenemos la convicción de que el proceso de extracción de proteínas de la dentina humana propuesto es eficaz, habiéndose obtenido proteínas no degradadas por la adición de inhibidores de las proteasas en todos los medios de extracción.

Este procedimiento de extracción secuencial de fracciones proteicas puede ser además, adaptado a otros tejidos mineralizados como el hueso. De hecho, puede aplicarse este procedimiento y determinaciones proteicas a otras materias de interés médico-legal. Por ejemplo, la determinación de metaloproteasas en tejido óseo en el que se haya producido fenómenos reparativos, como es el caso de las fracturas antemortem frente a las que suceden tras la muerte del sujeto.

Consideramos que el trabajo de investigación llevado a cabo, supone una contribución de la odontología al avance de las ciencias forenses en la resolución de ciertos problemas médico-judiciales. El conocimiento de los patrones proteicos dentinarios, los cambios que estos sufren con la edad del sujeto o con el intervalo postmortem, dan luz a la resolución de problemas relacionados con la identificación, la patología forense o el cronotanodiagnóstico.

Se propone un marcador novedoso de envejecimiento dentinario: la deoxipiridinolina. El incremento de la deoxipiridinolina en la dentina humana con la edad del sujeto debe incorporarse como un parámetro de utilidad en la práctica forense para la estimación de la edad dental. La aportación del conocimiento de estos cambios bioquímicos, supone una complementación indudable a los métodos clásicos morfológicos para la estimación de la edad dentaria.

El diente, como tejido de interés forense, ha sido clásicamente objeto de estudios morfológicos, sin embargo, el trabajo realizado complementa los datos estructurales y los enriquece desde la vertiente de la bioquímica forense. Por otra parte, los resultados obtenidos y la interpretación de los mismos plantean un sinfin de cuestiones que, aún sin resolver, suponen un reto para el futuro.

VI. CONCLUSIONES

Primera: Se propone un procedimiento de extracción de proteínas a partir de la dentina, que consigue un fraccionamiento secuencial eficaz de los componentes proteicos de la matriz orgánica de la dentina humana. Esta metodología ha permitido un mejor conocimiento de la bioquímica de la dentina humana.

Segunda: Se han detectado por vez primera proteínas con actividad gelatinolítica en la dentina humana. La gelatinasa de 72 kDa, en su forma activa y laterite, se ha podido identificar en extractos de guanidina obtenidos antes y después de desmineralizar la pieza dentaria con EDTA.

Tercera: Con la edad del individuo, los patrones de proteínas gelatinolíticas de la dentina humana se modifican.

Tras la desmineralización de la dentina (extractos G2), se observa un predominio de la gelatinasa de 72 kDa en sujetos jóvenes, mientras que se advierte la ausencia de toda actividad de dicha enzima en sujetos mayores de 40 años.

En los extractos de guanidina antes de la desmineralización de la muestra, destaca el predominio de la forma activa de la gelatinasa de 72 kDa en dientes jóvenes frente a los de sujetos de más de 40 años, en los que aparecen otras formas de metaloproteasas compatibles con la colagenasa intersticial, la estromelina tipo I y la gelatinasa de 92 kDa.

Cuarta: Una purificación parcial de los extractos EDTA de la dentina humana de dientes de exodoncias recientes por cromatografía en columna de DEAE-Sepharose y posterior electroforesis, permitió la obtención de una proteína altamente ácida, de 60 kDa de peso molecular aproximado, que no mostró identidad inmunológica con ninguna de las proteínas del suero humano.

Quinta: El mismo procedimiento de purificación aplicado a dientes procedentes de restos humanos esqueletizados de cadáveres que habían permanecido inhumados durante 30 años, permitió obtener una proteína de las mismas características que la de dientes de exodoncias recientes.

Sexta: En extractos EDTA sin purificar de dentina humana procedentes de exodoncias recientes, se ha detectado una proteína mayoritaria de aproximadamente 60 kDa de peso molecular. No ha sido posible encontrar cambios significativos de esta proteína con la edad del individuo.

Séptima: Existen diferencias en los patrones proteicos de la dentina humana en dientes procedentes de restos óseos esqueletizados frente a los de exodoncias recientes. En extractos proteicos sin purificar de la dentina de restos óseos, no se detectó actividad gelatinolítica, ni la proteína altamente ácida.

Octava: La deoxipiridinolina de la dentina humana aumenta con relación a la edad del sujeto. La relación de las variables (edad y deoxipiridinolina) se ajusta a modelos lineales, constituyendo la cuantificación de la deoxipiridinolina un método de utilidad para el establecimiento de la edad dental que complementaría a los ya existentes.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Avery JK, Cox CF, Chiego DJ. Structural and physiologic aspects of dentin innervation. En: Linde A, ed. *Dentin and dentinogenesis*. Florida: CRC Press, 1984.

- ◆ Bada JL, Kvenvolden KA, Peterson E. Racemization of amino acid in bones. *Nature* 1973; 245: 308-310.

- ◆ Bang G, Ramm E. Determination of age in humans from root dentin transparency. *Acta Odontol Scand* 1970; 28: 3-35.

- ◆ Bang G. Induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in rats and guinea pigs. *Scand J Dent Res* 1973; 81: 230.

- ◆ Becker J, Schuppan D, Benzian H, y cols. Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 1417-1429.

- ◆ Berg S. The determination of bone age. En: Frank L, ed. *Methods in Forensic Science*. New York: Interscience, 1963: 231-252.

- ◆ Bernhard EJ, Muschel RJ, Hughes EN. M_r 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res* 1990; 50: 3872-3877.

- ◆ Bernick S. Age changes to the dental pulp. *Front Oral Physiol* 1987; 6: 7-30.

- ◆ Bhussry B, Emmel V. Changes in the nitrogen content of enamel with age. *J Dent Res* 1955; 34: 672.

- ◆ Birkedal-Hansen H, Taylor RE. Detergent activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1173-1178.

- ◆ Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Booden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 197-250.
- ◆ Blumenthal NC. Mechanism of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite formation. En: Veis A, ed. *The chemistry and biology of mineralized tissues*. New York: Elsevier, 1981: 509-515.
- ◆ Boskey AL, Posner AS. The role of synthetic and bone extracted Ca-phospholipid-PO₄ complexes in hydroxyapatite formation. *Calcif Tissue Res* 1977; 23: 251-258.
- ◆ Boskey AL. The role of calcium-phospholipid-phosphate complexes in tissue mineralization. *Metab Bone Dis Rel Res* 1978; 1: 137-148.
- ◆ Boskey AL. Phospholipid and calcification. En: Hukins DWL, ed. *Calcified Tissues*. London: Macmillan, 1989: 215-243.
- ◆ Brenner CA, Adler RR, Rappolee DA, Pedersen RA, Werb Z. Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Develop* 1989; 3: 848-859.
- ◆ Bronckers ALJJ, Gay S, DiMuzio MT, Butler WT. Immunolocalization of γ -carboxyglutamic acid-containing proteins in developing molar tooth germs of the rat. *Coll Relat Res* 1985; 5: 17-22.
- ◆ Bronckers ALJJ, Gay S, Lyaruu DM, Gay RE, Miller EJ. Localization of type V collagen with monoclonal antibodies in developing dental and periodontal tissues of the rat and hamster. *Coll Relat Res* 1986; 6: 1-13.

- ◆ Bronckers ALJJ, Gay S, Finkelman RD, Butler WT. Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone Mineral* 1987; 2: 361-373.

- ◆ Bronckers ALJJ, Lyaruu DM, Woltgens JHM. Immunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis. En: Glimcher M, Lian J, eds. *The chemistry and biology of mineralized tissues*. Birmingham: EBSCO Media, 1985:65-70

- ◆ Butler WT, Bhowan M, DiMuzio MT, Cothran W, Linde A. Non-collagenous proteins of dentin. Isolation and partial characterization of rat dentin proteins and proteoglycans using a three-step preparative method. *Collagen Relat Res* 1981; 1: 187-199.

- ◆ Butler WT, Bhowan M, Dimuzio MT, Cothran WC, Linde A. Multiple forms of rat dentin phosphoproteins. *Archs Biochem Biophys* 1983; 225: 178-186.

- ◆ Butler WT. Dentin collagen: chemical structures and role in mineralization. En: Linde A, ed. *Dentin and dentinogenesis*. vol II. Florida: CRC Press, 1984: 37-53.

- ◆ Butler WT, Sato S, Rahemtulla F, y cols. Glycoproteins of bone and dentin. En: T BW, ed. *The chemistry and biology of mineralized tissues*. Birmingham: EBSCO Media, 1985: 107-112.

- ◆ Butler WT. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis. *Operative Dentistry* 1992 Suplemento 5: 18-23.

- ◆ Caloniuss PEB, Lunin M, Stout F. Histological criteria for age estimation of the developing human dentition. *Oral Surg* 1970; 29: 869-876.

- ◆ Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, y cols. Cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2407-2411.

- ◆ Castellano M. Estudio del comportamiento de material orgánico e inorgánico en el proceso de envejecimiento de restos óseos. Aplicación al establecimiento de la data. Tesis Doctoral. Granada: Universidad de Granada, 1976.

- ◆ Castellano M, Villanueva E. Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. I. Lípidos totales. *Zacchia* 1977; 13: 3-11.

- ◆ Castellano M, Villanueva E. Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. II. Colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres. *Zacchia* 1978a; 14: 1-12.

- ◆ Castellano M, Villanueva E. Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. III. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres por cromatografía de gases. *Zacchia* 1978b; 14: 347-355.

- ◆ Castellano M, Villanueva E, von Frenckel R. Estimating the data of bone remains: a multivariate study. *J Forensic Sci* 1984; 29: 527-534.

- ◆ Cawston TE, Galloway WA, Mercer E, Murphy G, Reynolds JJ. Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. *Biochem J* 1981; 195: 159-165.

- ◆ Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, y cols. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988; 263: 6579-6587.

- ◆ Conover MA, Urist MR. Dentin matrix bone morphogenetic protein. En: Veis A, ed. *The chemistry and biology of mineralized connective tissues*. New York: Elsevier, 1981: 597-606.

- ◆ Cookson DJ, Levine BA, Williams RJ, Jontell M, Linde A, de Bernard B. Cation binding by the rat-incisor-dentine phosphoprotein. A spectroscopic investigation. *Eur J Biochem* 1980; 110: 273-278.

- ◆ Cotmore JM, Nichols G, Wuthier RE. Phospholipid-calcium phosphate complex: enhanced calcium migration in the presence of phosphate. *Science* 1971; 172: 1339-1341.

- ◆ Dalitz GD. Age determination of adult human remains by teeth examination. *J Forensic Sci* 1963; 21: 11-21.

- ◆ DeClerk YA, Yean TD, Ratzkin BJ, Lu HS, Langley KE. Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 17445-17453.

- ◆ Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. A new system of dental age assesment. *Ann Hum Biol* 1973; 45: 211-227.

- ◆ Domenicucci C, Goldberg HA, Hofmann T, Isenman D, Wasi S, Sodek J. Characterization of porcine osteonectin extracted from foetal calvariae. *Biochem J* 1988; 253: 139-151.

- ◆ Drouin L, Overall CM, Sodek J. Identification of matrix metalloproteinase inhibitor (TIMP) in human parotid and submandibular saliva: partial purification and characterization. *J Periodont Res* 1988; 23: 370-377.

- ◆ Ellingson JS, Smith M, Larson LR. Phospholipid composition and fatty acid profiles in bovine predentin. *Calcif Tissue Res* 1977; 24: 127-133.

- ◆ Eyre DR. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science* 1980; 207: 1315-1322.

- ◆ Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP. Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1984; 137: 380-388.

- ◆ Eyre D. Collagen cross-linking amino acids. *Meth Enzymol* 1987; 144: 115-139.

- ◆ Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF- β in human dentin. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 717-723.

- ◆ Fleniken AM, Williams BRG. Developmental expression of the endogenous TIMP gen and a TIMP-lacZ fusion gen in transgenic mice. *Genes Dev* 1990; 4: 1094-1106.

- ◆ Fukae M, Kaneko I, Shimizu M. Metalloproteinases in the mineralized compartments of porcine dentine as detected by substrate-gel electrophoresis. *Archs Oral Biol* 1991; 36: 567-573.

- ◆ Fukae M, Tanabe T, Yamada M. Action of metalloproteinases on porcine dentin mineralization. *Calcif Tissue Int* 1994; 55: 426-435.

- ◆ Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archs Oral Biol* 1976; 21: 355-362.

- ◆ Gil F, Perez M, Facio A, Villanueva E, Tojo R, Gil A. Dental lead levels in the Galician population, Spain. *Scie Total Environ* 1994; 156: 145-150.

- ◆ Goldberg M, Escaig F. An autoradiographic study of the *in vivo* incorporation of (³H)-palmitic acid into the dentine and enamel lipids of rat incisor, with a comparison of rapid-freezing freeze-substitution fixation and aldehyde fixation. *Arch Oral Biol* 1984; 26: 691-695.

- ◆ Goldberg M, Septier D. Improved lipid preservation by malachite green-glutaraldehyde fixation in rat incisor predentine and dentine. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 717-726.

- ◆ Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He C. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated

TIMP-2. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 8207-8211.

◆ Gorter de Vries I, Quartier E, van Steirteghem A, Boute P, Coomans D, Wisse E. Characterization and immunocytochemical localization of dentine phosphoprotein in rat and bovine teeth. Arch Oral Biol 1986; 31: 57-66.

◆ Green MR, Pastewka JV, Peacock AC. Differential staining of phosphoproteins on polyacrylamide gels with a cationic carbocyanine dye. Anal Biochem 1973; 56: 43-51.

◆ Gustafson G. Age determination on teeth. J Amer Dent Ass 1950; 41: 45-54.

◆ Haaviko K. Tooth formation age estimated on a few selected teeth. A simple method for clinical use. Procc Finn Dent Soc 1974; 70: 15-19.

◆ Hauschka PV, Wians FHJ. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. Anat Rec 1989; 224: 180-188.

◆ Hayakawa T, Kishi JI, Nakanishi Y. Salivary gland morphogenesis: possible involvement of collagenase. En: Birkedal-Hansen H, ed. Matrix metalloproteinases and inhibitors. Stuttgart: Gustav Fisher, 1992: 344-351.

◆ Haynes V. Radiocarbon: analysis of organic carbon of fossil bone and enamel. Science 1968; 161: 687-688.

◆ Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. J Dent Res 1995; 74: 1226-1234.

◆ Helfman PM, Bada JL. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. Proc Natl Acad Sci, USA 1975; 72: 2891-2894.

- ◆ Helfman PM, Bada JL. Aspartic acid racemization in dentin as a measure of ageing. *Nature* 1976; 262: 279-281.
- ◆ Hjerpe A, Antonopoulos CA, Engfeldt B, Wikstrom B. Analysis of dentine glycosaminoglycans using high-performance liquid chromatography. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 496-501.
- ◆ Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggman U, Comey C, Dirrhofer R. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci* 1991; 36: 1649-1661.
- ◆ Holland GR. The extent of the odontoblast process in the cat. *J Anat* 1976; 121: 133-149.
- ◆ Holland PWH, Harper SJ, McVey JH, Hogan BLM. In vivo expression of mRNA for the Ca⁺⁺-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 1987; 105: 473-482.
- ◆ Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem* 1991; 266: 13064-13069.
- ◆ Ishiguro K, Yamashita K, Nakagaki H, Iwata K, Hayakawa T. Identification of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human teeth and its distribution in cementum and dentine. *Archs Oral Biol* 1994; 39: 345-349.
- ◆ Johansson G. Age determination from human teeth. *Odontol Revy* 1971; 22(Supl 21): 40-126.
- ◆ Jones SJ, Boyde A. Ultrastructure of dentin and dentinogenesis. En: Linde A, ed. *Dentin and dentinogenesis*. vol I. Florida: CRC Press, 1984: 81-134.

- ◆ Jonsson M, Fredriksson S, Jontell M, Linde A. Isoelectric focusing of the phosphoprotein of rat incisor dentin in ampholine and acid pH gradients. Evidence for carrier ampholyte-protein complexes. *J Chromatogr* 1978; 157: 235-242.

- ◆ Jontell M, Pertoft H, Linde A. Disagreement in molecular weight determinations of dentin phosphoprotein. *Biochem Biophys Acta* 1982; 705: 315-320.

- ◆ Jontell M, Linde A. Non collagenous proteins of predentine from dentinogenically active bovine teeth. *Biochem J* 1983; 214: 769-776.

- ◆ Kinoshita Y. Incorporation of serum albumin into the developing dentine and enamel matrix in the rabbit incisor. *Calcif Tissue Int* 1979; 29: 41-46.

- ◆ Knight B. Methods of dating skeletal remains. *Med Sci Law* 1969; 9: 247-252.

- ◆ Knight B. The dating of human bones. *The Criminologist* 1971;6:33-40.

- ◆ Kosa F, Antal A, Farkas I. Electron probe microanalysis of human teeth for the determination of individual age. *Medi Sci Law* 1990; 30: 109-114.

- ◆ Kraus BS, Jordon RE. *The human dentition before birth*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1965.

- ◆ Kuboki Y, Tsuzaki M, Sasaki S, Liu CF, Mechanic GL. Location of the intermolecular cross-links in bovine dentin collagen, solubilization with trypsin and isolation of cross-link peptides containing dihydroxylysinonorleucine and pyridinoline. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 102: 119-126.

- ◆ Kuboki Y, Okuguchi M, Takita H, y cols. Amino-terminal location of pyridinoline in dentin collagen. *Conn Tissue Res* 1993; 29: 99-110.

- ◆ Kvaal SI, Koppang HS, Solheim T. Relationship between age and deposit of peritubular dentine. *Gerodontology* 1994; 11: 93-98.

- ◆ Kvaal SI, Solheim T, Bjerketvedt D. Evaluation of different preparation, staining and microscopic techniques for counting cemental incremental lines in human teeth. *Biotech Histochem.* En prensa.

- ◆ Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227: 680-685.

- ◆ Leaver AG, Thomas M, Holbrook IB. Glycoproteins of human dentine. *Calcif Tissue Res* 1977; 22(Suppl): 347-349.

- ◆ Lee HC, Gaensslen RE, Carver HW, Pagliaro EM, Carrol-Reho J. ABH antigen typing in bone tissue. *J Forensic Sci* 1989; 34: 7-14.

- ◆ Lee HC, Pagliaro EM, Berka KM, y cols. Genetic markers in human bone: Deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *J Forensic Sci* 1991; 36: 320-330.

- ◆ Lelievre Y, Bouboutou R, Boiziau J, Faucher D, Achard D, Cartwright T. Low molecular weight, sequence based, collagenase inhibitors selectively block the interaction between collagenase and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). *Matrix* 1990; 10: 292-299.

- ◆ Lesot H, Smith AJ, Matthews JB, Ruch JB. An extracellular matrix protein of dentine, enamel and bone shares common antigenic determinants with keratins. *Calcif Tissue Int* 1988; 42:53.

- ◆ Lian JB, Tassinari M, Glowacki J. Resorption of implanted bone prepared from normal and warfarin-treated rats. *J Clin Invest* 1984; 73: 1223-1226.

- ◆ Linde A, Bhowm M, Butler WT. Noncollagenous proteins of dentin. *J Biol Chem* 1980; 255: 5931-5942.

- ◆ Linde A, Hansson H-A. Localization of Gla-proteins during calcification. En: de Bernard B, Sottocasa GL, Sandri G, eds. *Calcium-binding proteins*. Amsterdam: Elsevier, 1983: 65-66.

- ◆ Linde A. Dynamics aspects of dentinogenesis. En: Butler WT, ed. *The chemistry and biology of mineralized tissues*. Birmingham: EBSCO Media, 1985a.

- ◆ Linde A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J Dent Res* 1985b; 64: 523-529.

- ◆ Linde A. Differences between non-collagenous protein content of rat incisor and permanent bovine dentin. *Scand J Dent Res* 1988; 96: 188-198.

- ◆ Linde A, Robins SP. Quantitative assessment of collagen crosslinks in dissected predentin and dentin. *Collagen Rel Res* 1988; 8: 443-450.

- ◆ Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec* 1989; 224: 154-166.

- ◆ Linde A, Lussi A. Mineral induction by polyanionic dentin and bone proteins at physiological ionic conditions. *Conn Tissue Res* 1989; 21: 197-203.

- ◆ Linde A. Structure and calcification of dentin. En: Bonucci E, ed. *Calcification in biological systems*. Florida: CRC Press, 1992: 269-311.

- ◆ Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(5): 679-728.

- ◆ López-Nicolás M, Canteras M, Luna A. Age estimation by IBAS image analysis of teeth. *Forensic Sci Int* 1990; 45: 145-150.

- ◆ López-Nicolás M, Luna A. Application of automatic image analysis (IBAS system) to age calculation. Efficiency in the analysis of several teeth from a single subject. *Forensic Sci Int* 1991; 50: 195-202.

- ◆ López-Nicolás M, Morales A, Luna A. Morphometric study of teeth in age calculation. *J Forensic Odontostomatol* 1993; 11: 1-8.

- ◆ López-Nicolás M, Morales A, Luna A. Morphometric study of teeth in age calculation. *J Forensic Odontostomatol* 1993; 11: 1-8.

- ◆ López-Nicolás M, Morales A, Luna A. Application of dimorphism in teeth to age calculation. *J Forensic Odontostomatol* 1996; 14: 10-13.

- ◆ Lowry ON, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

- ◆ Lussi A, Crenshaw MA, Linde A. Induction and inhibition of hydroxyapatite formation by dentin phosphoprotein *in vitro*. *Archs Oral Biol* 1988; 33: 685-691.

- ◆ Lussi A, Linde A. Mineral induction *in vivo* by dentine proteins. *Caries Res* 1993; 27: 241-248.

- ◆ Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Moore WGI, O'Grady RL, Birkedal-Hansen H. Characteristics of a 95 kDa matrix metalloproteinases produced by mammary carcinoma cells. *Biochemistry* 1991; 30: 1449-1556.

- ◆ MacDougall M, Slavkin HC, Zeichner-David M. Characteristics of phosphorylated and non-phosphorylated dentine phosphoprotein. *Biochem J* 1993; 287: 651-655.
- ◆ MacDougall M, Zeichner-David M, Slavkin HC. Production and characterization of antibodies against murine dentin phosphoprotein. *Biochem J* 1985; 232: 493-500.
- ◆ Mainardi CL, Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM. Purification of a type IV collagen degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. *Collagen Rel Res* 1984; 4: 479-492.
- ◆ Mark MP, Prince CW, Gay S, Austin RL, Butler WT. 44-kDal bone phosphoprotein (osteopontin) antigenicity at ectopic sites in newborn rats: kidney and nervous tissues. *Cell Tissue Res* 1988; 251: 23-30.
- ◆ Martín A, Luna JD. *Bioestadística para las ciencias de la salud*. 2ª ed. Madrid: Ediciones Norma, 1989.
- ◆ Martín de las Heras S, Valenzuela A, Villanueva E, Overall CM. Changes in biochemical composition of human dentin with aging. Its usefulness for forensic identification. 49 Congreso de la Academia Americana de Ciencias Forenses, New York, 1997.
- ◆ Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hogan BLM. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell "culture shock" glycoprotein of M_r 43,000. *EMBO J* 1986; 5: 1465-1472.
- ◆ Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIGG* 1990; 6: 121-125.
- ◆ Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* 1992; 14: 455-463.

- ◆ Mechanic G, Gallop PM, Tanzer ML. The nature of the crosslinking in collagens from mineralized tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 45: 644-653.

- ◆ Miller EJ, Gay S. The collagens: an overview and update. *Meth Enzymol* 1987; 144: 3-41.

- ◆ Moore WGI, Birkedal-Hansen B, Pierson M, Birkedal-Hansen H. A M_r 21,000 inhibitor of matrix metalloproteinases from human fibroblasts. En: Birkedal-Hansen H, ed. *Matrix metalloproteinases and inhibitors*. Stuttgart: Gustav Fischer, 1992: 319-320.

- ◆ Moorees CFA, Fanning EA, Hunt EE. Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *J Dental Res* 1963; 42: 264-273.

- ◆ Morse DR. Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72: 721-745.

- ◆ Munksgaard EC, Rhodes M, Mayne R, Butler WT. Collagen synthesis and secretion by rat incisor odontoblasts in organ culture. *Eur J Biochem* 1978; 82: 609-617.

- ◆ Murphy G, Cawston TE, Reynolds JJ. An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid. Purification, characterization and action on metalloproteinases. *Biochem J* 1981; 195: 167-170.

- ◆ Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Partial purification of collagenase and elastinase from human polymorphonuclear leukocytes. Analysis of their actions on soluble and insoluble collagens. *Biochem J* 1982; 203: 209-211.

- ◆ Nagase H, Engild JJ, Suzuki K, Salvensen G. Stepwise activation of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. *Biochemistry* 1990; 29: 5783-5789.

- ◆ Nagata T, Goldberg H, Zhang Q, Domenicucci C, Sodek J. Biosynthesis of bone proteins by fetal porcine calvariae *in vitro*. Rapid association of sulfated sialoproteins (secreted phosphoprotein-1 and bone sialoprotein) and chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PGIII) with bone mineral. *Matrix* 1991; 11: 86-100.

- ◆ Nakamura O, Gohda E, Ozawa M, y cols. Immunohistochemical studies with a monoclonal antibody on the distribution of phosphophoryn in pre-dentin and dentin. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 491-500.

- ◆ Nakata T, Stepnick R, Zipkin I. Chemistry of human dental cementum: The effect of age and fluoride exposure on the concentration of ash, fluoride, calcium, phosphorus and magnesium. *J Periodont* 1972; 43: 115-124.

- ◆ Nishikawa S, Kitamura H. Microtubules, intermediate filaments and actin in the odontoblast of rat incisor. *Anat Rec* 1987; 219: 144-251.

- ◆ Nolla C. The development of the permanent teeth. *J Dent Child* 1960; 27: 254-266.

- ◆ Nomura S, Hogan BLM, Wills AJ, Heath JK, Edwards DR. Developmental expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) RNA. *Development* 1989; 105: 575-583.

- ◆ Ogino T, Ogino H, Nagy B. Application of aspartic acid racemization to forensic odontology: postmortem designation of age at death. *Forensic Sci Int* 1985; 29: 259-267.

- ◆ Ohtani S, Yamamoto K. Age estimation using the racemization of amino acid in human dentin. *J Forensic Sci* 1990; 36: 792-800.

- ◆ Okada Y, Watanabe S, Nakanishi I, et al. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS lett* 1988; 229: 157-160.

- ◆ Otsuka K, Yao K, Wasi S, et al. Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells *in vitro*. *J Biol Chem* 1984; 259: 9805-9812.

- ◆ Overall CM, Limeback H. Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. *Biochem J* 1988; 256: 965-972.

- ◆ Overall CM, Sodek J. Concanavalin A produces a matrix-degradative phenotype in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1990; 265: 21141-21151.

- ◆ Overall CM. Recent advances in matrix metalloproteinase research. *TIGG* 1991; 3: 384-399.

- ◆ Overall CM. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 732: 51-64.

- ◆ Pajouh MS, Nagle RB, Breathnach R, Finch JS, Brawer MK, Bowden GT. Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117: 144-150.

- ◆ Papapanou P, Lindhe J, Sterret J, Eneroth L. Considerations on the contribution of ageing to loss periodontal tissue support. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 611-615.

- ◆ Pfeiffer H, Mörnstad H, Teivens A. Estimation of chronological age using the aspartic acid racemization method. I. On human rib cartilage. *Int J Legal Med* 1995; 108: 19-23.

- ◆ Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1976; 73: 1447-1451.

- ◆ Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117: 765-771.

- ◆ Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla proteins, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 1985; 260: 14971-14975.

- ◆ Raggio CL, Boyan BD, Boskey AL. *In vivo* hydroxyapatite formation induced by lipids. *J Bone Min Res* 1986; 1: 409-415.

- ◆ Rahemtulla F, Prince CW, Butler WT. Isolation and partial characterization of proteoglycans from rat incisor. *Biochem J* 1984; 218: 877-885.

- ◆ Rahima M, Veis A. Two classes of dentin phosphophoryns, from a wide range of species, contain immunologically cross-reactive epitope regions. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 104-112.

- ◆ Ritz S, Schutz HW, Schwarzer B. The extent of aspartic acid racemization in dentin: a possible method for a more accurate determination of age at death? *Z Rechtsmed* 1990; 103: 457-462.

- ◆ Robey PG, Fischer LW, Young MF, Termine JD. The biochemistry of bone. In: Riggs B, Melton L, eds. *Osteoporosis: etiology, diagnosis and management*. New York: Raven Press, 1988: 95-109.

- ◆ Robins SP, Duncan A. Pyridinium crosslinks of bone and their location in peptides isolated from rat femur. *Biochem Biophys Acta* 1987; 914: 233-239.

- ◆ Romberg RW, Werness PG, Lollar P, Riggs BL, Mann KG. Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J Biol Chem* 1985; 260: 2728-2736.

- ◆ Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem* 1983; 258: 3058-3063.

- ◆ Salo T, Turpeenniemi-Hujanen T, Tryggvason K. Tumor-promoting phobol esters and cell proliferation stimulate secretion of basement membrane (type IV) collagen-degrading metalloproteinase by human fibroblasts. *J Biol Chem* 1985; 260: 8526-8531.

- ◆ Santini A, Land M, Raab G. The accuracy of simple ordinal scoring of tooth attrition in age assesment. *Forensic Sci Int* 1990; 48: 175-184.

- ◆ Sato S, Rahemtulla F, Prince CW, Tomana M, Butler WT. Acidic glycoproteins from bovine compact bone. *Connect Tissue Res* 1985; 14: 51-64.

- ◆ Schour I, Massler M. The development of the human dentition. *J Am Dent Assoc* 1941; 20: 379-427.

- ◆ Schwartz TR, Schwartz EA, Mieszerski L, McNally L, Kobilinsky L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci* 1991; 36: 979-990.

- ◆ Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 1988; 252: 313-323.

- ◆ Sellers A, Reynolds J, Meikle MC. Neutral metalloproteinases of rabbit bone. *Biochem J* 1978; 171: 493-496.

- ◆ Shapiro IM, Wuthier RE, Irving JT. A study of the phospholipids of bovine dental tissues, I. Enamel and dentin. *Arch Oral Biol* 1966; 11: 501-512.

- ◆ Sigal MJ, Pitaru JE, Aubin JE, TenCate AR. A combined scanning electron microscopy and immunofluorescence study demonstrating that the odontoblast process extends to the dentinoenamel junction in human teeth. *Anat Rec.* 1984; 210: 453-462.
- ◆ Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, Warnock GR, Holland MM. A systematic approach to the sampling of dental DNA. *J Forensic Sci* 1993; 39: 1194-1209.
- ◆ Snowden JM. The stabilization of in vivo assembled collagen fibrils by proteoglycans/glycosaminoglycans. *Biochem Biophys Acta* 1982; 703: 21-25.
- ◆ Sodek J, Mandell SM. Collagen metabolism in rat incisor predentine *in vivo*: synthesis and maturation of type I, $\alpha 1(I)$ trimer, and type V collagens. *Biochemistry* 1982; 21: 2011-2015.
- ◆ Sodek J, Domenicucci C, Zung P, Kuwata F, Wasi S. Biosynthesis, properties and distribution of osteonectin. En: Ali SY, ed. *Cell mediated calcification and matrix vesicles.* Amsterdam: Elsevier, 1986: 135-141.
- ◆ Solheim T. Dental color as an indicator of age. *Gerodontology* 1988; 4: 114-118.
- ◆ Solheim T. Dental root translucency as an indicator of age. *Scan J Dent Res* 1989; 97: 189-197.
- ◆ Solheim T. Dental cementum apposition as an indicator of age. *Scand J Dent Res* 1990; 98: 510-519.
- ◆ Solheim T. Amount of secondary dentin as an indicator of age. *Scand J Dent Res* 1992; 100: 193-199.

- ◆ Solheim T. A new method for dental age estimation in adults. *Forensic Sci Int* 1993; 59: 137-147.

- ◆ Solheim T, Kvaal S. Dental root surface structure as an indicator of age. *J Forensic Odontostomatol* 1993; 11: 9-21.

- ◆ Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a cys 73 active-site Zinc complex in latency and "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 364-368.

- ◆ Steinfort J, van den Bos T, Beertsen W. Differences between enamel-related and cementum-related dentin in the rat incisor with special emphasis on the phosphoproteins. *J Biol Chem* 1989; 264: 2840-2845.

- ◆ Stetler-Stevenson WG, Veis A. Bovine dentin phosphophoryn: composition and molecular weight. *Biochemistry* 1983; 22: 4326-4335.

- ◆ Stetler-Stevenson WG, Veis A. Type I collagen shows a specific binding affinity for bovine dentin phosphophoryn. *Calcified Tissue Int* 1986; 38: 135-141.

- ◆ Stetler-Stevenson WG, Veis A. Bovine dentin phosphophoryn: calcium ion binding properties of a high molecular weight preparation. *Calcif Tissue Int* 1987; 40: 97-102.

- ◆ Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, Wachter MP, Margulies IMK, Liotta LA. The activation of human type IV collagenase proenzyme. *J Biol Chem* 1989; 264: 1353-1356.

- ◆ Stricklin GP, Jeffrey JJ, Roswit WT, Eisen AZ. Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry* 1983; 22: 61-68.

- ◆ Stricklin GP, Welgus HG. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Purification and biochemical characterization. *J Biol Chem* 1983; 258: 12252-12258.

- ◆ Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvensen G, Nagase H. The activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990; 29: 10261-10270.

- ◆ Takagi Y, Nagai H, Sasa'ki S. Difference in noncollagenous matrix composition between crown and root dentin of bovine incisor. *Calcif Tissue Res* 1988; 42: 97-103.

- ◆ Takagi Y, Shimohawa H, Suzuki M, Nagai H, Sasaki S. Immunohistochemical localization of α 2HS glycoprotein in dentin. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 40-45.

- ◆ Takagi M, Hishikawa H, Hosokawa Y, Kagami Y, Rahemtulla F. Immunohistochemical localization of glycosaminoglycans and proteoglycans in predentin and dentin of rat incisor. *J Histochem Cytochem* 1991; 38: 319-324.

- ◆ TenCate AR. *Oral Histology: development, structure and function*. 3^a ed. St Louis: Mosby, 1989.

- ◆ Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ, Conn KM, Nylén MU. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem* 1980; 255: 9760-9768.

- ◆ Termine JD, Belcourt AB, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981; 26: 99-105.

- ◆ Thomas HF. The effect of various fixatives on the extent of the odontoblast process in human dentine. *Archs Oral Biol* 1983; 28: 465-469.

- ◆ Traub H, Altini M, Hille J. A comparison of radicular dentinal tubule size in two different age groups. *J Forensic Odontostomatol* 1988; 6: 43-54.

- ◆ Tsuzaki M, Yamauchi M, Mechanic G. Bovine dental pulp collagens: characterization of type III and V collagen. *Archs Oral Biol* 1990; 35: 195-200.

- ◆ Tung PS, Domenicucci C, Wasi S, Sodek J. Specific immunohistochemical localization of osteonectin and collagen types I and III in fetal and adult porcine dental tissues. *J Histochem Cytochem* 1985; 33: 531-540.

- ◆ Tuross N, Behrensmeyer A, Eanes E, Fischer L, Hare P. Molecular preservation and crystallographic alterations in a weathering sequence of wildbeest bones. *Appl Geochem* 1989; 4: 261-270.

- ◆ Tuross N. Recovery of bone and serum proteins from human skeletal tissue: IgG, osteonectin and albumin. En: Ortner DJ, Aufderheide AC, eds. *Human paleopathology: Current synthesis and future options*. Washington DC: Smithsonian Press, 1991: 51-54.

- ◆ Vaes G, Delaisse JM, Eeckhout Y. Relative roles of collagenase and lysosomal cysteine-proteinases in bone resorption. En: Birkedal-Hansen H, ed. *Matrix metalloproteinases and inhibitors*. Stuttgart: Gustav Fischer, 1992: 383-388.

- ◆ van der Linden PPGM, Duterloo HS. Development of the human dentition. *An Atlas*. Baltimore: Harper & Row, 1976.

- ◆ van Heerden PJ. The mesial root of the third mandibular molar as a possible indicator of age, *Memoria Diploma de Odontologia Forense*. Londres: London Hospital Medical College, 1985.

- ◆ Van Wart H, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase

gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5578-5582.

◆ Vasiliadis L, Darling A, Levers B. The histology of sclerotic human root dentine. *Arch Oral Biol* 1989; 28: 693-700.

◆ Veis A, Stetler-Stevenson W, Takagi Y, Sabsay B, Fullerton R. The nature and localization of the phosphorylated proteins of mineralized dentin. En: Veis A, ed. *The chemistry and biology of mineralized connective tissues*. New York: Elsevier, 1981: 377-387.

◆ Villanueva E, Girela F, Castellano M. The application of differential thermal analysis and thermogravimetric analysis to dating bone remains. *J Forensic Sci* 1976; 21: 822-830.

◆ Walters C, Eyre DR. Collagen crosslinks in human dentin: increasing content of hydroxypyridinium residues with age. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 401-405.

◆ Weinstock M, Leblond CP. Radioautography visualization of the deposition of a phosphoprotein at the mineralization front in the dentin of the rat incisor. *J Cell Biol* 1973; 56: 838-845.

◆ Weinstock M, Leblond CP. Synthesis, migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after ³H proline administration. *J Cell Biol* 1974; 60: 92-127.

◆ Welgus HG, Stricklin GP. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Comparative studies in human connective tissues, serum, and amniotic fluid. *J Biol Chem* 1983; 258: 12259-12264.

◆ Werb Z, Alexander CM, Adler RR. Expression and function of matrix metalloproteinases in development. En: Birkedal-Hansen H, ed. *Matrix metalloproteinases and inhibitors*. Stuttgart: Gustav Fischer, 1992: 337-343.

- ◆ Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40--transformed human lung fibroblasts secrete a 92 kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989; 264: 17213-17221.

- ◆ Wilkinson D, Palmer W. Lead in teeth as a function of age. *Int Lab* 1975; 5: 41-46.

- ◆ Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-2154.

- ◆ Wuthier RE. Lipids in dentinogenesis. En: Linde A, ed. *Dentin and Dentinogenesis*. vol II. Florida: CRC Press, 1984: 93-106.

- ◆ Zanetti M, de Bernard B, Jontell M, Linde A. Ca^{+2} -binding studies of the phosphoprotein from rat-incisor dentine. *Eur J Biochem* 1981; 113: 541-546.