



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN  
Y DISTRIBUCIÓN DE LA AMELOGENINA Y ENAMELISINA EN EL  
DESARROLLO DEL ÓRGANO DEL ESMALTE EN DIENTES FETALES  
HUMANOS

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER GUTIÉRREZ CANTÚ

TUTOR:  
Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera

---

Vo. Bo.

ASESORES:  
Dr. Alfredo Feria Velasco, U de G  
Dr. Héctor Flores, UASLP.

AGUASCALIENTES AGS

## CARTAS DE LIBERACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

M. en C. FRANCISCO JAVIER GUTIÉRREZ CANTÚ  
ALUMNO DEL DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,  
P R E S E N T E .

Estimado alumno: Gutiérrez:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "Análisis Inmunohistoquímico comparativo de la expresión y distribución de la amelogenina y enamelinina en el desarrollo del órgano del esmalte en dientes fetales humanos", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., 25 de marzo de 2011  
"SE LUMEN PROFERRE"  
LA DECANO

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ



c.c.p.- Archivo  
MCGD,mjda



M. en C. Martha Cristina González Díaz

Decana del Centro de Ciencias Básicas

Presente.

Por medio de este conducto hago constar que el M. en C. Francisco Javier Gutiérrez Cantú ha cumplido con todos los requisitos de escritura y revisión de tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Biológicas con la Tesis: **Análisis Inmunohistoquímico comparativo de la expresión y distribución de la amelogenina y enamelinina en el desarrollo del órgano del esmalte en dientes fetales humanos.**

Después de revisar y corregir su escrito hago constar que el M. en C. Gutiérrez Cantú, incorporó todas mis recomendaciones y doy mi voto aprobatorio para que proceda a los trámites correspondientes para la impresión de tesis y la obtención del grado.

ATENTAMENTE,

"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., 24 de marzo de 2011.

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera

Tutora de Tesis

Profesor-Investigador del Departamento de Morfología

M. en C. Martha Cristina González Díaz

Decano del Centro de Ciencias Básicas

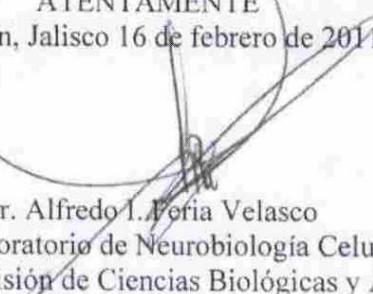
Presente.

Por medio de este conducto hacemos constar que el M. en C. Francisco Javier Gutiérrez Cantú ha cumplido con todos los requisitos de escritura y revisión de tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencia Biológicas con la tesis: **Análisis inmunohistoquímico de la expresión y distribución de la amelogenina y enamelisina en el desarrollo del órgano del esmalte en dientes fetales humanos.**

Después de revisar y corregir su escrito hago constar que el M. en C. Francisco Javier Gutiérrez Cantú, incorporó todas mis recomendaciones y doy mi voto aprobatorio para que proceda a los trámites correspondientes para la impresión de tesis y la obtención de grado.

ATENTAMENTE

Zapopan, Jalisco 16 de febrero de 2011.

  
Dr. Alfredo I. Peria Velasco  
Jefe de laboratorio de Neurobiología Celular y  
Director de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales

M. en C. Martha Cristina González Díaz

Decano del Centro de Ciencias Básicas

Presente.

Por medio de este conducto hacemos constar que el M. en C. Francisco Javier Gutiérrez Cantú ha cumplido con todos los requisitos de escritura y revisión de tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencia Biológicas con la tesis: **Análisis inmunohistoquímico de la expresión y distribución de la amelogenina y enamelisina en el desarrollo del órgano del esmalte en dientes fetales humanos.**

Después de revisar y corregir su escrito hago constar que el M. en C. Francisco Javier Gutiérrez Cantú, incorporó todas mis recomendaciones y doy mi voto aprobatorio para que proceda a los trámites correspondientes para la impresión de tesis y la obtención de grado.

ATENTAMENTE

San Luis Potosí, San Luis Potosí, 16 de febrero de 2011.



Dr. Héctor Eduardo Flores Reyes  
Facultad de Estomatología, UASLP.

## RESUMEN

La amelogenina y la enamelinina, son proteínas que desempeñan un papel fundamental en la formación y desarrollo del esmalte dental. La amelogenina durante del desarrollo del germen dental compone el 90% de la matriz orgánica del esmalte y constituye un andamio para la organización de los cristales de hidroxiapatita. Mientras que la enamelinina, a medida que el esmalte madura, es secretada para degradar a la amelogenina, de tal manera que el espacio dejado por esa proteína sea ocupado por los prismas del esmalte. Estas proteínas son sintetizadas intracelularmente en el Retículo Endoplásmico Rugoso (RER), mientras que el Aparato de Golgi es el organelo que realiza las modificaciones postraduccionales, la distribución y secreción de las mismas. La alteración en el proceso de secreción de estas proteínas, produce graves consecuencias en la estructura del órgano dentario maduro, tal y como se manifiesta en la amelogénesis imperfecta. Un aspecto que aun no se ha dilucidado concretamente, son las vías intracelulares de expresión y distribución espacial de amelogenina y enamelinina, durante el desarrollo del germen dental humano. Por lo que en la presente tesis se realizó un estudio de los sitios de expresión y la distribución espacial extracelular e intracelular de la amelogenina y enamelinina, así como vías de secreción en maxilares fetales humanos. En nuestro estudio realizamos un marcaje fluorescente entre Retículo endoplásmico y enamelinina en el cual se percibe que como ambos comparten sitios de expresión y localización espacial. Analizando por medio de colocalización, se aprecia que el porcentaje de

esta es de un 99.95%, lo que es altamente probable que la secreción de la enamelisina se da por intermedio de retículo endoplásmico. Así mismo se realizó marcaje fluorescente entre Aparato de Golgi y enamelisina dándonos una colocalización de un 99.92% lo que nos indica que es probable un acoplamiento de estas dos estructuras en el proceso de secreción de la proteína, indicándonos cual es su vía de secreción. Al analizar la colocalización de ambas proteínas vemos la colocalización de amelogenina y enamelisina en estadio presecretor observamos una mayor presencia de amelogenina que de enamelisina siendo la localización más específica en el citosol. En una acercamiento podremos observar que se presentan en este estadio la secreción de amelogenina por medio de vesículas en el órgano del esmalte, no sucediendo lo mismo con la enamelisina la cual se percibe dentro de la célula creyendo que está en estado latente. El análisis de colocalización de ambas proteínas nos marca un 90.81%.

En el análisis en estadio secretor encontramos que existe secreción de ambas proteínas observando presencia de ambas en el esmalte mineralizado recién formado, su porcentaje de colocalización de estas proteínas bajó siendo de un 78.65% lo que nos permitiría sugerir que esto se da por el aumento de secreción de enamelisina en este estadio y la degradación que está sufriendo la amelogenina por esta.

## ÍNDICE

Carta de liberación del Decano .....	vii
Carta de liberación de Tutor .....	vii
Resumen .....	vii
Introducción .....	1
Planteamiento del problema y Justificación .....	18
Objetivo .....	19
Metodología .....	20
Resultados .....	29
Discusión .....	59
Conclusión .....	65
Bibliografía .....	66
Anexos .....	79

## INTRODUCCIÓN

El proceso de embriogénesis de la cara y de las estructuras intraorales asociadas, consiste en una compleja serie de sucesos altamente integrados que comprenden migración celular extensa, interacciones de tejidos, crecimiento y diferenciación celular<sup>1</sup>.

Luego de formadas algunas estructuras de la cavidad bucal, desde el fondo del surco que existe entre el paladar y el labio, crecen dos crestas epiteliales derivadas del ectodermo, una exterior vestibular o labial, que permite la identificación de una zona vestibular por fuera, y otra interior o dental llamada lámina dentaria, de la cual derivará la pieza dentaria que continúa su proliferación en dirección lingual o palatina<sup>2, 3</sup>.

El ciclo vital de los órganos dentarios comprende una serie de cambios químicos, morfológicos y funcionales que comienzan en la sexta semana de vida intrauterina, a los cuarenta y cinco días aproximadamente y que continúan a lo largo de toda la vida del diente. La primera manifestación consiste en la diferenciación de la lámina dental o listón dentario, a partir del ectodermo que tapiza la cavidad bucal primitiva o estomodeo (introduce una cita bibliográfica actualizada).

El epitelio ectodérmico bucal en ese momento está constituido por dos capas: una superficial de células aplanadas y otra basal de células altas, conectadas al tejido conectivo embrionario o mesénquima por medio de la membrana basal (MB). De acuerdo con los resultados obtenidos sobre inducción epitelio-mesénquima en

cultivos celulares, se postula que la MB es un factor importante para la diferenciación celular y organogénesis dental <sup>4,5</sup>.

Las células basales del epitelio bucal, inducidas por el ectomesénquima subyacente, proliferan a todo lo largo del borde libre de los frutos maxilares, dando lugar a dos nuevas estructuras: la lámina vestibular y la lámina dentaria.

En el desarrollo del diente ocurren interacciones morfogénicas entre el epitelio que cubre el proceso facial (ectodermo) y el mesénquima subyacente, la morfogénesis implica diferenciación de varios tipos de células dentales, el epitelio ectodérmico origina el esmalte, y el ectomesénquima (que originará papila dental) forma el complejo dentinopulpar, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar <sup>6</sup>.

Las células de la lámina vestibular proliferan dentro del ectomesénquima, se agrandan rápidamente degeneran y forman una hendidura que constituye el surco vestibular entre el carrillo y la zona dentaria.

Durante la octava semana de vida intrauterina, merced a una actividad proliferativa intensa y localizada, se forman, en lugares específicos, 10 crecimientos epiteliales dentro del ectomesénquima de cada maxilar, en los sitios predeterminados genéticamente correspondientes a los 20 dientes deciduos. De la lámina dentaria se originan también los 32 gérmenes de la dentición permanente alrededor del quinto mes de gestación. Los primordios se sitúan por lingual (mandíbula inferior) o palatino (mandíbula superior) en relación a los elementos primarios. Los molares se desarrollan por extensión distal de la lámina

dental. En los vertebrados, el desarrollo dental es dado por apéndices ectodérmicos<sup>7</sup>.

El indicio del primer molar permanente se presenta desde el cuarto mes de vida intrauterina. El segundo y tercer molar comienzan su desarrollo después del nacimiento, alrededor de los cuatro o cinco años de edad.

En esta última etapa, las células epiteliales además de continuar su proliferación se van diferenciando. Mientras las células periféricas vecinas a la lámina dentaria que les dio origen, se aplanan para formar el epitelio externo, las células ubicadas en la zona cóncava se alargan y adoptan una forma cilíndrica alta formando así el epitelio interno del órgano del esmalte del cual derivan los ameloblastos, que se encuentran separados de los futuros odontoblastos de la papila dental, por una membrana basal. El epitelio interno ejerce una influencia organizativa sobre las células de la papila, induciéndolas en su diferenciación a odontoblastos que son las células que fabrican la dentina. Cuando los odontoblastos elaboran la primera laminilla de dentina, se produce una profunda modificación en los preameloblastos los que en la etapa de campana avanzada comienzan la síntesis del esmalte. Todo este proceso se conoce como *inducción recíproca*<sup>5,8</sup>.

### **ESTADIOS DE DESARROLLO DEL DIENTE.**

Los gérmenes dentarios siguen en su evolución una serie de etapas que, de acuerdo a su morfología, se denomina: estadio de brote macizo (o yema), estadio de casquete, estadio de campana y estadio de folículo dentario, terminal o maduro.

En el estadio de brote aparecen engrosamientos de aspecto redondeado que surgen de la división mitótica de las células de la capa basal del epitelio de la lámina dentaria, los cuales serán los futuros órganos del esmalte que darán lugar al único tejido de naturaleza ectodérmica del diente, el esmalte.

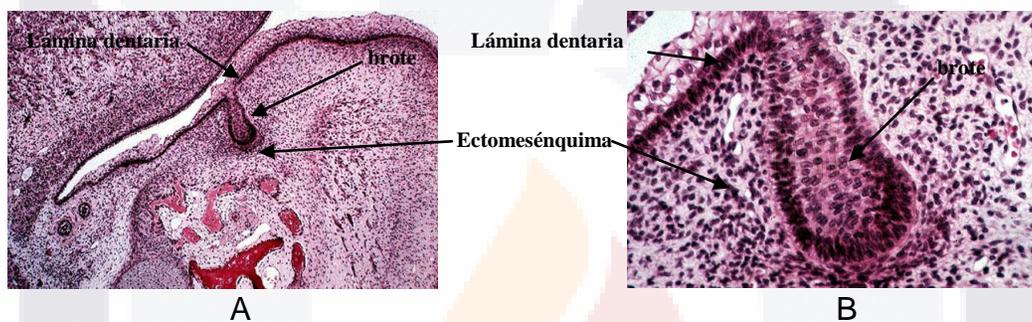


Figura 1. Cortes histológicos que muestra el desarrollo del diente en un estadio de brote. Tinción hematoxilina y eosina A) Se observa una proliferación de las células del epitelio de la lámina dental dentro del ectomesénquima. H-E 40X. B) Vemos un acercamiento del brote dentro del Ectomesénquima. H-E 100x

### Estadio de casquete

En el estadio de casquete alrededor de la novena semana de vida intrauterina se da una proliferación desigual en las caras laterales del brote, dando lugar a una concavidad en su cara profunda, la cual encierra una pequeña porción de ectomesénquima que es la futura papila dental que formará el complejo dentinopulpar.

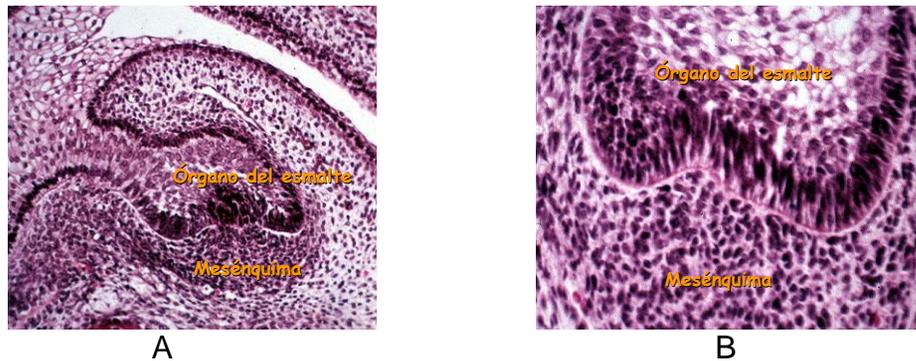


Figura 2. Cortes histológicos del desarrollo dental en estadio de casquete. Tinción hematoxilina y eosina. A) Etapa inicial del estadio de casquete, en el cual observamos la concavidad formada en el órgano del esmalte y la acumulación de ectomesénquima que formará la papila dental H-E, 100X. B) Acercamiento en estadio de casquete en el que podemos ver el órgano del esmalte y la futura papila dental. H-E 600X

### Estadio de campana

Este periodo aparece entre la catorce a dieciocho semanas de vida intrauterina, acentuándose la invaginación del epitelio dental interno tomando la forma de una campana. En esta etapa podemos observar órgano del esmalte, papila dental y saco dentario, se consideran una etapa de campana temprana en la cual hay diferenciación celular sin secreción de matriz y una etapa de campana avanzada o tardía en la cual aparece una secreción de predentina.

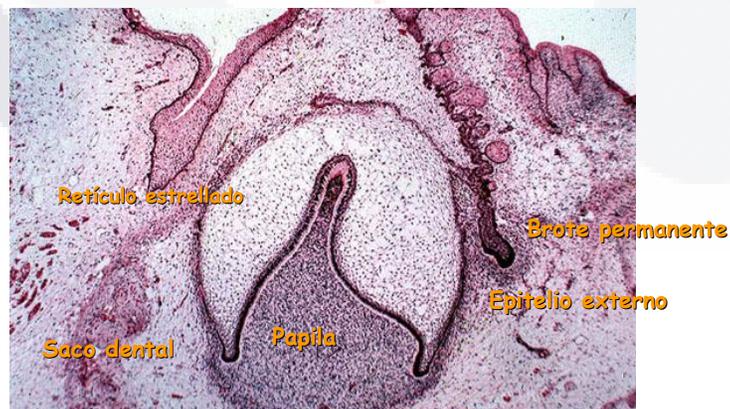


Figura 3. Corte histológico que muestra un diente en desarrollo en periodo de campana tardía en el cual podemos observar el epitelio dental externo y retículo estrellado del órgano del esmalte, así como la papila dental y el saco dentario. Se puede ver que en la parte más cóncava futuro borde incisal existe secreción de predentina. H-E 100 X

## Estadio secretor

Este estadio da inicio cuando encontramos un depósito de matriz de esmalte sobre las capas de dentina en desarrollo en las futuras cúspides o borde incisal. Este depósito se da en dentina y esmalte en capas sucesivas de la matriz extracelular en una forma regular y rítmica.



Figura 4. Desarrollo del diente en un estadio secretor, se observa un incremento rítmico de esmalte por medio de ameloblastos y dentina por medio de odontoblastos. Tejido mineralizado. Tinción H-E 600X.

Durante el desarrollo del germen dentario los ameloblastos (células que fabrican el esmalte)<sup>9</sup>, atraviesan una serie sucesiva de etapas, que abarcan todos los cambios que sufren estos elementos desde que las células poseen un carácter absolutamente indiferenciado hasta que, tras diferenciarse y madurar, desaparecen por completo, a continuación se exponen los cambios que ocurren en estas células

## CICLO VITAL DE LOS AMELOBLASTOS.

Los ameloblastos atraviesan diferentes etapas cada una de ellas se caracteriza por presentar cambios estructurales citoquímicos y ultraestructurales que dependen del estado funcional, que poseen las células en relación con los procesos de formación o maduración del esmalte<sup>10</sup>.

Los procesos de deposición de la matriz y su mineralización están íntimamente ligados en el tiempo. La secreción de la matriz orgánica por los ameloblastos se explica mediante la secreción de cuerpos ameloblásticos que pasarían a la MEC por una evaginación de la membrana del ameloblasto. La matriz contiene principalmente proteínas amelogeninas ricas en prolina<sup>11</sup>.

El rasgo más importante en la mineralización del esmalte es que tanto las amelogeninas y enamelinas son secretadas y degradadas casi de inmediato durante la amelogénesis, dando como resultado el tejido más cristalino y organizado en el cuerpo de los animales, el esmalte dental<sup>12</sup>.

Las etapas o periodos que constituyen el ciclo vital del ameloblasto, son las siguientes: Etapa Morfogénica (preameloblasto), etapa de organización o diferenciación (ameloblasto joven), etapa formativa o de secreción (ameloblasto activo, secretor o maduro), etapa de maduración, etapa de protección, etapa desmolítica

El desarrollo de los ameloblastos progresa desde los bordes incisales o cuspídeos hacia el asa cervical, por lo cual, en un solo corte histológico de la etapa morfogénica aposicional pueden observarse la mayoría de las características histológicas del ciclo vital de los ameloblastos (Ver figura 5).

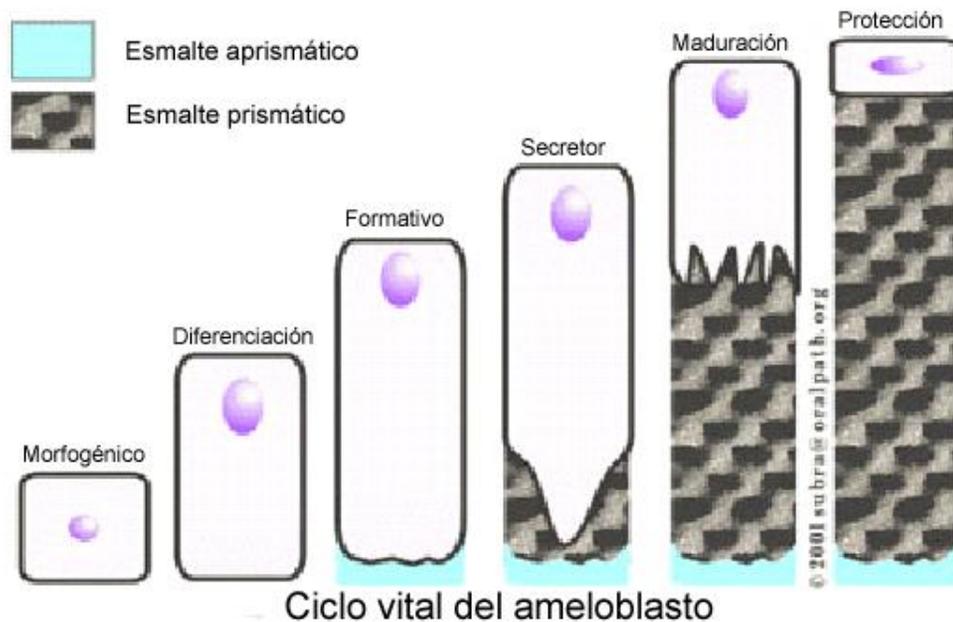


Figura 5. Ciclo de vida del ameloblasto secretor de matriz de esmalte. Paco, tienes que explicar cada figura.

Los ameloblastos a través de su vida van formando una matriz orgánica de tejido que al mineralizarse se llamará esmalte.

### **MATRIZ ORGÁNICA DEL ESMALTE.**

El esmalte está constituido químicamente por una matriz orgánica (1-2%), una matriz inorgánica (95%) y agua (3-5%)<sup>5,13</sup>. El órgano del esmalte en los gérmenes dentarios se caracteriza histológicamente por el retículo estrellado, constituido por células epiteliales con pronunciados espacios intercelulares entre ellas<sup>14</sup>.

El esmalte dental es de procedencia ectodérmica y se encuentra altamente mineralizado, es sintetizado y secretado por células especializadas del órgano del esmalte llamadas ameloblastos<sup>15</sup>.

La formación del esmalte requiere de la expresión de múltiples genes que transcriben las proteínas y proteinasas o proteasas de matriz necesarias para controlar el preciso proceso de crecimiento y mineralización de los cristales del esmalte<sup>16</sup>.

El esmalte dental está formado inicialmente por matriz que contiene aproximadamente 30% de proteínas del esmalte. El esmalte se restringe normalmente a las coronas anatómicas de los dientes aunque pueden encontrarse ectópicamente en las raíces<sup>17</sup>.

La mineralización del esmalte es un evento extracelular, ocurre en una matriz cuyo componente principal y más abundante son las amelogeninas<sup>18</sup>.

La información acerca de la composición, mecanismos de acción durante la mineralización y cambios en la maduración de la matriz proteica del esmalte ha sido difícil de obtener, pues muchos de sus componentes se encuentran solo en pequeñas cantidades y la mayoría experimenta un proceso proteolítico después de la secreción<sup>19,20</sup>. Sin embargo, con el uso de las técnicas moleculares, se han logrado progresos significativos en esta área<sup>21</sup>.

Los ameloblastos producen dos clases de las proteínas de la matriz<sup>22</sup>, la amelogenina, un producto relativamente homogéneo, que constituye el aproximadamente 90% de la matriz secretada por el esmalte<sup>23,24</sup>, y un grupo heterogéneo de proteínas no amelogeninas, como la tuftelina, ameloblastina, enamulina, metal proteinasa, y las proteasas de la serina, que constituyen el 10% restante<sup>25,26,27,28,29</sup>.

El papel del epitelio del esmalte y de las proteínas de la matriz del esmalte en la mineralización del esmalte ha sido el tema de diferentes revisiones <sup>21,30</sup>.

El componente orgánico más importante es de naturaleza proteica, y constituye un complejo sistema de multiagregados polipeptídicos que, en general, no han sido todavía caracterizados de forma definitiva. La dificultad principal se debe a la contaminación que se produce al tratar de separar o aislar la porción orgánica del esmalte de la dentina. Entre las proteínas presentes en la matriz orgánica destacan: amelogenina, enamelinas, ameloblastina o amelinas, tuftelinas y parvalbúmina.

A la amelogenina se le denomina proteína de esmalte inmaduro y se localiza entre los cristales de las sales minerales, sin estar ligada a ellos. Es hidrofóbica, fosforilada y glucosilada con un peso molecular de 25 KDa, rica en prolina, ácido glutámico, histidina y leucina, constituye el 90% de la matriz al comenzar la amelogénesis <sup>31,32,33</sup> y disminuye progresivamente a medida que aumenta la madurez del esmalte <sup>24,34</sup>.

Las enamelinas son hidrofílicas, glicosiladas, tienen un peso molecular de 70 KDa, ricas en serina, aspártico y glicina, y se localizan en la periferia de los cristales formando las proteínas de cubierta, algunos autores mencionan que se encuentran en el centro de las estructuras cristalinas. Representan de 2-3% de la matriz orgánica del esmalte. Se admite que no son secretadas por los ameloblastos y se sugiere que son un resultado de la degradación de las amelogeninas.

Las ameloblastinas o amelinas se localizan mediante inmunohistoquímica en las capas más superficiales del esmalte y en la periferia de los cristales. Representan el 5% de la matriz orgánica.

La tuftelina o proteína de flecos presenta un peso molecular que oscila entre 50 y 70 KDa, se localiza en la zona de unión amelodentinaria al comienzo de la formación del esmalte. Representa el 1-2% del componente orgánico.

La parvalbúmina es una proteína identificada en el polo distal del proceso de Tomes del ameloblasto secretor. Su función ésta asociada al transporte de calcio del medio intracelular al extracelular.

Las proteínas secretadas del esmalte se acoplan para formar una matriz extracelular compleja del esmalte que controla la iniciación e índice de crecimiento de los cristales minerales<sup>35,36</sup>. De hecho, el estadio secretor de la amelogénesis es un proceso de formación único, en el qué interacciones finas ocurren durante la secreción de las proteínas, de la degradación parcial de la proteína, y de la mineralización de los cristales finos<sup>37</sup>.

Una vez que comienza la mineralización, las proteínas del esmalte son degradadas progresivamente en la matriz por las proteasas; este proceso continúa hasta la maduración completa del esmalte, y da lugar a un tejido altamente mineralizado<sup>38, 39</sup>.

A través del estadio secretor por lo menos tres proteínas estructurales del esmalte son secretadas en la matriz, estas incluyen amelogenina<sup>40</sup>, ameloblastina y enamulina<sup>28,41</sup>.

### **Importancia de la amelogenina y la enamelisina en el desarrollo dental.**

Como ya se mencionó anteriormente, la amelogenina es la principal proteína de la matriz del esmalte dental (90%) y actúa como una nanoestructura promotora del desarrollo periodontal<sup>42</sup>. La concentración de amelogenina disminuye progresivamente al madurar el esmalte. Las células secretoras del esmalte se conocen como ameloblastos y al terminar de sintetizarlo, a través de un proceso conocido como amelogénesis, involucran y desaparecen durante la erupción dentaria a través de un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis<sup>43</sup>. Por lo anterior, después de la erupción del diente, no hay crecimiento ni nueva aposición de esmalte. El esmalte maduro es una estructura acelular, avascular y sin inervación, incapaz de repararse, aunque puede remineralizarse. La disposición de los prismas de hidroxiapatita, así como la estructura y resistencia del esmalte dependen de la disposición de matriz orgánica durante su formación, en la que la amelogenina juega un papel fundamental. El conocimiento de la histología del esmalte y de su histogénesis (amelogénesis) es necesario para interpretar la patología que afecta a esta estructura dentaria y su desarrollo así como para comprender las bases científicas de la prevención y la terapéutica empleadas por los estomatólogos. Estas alteraciones comprenden la amelogénesis imperfecta, la patología neoplásica y la caries dental.

La amelogenina se conoce como la proteína del esmalte inmaduro y se localiza entre los cristales de las sales minerales, sin estar ligada a ellos. Es la proteína más abundante del esmalte<sup>24, 43,44</sup> y se encuentra exclusivamente en él<sup>45</sup>. Es hidrofóbica, rica en aminoácidos como prolina, glutamina, leucina e histidina, en

este orden de importancia<sup>45</sup>. Es expresada por los ameloblastos y presenta una estructura primaria altamente conservada entre las especies de mamíferos<sup>46, 47</sup>. De forma cuantitativa se ha demostrado que la amelogenina se encuentra en bajas concentraciones cerca de las superficies secretoras<sup>36</sup>. Las amelogeninas son las únicas proteínas tejido-específicas sintetizadas por células derivadas de los epitelios de órgano de esmalte y comprenden 90% de la proteína de la matriz de esmalte en desarrollo<sup>48</sup>. Los defectos producidos en el gen de la amelogenina, localizado en el cromosoma X, produce la amelogénesis imperfecta del esmalte<sup>49</sup>.

Además de las amelogeninas, dentro de la matriz orgánica del esmalte se encuentran proteasas que por su importancia para el desarrollo dental se describen a continuación.

### **Metaloproteinasas o metaloproteasas.**

En 1962, Gross y Lapiere observaron que la rápida remodelación de las colas de renacuajo estaba relacionada con la degradación de colágena a pH neutro. Estudios posteriores, mostraron que la enzima involucrada tenía la habilidad de romper las moléculas de colágena tipo I en fragmentos característicos de  $\frac{3}{4}$  y  $\frac{1}{4}$ <sup>50</sup>. Los primeros reportes sobre la presencia de colagenasas en el ser humano, surgieron a partir de estudios en encía y hueso. Estas observaciones constituyen la base a partir de la cual se empezaron a realizar más investigaciones, que han llevado al aislamiento y clonación de un número continuo y creciente de metaloproteinasas de la matriz (MMPs, por sus siglas en inglés).

### **Concepto y clasificación de las MMPs.**

Las MMPs son un grupo de enzimas proteolíticas que participan en la degradación y cambio de la matriz extracelular de todos los tejidos del organismo incluyendo tejido mesenquimático, hueso, esmalte, y dentina y pertenecen a la gran subfamilia de las endopeptidasas, correspondiendo a la familia actualmente 159 MMPs (www.merops.ac.uk), de las cuales 28 son específicas de la matriz extracelular<sup>51,52,53</sup>.

Como se muestra en la tabla 1, las MMPs se clasifican específicamente en 5 grupos: colagenasas intersticiales, gelatinasas, estromelisin, (matrilisina y metaloelastasa), MMPs de tipo membranal y otras MMPs<sup>50</sup>.

### **MMP-20 o enamelin**

La MMP20 o enamelin es la enzima proteolítica más común durante la formación del diente, es secretada exclusivamente por odontoblastos y ameloblastos, tiene como función degradar la proteína de la matriz del esmalte y la amelogenina<sup>54</sup>. Además de la enamelin, se ha visto que la MMP19 degrada la tenascina, proteína que se localiza en la pulpa dental, sin embargo no existen estudios que demuestren la función de esta proteasa en la degradación de este componente en la pulpa dental<sup>55</sup>.

Estudios realizados sobre las proteasas presentes en el desarrollo del esmalte sugieren que las metaloproteinasas (MMPs) son importantes durante la formación

inicial del esmalte mientras que las serín-proteasas están implicadas sobre todo durante los estadios de maduración del esmalte<sup>56</sup>.

**Tabla 1. Clasificación de las MMPS, por número, nombre común**

Clasificación	Número de MMP	Nombre Común
Colagenasas	MMP-1	Intersticial, <b>colagenasa 1</b> , colagenasa de vertebrados
	MMP-5	Colagenasa 3/4, colagenasa tisular, colagenasa tipo 4*, <b>Gelatinasa A</b>
	MMP-8	Colagenasa del neutrófilo, <b>colagenasa 2</b>
	MMP-13	<b>Colagenasa 3</b> , colagenasa rata
	MMP-18	<b>Colagenasa 4</b>
	MMP-19	RASI-1, RASI-6, <b>MMP 19</b>
Gelatinasas	MMP-2	<b>Gelatinasa A</b> , colagenasa 3/4, colagenasa tisular, colagenasa tipo 4
	MMP-9	<b>Gelatinasa B</b> , gelatinasa del macrófago, gelatinasa del neutrófilo, colagenasa tipo IV, colagenasa tipo V
Estromelisin, Matrilisina, Metaloelastasa	MMP-3	<b>Estromelisina 1</b> , colagenasa activadora de proteína, activador procollagenasa, proteoglicanasa, transina
	MMP-10	<b>Estromelisina 2</b> , transina-2
	MMP-11	<b>Estromelisina 3</b>
	MMP-7	<b>Matrilisina</b> , matrinal, metaloproteinasa-1 putativa, metaloendopeptidasa uterina
	MMP-26	<b>Matrilisina 2</b> , endometasa
	MMP-12	<b>Elastasa del macrófago</b> , metaloelastasa
Metaloproteinasas tipo Membranal	MMP-14	<b>Metaloproteinasa de la Matriz tipo 1</b> , MT1-MMP, membrana tipo 1
	MMP-15	<b>Metaloproteinasa de la matriz tipo 2</b> , MT2-MMP, SMCP-2, membrana tipo 2
	MMP-16	<b>Metaloproteinasa de la Matriz tipo 3</b> , MT3-MMP, metaloproteinasa ovárica

	MMP-17	<b>Metaloproteinasa de la Matriz tipo 4</b> , membrana tipo 4, MT4-MMP	
	MMP-24	<b>Metaloproteinasa de la Matriz tipo 5</b> , MT5-MMP	
	MMP-25	<b>Metaloproteinasa de la Matriz tipo 5</b> , leucolisina, MT6-MMP	
<b>Otras</b>	Envelisina	No reportado	
	MMP-20	<b>Enamelisina</b>	
	MMP-21	<b>Metaloproteinasa de la Matriz 21</b> , XMMP (Xenopus)	
	MMP-22	<b>Metaloproteinasa de la Matriz 22</b> , MMP-27 (homo sapiens)	
	MMP-23	<b>Metaloproteinasa de la Matriz 23</b> , CA-MMP, proteína MIFR (homo sapiens)	
	MMP-28	<b>Epilisina</b>	
	MMP-4	<b>Telopectidasa</b>	
	MMP-6 (MMP-3)	<b>MMP ácida</b>	

Como se mencionó anteriormente, la enamelisina es miembro de las MMP, se ha realizado la clonación del m RNA de la enamelisina de cerdo, vaca, ratón y ser humano<sup>57</sup>. La enamelisina o MMP-20, es una MMP específica de la amelogenina y es considerada una enzima predominante en la formación de la matriz del esmalte<sup>58</sup>.

En el desarrollo dental es expresada primariamente durante el estadio de secreción tardío de la amelogénesis pero no en el esmalte maduro<sup>59</sup>.

En el desarrollo del diente, la MMP-20 se encuentra expresada primariamente en el estadio secretor durante la amelogénesis pero no se encuentra expresado en el esmalte maduro<sup>59,60</sup>.

Se ha sugerido que la presencia de fluoruro dentro del esmalte induce molecularmente o morfológicamente cambios en las proteínas del esmalte, haciendo que sean menos susceptibles a la degradación<sup>61</sup>. En estudios recientes se ha observado que la enamelisina es responsable de degradar amelogenina in

vitro y bajo condiciones fisiológicas<sup>62,63</sup>. Su patrón de expresión se restringe al desarrollo del diente, la MMp-20 se ha localizado tanto en ameloblastos y odontoblastos<sup>62, 64,65</sup>. Sin embargo, no existen reportes científicos que muestren la distribución de la amelogenina y enamelisina en las células durante el desarrollo dental, a pesar de que se propone que ambas tienen un papel importante en la formación y desarrollo del esmalte dental.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

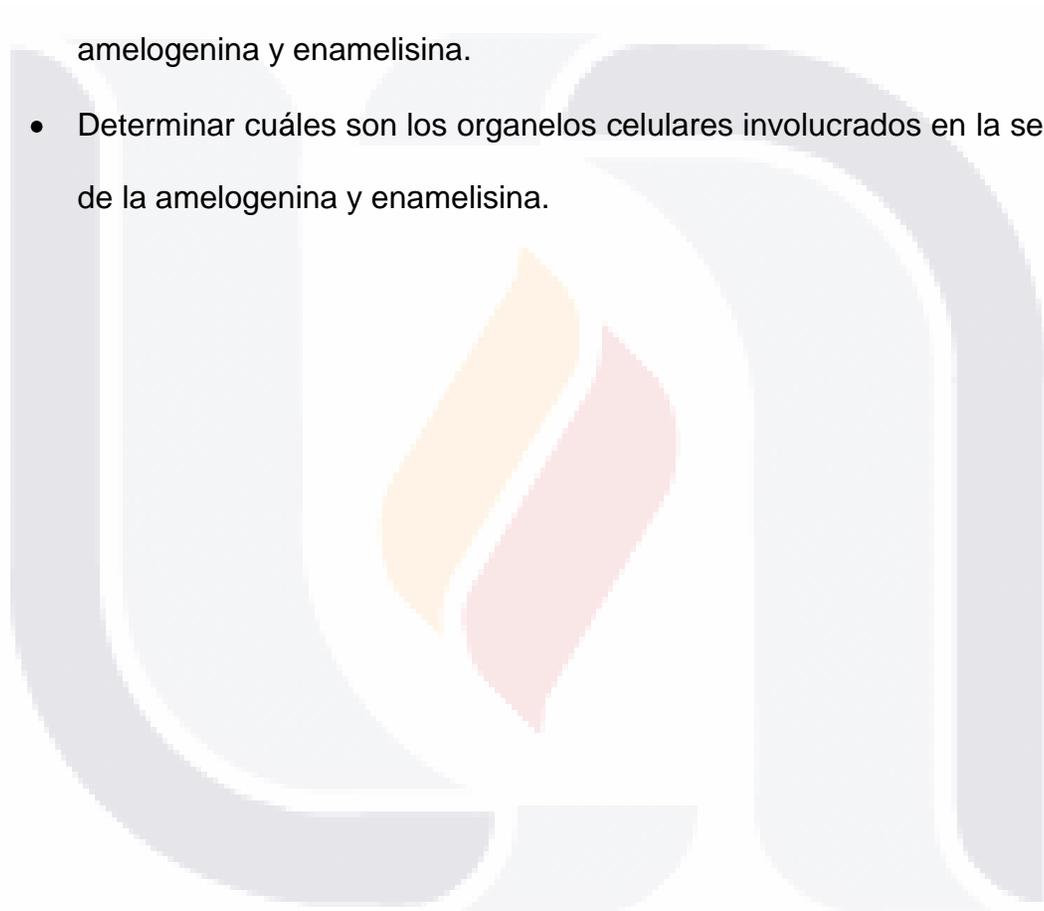
La amelogenina y la enamelisina son proteínas que participan de manera preponderante en la formación del esmalte. La amelogenina constituye el mayor porcentaje de la matriz orgánica del esmalte, y funciona como un andamio que promueve la formación del tejido periodontal. Mientras que la enamelisina se presenta en el frente de mineralización del diente, participa en los acontecimientos tempranos de la hendidura, los cuales permiten que los cristales del esmalte crezcan en longitud pero no en la anchura o el grueso, estructurando la futura morfología del esmalte maduro<sup>41,59,66</sup>.

Las alteraciones en la producción de la amelogenina y la enamelisina, pueden conducir a la amelogénesis imperfecta. Esta enfermedad en la que están implicados desordenes genéticos, se caracteriza por anomalías en el desarrollo, cantidad y calidad del esmalte dental, lo cual tiene un efecto claro en la deposición y distribución de la amelogenina, durante la amelogénesis<sup>47</sup>.

Por lo anterior es necesario conocer la distribución y vías de secreción extracelular e intracelular de la amelogenina y enamelisina, durante el desarrollo del órgano del esmalte, en fetos dentales humanos; con el fin de comprender como se lleva a cabo este proceso; así como la interacción entre ambas proteínas, lo cual constituye el fin de la presente tesis.

**OBJETIVOS:**

- Determinar en qué etapa y estructuras del desarrollo del órgano del esmalte dental aparecen la amelogenina y la enamelisina, así como su probable co-localización.
- Obtener información acerca de la distribución intracelular y extracelular de amelogenina y enamelisina.
- Determinar cuáles son los organelos celulares involucrados en la secreción de la amelogenina y enamelisina.



## METODOLOGÍA

**TIPO DE ESTUDIO.** Estudio de tipo descriptivo. Se determinó la presencia de las proteínas amelisinina y amelogenina, así como su colocación en los diferentes estadios de formación del órgano del esmalte y su disposición en las diferentes estructuras embriológicas.

**Población y muestra.** Se utilizaron mandíbulas y maxilares de fetos humanos con una edad de 14 a 22 semanas de vida intrauterina. Se obtuvo el consentimiento de las autoridades para su uso. (Anexo 1)

### Criterios de Inclusión:

- Fetos humanos con una edad entre 14 semanas a 22 semanas de vida intrauterina.
- Fetos que no tengan ninguna alteración visible.

### Criterios de exclusión:

- Fetos humanos con menos de 10 semanas y más de 26 semanas de vida intrauterina.
- Fetos que tengan alguna alteración fuera de lo normal.

## VARIABLES

Definición conceptual de variable	Definición operacional de variable. (indicador)	Escala de medición
Etapa de desarrollo dental	Estadios en que se encuentra el desarrollo de la pieza dentaria estudiada. (histológicamente)	categoría
Expresión de la proteína Enamelisina	Estadio y lugar del órgano del esmalte donde se marca la proteína amelina a través del desarrollo	categoría

	dental, al aplicársele un anticuerpo.	
Expresión de la proteína Amelogenina	Estadio y lugar del órgano del esmalte donde se marca la proteína amelogenina a través del desarrollo dental, al aplicársele un anticuerpo.	categórica
Colocalización de las proteínas Enamelisina y Amelogenina	Estadio y lugar del órgano dental donde se colocan las proteínas amelisina y amelogenina a través del desarrollo dental, al aplicar marcadores específicos.	categórica

Variables Dependientes: Enamelisina y Amelogenina

Variables Independientes: Edad de los fetos a partir de los cuales se obtuvieron las mandíbulas.

#### **Obtención de los especímenes.**

Los permisos para el uso de fetos humanos, en la presente investigación, fueron otorgados por el Hospital General de Zacatecas, institución que realizó la donación. ( Anexo 1)

Se obtuvieron gérmenes dentales humanos a partir de 6 fetos, de entre 14 y 22 semanas de vida intrauterina; donados por el Área de Patología del “Hospital General de Zacatecas”, gracias a la gestión del Dr. Sixto Javier Sosa Díaz. Todos los fetos tuvieron un periodo de fijación mayor a 4 meses, en formalina neutra al 10%. Previo a su procesamiento se realizó una revisión macroscópica para corroborar la ausencia de malformaciones aparentes.

### **Disección y preparación de muestras.**

Se disecaron los maxilares de los 6 especímenes obtenidos, posteriormente estos, fueron separados en superiores e inferiores y segmentados a su vez en izquierdo y derecho, obteniendo así un total de 24 muestras. A continuación se colocaron en solución descalcificante de EDTA al 10 % (ácido etilendiaminotetracético), por 30 días, transcurrido este tiempo se colocaron en buffer salino de fosfatos (PBS al 1X) por 30 min. Finalmente se procesaron por la técnica histológica y se incluyeron en parafina, se obtuvieron cortes histológicos de 5µm de espesor. Los portaobjetos empleados fueron previamente tratados con silano (3-aminopropil) triethoxy-silano), para mantener el tejido fijado durante el proceso inmunohistoquímico.

### **Anticuerpos para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.**

Para el inmunomarcaje se usaron anticuerpos primarios policlonales, anti-amelogenina (Hokudo, Japón) y anti-enamelisina (Chemicon International, USA), así como el anticuerpo anti-amelogenina producido en el laboratorio de Biología Celular y Tisular de la UAA. Como segundo anticuerpo se empleó Proteína A peroxidada (Amersham, USA).

En el marcateo inmunofluorescente se usaron como anticuerpos primarios los anticuerpos policlonales anti-enamelisina y anti-amelogenina; anteriormente mencionados, así como el anticuerpo monoclonal anti-golgin-97 para ser humano

de Molecular Probes, USA. Para la inmunofluorescencia de Retículo Endoplásmico se usó el primer anticuerpo monoclonal del kit SelectFX Alexa Fluor 488 Endoplasmic Reticulum (anti- Proteína disulfuro isomerasa, Molecular Probes USA). Como anticuerpos secundarios se usaron: Qdot 565 chivo anti-conejo (Molecular Probes), Qdot 525 chivo anti-conejo (Molecular Probes) y el anticuerpo Alexa Fluor 488 chivo anti-ratón (kit SelectFX Alexa Fluor 488, Molecular Probes, USA).

#### **Obtención de un anticuerpo policlonal dirigido contra amelogenina de la matriz del esmalte dental de cerdo.**

Se purificó amelogenina dental a partir del producto comercial derivado de matriz de esmalte dental de cerdo, Emdogain (Strauman, Suiza). Para lo cual se colocaron en un tubo de centrifuga de 1.5 ml, 50 µl de Emdogain y 50 µl de amortiguador de muestra 2X (Laemli, 1970), la mezcla se calentó por 5 minutos a 100 °C, con el fin de disminuir su densidad y hacerla fluida. La muestra fue analizada en geles de poliacrilamida-SDS al 10% (Laemli, 1970), en una cámara MiniProtean III (BioRad, USA) durante 1.5 horas a 100V; una vez concluida la corrida los geles se tiñeron con azul de Coomassie R250 en 10% de metanol y 10% de ácido acético en agua destilada.

Para el análisis de Western Blot, se separó la muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %, como se mencionó anteriormente, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa 0.5 µm (BioRad), en una cámara Mini Trans-Blot a 253mA por 45 min. Posteriormente, la membrana fue teñida con Rojo de

Ponceau al 1% de ácido acético en agua (5%), para corroborar la transferencia de las proteínas, a continuación se eliminó el colorante con repetidos lavados con agua destilada. La membrana fue bloqueada con Skim Milk (Difco) al 7% en PBS-Tween al 0.25%, dos horas a temperatura ambiente. Se colocó entonces, el anticuerpo Anti-amelogenina (Hokudo, Japón) en una dilución 1:250 en PBS-Tween, se incubó toda la noche a 4 °C; posteriormente se colocó Proteína A peroxidada (Amersham, USA) como anticuerpo secundario a una dilución de 1:1000 en PBS-Tween. La inmunodetección se reveló con Diaminobencidina (Sigma) en amortiguador Tris (cita bibliográfica).

Una vez identificada la proteína, en los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie, comparándolos con los resultados del Western Blot, la banda correspondiente a la amelogenina se cortó y fue analizada por electroforesis desnaturalizante. Una vez corroborada la pureza de la proteína mediante Western Blot, se cortó la banda correspondiente, se maceró con un emboló de jeringa de insulina hasta que se convirtiera en una mezcla fluida. Se emulsificaron 500µl de gel homogeneizado y 500µ de adyuvante completo de Freund (Amersham, USA), 250µg de proteína. Esta emulsión fue inyectada en un conejo hembra de aproximadamente 3Kg de peso, intradérmicamente en el torso. Previo a la inmunización, se colectaron 3ml de sangre y se separó el suero, para emplearlo como control. Se realizó un segundo desafío empleando el homogenizado del gel y adyuvante incompleto de Freund en las proporciones ya mencionadas, se realizaron dos desafíos Más con el homogenizado del gel diluido en hidróxido de aluminio y magnesio. Cada inoculación se llevó a cabo en

intervalos de una semana. Al final se colectaron 20ml de sangre mediante punción cardiaca y se separó el suero por centrifugación, a continuación el suero policlonal fue adsorbido con un extracto total de *E. coli* y posteriormente con el suero preinmune<sup>4</sup>.

Se realizó la titulación del anticuerpo mediante Western Blot, empleando la amelogenina purificada y el suero inmune adsorbido a una dilución de 1:50, 1:100, 1:500, 1:200, 1:1000 y 1:5000.

También se probó el suero inmune en tejidos de germen dental de feto humano, procesados histológicamente. La técnica empleada se menciona en párrafos posteriores.

Las imágenes de los geles de poliacrilamida, así como las imágenes del Western Blot, fueron tomadas con el fotodocumentador Chemi Doc (BioRad) con el software Quantity One (BioRad).

### **Inmunohistoquímica**

Se obtuvieron cortes histológicos de 5 $\mu$ m de espesor, de mandíbula de feto humano; los cortes fueron desparafinados en xilol, dos inmersiones por 10 min cada una, posteriormente se colocaron en alcohol absoluto, por 3 min, a continuación se incubaron 30 min en peróxido de hidrógeno (SIGMA-ALDRICH, USA) al 1% en metanol para neutralizar la peroxidasa endógena, posteriormente se lavaron con amortiguador salino de fosfatos 1X (PBS 1X); se rehidataron en concentraciones descendentes de alcohol y se colocaron en citrato de sodio (J.T.Baker, México) 0.01M en olla exprés (Presto) por 2min a su máxima presión,

para desenmascarar antígenos los cortes fueron colocados después en PBS1X durante 5 minutos, en seguida se bloquearon con albúmina sérica bovina (SIGMA-ALDRICH, USA) al 1% por 2hrs a temperatura ambiente, en cámara húmeda. A continuación los cortes se lavaron 3 veces con PBS-Tween (Sigma-Aldrich, USA) al 0.025% (PBS-T) y se incubaron 2hrs a temperatura ambiente en cámara húmeda, con los primeros anticuerpos: anti-amelogenina (HOKUDO, CO. Japón) 1:100 y el anti-enamelisina (Chemicon International, USA) 1:50, así como el anticuerpo anti-amelogenina producido en el laboratorio 1:1000. Transcurrido este proceso, se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron con Proteína A peroxidada (Amersham, USA) 1:1000 por dos horas a temperatura ambiente, en cámara húmeda, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-T. La reacción inmune se reveló con 3'3-Diaminobenzidina (Sigma) en amortiguador Tris-HCl (J.T.Baker, USA) pH 7.6, después se lavaron 3 veces con PBS-T. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Harris, por 20 segundos, se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol 70%, 96% y 100% y finalmente se aclararon en dos cambios de xilol de 5 min por cada cambio. Los cortes así procesados se montaron con resina Entellan (Fermont). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio Motic (China) con el software Imagen Pro Plus 3.0.

### **Inmunofluorescencia**

Se realizaron marcajes inmunofluorescentes en cortes de mandíbula de feto humano de 5µm de espesor y en cortes del mismo espesor de páncreas de rata,

estos últimos con el fin de obtener controles positivos para el marcaje de Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi. Los cortes fueron desparafinados en xilol, dos inmersiones por 10 min cada una, posteriormente se colocaron en alcohol al 100%, por 3 min, consecutivamente se lavaron con amortiguador salino de fosfatos 1X (PBS 1X) por 5 min; se rehidrataron en concentraciones descendentes de alcohol y se colocaron en citrato de sodio (J.T.Baker, México) 0.01M en olla exprés (Presto) por 2min a su máxima presión, para desenmascarar antígenos, para después, colocar los cortes en PBS 1X durante 5 minutos, inmediatamente después se bloquearon con albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, USA) al 1% por 2hrs a temperatura ambiente, en cámara húmeda. A continuación los cortes se lavaron 3 veces amortiguador salino de fosfatos 1X, conteniendo 0.025% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) (PBS-T) y se incubaron toda la noche a 4 °C, con los siguientes anticuerpos policlonales: anti-enamelisina (Chemicon International, USA) 1:50 y anti-amelogenina (producido en el laboratorio); y con el anticuerpo monoclonal: anti- Golgi (Anti-golgin-97, humano, Molecular Probes, USA) 1:200; para la inmunofluorescencia de Retículo Endoplásmico se usó el primer anticuerpo monoclonal del kit SelectFX Alexa Fluor 488 Endoplasmic Reticulum (anti- Proteína disulfuro isomerasa, Molecular Probes, USA) 1:200, las muestras fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes en cámara húmeda. Los anticuerpos secundarios usados fueron: Qdot 565 chivo anti-conejo (Molecular Probes, USA) 1:500 para el anticuerpo anti-amelogenina, Qdot 525 chivo anti-conejo (Molecular Probes, USA) 1:500 para el anticuerpo anti-

enamelisina y el anticuerpo Alexa Fluor 488 chivo anti-ratón (kit SelectFX Alexa Fluor 488, Molecular Probes, USA) 1:500 para el anticuerpo anti- Retículo Endoplásmico y para el anticuerpo anti-Golgi. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Harris (Sigma, USA), por 20 segundos, se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol 70%, 96% y 100% y finalmente se aclararon en dos cambios de xilol de 1 min por cada cambio. Los cortes así procesados se montaron con resina Entellan (Fermont, México). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal LEICA DMI 4000 B, y analizadas con el software LAF (Leica, Alemania).

Con respecto a los dobles y triples marcajes se llevaron a cabo siguiendo la metodología antes mencionada, para cada una de las reacciones, terminando una para luego comenzar con el segundo y el tercer marcaje según correspondió a cada muestra y finalmente fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris (SIGMA, USA), deshidratadas hasta xilol y montadas en resina Entellan (Fermont, México) con las especificaciones antes mencionadas.

Las muestras procesadas para inmunofluorescencia fueron observadas en el microscopio confocal LEICA DMI 4000 B, y capturados con el software LAF (Leica, Alemania).

## RESULTADOS

### Obtención del anticuerpo policlonal anti amelogenina

**Purificación de amelogenina:** Se purificó amelogenina a partir del producto comercial derivado de matriz de esmalte dental de cerdo: Emdogain® (Straumann, Suiza), como se describió en metodología.

En el análisis electroforético del Emdogain® (Figura 6), se aprecia la presencia de una banda en un peso molecular de 25kD, que corresponde al peso molecular de amelogenina.

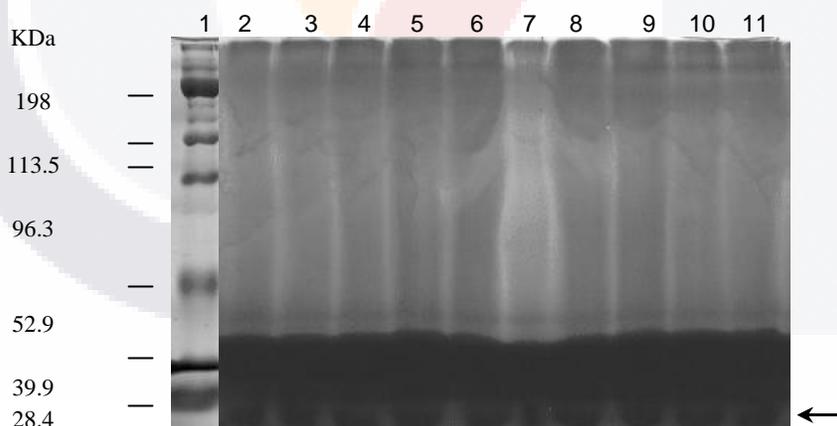


Fig. 6. Separación electroforética del Emdogain, gel de poliacrilamida-SDS al 10%. Carril 1, MPM. Carriles 2-11, proteínas del Emdogain, la flecha señala la proteína seleccionada como la amelogenina.

A partir del gel electroforético de Emdogain® (Straumann, Suiza), y mediante el método de transferencia de gel a gel, se eliminaron los componentes no correspondientes a amelogenina. Se obtuvieron dos proteínas una correspondiente a 25 kDa, y otra a 18 kDa, la primera corresponde al peso molecular de la amelogenina, la segunda probablemente corresponde porciones degradadas de la misma proteína (Figura 7).

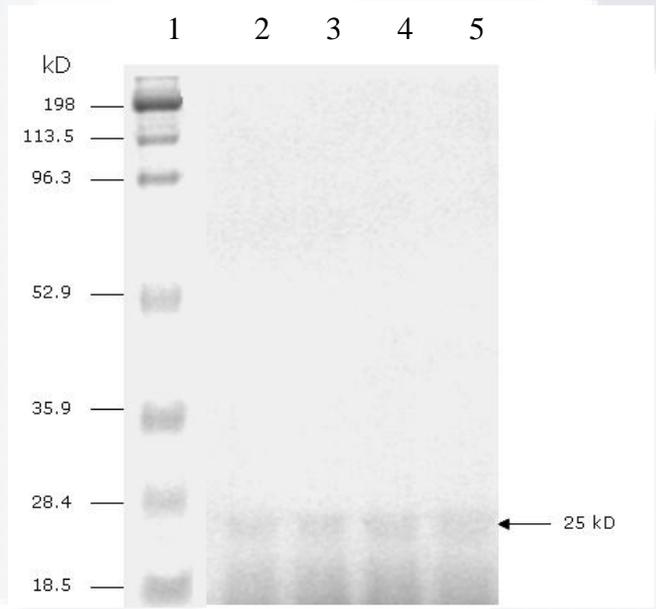


Fig. 7. Amelogenina purificada. Gel de poliacrilamida-SDS al 10%. El carril 1 muestra los marcadores de peso molecular. En los carriles 2, 3, 4 y 5 se muestra el corrimiento del Emdogain, la flecha señala la amelogenina. Banda que fue purificada por el procedimiento de transferencia gel a gel.

### Adsorción del Suero inmune:

Se obtuvieron 30 ml de suero inmune, Posteriormente el suero fue adsorbido, empleando el suero preinmune y después un extracto total de *Escherichia coli* K-12. La adsorción del suero inmune conteniendo el anticuerpo anti-amelogenina se realizó para eliminar las inmunoglobulinas inespecíficas de este suero. La adsorción se realizó de la siguiente manera, primero el suero preinmune fue separado a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, luego transferido a una membrana de nitrocelulosa como se ha descrito anteriormente. Posteriormente esta membrana fue incubada con el suero inmune durante 2 hrs a temperatura ambiente, posteriormente fue incubado con proteína A peroxidada 1:1000, . La membrana de nitrocelulosas fue posteriormente revelada con diamino bencidina como se describió arriba. El suero inmune así adsorbido fue recuperado y almacenado a 4°C. El suero inmune adsorbido así con el suero preinmune fue posteriormente adsorbido con un extracto total de *E. coli*, siguiendo el mismo procedimiento (Cita bibliográfica). En la figura 8 se muestra en el panel A la adsorción realizada con el suero preinmune, mientras que en el panel B se muestra la adsorción hecha con el extracto total de *E. coli*.

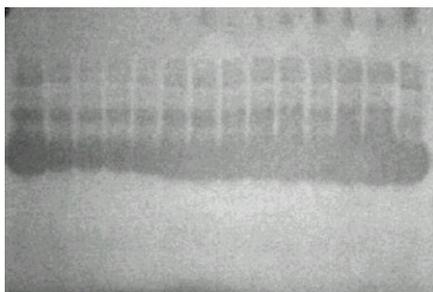
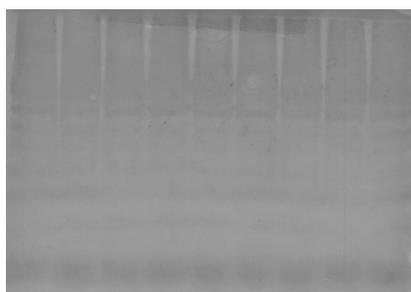
**A****B**

Fig. 8. Western Blot de la adsorción del anticuerpo policlonal anti amelogenina obtenido. A) Adsorción con suero preinmune de conejo, B) adsorción con extracto total de *E. coli*.

**Titulación del anticuerpo policlonal anti amelogenina:**

Una vez adsorbido el suero inmune, se procedió a realizar su titulación, empleando Western Blot (Cita bibliográfica. Se probaron diluciones 1: 50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 y 1:5000, tal y como se muestra en la Figura 9. En todas las diluciones, el marcaje fue intenso y específico,.



Fig. 9.- Western Blot. Titulación del anticuerpo policlonal anti amelogenina obtenido y reconocimiento de la enamelisina. Carril 1, marcadores de peso molecular, carril 2, 3, observamos los controles negativos de IgG anti conejo. En el 4, 5, 6, 7, 8, 9 reconocimiento del Emdogain con el anticuerpo policlonal anti amelogenina en diluciones 1: 50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 y 1:5000, respectivamente. Carril 10 y 11. Reconocimiento de la enamelisina con un anticuerpo policlonal comercial (Chemicon Int.). Este resultado muestra claramente que ambas proteínas son distintas. Como anticuerpo secundario se usó IgG anticonejo peroxidado. El revelado se realizó con diaminobencidina.

## Inmunohistoquímica

Como se puede observar en la figura 10, el anticuerpo producido en el laboratorio marcó la amelogenina (10b), con mayor intensidad que el anticuerpo comercial (10a). Se marcó el epitelio dental interno y la papila dental. El marcaje con el anticuerpo comercial anti amelisinina se observó en el epitelio dental interno (10c).

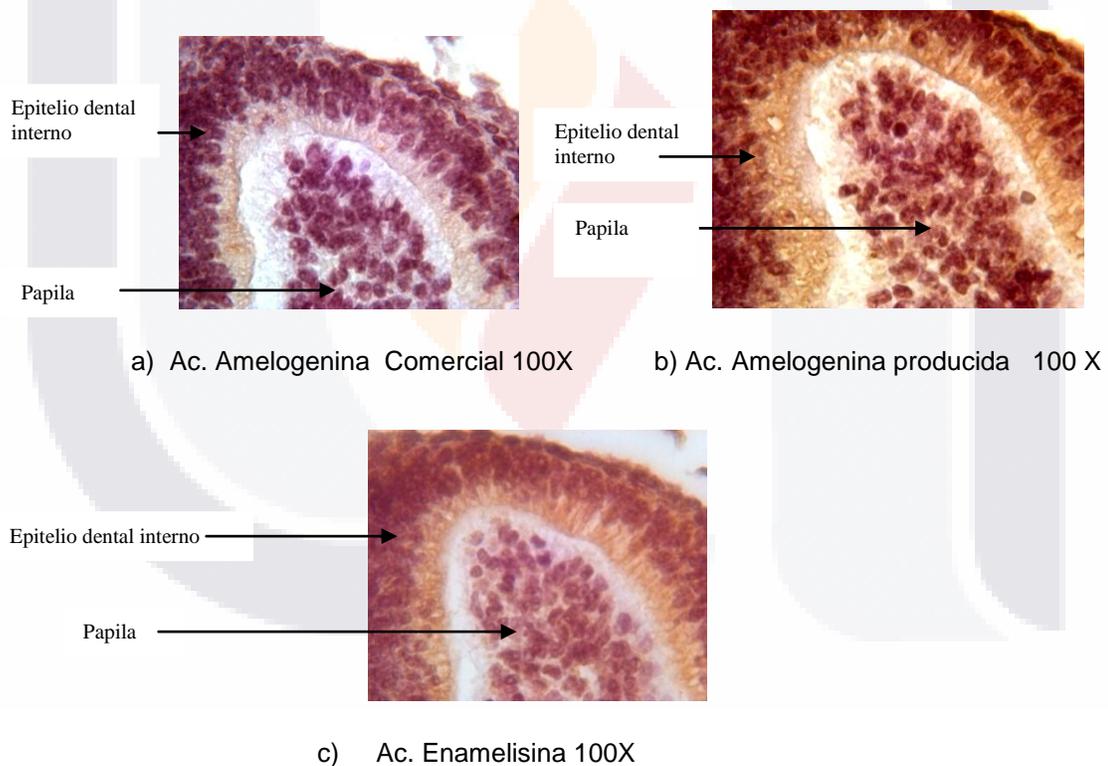


Fig.10.- Inmunohistoquímica. a) Marcaje con un Ac. Anti-amelogenina manufacturado por casa Hokudo (Japón) dilución 1:200; b) Marcaje con Ac. Producido en laboratorio, dilución 1:1000; c) Marcaje con Ac. Anti-enamelisina de Chemicon Internacional, a una dilución 1:50.

## **INMUNOFLUORESCENCIA**

### **INMUNOFLUORESCENCIA DE PÁNCREAS DE RATA Y GERMEN DENTAL HUMANO**

El marcaje inmunofluorescente para Retículo Endoplásmico (RE) y Aparato de Golgi (AG) se realizó en cortes de páncreas de rata, para validar la técnica empleada usando anticuerpos secundarios marcados con. Select FX Alexa Fluor 488. El control negativo se realizó sin poner el 1er. Anticuerpo (Figura 11), no presenta reconocimiento del RE.

Mediante la tinción Hematoxilina y Eosina (HE), fue posible observar la integridad estructural del tejido. En la tinción fluorescente del control positivo (Figura 12), se observó un marcaje intenso alrededor del núcleo, la intensidad disminuye hacia la membrana celular. Estos resultados son congruentes con la distribución del RE en las células secretoras de páncreas.

Los cortes de páncreas de rata, en los que se realizó inmunofluorescencia para marcar AG (Figuras 13 y 14), muestran un marcaje específico, pues el control negativo que se realizó sin poner el 1er. Anticuerpo no presenta reconocimiento,, mientras que en el control positivo se observa, una tinción de apariencia granular distribuida de manera homogénea en el citoplasma.

Se observó un marcaje específico e intenso, ubicándose el RE más próximo al núcleo que el AG (Figuras 12 y 14). Se observó una autofluorescencia mínima en los controles.

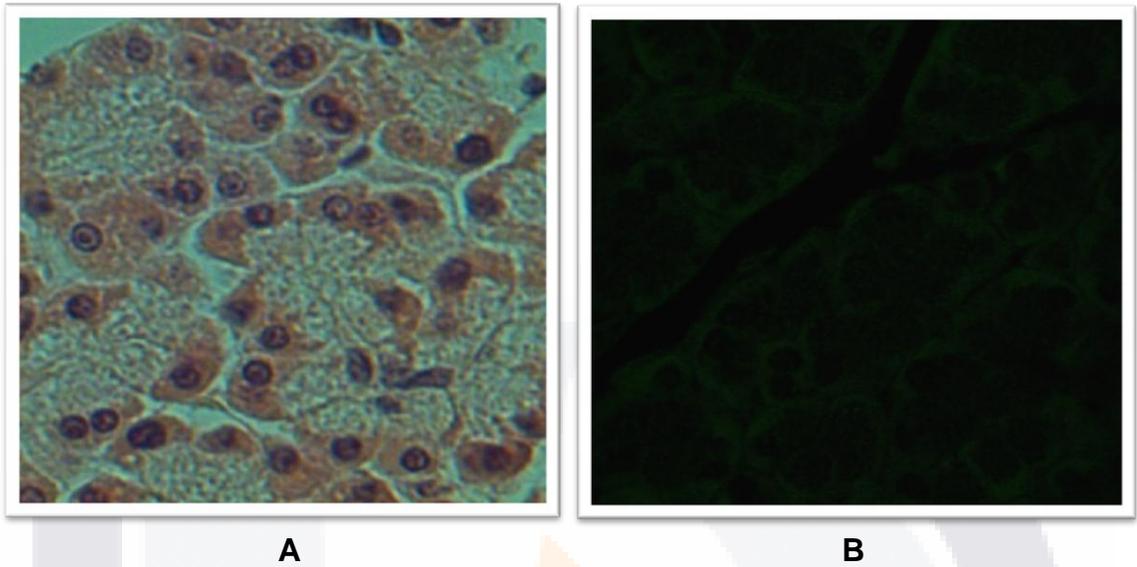


Fig. 11.- Control negativo de la tinción inmunofluorescente de Retículo Endoplásmico (RE) en páncreas de rata. A) Páncreas de rata, campo claro de control negativo de la inmunotinción indirecta con anticuerpo anti-RE (Select FX Alexa Fluor 488),contrateñido con tinción H y E. 100x. B) Páncreas de rata, Microscopio Confocal,control negativo de la inmunotinción indirecta con anticuerpo anti RE(Select FX Alexa Fluor 488) 600X..

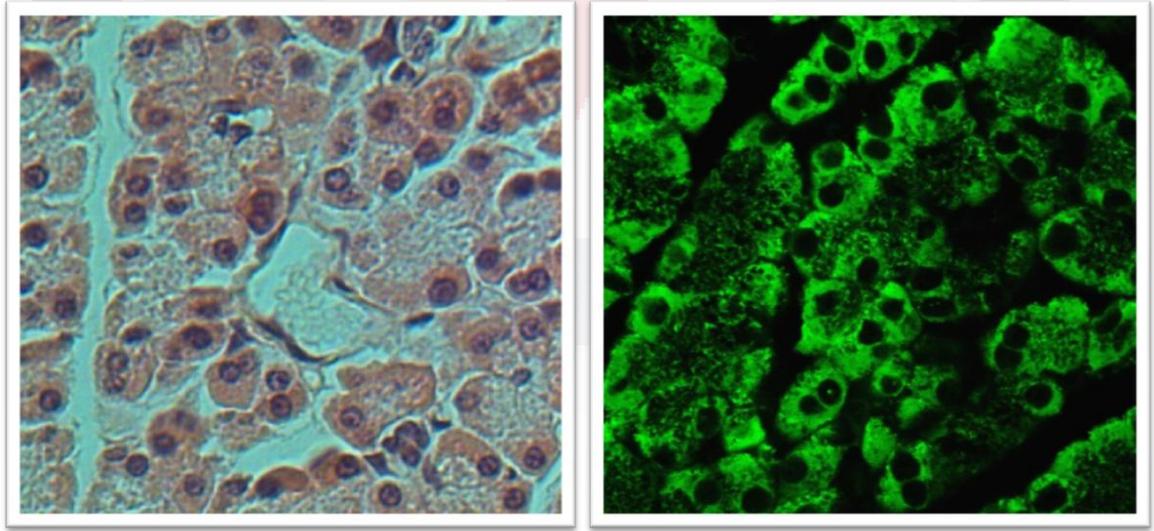


Fig. 12. Tinción inmunofluorescente de retículo Endoplásmico (RE) en páncreas de rata. A) Páncreas de rata, campo claro de la inmunotinción indirecta con anticuerpo anti-RE (Select FX Alexa Fluor 488), contrateñido con tinción H y E. 100x. B) Páncreas de rata, Microscopio Confocal, inmunotinción indirecta con anticuerpo anti RE (Select FX Alexa Fluor 488) 600X

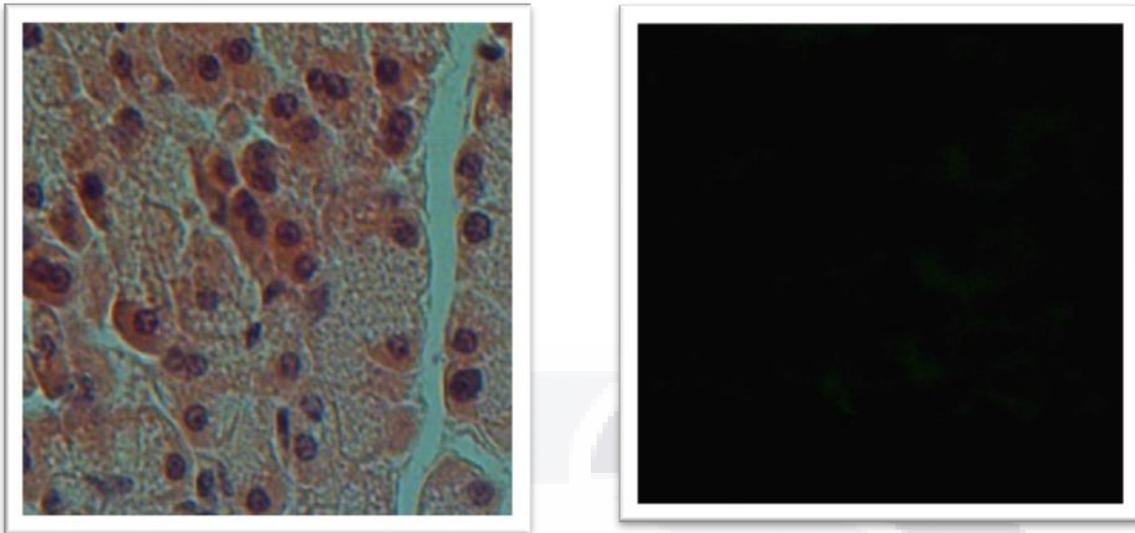


Fig. 13. Control negativo de la tinción inmunofluorescente de Aparato de Golgi (AG) en páncreas de rata. A) Páncreas de rata, campo claro de la inmunotinción indirecta con anticuerpo anti-golgina (Select FX Alexa Fluor 488), contrateñido con tinción H y E. 100x; B) Páncreas de rata, Microscopio Confocal, control negativo de la inmunotinción indirecta con anticuerpo anti golgin (Select FX Alexa Fluor 488) 600X.

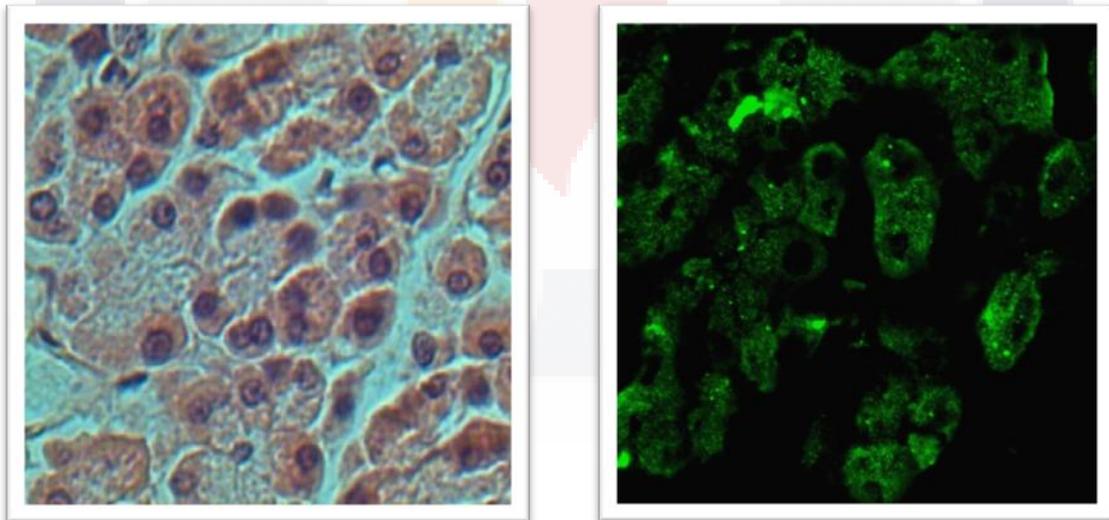


Fig. 14. Tinción inmunofluorescente de Aparato de Golgi (AG) en páncreas de rata,. A) Páncreas de rata, campo claro de la inmunotinción indirecta con anticuerpo anti-golgina (Select FX Alexa Fluor 488), contrateñido con tinción H y E. 100x. B) Páncreas de rata, Microscopio Confocal, inmunotinción indirecta con anticuerpo anti golgina (Select FX Alexa Fluor 488) 600X.

La misma técnica fue realizada en germen dentario humano. En la fig. 15A se observa un corte de un germen dental en campo claro en el estadio de campana tardía en donde existe una secreción de dentina en la parte central así como odontoblastos en la región basal y ameloblastos en la región apical. En fig. 15B se observa el control negativo para el cual se utilizaron cortes seriados a los que no se les aplicó el 1er. anticuerpo observado con el microscopio Confocal, con una fluorescencia basal mínima en comparación con las muestras inmunomarcadas. En la figura 16A observamos germen dentario en campo claro teñido con hematoxilina eosina se ve un estadio de campana tardía en donde existe una secreción de dentina del manto en la parte central así como odontoblastos. En la figura 9B un inmunomarcaje fluorescente de RE con Select FX Alexa Fluor 488. Endoplasmic reticulum Labeling kit (Molecular Probes). En el cual podemos observar un marcaje muy abundante del RE en el tejido.

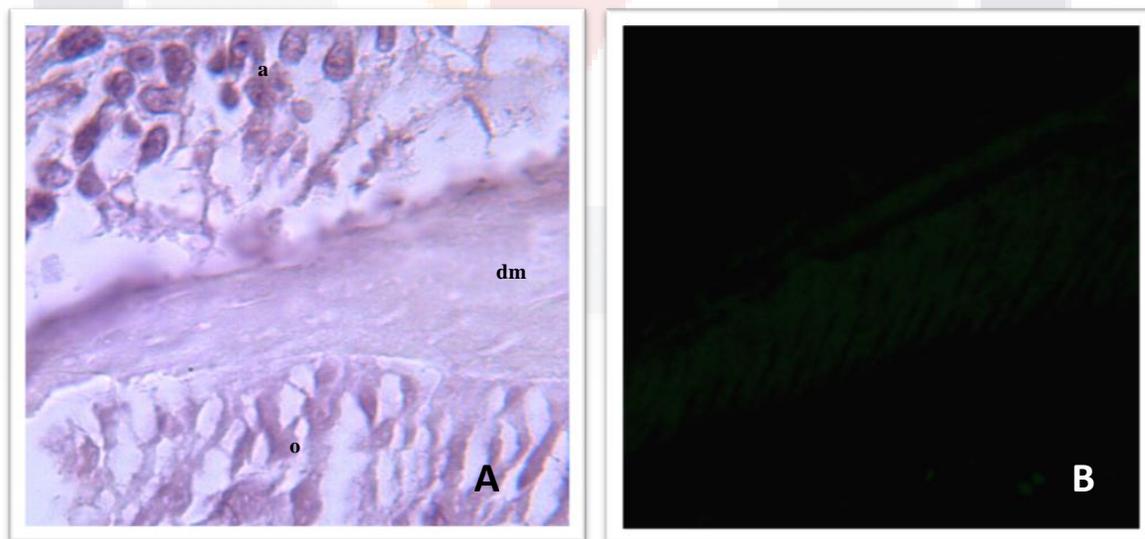


Fig. 15.- Control negativo de la tinción inmunofluorescente de Retículo Endoplásmico (RE) en germen dentario. Estadio de campana tardía: (a). A) Germen dentario humano, estadio de campana tardía: campo claro de la inmunotinción indirecta con anticuerpo anti-RE (Select FX Alexa Fluor 488), contrateñido con tinción H y E. 100x; B) Microscopio Confocal, inmunotinción indirecta

con anticuerpo anti RE (Select FX Alexa Fluor 488) 600x. odontoblasto (o), dentina del manto (dm) y ameloblastos

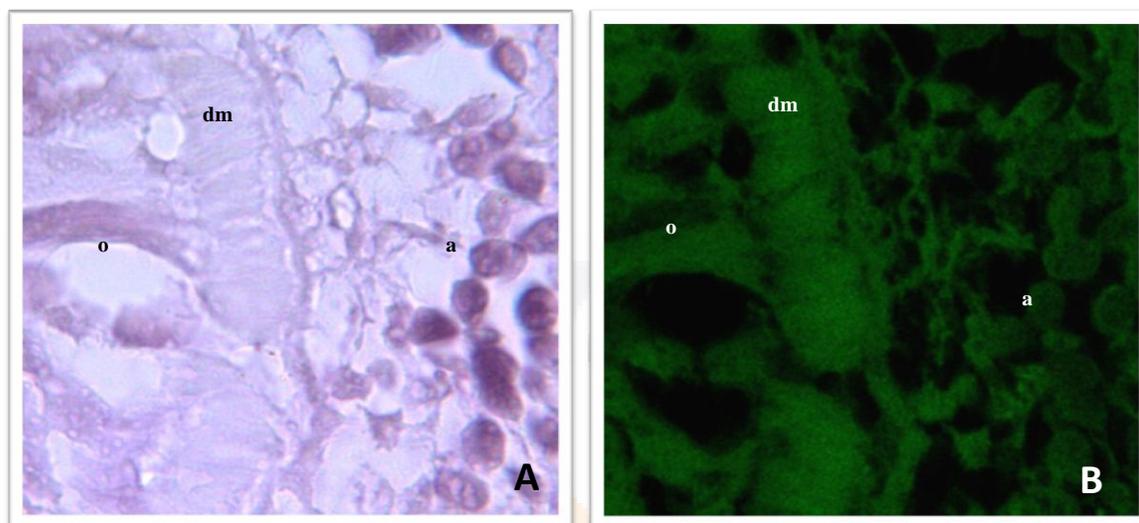


Fig. 16. Tinción inmunofluorescente de Retículo Endoplásmico (RE) en germen dental estadio de campana tardía. A) Germen dentario humano, estadio de campana tardía: campo claro de la inmunotinción indirecta con anticuerpo anti-RE (Select FX Alexa Fluor 488),contrateñido con tinción H y E. 100x. B) Microscópio Confocal, inmunotinción indirecta con anticuerpo anti RE(Select FX Alexa Fluor 488) 600x odontoblasto (o), dentina del manto (dm) y ameloblastos (a)

## INMUNOFLUORESCENCIA DE GERMEN DENTAL HUMANO

### Doble marcaje: Amelogenina - RE

Se realizó un doble marcaje, utilizando Anti-amelogenina (producido en el laboratorio), y como segundo anticuerpo (Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes), (color azul claro) y Anti-RE (Molecular Probes); como 2º.anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes) (color verde), en un espécimen de germen dentario humano en estadio de campana tardía. Se observa en la figura 17A, vista en campo claro con una tinción de hematoxilina, una secreción de dentina en la parte central, así como odontoblastos

en la parte inferior y ameloblastos en la parte superior. En la figura 17B se observó bajo el microscopio Confocal: a) marcaje con el anticuerpo policlonal anti-amelogenina producido en el laboratorio, y como anticuerpo secundario se empleó Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes), en el cual se observa un marcaje de amelogenina tanto en órgano del esmalte como en papila dental. b) marcaje con Anti-RE (Molecular Probes); como anticuerpo secundario se empleó Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes) en el espécimen se observó la disposición del retículo endoplásmico tanto en órgano del esmalte como en papila dental. c) Se observa una sobreposición de la amelogenina y el R-E.

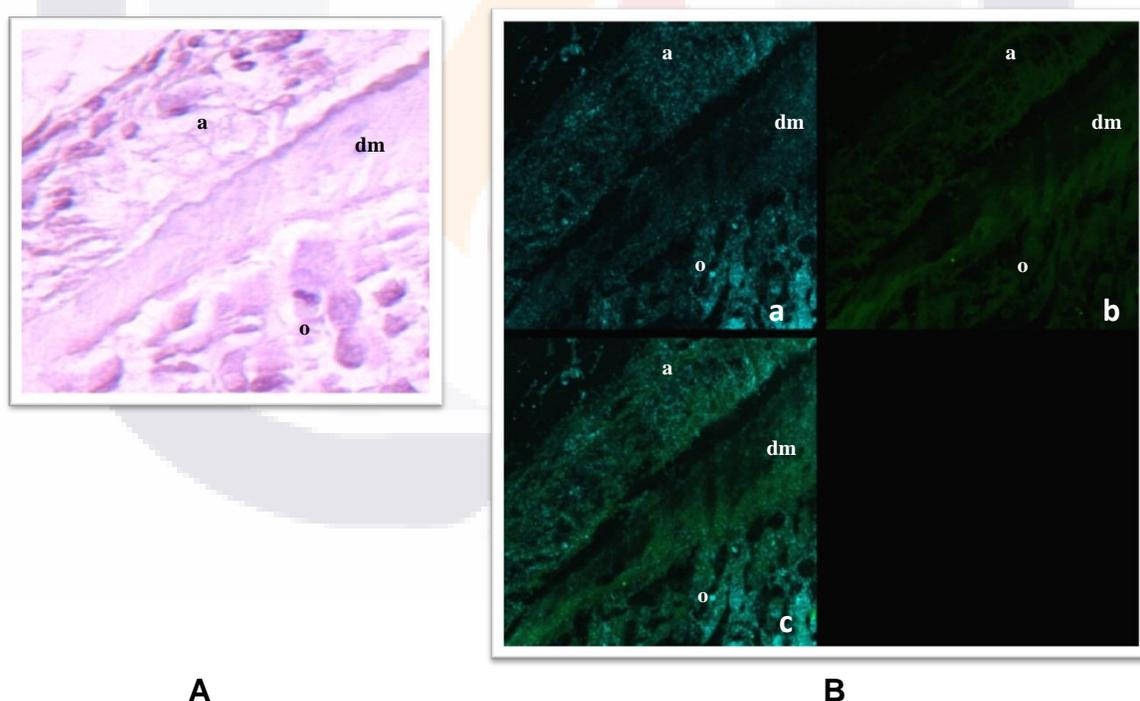


Fig. 17. Marcaje inmunofluorescente de RE en germe dental humano. Estadio de campana tardía: A) Germen dental humano, estadio de campana tardía. H-E. Microscopio Óptico, 1000x. B) Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: a) Anti-amelogenina (producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes). b) Anti-RE (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes) c) Sobreposición de ambos marcadores. Ameloblastos (a), dentina del manto (dm) y odontoblastos (o).

## Análisis de colocalización

En un sentido biológico, la co-localización describe la existencia de 2 o más moléculas ocupando la misma posición en el espacio. Estas moléculas son, a menudo, proteínas visualizadas mediante anticuerpos o sondas fluorescentes.

### Doble marcaje: Amelogenina – RE

Se llevó a cabo la colocalización de ambos marcadores mediante el software de colocalización del microscopio Confocal, teniendo un porcentaje de colocalización de 53.29%.

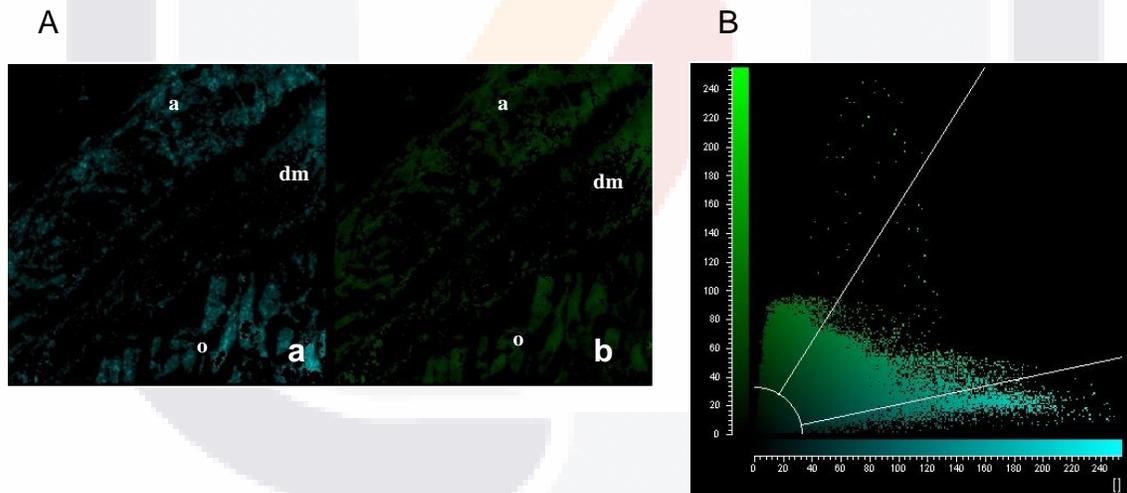


Fig.18. Colocalización por medio del programa del microscopio confocal, con un porcentaje de colocalización del 53.29 %.A) Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: a) Anti-amelogenina (producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes). b) Anti-RE (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes) B) Gráfica de Colocalización. Ameloblastos (a), dentina del manto (dm), odontoblastos (o).

	Colocalization
Pearson's Correlation	0.3729
Overlap Coefficient	0.6917
<b>Colocalization Rate</b>	<b>53.29%</b>
Colocalization Area	3739.39 $\mu\text{m}^2$
Area Image	14908.43 $\mu\text{m}^2$
Area Foreground	7016.54 $\mu\text{m}^2$
Area Background	7891.90 $\mu\text{m}^2$

Tabla 1. Análisis de Colocalización, del doble marcaje Amelogenina- RE.

### **Doble marcaje: Enamelisina – RE**

Se realizó un doble marcaje, utilizando anti-enamelisina (Chemicon International, USA), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes, USA) (color rojo) y anti-Retículo Endoplásmico (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes) (color verde), en un espécimen de germen dentario humano en estadio de campana tardía. Se observa en la figura 19A, vista en campo claro con una tinción de hematoxilina, una secreción de dentina en la parte central así como odontoblastos en la parte inferior y ameloblastos en la parte superior. En la figura 19B observamos bajo el microscopio Confocal: a) Anti-enamelisina (Chemicon International, USA), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes, USA), se observa la disposición de la enamelisina más marcada en los ameloblastos,

aunque se observa también su presencia en odontoblastos. b) marcaje con Anti-RE (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes) en el observamos la disposición del retículo endoplásmico tanto en órgano del esmalte como en papila dental. c) Se observa una sobreposición de ambos marcadores.

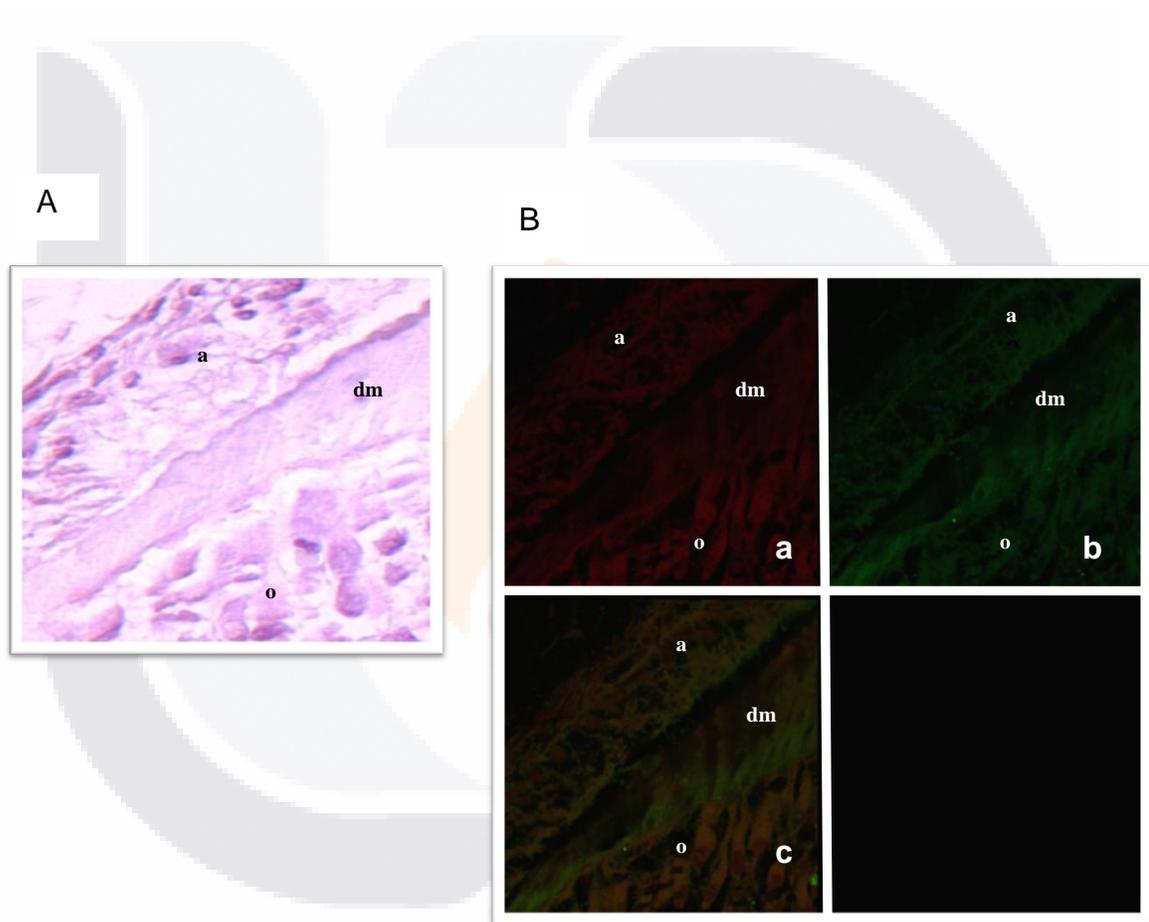


Fig. 19. Marcaje inmunofluorescente de RE en germen dental humano. Estadio de campana tardía: A) Germen dental humano, estadio de campana tardía. H-E. Microscopio Óptico, 1000x B) Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: a) Anti-enamelisina (Chemicon), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes) b) Anti-RE (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes) c) Sobreposición. Ameloblastos (a), dentina del manto (dm) y odontoblastos (o).

## Análisis de Colocalización

### Doble marcaje: Enamelisina – RE

Se llevó a cabo la colocalización de ambos marcadores mediante el software de colocalización del microscopio Confocal, teniendo un porcentaje de colocalización de 99.95%.

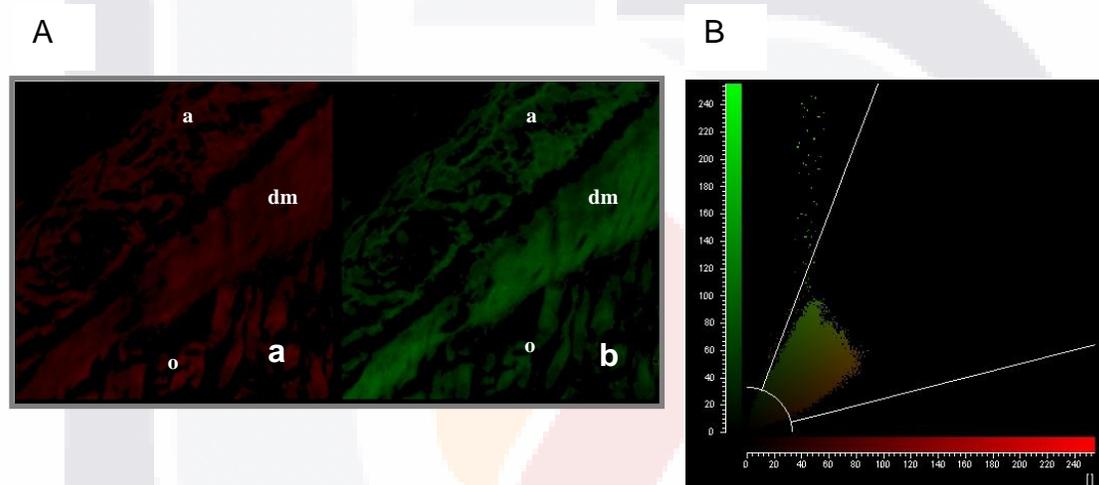


Fig. 20. Colocalización por medio del programa del microscopio confocal, con un porcentaje de colocalización del 99.95 %. A) Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: a) Anti-enamelisina (Chemicon), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes). b) Anti-RE (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes). B) Gráfica de Colocalización.ameloblastos(a), dentina del manto (dm), odontoblastos (o).

	Colocalization
Pearson's Correlation	0.8729
Overlap Coefficient	0.9492
<b>Colocalization Rate</b>	<b>99.95%</b>
Colocalization Area	7289.86 $\mu\text{m}^2$
Area Image	14908.43 $\mu\text{m}^2$
Area Foreground	7293.50 $\mu\text{m}^2$
Area Background	7614.94 $\mu\text{m}^2$

Tabla 2. Análisis de Colocalización, del doble marcaje Enamelisina- RE.

**Doble marcaje: Amelogenina – Enamelisina.**

Se realizó un doble marcaje, utilizando anti-enamelisina (Chemicon International, USA), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes, USA) (color rojo) (color rojo) y Utilizando Anti-amelogenina (producido en el laboratorio), y como segundo anticuerpo (Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes), (color azul claro), en un espécimen de germen dentario humano en estadio de campana tardía. Se observa en la figura 21A, vista en campo claro con una tinción de hematoxilina una secreción de dentina en la parte central así como odontoblastos en la parte inferior y ameloblastos en la parte superior. En la figura 21B observamos bajo microscopio Confocal: a) Anti-enamelisina (Chemicon International, USA), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes, USA), se observa la disposición de la enamelisina más marcada en los ameloblastos, aunque se observa también su presencia en odontoblastos, observándose en la dentina que se encuentra mineralizándose . b) marcaje con Anti-amelogenina (producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes, USA), en el cual se observa un marcaje de amelogenina tanto en órgano del esmalte como en papila dental. c) Se observa una sobreposición de ambos marcadores.

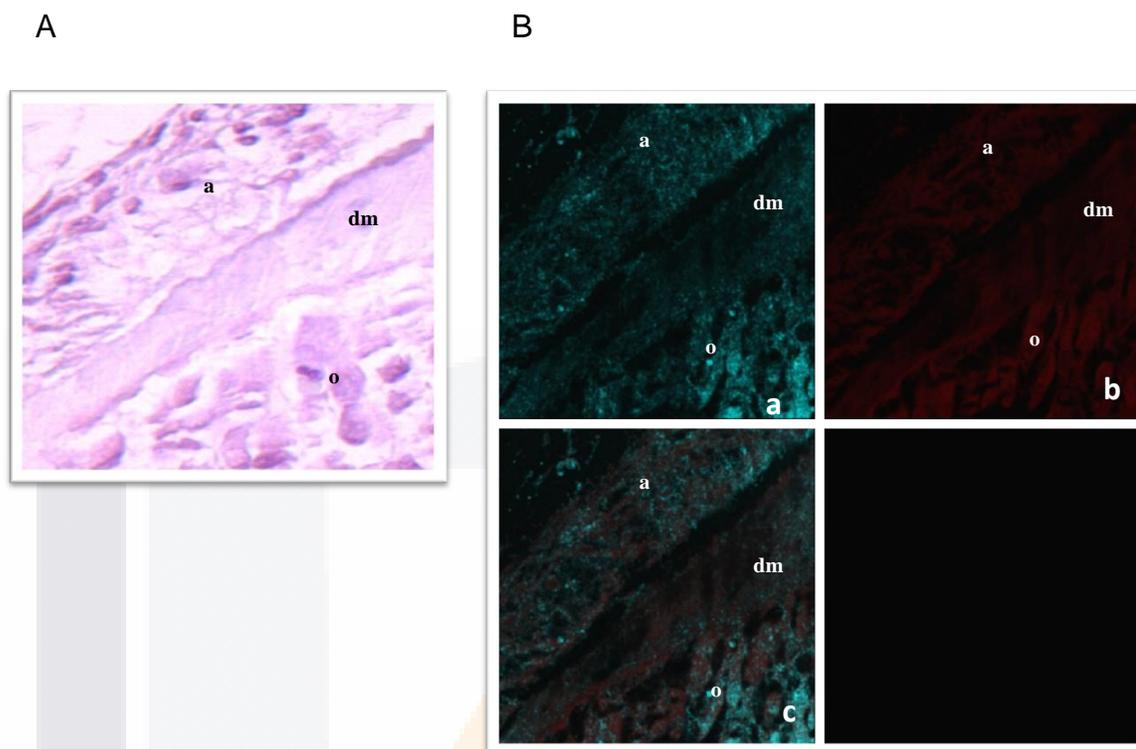


Fig. 21. Marcaje inmunofluorescente de RE en germe dental humano. Estadio de campana tardía: ameloblastos, dentina del manto y odontoblastos. A) Germe dental humano, estadio de campana tardía. H-E. Microscopio Óptico, 1000x. B) Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: a) Anti-amelogenina (producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes). b) Anti-enamelisina (Chemicon), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes). c) Sobreposición. Ameloblastos (a), dentina del manto (dm), odontoblastos (o).

### Análisis de Colocalización

#### Amelogenina – Enamelisina

Se llevó a cabo la colocalización de ambos marcadores mediante el software de colocalización del microscopio Confocal, teniendo un porcentaje de colocalización de 78.65%.

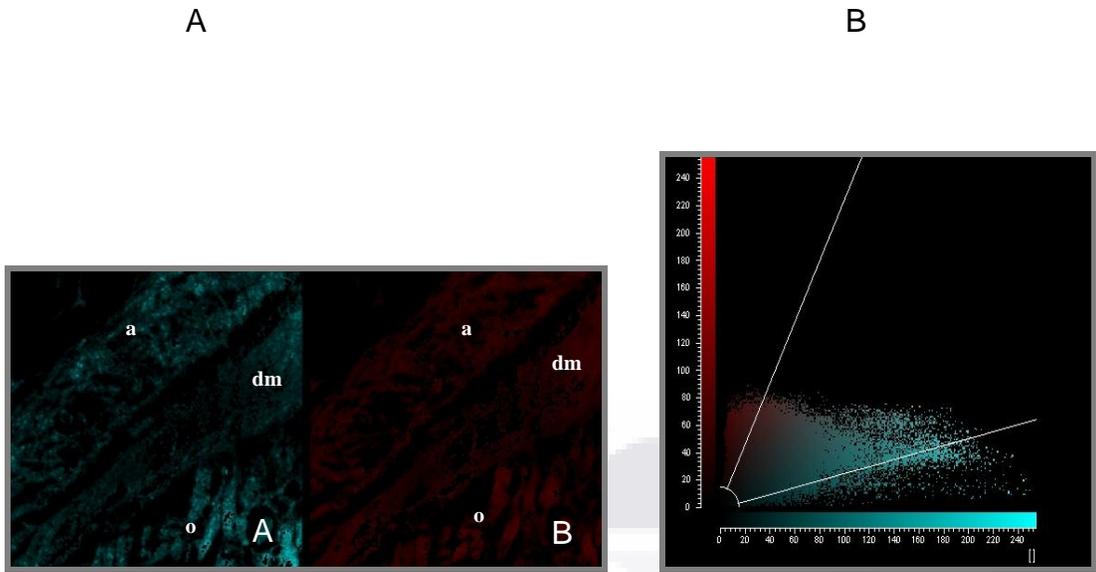


Fig. 22. Colocalización mediante el software del Microscopio confocal, con un porcentaje de colocalización del 78.65 %. Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: A) Anti-amelogenina (producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes). B) Anti-enamelisina (Chemicon), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes). C) Gráfica de colocalización Ameloblastos(a), dentina del manto (dm), odontoblastos (o).

	Colocalization
Pearson's Correlation	0.5197
Overlap Coefficient	0.768
Colocalization Rate	<b>78.65%</b>
Colocalization Area	7843.84 $\mu\text{m}^2$
Area Image	14908.43 $\mu\text{m}^2$
Area Foreground	9973.50 $\mu\text{m}^2$
Area Background	4934.94 $\mu\text{m}^2$

Tabla 3. Análisis de Colocalización, del doble marcaje Amelogenina- Enamelisina.

### Triple marcaje: Retículo Endoplásmico - Amelogenina – Enamelisina.

En esta imagen se observa el marcaje de amelogenina, enamelisina y RE en un germen dental humano en estadio de campana tardía. Se puede apreciar una disminución en la distribución de la amelogenina, que además se presenta en forma granular en tanto que la enamelisina se observa distribuida de manera homogénea, con respecto al RE presenta una distribución abundante similar a los marcajes anteriores. En la figura (23d) se observa una sobreposición de cada uno de estos marcajes y es posible apreciar que amelogenina y enamelisina convergen.

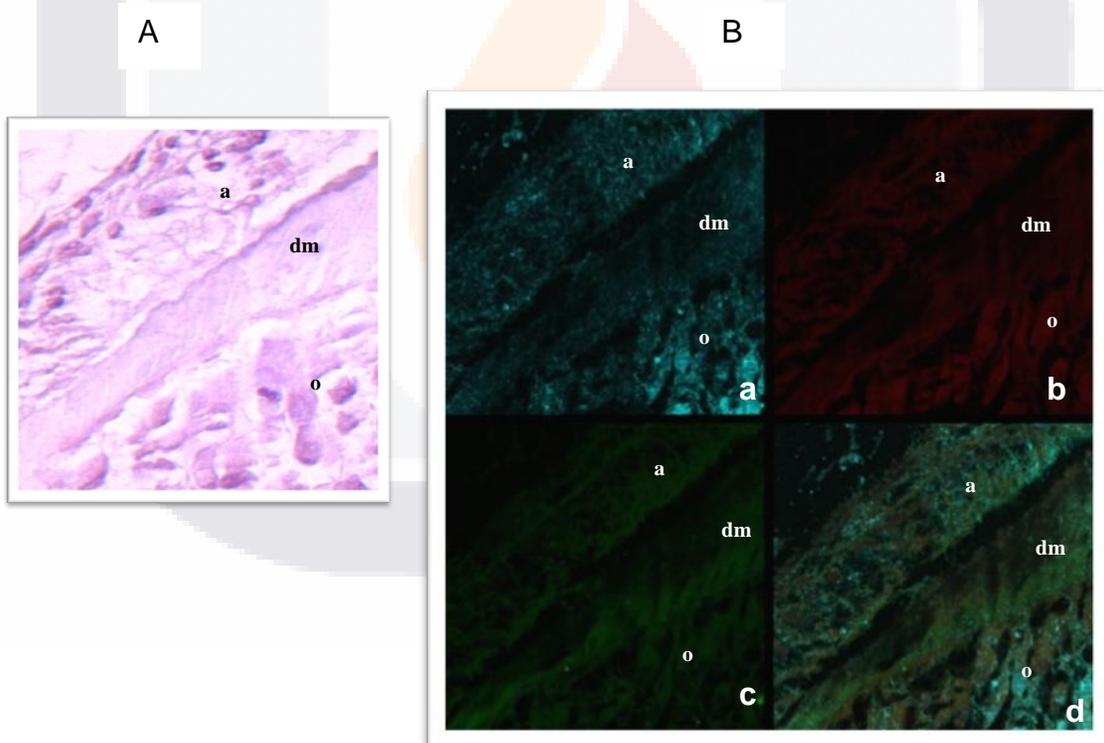


Figura 23. Triple marcaje inmunofluorescente de germen dental humano Amelogenina-Enamelisina-RE. A) Germen dental humano, estadio de campana tardía. H-E. Microscopio Óptico, 1000x. B) Microscopio Confocal, 600x Triple marcaje: a) Anti-amelogenina (producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes). b) Anti-enamelisina (Chemicon), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes) c) Anti-RE (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes). d) Colocalización de los tres marcadores. Ameloblastos(a), dentina del manto (dm), odontoblastos (o)

## Aparato de Golgi

Marcaje inmunofluorescente de Aparato de Golgi en germen dental humano. A) Estadio de campana inicial se observa papila, odontoblastos, ameloblastos y órgano del esmalte. B) Estadio de campana tardía: ameloblastos, dentina del manto y odontoblastos. Microscopio Confocal, 600x.

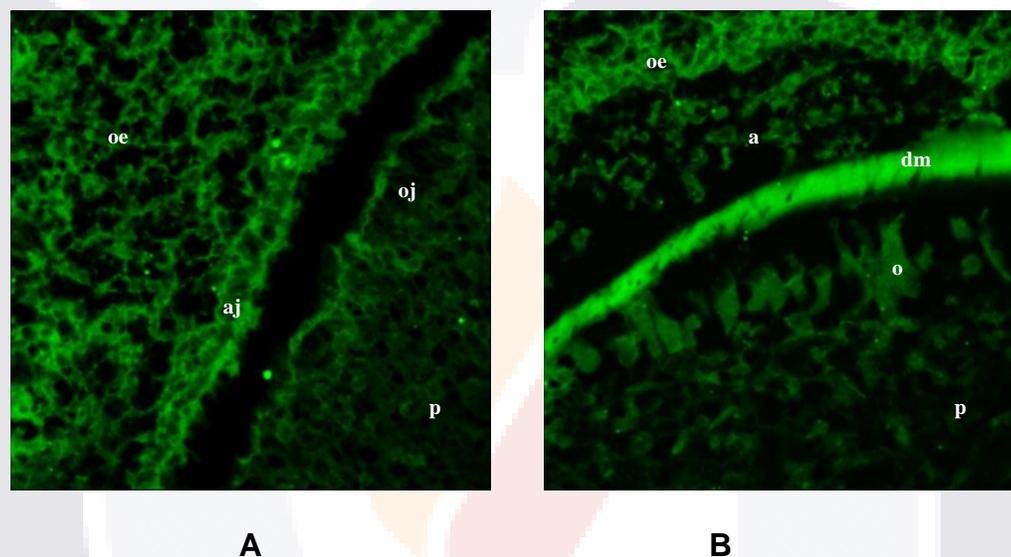


Fig. 24. Marcaje inmunofluorescente de Aparato de Golgi en germen dental humano. A) Estadio de campana inicial se observa papila (p), odontoblastos jóvenes (oj), ameloblastos jóvenes (aj) y órgano del esmalte (oe). B) Estadio de campana tardía: órgano del esmalte (oe), ameloblastos (a), dentina del manto (dm), odontoblastos (o) y papila (p). Microscopio Confocal, 600x.

## Aparato de Golgi-Amelogenina

En la figura 25A. se observa un doble marcaje utilizando como primer anticuerpo Anti-Golgi (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes). (Verde), en el lado superior derecho se encuentra el órgano del esmalte, en el lado izquierdo la papila dental. Se ve una mayor actividad en las

células del retículo estrellado. En la figura 25B. Se marco utilizando como primer anticuerpo Anti-amelogenina (Producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes. (azul claro), se ven gránulos de amelogenina tanto en células de retículo estrellado como en papila dental. En la figura 25C, se observa la colocalización de aparato de Golgi y amelogenina, resaltándose la relación entre ambos marcajes y la acumulación de amelogenina hacia la membrana basal (porción inferior izquierda).

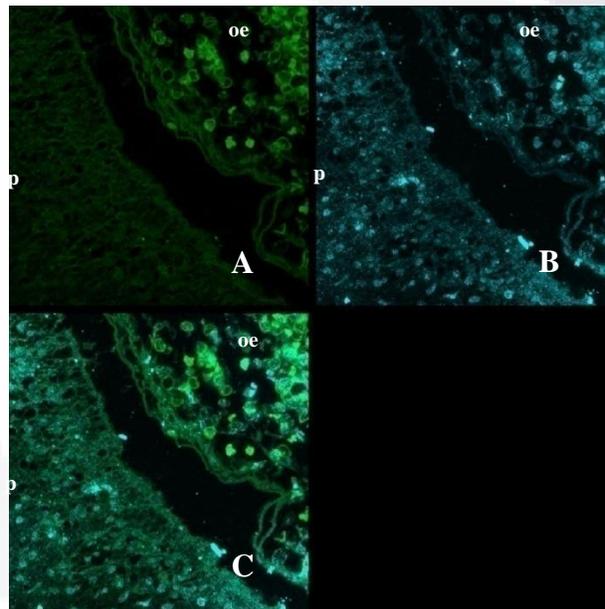


Fig. 25. Marcaje inmunofluorescente de RE en germen dental humano. Estadio de campana temprana, las células están en estadio presecretor.

Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: A) Anti-Golgi (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes). B) Anti-amelogenina (Producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes. C) Sobreposición de ambos marcajes. (p= papila; oe= órgano del esmalte.)

## Colocalización Aparato de Golgi - Amelogenina

En esta figura se observa exclusivamente la colocalización entre el aparato de golgi y la amelogenina siendo esta de: 78.82%

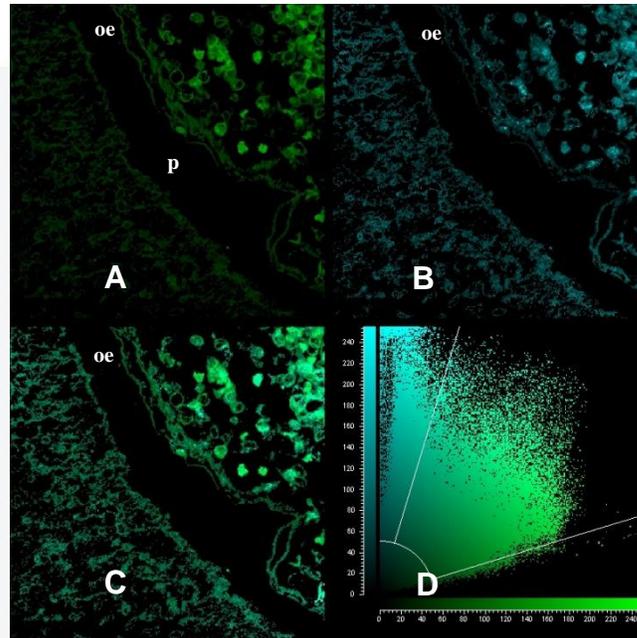


Fig.26. Colocalización Aparato de Golgi- Amelogenina, con un porcentaje de colocalización del 78.82 %. Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: A) Anti-amelogenina (Producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes).B) Anti-RE (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes).C) Sobreposición. D) Gráfica de colocalización. p= Papila; oe= órgano del esmalte.

	Colocalization
Pearson's Correlation	0.5248
Overlap Coefficient	0.7499
Colocalization Rate	<b>78.82%</b>
Colocalization Area	8231.22 $\mu\text{m}^2$
Area Image	30486.28 $\mu\text{m}^2$
Area Foreground	10443.55 $\mu\text{m}^2$
Area Background	20042.73 $\mu\text{m}^2$

Tabla 4. Análisis de Colocalización, del doble marcaje Aparato de Golgi- Amelogenina.

### **Aparato de Golgi – Enamelisina**

En la figura 27A. se observa un doble marcaje utilizando como primer anticuerpo Anti-Golgi (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes) (verde), en el lado superior derecho se encuentra el órgano del esmalte, en el lado izquierdo la papila dental. Se ve una mayor actividad en las células del retículo estrellado. En la figura 27B, Se marco utilizando como primer anticuerpo Anti-Enamelisina (CHEMICON), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes) (rojo), se ven gránulos de enamelisina tanto en células de retículo estrellado como en papila dental, siendo más marcado en retículo estrellado, creándose un depósito hacia la membrana basal. Finalmente en la figura 27C. Colocalización de aparato de golgi y enamelisina, se observa la relación entre ambos marcajes y la acumulación de amelogenina hacia la membrana basal (porción inferior izquierda).

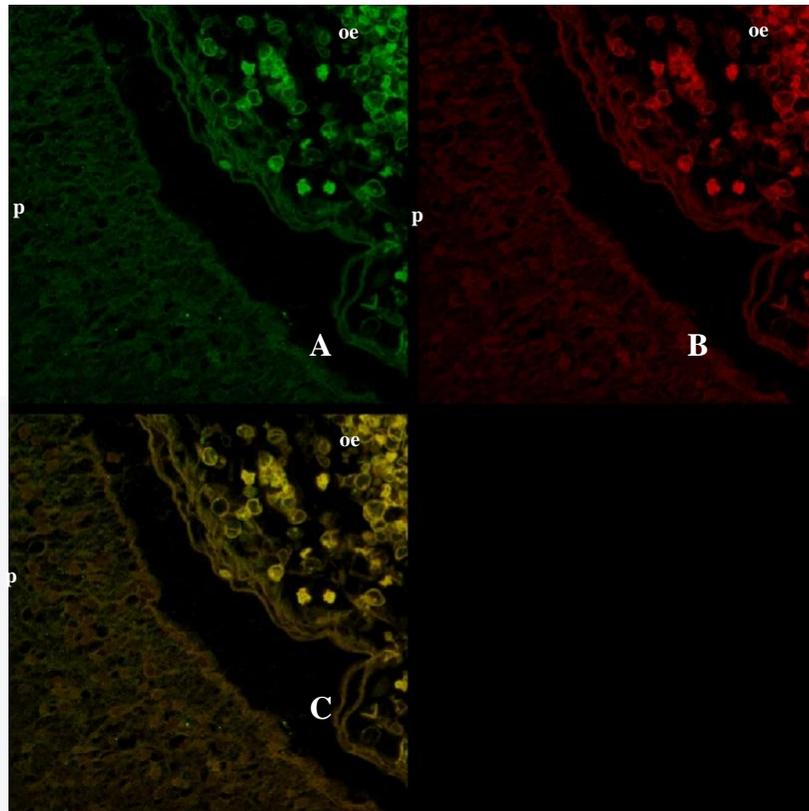


Fig. 27. Marcaje inmunofluorescente de Aparato de Golgi (AG) en germen dental humano. Estadio de campana temprana: las células están en estadio presecretor. Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: A) Anti-Golgi (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes). B) Anti-Enamelisina (CHEMICON), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes).C) Sobreposición. P= Papila; oe= órgano del esmalte.

### Colocalización Aparato de Golgi – Enamelisina

En esta figura se observa exclusivamente la colocalización entre el aparato de Golgi y la enamelisina siendo esta de: 99.92 %.

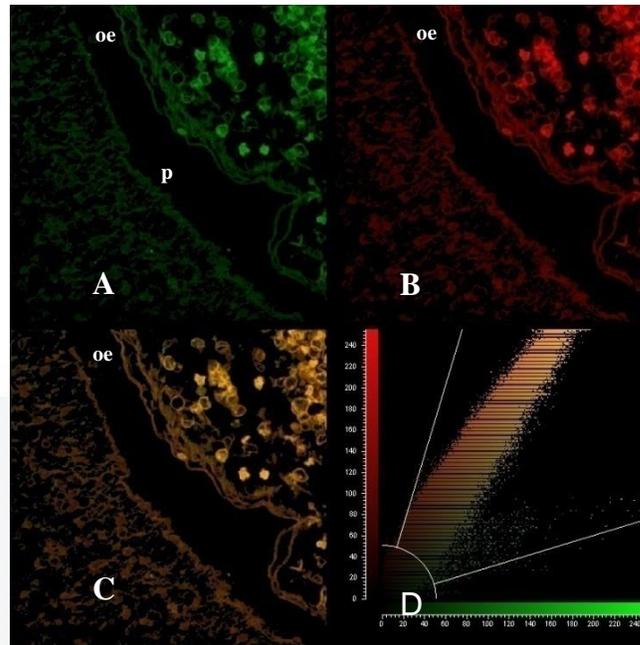


Fig. 28. Colocalización Aparato de Golgi- Enamelisina, con un porcentaje de colocalización del 99.92 %. Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: A) Anti-Golgi (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes). B) Anti-Enamelisina (CHEMICON), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes).C) Sobreposición. D) Gráfica de Colocalización= Papila; oe= órgano del esmalte.

	Colocalization
Pearson's Correlation	0.9618
Overlap Coefficient	0.9788
Colocalization Rate	<b>99.92%</b>
Colocalization Area	9524.23 $\mu\text{m}^2$
Area Image	30486.28 $\mu\text{m}^2$
Area Foreground	9532.31 $\mu\text{m}^2$
Area Background	20953.97 $\mu\text{m}^2$

Tabla 5. Análisis de Colocalización, del doble marcaje Aparato de Golgi-Enamelisina.

## Amelogenina – Enamelisina

En la figura 29A. se observa un marcaje utilizando como primer anticuerpo Anti-amelogenina (Producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes (azul claro), en el lado superior derecho se encuentra el órgano del esmalte, en el lado izquierdo la papila dental, se ven gránulos de amelogenina tanto en células de retículo estrellado como en papila dental Se ve una mayor actividad. En la figura 29B, se marco utilizando como primer anticuerpo Anti-Enamelisina (CHEMICON), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes) (rojo), se ven gránulos de enamelisina tanto en células de retículo estrellado como en papila dental, siendo más marcado en retículo estrellado, creándose un depósito hacia la membrana basal. En la figura 29C, podemos observar la colocalización de amelogenina y enamelisina, además de la relación entre ambos marcajes y la acumulación de enamelisina hacia la membrana basal (porción central). Se observa la secreción de la enamelisina en la periferia de las células y la amelogenina en la parte central. Ambas proteínas se encuentran en órgano del esmalte y en papila dental.

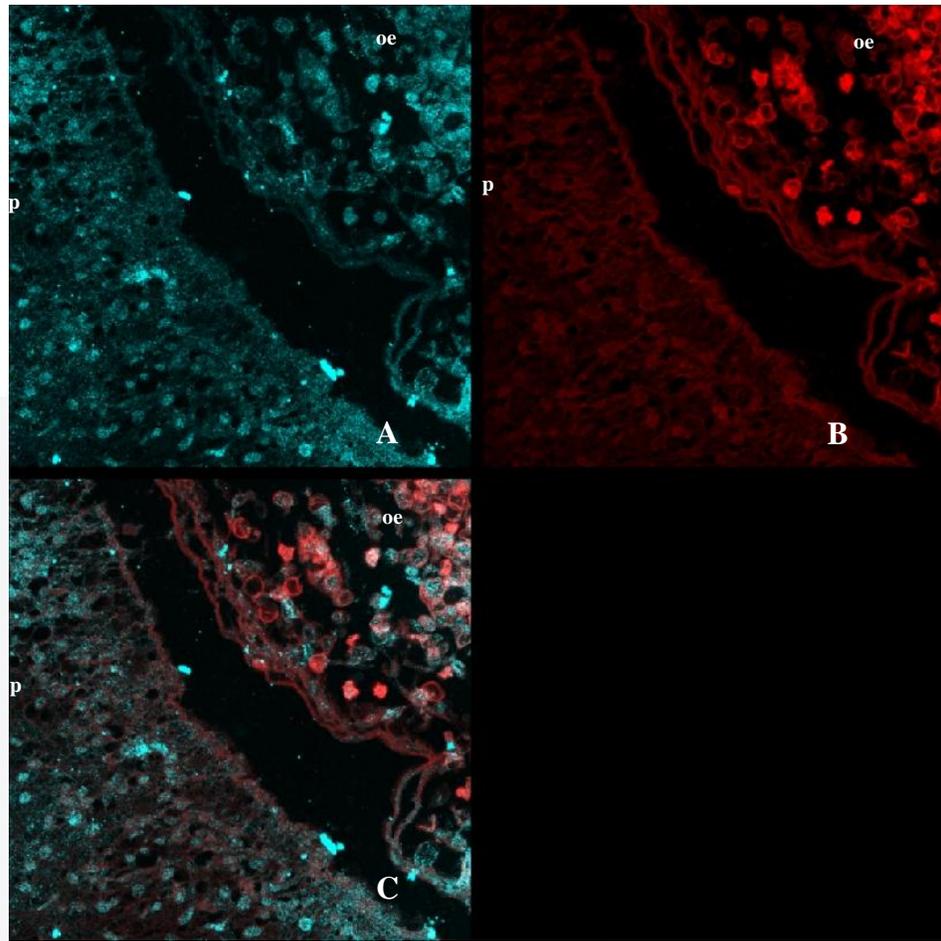


Fig. 29. Marcaje inmunofluorescente de RE en germen dental humano. Estadio de campana temprana, las células están en estadio presecretor. Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: A) Anti-Amelogenina (Producido en el laboratorio); 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes).B) Anti-enamelisina (Producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes. C) Sobreposición. P= papila; oe= órgano del esmalte.

### Colocalización Enamelisina – Amelogenina

En esta figura se observa exclusivamente la colocalización entre el aparato de Golgi y la enamelisina siendo esta de: 90.81 %.

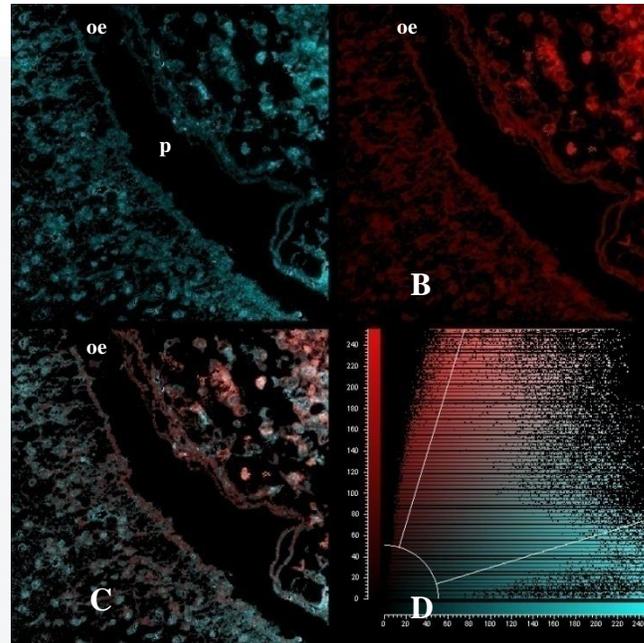


Fig. 30. Colocalización Amelogenina-Enamelisina, con un porcentaje de colocalización de 90.81%. Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: A) Anti-Amelogenina (Producido en el laboratorio); 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes). B) Anti-enamelisina (Producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes). C) Sobreposición. D) Gráfica de Colocalización. p=papila; oe= órgano del esmalte.

	Colocalization
Pearson's Correlation	0.5532
Overlap Coefficient	0.7672
Colocalization Rate	90.81%
Colocalization Area	11655.55 $\mu\text{m}^2$
Area Image	30486.28 $\mu\text{m}^2$
Area Foreground	12835.00 $\mu\text{m}^2$
Area Background	17651.28 $\mu\text{m}^2$

Tabla 6. Análisis de Colocalización, del doble marcaje Amelogenina-Enamelisina.

### **Triple marcaje**

En esta imagen podemos observar la expresión de amelogenina, enamelisina y Aparato de Golgi ocupando la misma posición en el espacio en un germen dentario en estadio de campana temprana. En relación al marcaje de RE, se observa que este se encuentra distribuido cercano al núcleo y es menos abundante que en la etapa de campana tardía. La expresión de amelogenina es abundante y se observa distribuido en el interior de las células principalmente, la amelogenenina también se observó en esta etapa del desarrollo la presencia de enamelisina, en menor proporción que la amelogenina y cerca del núcleo. En la sobreposición de los tres marcajes destaca el marcaje de enamelisina.

**Aparato de Golgi – Amelogenina- Enamelisina**

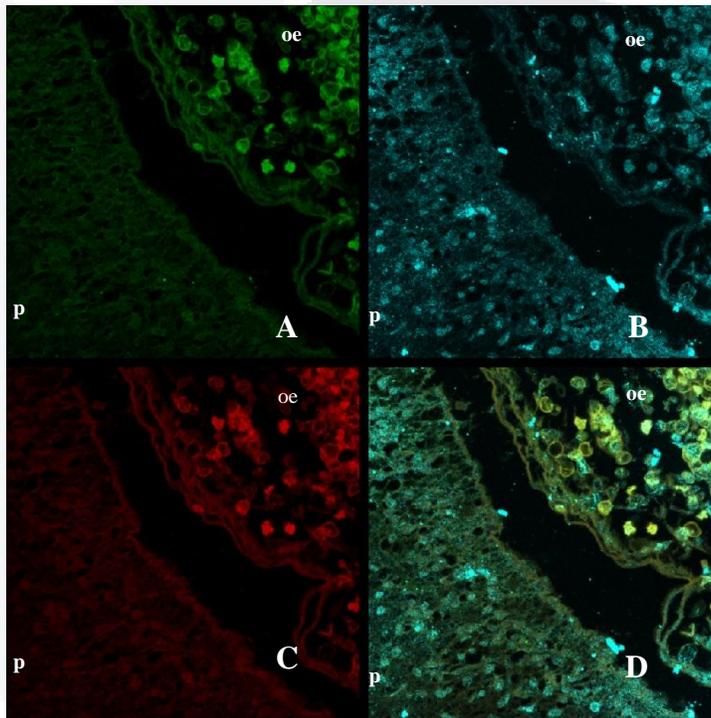


Figura 31. Triple marcaje inmunofluorescente de germen dental humano Aparato de Golgi-Amelogenina-Enamelisina. Microscopio Confocal, 600x doble marcaje: A) Anti-Golgi (Molecular Probes); 2º anticuerpo: Alexa Fluor 488 Secondary Antibody (Molecular Probes). B) Anti-Amelogenina (Producido en el laboratorio); 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 565 conjugate (Molecular Probes).C) Anti-enamelisina (Producido en el laboratorio), 2º anticuerpo: Qdot Secondary Antibody 525 conjugate (Molecular Probes). D) Sobreposición. P= Papila; oe= órgano del esmalte.

## DISCUSIÓN

El método empleado para la purificación de la amelogenina, es un método económico, altamente reproducible y eficiente, que se realiza en sólo dos pasos, sin perder proteína (Alvarado-Estrada et al., 2003), el cual había sido propuesto para purificación de péptidos enriquecidos, sin embargo durante el presente trabajo se demostró que se puede utilizar para la purificación de cualquier tipo de péptidos separados por electroforesis desnaturalizante.

Existen otros métodos de purificación de proteínas cuya desventaja, al ser comparados con el nuestro es la baja eficiencia de recuperación de proteína. Pues por ejemplo, al purificar por afinidad se obtiene un rendimiento de aproximadamente el 60 % de la proteína total que se encuentra en el sistema (que es requerida en concentraciones que pueden ir de 1 a 50 mg) y por lo general se emplea una gran cantidad de tejido o células para obtener un buen resultado (Harris y Angal, 1990). Esta proteína se obtiene diluida y generalmente con una gran cantidad de sales. El manejo que se le da a la proteína purificada, para eliminar sales, ya sea diálisis o algún otro procedimiento baja la eficiencia del proceso de purificación, debido a degradación y pérdida por adsorción inespecífica en las membranas de diálisis o sistemas de filtración empleados para tal propósito (Guerrero-Barrera et al., 1999). Nuestro procedimiento de purificación en cambio, reduce el manejo de la proteína en un 90% y asegura el máximo rendimiento a partir de poca cantidad de extracto total de proteínas (200  $\mu$ g). En dos procedimientos se garantiza la obtención de una proteína pura, lista para ser

empleada para la producción de anticuerpos específicos, usando la poliacrilamida como un adyuvante más. Así, se obtuvo un anticuerpo con un gran poder de reconocimiento, útil para análisis por Western Blot, (Fig.9) inmunohistoquímica (Fig. 10b) e inmunofluorescencia indirecta (Fig. 25B). El cual reconoce amelogenina de cerdo y de humano.

Existen estudios de inmunolocalización de enamelinina y amelogenina en ratones (Caterina 2002), incisivos de rata (Bour –Boutin 2004) y cerdos (Ikawa 2005). En nuestro estudio utilizamos gérmenes dentales de feto humano de anfiteatro, para estudiar la expresión y distribución de la amelogenina y enamelinina durante el desarrollo.

MMP-20 tiene características estructurales y enzimáticas únicas, siendo capaz de degradar el amelogenina, el componente principal de la matriz del esmalte, y por lo tanto se cree para jugar un papel principal durante el desarrollo del esmalte.

Aunque su patrón de expresión se restringe al desarrollo del diente, la MMP-20 se ha localizado tanto en ameloblastos y odontoblastos (Bartlett y otros 1996; Begue-Kirn y otros. 1998; Caterina y otros 2000).

Terminae (1980), Furkae (1998), Oida (2002) mencionan que la amelogenina se conoce como la proteína del esmalte inmaduro y se localiza entre los cristales de las sales minerales, sin estar ligada a ellos. Es la proteína más abundante del esmalte y se encuentra exclusivamente en él.

Nosotros observamos por medio de microscopia confocal que realmente se encuentran en ameloblastos y odontoblastos siendo más marcada en ameloblastos que en odontoblastos (Fig. 25B). Coincidimos con Bourd-Boittin

(2004) en que esto es algo inesperado si consideramos que estas células tienen orígenes diferentes en el desarrollo; epitelial para los ameloblastos y células derivadas de la cresta neural para los odontoblastos, y que producen diferentes matrices, esmalte dental y dentina respectivamente.

Bourd-Boittin (2004) nos dice que la MMP-20 se localiza en los mismos puntos que la amelogenina. Sin embargo, en ambos tipos de la célula, su expresión temporal no coincide exactamente. La expresión de la amelogenina precede a la de MMP-20. Aunque la expresión del amelogenina en ameloblasto persiste en las diversas etapas de desarrollo y en odontoblastos su expresión es transitoria y desaparece con su maduración.

Al analizar la colocalización de ambas proteínas podemos decir lo siguiente, si vemos la colocalización de amelogenina y enamelisina en estadio presecretor (Fig.29) observamos una mayor presencia de amelogenina que de enamelisina siendo la localización más específica en el citosol. En una acercamiento a la (Fig. 29C) podremos observar que se presentan en este estadio la secreción de amelogenina por medio de vesículas en el órgano del esmalte, no sucediendo lo mismo con la enamelisina la cual se percibe dentro de la célula creyendo que esta en estado latente. El análisis de colocalización de ambas proteínas nos marca un 90.81%.(Fig. 30)

En el análisis en estadio secretor (Fig. 21) encontramos que existe secreción de ambas proteínas observando presencia de ambas en el esmalte mineralizado recién formado, su porcentaje de colocalización de estas proteínas bajó siendo de un 78.65%, (Fig.22) lo que nos permitiría sugerir que esto se da por el aumento

de secreción de enamelinina en este estadio y la degradación que está sufriendo la amelogenina por esta.

(Sawada y Nanci 1995) postulan que los productos de la degradación de la amelogenina por su bajo peso molecular se difunden a través de la membrana que separa preameloblastos y preodontoblastos para atraparse en el esmalte dental de formación.

Esto podría sugerir como nos menciona (Bourd-Boittin 2004) que la degradación local de amelogenina por MMP-20 podría producir una masa de péptidos de bajo peso molecular que podrían servir como moléculas señal.

Furkae y col (1998) Realizaron estudios inmunohistoquímicos localizando la enamelinina en vesículas secretoras dentro de los ameloblastos y en esmalte en formación, los cuales se distribuían hacia la cara secretora del proceso de Tomes dentro de vesículas secretoras, pero no se presentaban dentro del retículo endoplásmico rugoso.

En nuestro estudio realizamos un marcaje fluorescente entre Retículo endoplásmico (verde) y enamelinina (rojo) (Fig.19) en el cual se percibe que como ambos comparten sitios de expresión y localización espacial. Analizando por medio de colocalización, se aprecia que el porcentaje de esta es de un 99.95% (Fig.20), lo que es altamente probable que la secreción de la enamelinina se da por intermedio de retículo endoplásmico. Así mismo se realizó marcaje fluorescente entre Aparato de Golgi (verde) y enamelinina (rojo) (Fig.27) dándonos una colocalización de un 99.92% (Fig. 28) lo que nos indica que es probable un

acoplamiento de estas dos estructuras en el proceso de secreción de la proteína, esto nos indica cual es su vía de secreción.

De igual manera se realizo el marcaje fluorescente entre Aparato de Golgi (verde) y Amelogenina (azul) (Fig.25) y Retículo endoplásmico (verde) y amelogenina (azul) (Fig.17).

La colocalización entre Aparato de Golgi-Amelogenina nos da un resultado de un 78.82, (Fig. 26) esta colocalización se percibe baja debido a que se observa que hay amelogenina que ya fue secretada fuera de la célula. La colocalización entre Retículo endoplásmico-Amelogenina nos proporciona un 53.29% ( Fig.18) lo que podría indicarnos que la amelogenina se encuentra en un porcentaje alto ya secretada, esto es de entender si comprendemos que ya se formo esmalte y que su secreción baja en relación con el periodo inicial de formación.

En nuestro estudio combinamos fluoroforos normales (Alexa 488) con un nuevo material fluorescente Quantum Dots.

Los Quantum (QDs) son nanocristales semiconductores de aproximadamente 2-100 nanómetros de diámetro. Estructuralmente, tienen una base y una cáscara (Dabbousi y otros 1997) de metaloide. Las capas orgánicas se pueden agregar a la superficie para alcanzar biodisponibilidad o el alcance hacia sitios específicos. QDs posee las características luminescentes únicas (Akerman y otros 2002). Un uso probable de QDs es como un fluoroforo óptimo para la proyección de imagen biomédica *in vivo* (Larson y otros 2003; Morgan y otros 2005). Puede también ser utilizado para apuntar las células específicas (e.g., células neoplásticas de etiquetado) después de la conjugación con las mitades bioactivas específicas (Cai

y otros 2006; Voura y otros 2004). Al utilizar los Q Dots y los fluoroforos normales nos evidencia que tienen más tiempo de duración que los fluoroforos así como un aumento muy marcado en su fluorescencia.

En nuestro estudio realizamos un marcaje combinando fluoroforos y Quantum Dots y observamos que la duración y el nivel de fluorescencia de los quantum es superior a los fluoroforos normales haciéndolos un material de elección para marcaje en sistemas biológicos.

Los Q Dots son nanocristales semiconductores fluorescentes de pocos nanómetros de diámetro, tanto su forma como su tamaño dependen de su absorción y emisión. Su absorción tiene una gran posibilidad de energías altas lo que da como resultado un espectro de absorción de banda ancha, mejor que la mayoría de los fluoroforos, así como un mayor tiempo de vida lo cual le permite separar sus señales de células en las que se ha encontrado autofluorescencia de tiempo de vida más cortos. Cuanto más grande es el punto quantum, su espectro fluorescente se desplaza al rojo intenso, mientras más pequeño es, se ubicará en el extremo azul. Puntos más grandes de Q Dots tienen más niveles de energía. (Zaia y col) Debido a estas propiedades los Q Dots tienen un gran potencial de aplicación en la biología celular, específicamente, en la observación de difusión de receptores individuales de glicina de neuronas, en la identificación de nódulos linfáticos por su emisión cercana al infrarrojo durante cirugías de animales vivos, en estudios de procesos intracelulares a nivel molecular simple, imagenología de alta resolución, como marcadores inmunofluorescentes fijados en células y tejidos, en inmunotinción de proteínas de membrana, microtúbulos, actina y

antígenos nucleares, así como fluorescencia en hibridación in situ de cromosomas o DNA combinado. (Michalet y col).

## CONCLUSIÓN

- Se obtuvo un anticuerpo policlonal anti-amelogenina, específico y eficiente, para el reconocimiento de esta proteína en humano y cerdo.
- Se observó una presencia de amelogenina y enamelisina en ambos estadios, tanto presecretor como secretor.
- En presecretor se observa más presencia de amelogenina afuera de la célula no siendo así en el secretor donde se observa una mayor producción de enamelisina así como su situación fuera de la célula.
- Consideramos que ambas proteínas siguen la misma vía de secreción solo que se encuentran en diferentes cantidades dependiendo del estadio.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Aguirre A, García M, Hernández MR, Mery C, Montenegro MA, Sabag N, Wurgaft R. “Histología y embriología del sistema estomatognático” ediciones facultad de odontología (1997).
- 2.- Orban B. “Histología y embriología bucodental”. Editorial Labor S.A (1957), Argentina.
- 3.- Graveson AC, Smith MM. Neural crest potential for tooth development in amphibian: Developmental and evolutionary significance. *Dev Biol* (1997).188: 34-42.
- 4.- Guerrero-Barrera, AL, De la Garza, M, Mondragón R, García-Cuéllar C, Segura-Nieto M. Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins. *Microbiology* (1999).145: 3235- 3244
5. - Lumsden AGS. The neural crest contribution to tooth development in the mammalian embryo. In: Maderson PFA (ed). *Developmental and Evolutionary Aspects of the Neural Crest*. New York: Wiley (1987).261-300.
- 6.- Alvarado Estrada, K. N., Mondragón, R., Bautista, C. A., Prieto Macías., C. K., Avelar, F. J., Martínez, M. C. & Guerrero-Barrera, A. L. Nuevo método de

purificación para proteínas de procariontes relacionadas con actina y proteínas que se les asocian, aplicable a la purificación de péptidos enriquecidos en un gel de poliacrilamida. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. (2003). 28: 3-7.

7. - Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. Journal of cell science (2003)116:1647-1648.

8.- Gomez De Ferraris M.E. "Histología y embriología bucodental", Editorial Panamericana. (2002)

9. - Nakamura H, Ozawa H. Immunolocalization of CD44 and the Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Family in the Stratum Intermedium and Papillary Layer of the Mouse Enamel Organ. Journal of Histochemistry & Cytochemistry (1997). 45:1481-1492.

10.- <http://www.novartisfound.org.uk/catalog/205cont.htm>.

11. - Smith Cs, Nancy A. Overview of morphological changes in enamel organ cell associated with major events in amelogenesis. Int. J Dev. Biol (1995). 39:153-161.

12. - Aoba T, Tanabe T, Moreno EC. Function of amelogenins in porcine enamel mineralization during the secretory stage of amelogenesis. *Adv Dent Res* (1987). 1(2):252-260.
13. - Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in Developing Dental Enamel. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* (1999).10(4):425-441.
- 14.- Ida-Yonemochi H, Ohshiro K, Swelam W, Metwaly H, Saku T. Perlecan, a Basement membrane-type Heparan Sulfate Proteoglycan, in the Strellate reticulum. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. (2005). Vol: 53(6):763-772.
- 15.- Deutsch D, Palmon A, Fisher LW, Kolodny N, Terminae JD, Young MF. Sequencing of Bovine Enamelin ("Tuftelin") a novel Acidic Enamel Protein. *Journal of Biological Chemistry* (1991).Vol.266(24):16021-16028,
- 16- Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S, Wright JT. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J. Med. Genet* (2004). 41:545-549.
17. - Risnes S. Ectopic tooth enamel an sem study of the structure of enamel in enamel pearls. *Adv Dent Res* (1989). 3(2):258-264.

18. - Bouropoulos N, Moradian-Oldak J. Induction of Apatite by the Cooperative Effect of Amelogenin and the 32-kDa Enamelin. *J Dent Res* (2004). 83(4):278-282.
19. - Fincham, AG, Moradian-Oldak, J, and Simmer, JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct. Biol* (1999). 126, 270–299.
20. - Zeichner-David M, Macdougall M, Vides J, Snead ML. Immunochemical and biochemical studies of human enamel proteins during neonatal development. *J Dent Res* (1987). 66(1):50-56.
- 21.- Abramovich A. “Histología y embriología dentaria” Editorial Panamericana (1999)
- 22.- Furkae M, Tanabe T, Nagano T, Ando H, Yamakoshi Y, Yamada M, Simmer JP, Oida S. Odontoblasts Enhance the Maturation of Enamel Crystals by Secreting EMSP1 at the Enamel-Dentin Junction. *J Dent Res*. (2002)81(10):668-672.
- 23.- Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: Nature and function. *Eur J oral Sci* (1998); 106:282-291.

24. - Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ, Conn KM, Nylen MU. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem* (1980)255:9760-9768.
25. - Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* (1995) 39:145–152.
26. - Fincham A, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* (1999).126:270-299.
27. - Bouropoulos N, Moradian-Oldak J. Induction of Apatite by the Cooperative Effect of Amelogenin and the 32-kDa Enamelin. *J Dent Res.* (2004). 83(4):278-282.
28. - Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kosak CA, Yamada KM, Yamada Y. Full-length sequence, localization, and Chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* (1996) 271:4431-4435.
29. - Hu JC, Zhang CH, yang Y, Simmer JP. Cloning and Characterization of the Mouse and Human Enamelin Genes. *J Dent Res* (2001). 80(3):898-902.
30. - Sasaki T. *Cell Biology of tooth Enamel Formation*. Basel: Karger, 1990.

31. - Ravindranath MH, Tam W-Y, Bringas P, Santos V, Fincham A. Amelogenin-Cytokeratin 14 Interaction in Ameloblasts during Enamel Formation. *Journal of Biological Chemistry* (2001). 276(39): 36586-36597.
32. - Hoang AM, Klebe RJ, Steffensen B, Ryu OH, Simmer JP, Cochran DL. Amelogenin is a Cell adhesion Protein. *J Dent Res* (2002). 81(7):497-500.
- 33.- Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Experimental Cell Research* (2005).304:493-505.
34. - Akita, H., Fukae, M., Shimoda, S., and Aoba, T. Localization of glycosylated matrix proteins in secretory porcine enamel and their possible functional roles in enamel (1992) *Arch. Oral Biol.* 37,953–962.
35. - Nanci, A, Smith CE .Development and calcification of enamel. In Bonucci E, ed. *Calcification in Biological Systems*. Boca Raton, FL, CRC Press, (1992) 313–343.
- 36.- Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikat M, Chen Y, Krebsbach PH, Yamada Y. Comparative Immunochemical Analyses of the developmental Expression and

Distribution of Ameloblastin and Amelogenin in Rat Incisors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. (1998). 46(8):911-934.

37. - Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* (1998) 9:128–161

38.- Deutsch D. Structure and function of enamel gene product. *Anat. Rec.* (1989) 224:189–210

39. - Sidney Delgado, Didier Casane, Laure Bonnaud, Michel Laurin, Jean-Yves Sire, Marc Girondot. Molecular Evidence for Precambrian Origin of Amelogenin, the Major Protein of Vertebrate Enamel. *Mol. Biol. Evol.* (2001). 18(12):2146–2153.

40. - Snead ML, Lau EC, Zeichner-David M, Finchman AG, Woo SL, Slavkin HC. DNA sequence for cloned cDNA for murine amelogenin reveals the amino acid sequence for enamel-specific protein. *Biochem Biophys Res Commun* (1985).129:812-818.

41. - Furkae M, Tanabe T, Murakami C, Dohi N, Uchida T, Shimizu M. Primary structure of the porcine 89-kDa enamelin. *Adv Dent Res* (1996). 10:111-118.

- 42.- Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni A. Amelogenin: a potencial regulator of cementum associated genes. *J Periodontal* (2003) 74:1423-1431.
- 43.- Furkae M, Tanabe T, Uchida T, Lee S-K, Ryu O.-H, Murakami C, Wakida K, Simmer JP, Yamada Y, Bartlett JD. Enamelysin (Matrix Metalloproteinase-20): Localization in the Developing Tooth and Effects of pH and Calcium on Amelogenin Hydrolysis. *J Dent Res* (1998). 77(8): 1580-1588.
- 44.- Oida S, Ngano T, Yamakoshi Y, Ando H, Yamada M, Furkae M. Amelogenin Gen expresión in Porcine Odontoblasts. *J Dent Res* (2002).81(2):103-108.
45. - Diekwisch TG, Ware J, Fincham AG, Zeichner-David M. Immunohistochemical Similarities and Differences between Amelogenin and Tuftelin Gene Products During Tooth Development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (1997).Vol. 45(6):859-866.
46. - Bonass WA, Brookes SJ. The rat amelogenina gen – some aspects of evolution an expression. *Adv Dent Res* 10:182-186.
47. - Hu JC, Sun X, Zhang C, Simmer JP. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci.* (2001).109:125-132

48. - Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of Dental Enamel Formation. *Crit rev Oral Biol Med* (1995). 6(2):84-108.
49. - Paine ML, Krebsbach PH, Chen LS, Paine CT, Yamada Y, Deutsch D, Snead ML. Protein-to-Protein Interactions: Criteria Defining the Assembly of the Enamel Organic Matrix. *J Dent Res* (1998). 77(3):49-502.
- 50.- Steffensen B, Hakkinen L, Larjava H. Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* (2001);12(5):373-98
51. - Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* (1993); 4(2):197-250.
- 52.- Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM. Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem* (2001). 14; 276(50):47402-10.
- 53.- Palosaari H, Ding Y, Lrmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, Tjaderhane L. Regulation and Interactions of MT1-MMP and MMP-20 in Human Odontoblasts and Pulp Tissue in vitro. *J Dent Res* (2002).81(5):354-359,

54. - Takata T, Zhao M, Uchida T, Wang T, Auki T, Bartlett JD, Nikai H. Immunohistochemical Detection and Distribution of Enamelysin (MMP-20) in Human Odontogenic Tumors. *J Dent Res* (2000).79(8):1608-1613.
55. - Sulkala M., Larmas M., Sorsa T., Salo T., Tjäderhane. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, Enamelysin) in Mature Human Teeth. *J Dent Res* (2002). 81 (9): 603-7.
- 56.- Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* (1991). 25;266(21):14064-71.
57. - Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Bartlett JD. Enamelysin (matrix Metalloproteinase 20)-deficient Mice Display an Amelogenesis imperfecta Phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. (2002).20(12):Vol.277, No. 51.
- 58.- Zhu L, Ang S , Quantum Dots as a Novel Immunofluorescent Detection System for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (2004), 597–598.

- 59.- Bourd-Boittin K, Septier D, Hall R, Goldberg M, Menashi S. Immunolocalization of enamelysin (Matrix Metalloproteinase-20) in the Forming Rat Incisor. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (2004). 52(4):437-445.
60. - Wang L, Moradian-Oldak J. Assessment of Enamelysin (MMP-20) Selectivity to Three peptide Bonds on Amelogenin Sequence. *J Dent Res* (2002). 81(10):664-667.
- 61.- Wright J.T, Chen S.C, Hall K.I, Yamauchi M, Bawden J.W. Protein characterization of fluorosed Human Enamel. *J Dent Res* (1996).75(12): 1936-1941.
- 62.- Caterina J, Shi J, Sun X, Qian Q, Yamada S, Liu Y, Krakora S, Bartlett JD, Yamada Y. Cloning, Characterization, and Expresión Análisis of Mouse Enamelysin. *J Dent Res* (2000).79(9):1697-1703.
- 63 .- Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Iarmas M, Sorsa T, Salo T. Human Odontoblast culture method: The expression of Collagen and Matrix Metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res* (2000)15(8):55-58.
- 64.- Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene*(1996) 183:123–128.

- 65.- Begue–Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci* (1998) 106:963–970.
- 66.- Tanabe T, Furkae M, Uchida T, Shimizu M. Possible actions of metalloproteinases found in porcine enamel in an early secretory stage. *Adv Dent Res* (1996).10:170-172.
- 67.- Harris ELV, Angal S. Protein purification applications, a practical approach. IRL Press. Oxford University Press. 1990.
- 68.- Akerman YO, WC de Chan, Laakkonen P, SN de Bhatia, Ruoslahti E. Nanocrystal que apunta in vivo. *Proc Acad nacional Sci los E.E.U.U.* 2002; 99 (20): 12617-12621.
- 69.- Cai W, espinilla DW, Chen K, Gheysens O, Cao Q, Wang SX, y otros Péptido-etiquetada puntos del infrarrojo cercano del cuántum para la vasculatura del tumor de la proyección de imagen en temas vivos. *Lett nano.* 2006; 6 (4): 669-676.
- 70.- Dabbousi BO, Rodriguez-Viejo J, Mikulec FV, JR de Heine, Mattoussi H, Ober R, y otros (CdSe) puntos del cuántum de la corazón-cáscara de ZnS: síntesis y

caracterización de una serie del tamaño de nanocrystallites altamente luminescentes. J Phys Chem B. 1997; 101 (46): 9463-9475.

71.- Larson dr, Zipfel WR, RM de Williams, interruptor de Clark, P.M. de Bruchez, FW sabio, y otros puntos solubles en agua del cuántum para la proyección de imagen de la fluorescencia del multifotón in vivo. Ciencia. 2003; 300 (5624): 1434-1436.

72.- Morgan NY, S inglés, Chen W, Chernomordik V, Russo A, paladio de Smith, y otros proyección de imagen óptica no invasor in vivo en tiempo real usando puntos fluorescentes del infrarrojo cercano del cuántum. Acad Radiol. 2005; 12 (3): 313-323.

73.- Voura EB, Jaiswal JK, Mattoussi H, Simon SM. Siguiendo la extravasación de la célula del tumor metastático con cuántum puntee los nanocrystals y la microscopia de la emisión-exploración de la fluorescencia. MED nacional. 2004; 10 (9): 993-998.

74.- Zaia A. Nakagawa R. De cuadros I. An in vitro evaluation of four materials as barrier to coronal microleakage in root, filled teeth. Int, endodom 202; 35: 729-34.

75.- Michalet X, Pinaud F. Bentolila L. Quantum Dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics. SCIENCE January 2005; 307:538-44.

## ANEXO 1

## Carta de comité de Ética


**HOSPITAL GENERAL ZACATECA  
DE LOS SERVICIOS DE SALUD DE ZACATECAS**

 Paseo Francisco García Salinas S/N  
GUADALUPE, ZAC.

Tels. 3-30-04, 3-30-05 30-0


**COMITÉ DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION Y ETICA**

GUADALUPE, ZAC. 02 DE DICIEMBRE DEL 2005

**ASUNTO: Carta de aceptación**
**M en C. Francisco Gutiérrez Cantú**
**P R E S E N T E**
**At'n. Dr. Sixto Javier Sosa Díaz**

*Se hace de su conocimiento que después de analizar su petición de permiso para realizar obtención de muestras (Tejido humano obtenido por la disección de productos fetales y del material quirúrgico que se recibe y se colecta en bloques de parafina en el Área de Patología del HGZ.) Cuyo objetivo es: "DETERMINAR POR INMUNOHISTOQUIMICA ENZIMAS Y PROTEINAS QUE PARTICIPAN EN LA DIFERENCIACIÓN Y POSTERIOR DESARROLLO DEL GERMEN DENTARIO". El Comité de Enseñanza e Investigación y Ética del HGZ., no tiene inconveniente en que realice esta etapa, de recolección de muestras en esta Unidad Hospitalaria, y con el permiso previo del Departamento de Anatomía Patológica. Únicamente faltaría dar a conocer a todo el personal de ese servicio la manera como será desarrollada esa etapa.*

*Se extiende la presente a solicitud del interesado, y para los fines que a el mismo convengan.*

*Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.*

**ATENTAMENTE**
**Dr. Heladio G. Verver y Vargas R.**  
*Presidente del Comité de E. I. y E*
**Dr. Sergio Avila Rodriguez**  
*Secretario del Comité de E. I. y E.*
**Dr. Arturo Araujo Conejo**  
*Vocal del Comité de E. I. y E.*
**C.c.p. Archivo del Comité de Enseñanza e Investigación y Etica.  
C.c.p. Minutario.**

## ANEXO 2

**Carta de aceptación de artículo y artículo**

**Date:** 23 Mar 2011  
**To:** "Alma L. Guerrero-Barrera" alguerre@correo.uaa.mx  
**From:** "J. Denry Sato" jdsatoivan@aol.com;denrysato@aol.com  
**Subject:** IVAN: Your manuscript entitled Amelogenin and enamelysin localization in human d  
Dear Dr. Guerrero-Barrera,

Congratulations, your manuscript #IVAN-D-10-00115R1 entitled, "Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs," has been accepted for publication in In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal.

The print publication process for your paper will be handled by Springer. If you have any questions, please contact Raymond Ramonas at Raymond.Ramonas@springer.com. Please note: if you have provided color figures in your manuscript and you wish to have them printed in color, you must let either myself or Raymond Ramonas know as soon as possible to make the appropriate arrangements. The cost to have all of your figures in this article printed in color is \$534.

It may take at least four to six weeks from the time of the paper's acceptance to receive a page proof of your article and an order blank for reprints. Please follow the instructions given at that time for the return of your corrected proof. Once the proof is corrected and finalized, it will be placed on Online First.

If you have not yet forwarded your copyright transfer form to the SIVB Business Office, by mail at 514 Daniels St., Suite 411, Raleigh, NC 27605, USA, or by fax to (919) 562-0608 please do so immediately, as processing of your paper cannot continue without it. You can find a copy of the copyright form at: <http://www.springer.com/west/home/generic/search/results?SGWID=4-40109-70-141760849-0>.

Please notify the other author(s) of acceptance. If this office can be of further assistance to you, please let me know.

For queries regarding your accepted paper, please click the following link, complete the query form and click "Submit".

<http://www.springer.com/west/home/life+sci/cell+biology?SGWID=4-10032-70-141760849-0&detailsPage=journal|contactProduction>

Please remember to always include your manuscript number, #IVAN-D-10-00115R1, whenever inquiring about your manuscript.

Thank you for publishing in In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal.

Sincerely,

J. Denry Sato, D.Phil  
Editor-in-Chief  
In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal

Reviewer comments:

Please refer to the attached file for your perusal.

Editorial Manager(tm) for In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal  
Manuscript Draft

Manuscript Number: IVAN-D-10-00115R1

Title: Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs

Article Type: Reports (short research papers)

Keywords: amelogenesis, amelogenin, enamelysin, co-localization

Corresponding Author: Alma L. Guerrero-Barrera, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidad Autonoma de Aguascalientes

First Author: Francisco Javier Gutierrez-Cantu, M. Sci.

Order of Authors: Francisco Javier Gutierrez-Cantu, M. Sci.;Alfredo Feria Velasco, Ph D;Laura Nayeli Palacios-Arenas, LAQB;Keila Neri Alvarado-Estrada, Biologist;Francisco Javier Avelar-Gonzalez, Ph D;Hector Flores-Reyes, Ph D;Jairo Mariel-Cardenas, M. Sci.;Alma L. Guerrero-Barrera, PhD

**Abstract:** Odontogenesis is extensively studied in animal models but less understood in human. In early amelogenesis, amelogenin constitutes 90% of enamel organic matrix, which is degraded by enamelysin and replaced by hydroxyapatite crystals. Here, amelogenin and enamelysin distribution changes during amelogenesis were shown by co-localization experiments by confocal microscopy. Early bell stage showed more amelogenin labeling than enamelysin, as free immunoreactive granular patches towards basal membrane between ameloblast and odontoblast. Increased amelogenin expression and secretion towards extracellular matrix formation region was found. Enamelysin distribution was perinuclear in early bell stage. During late bell stage a decreasing amelogenin labeling in contrast with enamelysin increasing along the cells was found, suggesting specific temporal amelogenin degradation. Enamelysin was located initially around nuclei and later was found in all the ameloblast and stellate reticulum cytoplasm. Amelogenin was observed inside ameloblast, stellate reticulum and intermediate stratum cells in the enamel as well as in the newly formed dentin extracellular matrix. In contrast, in dentin more amelogenin than enamelysin was found located close to the periphery.

\*Manuscript

[Click here to download Manuscript: Gutierrez Cantu et al In Vitro Short version.doc](#)

[Click here to view linked Reference](#)

### **Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs**

Francisco Javier Gutiérrez-Cantú<sup>1,2</sup>, Alfredo Feria-Velasco<sup>3</sup>, Laura Nayeli

Palacios- Arenas<sup>1</sup>, Keila Neri Alvarado-Estrada<sup>2</sup>, Francisco Javier Avelar-

González<sup>1</sup>, Héctor Flores-Reyes<sup>2</sup>, Jairo Mariel-Cárdenas <sup>1,2</sup>, Alma Lilián Guerrero-

Barrera<sup>1</sup>

1 Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

2 Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

3. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, México.

*Running head: Amelogenin and enamelysin in human*

Alma Lilián Guerrero-Barrera. Centro de Ciencias Básicas, UAA. Av. Universidad

940, C. U. Aguascalientes, Ags., México. CP. 20100.

**Summary.** Odontogenesis is extensively studied in animal models but less understood in human. In early amelogenesis, amelogenin constitutes 90% of enamel organic matrix, which is degraded by enamelysin and replaced by hydroxyapatite crystals. Here, amelogenin and enamelysin distribution changes during amelogenesis were shown by co-localization experiments by confocal microscopy. Early bell stage showed more amelogenin labeling than enamelysin, as free immunoreactive granular patches towards basal membrane between ameloblast and odontoblast. Increased amelogenin expression and secretion towards extracellular matrix formation region was found. Enamelysin distribution was perinuclear in early bell stage. During late bell stage a decreasing amelogenin labeling in contrast with enamelysin increasing along the cells was found, suggesting specific temporal amelogenin degradation. Enamelysin was located initially around nuclei and later was found in all the ameloblast and stellate reticulum cytoplasm. Amelogenin was observed inside ameloblast, stellate reticulum and intermediate stratum cells in the enamel as well as in the newly formed dentin extracellular matrix. In contrast, in dentin more amelogenin than enamelysin was found located close to the periphery.

**Key words:** amelogenesis, amelogenin, enamelysin, co-localization

Odontogenesis initiates through a series of intra and intercellular interactions that induce odontoblasts and ameloblasts differentiation, which form the dentin and enamel respectively (Thesleff et al. 1995). During enamel formation, ameloblasts produce a number of matrix proteins that promote and regulate the mineral deposition of ion in apatite crystals (Bourd-Boittin et al., 2004; Massa et al. 2006; Nanci et al. 1998; Orsini et al. 2001). In enamel matrix amelogenin is the main protein representing 90% of organic content in enamel matrix, but there are also no amelogenin proteins like proteases and anionic proteins such tuftelin and ameloblastin (Deutsch et al. 1995; el Rouby et al. 2010; Fong et al. 1996; Krebsbach et al. 1996; Kumasaka et al. 2010; Sasaki and Shimokawa. 1995; Sumita et al. 2010). Amelogenesis involves amelogenin and enamel organic matrix production, their sequential degradation by the metalloproteinases action, and the following organic matrix mineralization that continues until the enamel maturity, producing a highly mineralized tissue (Delgado, 2001; Deutsch et al. 1995; Smith et al. 1998). Any alteration produces health problems like imperfect amelogenesis (Tanimoto et al., 2008). One aspect not yet clarified is the amelogenin and enamelysin spatial distribution during enamel formation. Therefore the aim of this work was to study the extracellular and intracellular spatial distribution of these proteins in the enamel organ of the human tooth germ during its development.

Almost all reactive were from Sigma. Protocol was approved by the human ethic committee of Zacatecas General Hospital, Mexico. Human fetal jaws from six amphitheater fetuses between 14-22 weeks of intrauterine life, without any defect, donated by Pathology Department were used. Jaws were dissected and separated

Odontogenesis initiates through a series of intra and intercellular interactions that induce odontoblasts and ameloblasts differentiation, which form the dentin and enamel respectively (Thesleff et al. 1995). During enamel formation, ameloblasts produce a number of matrix proteins that promote and regulate the mineral deposition of ion in apatite crystals (Bourd-Boittin et al., 2004; Massa et al. 2006; Nanci et al. 1998; Orsini et al. 2001). In enamel matrix amelogenin is the main protein representing 90% of organic content in enamel matrix, but there are also no amelogenin proteins like proteases and anionic proteins such tuftelin and ameloblastin (Deutsch et al. 1995; el Rouby et al. 2010; Fong et al. 1996; Krebsbach et al. 1996; Kumasaka et al. 2010; Sasaki and Shimokawa. 1995; Sumita et al. 2010). Amelogenesis involves amelogenin and enamel organic matrix production, their sequential degradation by the metalloproteinases action, and the following organic matrix mineralization that continues until the enamel maturity, producing a highly mineralized tissue (Delgado, 2001; Deutsch et al. 1995; Smith et al. 1998). Any alteration produces health problems like imperfect amelogenesis (Tanimoto et al., 2008). One aspect not yet clarified is the amelogenin and enamelysin spatial distribution during enamel formation. Therefore the aim of this work was to study the extracellular and intracellular spatial distribution of these proteins in the enamel organ of the human tooth germ during its development.

Almost all reactive were from Sigma. Protocol was approved by the human ethic committee of Zacatecas General Hospital, Mexico. Human fetal jaws from six amphitheater fetuses between 14-22 weeks of intrauterine life, without any defect, donated by Pathology Department were used. Jaws were dissected and separated

was titer by Western blot, using 50 µg of amelogenin. Images were taken with the Chemi Doc image analyzer, with software Quantity One (Bio-Rad).

Deparaffinized sections were autoclaved in 0.01 M sodium citrate for antigenic retrieval (Hayat et al. 2002), and labeled by indirect immunohistochemistry with anti-amelogenin polyclonal antibody, 1:1000, using as a secondary antibody Qdot 565 goat anti-rabbit (Molecular Probes) 1:500. Second labeling was with anti-enamelysin polyclonal antibody (1:50) (Chemicon International), as secondary antibody was used Qdot 525 goat anti-rabbit (1:500). Sections were counterstained with Harris Hematoxylin, dehydrated, cleared and assembled with Entellan resin (Fermont, Mexico). Images were taken with confocal microscope LEICA DMI 4000 B and analyzed with the software LAF.

As described above, a specific polyclonal anti-amelogenin that recognized amelogenin from rat total extract better than commercial polyclonal anti-amelogenin antibody (Hokudo) was obtained (Figure 1).

Odontogenesis is not well understood in human (el Rouby et al. 2010; Kavitha et al., 2010; Kumasaka et al. 2010; Nandasena et al., 2010; Sumita et al. 2010). Enamelysin and amelogenin immunolocalization has been done in mice, rats and pigs incisors (Caterina et al. 2000; Bourd-Boittin et al. 2004). In human the biochemical role of amelogenin and enamelysin in enamel mineralization has been described (Desphande et al., 2010; Sun et al., 2008; Tanimoto et al., 2008). In this work, amelogenin and enamelysin appearance and distribution were studied during the human tooth development. Enamelysin degrades amelogenin, whose expression pattern is restricted to the tooth growth and it has been located in ameloblasts and odontoblasts (Begue-Kim et al. 1998; Caterina et al. 2000). Here,

in early bell stage amelogenin showed greater fluorescence intensity than enamelysin, was found towards to basal membrane between ameloblast and odontoblast, as free patches of immune-reactive granular material, and also as patches inside of cells of stellate reticulum, ameloblast, dental papilla, odontoblast and intermediate stratum, in that intensity order (Fig. 2). Enamelysin was found always as perinuclear patches, but only inside cells of stellate reticulum and dental papilla. Amelogenin has been located between mineral crystals, but not linked with them (Furkae et al. 1998; Oida et al. 2002). Here, amelogenin was found inside both, ameloblasts (which have epithelial origin) and odontoblasts (which are derivate cells from the neural crest). They produce enamel and dentin respectively (Bourd-Boittin et al. 2004). In ameloblast was observed more amelogenin labeling. In the late bell stage, enamelysin patches were more numerous close to the mineralized tissue, while amelogenin showed a considerable reduction (Fig. 3). Strong amelogenin labeling in primary dentin (d) as well as in aprismatic enamel (e), in comparison with the low label intensity in dental papille (p), was observed in Figure 4A. The aprismatic enamel shows a high labeling for enamelysin, but not in primary dentin, and as in the amelogenin case, dental papille showed few labeling (Figure 4B). The amelogenin and enamelysin co-localization was present on the surface of aprismatic enamel and as previously described for the enamel organ, but very few is showed in dental papille (Figure 4C). Desphande and collaborators (2010) have postulated that in the early tooth germ development the interactions of dentin and enamel protein assemblies regulate growth and structural organization of mineral crystal at the enamel boundary. They showed that collagen fibrils guide amelogenin assembly into filament-like

structures oriented along the long axes of the fibrils. They also showed that the amelogenin-calcium phosphate mineral complexes lead to oriented deposition of elongated amorphous mineral particles along the fibril axes and suggest that interactions between collagen and amelogenin might play an important role in the formation of dentin enamel boundary providing structural continuity between dentin and enamel. In agreement with this proposal here, amelogenin was found in mantle dentin as well as inside odontoblasts. Bourd-Boittin and collaborators (2004) observed that amelogenin expression precedes enamelysin. Although amelogenin expression persists in various stages of development in the ameloblasts its expression in odontoblasts is transient and disappears at maturity (Bourd-Boittin et al. 2004). Here enamelysin was observed in dental enamel and inside odontoblasts. However, it was not present in the first deposition of mantle dentine. This result suggests that enamelysin has an important role in the dentin mantle mineralization. More studies are necessary in order to understand the amelogenin presence in ameloblast and odontoblast during early stages.

In biological meaning, co-localization describes two or more molecules occupying the same position in space, showing intermolecular interactions (Miyashita, 2004; Nohe and Petersen, 2004). These molecules are often proteins visualized through antibodies or fluorescent probes. Amelogenin and enamelysin co-localization was observed in the pre-secretor stage. There was more amelogenin cytosolic expression than enamelysin (Fig. 2). Optical zoom of this region (Fig. 2D), shows that at this stage the amelogenin secretion is through granular material of the enamel organ, which suggested the presence of vesicles. Co-localization for both proteins was 90.81% (Table 1). Both amelogenin and enamelysin are synthesized

by ameloblast (Zhang et al. 2007). Enamelysin is primarily responsible for the initial amelogenin hydrolysis and the matrix formation regulation at the secretor and early amelogenesis maturation stages (Llano et al. 1997). However this hydrolysis is not possible in pre-secretor stage, the enamelysin found inside the cell is probably not active, more studies are necessary to prove this inactivity.

During the secretor stage analysis (Fig. 3), both proteins were on the surface of the extracellular matrix of a newly formed dentin and enamel, the co-localization percentage of these proteins decreased to 78.65% (Table 2). Enamel formation is a complex and well-coordinated biological process involving two major steps: secretion and maturation. During secretor stage, tall columnar ameloblasts actively synthesize and secrete the enamel matrix proteins amelogenin and enamelysin through their Tomes' processes (Park et al. 2007). The increase in enamelysin secretion observed here, suggest amelogenin degradation. Low molecular weight products are diffused through the membrane that separates pre-ameloblasts and preodontoblasts to be caught in the dental enamel formation (Bourd-Boittin et al. 2004). This could suggest that local amelogenin degradation by enamelysin could produce a mass of peptides of low molecular weight that could serve as a molecular signal (Bourd-Boittin et al. 2004).

In conclusion, here is corroborated the amelogenin expression in the pre-secretor and secretor stages leading to enamel formation, also is showed the expression of enamelysin inside the cells in the pre-secretor stage apparently inactive. During the secretor stage, enamelysin abundance is increasing while amelogenin diminished suggesting specific degradation. Finally, also is showed the amelogenin presence in dentin mantle suggesting a structural continuity between dentin and enamel.

### Acknowledges

Francisco Javier Gutiérrez Cantú was supported by CONACYT scholarship No. 198923. This work was supported by PROMEP UASLP-195. We thank to Dr. Roberto Rico his kindly observations to manuscript.

### References

- Begue–Kim C.; Krebsbach P. H.; Bartlett J. D.; Butler W. T. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur. J. Oral. Sci.* 106: 963–970; 1998.
- Bourd-Boittin K.; Septier D.; Hall R.; Goldberg M.; Menashi S. Immunolocalization of enamelysin (Matrix Metalloproteinase-20) in the Forming Rat Incisor. *J. Histochem. Cytochem.* 52(4): 437-445; 2004.
- Caterina J.; Shi J.; Sun X.; Qian Q.; Yamada S.; Liu Y.; Krakora S.; Bartlett J. D.; Yamada Y. Cloning, Characterization, and Expression Analysis of Mouse Enamelysin. *J. Dent. Res.* 79(9): 1697-1703; 2000.
- Deshpande A. S.; Fang Ping-An.; Simmer J.P, Margolis H. C.; Beniash E. Amelogenin-Collagen Interactions Regulate Calcium Phosphate Mineralization *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* 285 (25): 19277–19287; 2010.
- Deutsch D.; Palmon A.; Dafni L.; Catalano-Sherman J.; Young M. F.; Fisher L. W. The enamelin (tuftelin) gene. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 135–143; 1995.

- Delgado S.; Casane D.; Bonnaud L.; Laurin M.; Sire J.; Girondot M. Molecular Evidence for Precambrian Origin of Amelogenin, the Major Protein of Vertebrate Enamel. *Mol. Biol. Evol.* 18(12): 2146–2153; 2001.
- El Roubi E. H.; Bashir M. H.; Korany N. S. The effect of lathyrism on dentin structure of the rat incisors: a morphometric and scanning electron microscopic investigation. *J. Oral. Pathol. Med.* 39(5): 424-430; 2010.
- Fong C. D.; Slaby I.; Hammarstro L. Amelin: an enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *J. Bone Miner. Res.* 11: 892–898; 1996.
- Furkae M.; Tanabe T.; Uchida T.; Lee S-K.; Ryu O. H.; Murakami C.; Wakida K.; Simmer J. P.; Yamada Y.; Bartlett J. D. Enamelysin (Matrix Metalloproteinase-20): Localization in the Developing Tooth and Effects of pH and Calcium on Amelogenin Hydrolysis. *J. Dent. Res.* 77(8): 1580-1588; 1998.
- Harold E.; Lane D. *Antibodies a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 61-67; 1998.
- Hayat M. *A Microscopy, immunohistochemistry and antigen retrieval methods for light and electron microscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA. pp 71-92; 2002.
- Kavitha B.; Priyadarshini V.; Sivapathasudharam B.; Sarawathi T. R. Role of genes in orodental diseases. *Indian J. Dent. Res.* 21(2): 270-274; 2010.
- Krebsbach P. H.; Lee S. K.; Matsuki Y.; Kozak C. A.; Yamada K. M.; Yamada Y. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J. Biol. Chem.* 271: 4431–4435; 1996.

- Kumasaka S.; Shimozuma M.; Kawamoto T.; Mishima K.; Tokuyama R.; Kamiya Y.; Davaadorj P.; Saito I.; Satomura K. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochem. Cell. Biol.* 133(5): 577-584; 2010.
- Llano E.; Pendas A. M.; Knauper V.; Sorsa T.; Salo T.; Salido E.; Murphy G.; Simmer J. P.; Bartlett J. D.; Lopez-Otin C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20), *Biochemistry.* 36: 15101–15108; 1997.
- Massa L. F.; Bradaschia-Correa V.; Arana-Chavez V. E. Immunocytochemical Study of Amelogenin Deposition during the Early Odontogenesis of Molars in Alendronate treated Newborn Rats. *J. Histochem. Cytochem.* 54(6): 713 – 725; 2006.
- Miyashita T. Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins. *Methods Mol Biol.* 261:399-410; 2004.
- Nanci A.; Zalzal S.; Lavoie P.; Kunikata M.; Chen W. Y.; Krebsbach P. H.; Yamada Y. Comparative immunochemical analyses of developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 911–934; 1998.
- Nandaseena T. L.; Jayawardena C. K.; Tilakartne W. M.; Nanayakkara C. D. Distribution pattern of cholinesterase enzymes in human tooth germs. *Arch. Oral Biol.* 55(8): 561-569; 2010.
- Nohe A.; Petersen N. O. Analyzing for co-localization of proteins at a cell membrane. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5(2): 213-220; 2004.

- Oida S.; Ngano T.; Yamakoshi Y.; Ando H.; Yamada M.; Furkae M. Amelogenin Gen expression in Porcine Odontoblasts. *J. Dent. Res.* 81(2): 103-108; 2002.
- Orsini G.; Lavoie P.; Smith C. E.; Nanci A. Immunochemical Characterization of a Chicken Egg Yolk Antibody to Secretory Forms of Rat Incisor Amelogenin. *J. Histochem. Cytochem.* 49(3): 285-292; 2001.
- Park J. C.; Park J. T.; Son H. H.; Kim H. J.; Jeong M. J.; Lee C. S.; Dey R.; Cho M. II. The amyloid protein AP in is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur. J. Oral. Sci.* 115: 153-160; 2007.
- Sasaky S.; Shimokawa H. The amelogenin gene. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 127-133; 1995.
- Smith C. E. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 9: 128-161; 1998.
- Sumita Y.; Honda M. J.; Ueda M.; Asahina I.; Kagami H. Differential effects of growth differentiation factor-5 on porcine dental papilla and follicle derived cells. *Growth Factors.* 28(2): 56-65; 2010.
- Sun, Z.; Fan D.; Fan Y.; Du C.; Moradian-Oldak J. Enamel proteases reduce amelogenin-apatite binding. *J. Dent. Res.* 87(12): 1133-1137; 2008.
- Tanimoto K.; Le T.; Zhu L.; Witkowska H. E.; Robinson S.; Hall S.; Hwang P. ; Denbesten P.; Li W. Reduced amelogenin-MMP20 interactions in amelogenesis imperfecta. *J. Dent. Res.* 87(5): 451-455; 2008.
- Thesleff I.; Vaahtokari A.; Kettunen P.; Aberg T. Epithelial mesenchymal signaling during tooth development. *Connect. Tissue. Res.* 32: 9-15; 1995.

Zhang Y.; Li W.; Chi H. S.; Chen J.; DenBesten P. K. JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 *in vitro*. *Matrix Biol.* 26(8): 633–641; 2007.

## Figure

### Figure Legends

**Figure 1.** Specific recognition of total protein extract of eleven day-old rat with the polyclonal anti-amelogenin antibody. A) 10% SDS-PAGE of eleven day-old rat total protein extract. Lane 1, molecular weight markers (MWM); lane 2 and 3, total protein extract (50 µg). B) Western blot. Lane 1, MWM; lane 2, negative control no primary antibody was used. Lane 3, polyclonal anti-amelogenin produced here (dilution 1:1000); lane 4, commercial anti-amelogenin antibody (dilution 1:100). The reaction was revealed with 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride.

**Figure 2.** Amelogenin and enamelysin immunofluorescent labeling in human dental germs. Early bell stage, cells are in a pre-secretor stage. Confocal Microscopy, 600x double labeling: A) anti-amelogenin (reported here); secondary antibody: Q dot secondary antibody 565 conjugates, light blue (Molecular Probes). B) Anti-enamelysin (Chemicon International), secondary antibody: Q dot secondary antibody 525 conjugates, red (Molecular Probes). C) Co-localization. D) Zoom-in on the co-localization: secretion of amelogenin is observed through dense granules in the enamel organ, on the other hand, enamelysin is found inside the cell. Papilla (p); enamel organ (oe). The inset shows the early bell stage, where organic matrix is not present. The red circle shows the studied region.

**Figure 3.** Amelogenin and Enamelysin immunofluorescent labeling, in human dental germ. Late bell stage. Confocal Microscopy, 600x double labeling: A) anti-amelogenin (produced here); secondary antibody: Q dot secondary antibody 565 conjugates, light blue (Molecular Probes). B) Anti-enamelysin (Chemicon

International), secondary antibody: Q dot secondary antibody 525 conjugates, red (Molecular Probes). C) Co-localization. D) Zoom in on the co-localization. Stellate reticulum (Re), extracellular matrix of newly formed dentin and enamel (D). Ameloblasts (Am). The inset shows the late bell stage in where the dentin production is done. The red circle shows the studied region.

**Figure 4.** Amelogenin and Enamelysin immunofluorescent labeling, in human dental germ. Late bell stage. Confocal Microscopy, 600x double labeling: A) Anti-amelogenin (Produced here); secondary antibody: Q dot secondary antibody 565 conjugates, light blue (Molecular Probes). B) Anti-enamelysin (Chemicon International), secondary antibody: Q dot secondary antibody 525 conjugates, red (Molecular Probes). C) Co-localization. Papilla (p), dentin (d), enamel (e).

**Table****Tables**

Table 1. Co-localization analysis with double indirect labeling amelogenin-enamelysin in early bell stage.

	Co-localization
Pearson's Correlation	0.5532
Overlap Coefficient	0.7872
Colocalization Rate	90.81%
Colocalization Area	11655.55 $\mu\text{m}^2$
Area Image	30486.28 $\mu\text{m}^2$
Area Foreground	12835.00 $\mu\text{m}^2$
Area Background	17651.28 $\mu\text{m}^2$

Table 2. Co-localization analysis with double indirect labeling amelogenin-enamelysin in late bell stage.

	Co-localization
Pearson's Correlation	0.5197
Overlap Coefficient	0.768
Colocalization Rate	78.65%
Colocalization Area	7843.84 $\mu\text{m}^2$
Area Image	14908.43 $\mu\text{m}^2$
Area Foreground	9973.50 $\mu\text{m}^2$
Area Background	4934.94 $\mu\text{m}^2$

Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

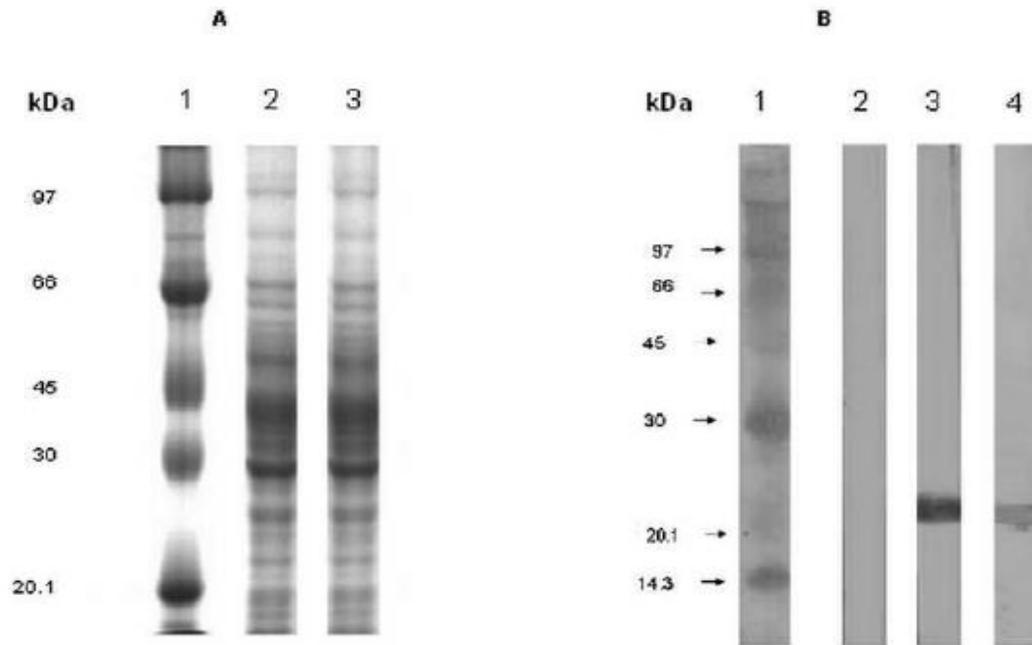


Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

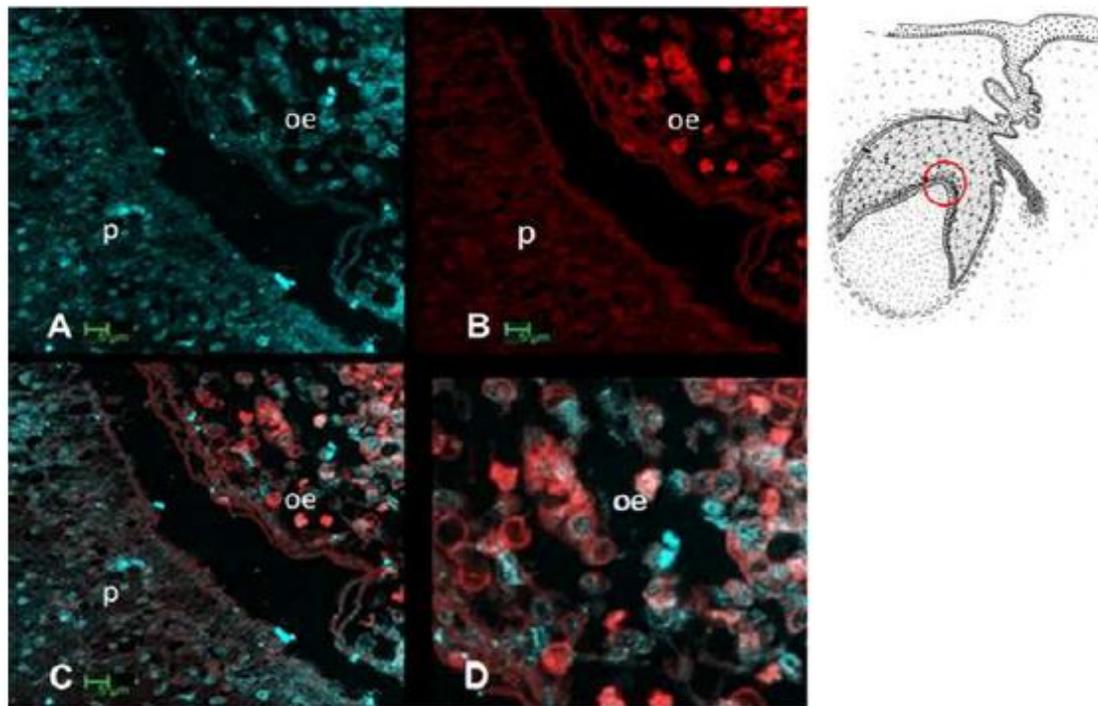


Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

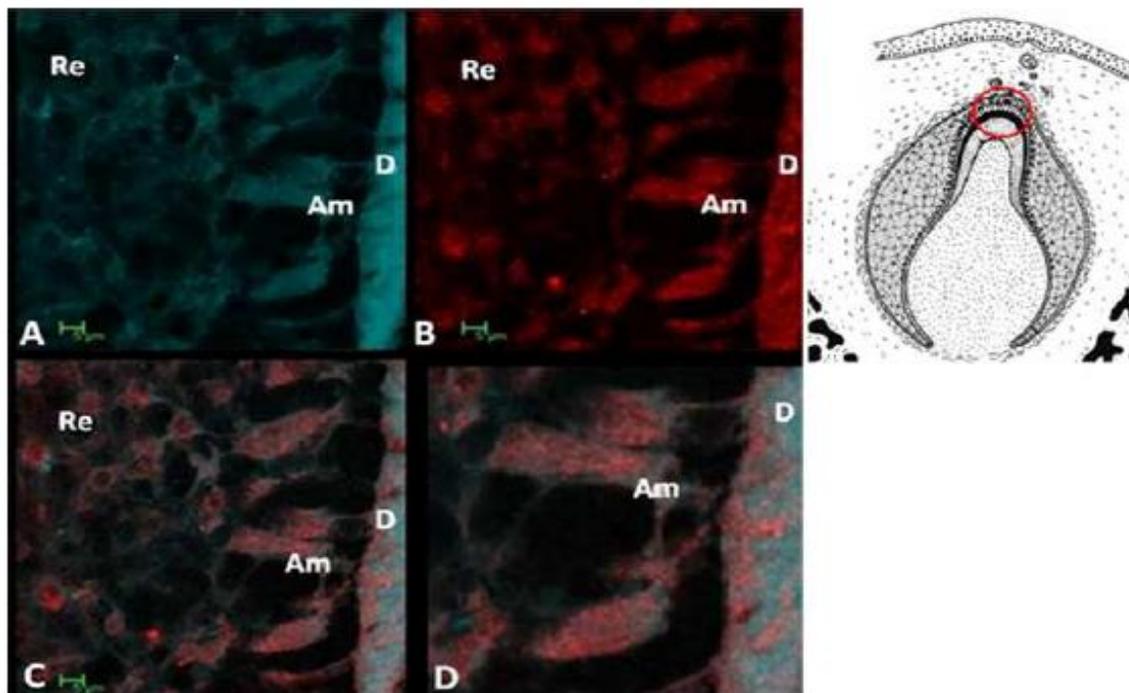


Figure  
[Click here to download High resolution Image](#)

