



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS.

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA.

TESIS

**Expresión De Las Proteínas Del Esmalte En Dientes Fetales
Humanos.**

PRESENTA

M. en C. Paloma María Campos Navarro.

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

TUTORES:

Dra. En C. Alma Lilian Guerrero Barrera.
Dr. En C. Francisco Javier Gutiérrez Cantú.

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL
Dr. En C. Francisco Javier Avelar González.

Aguascalientes, Ags., a 27 de noviembre de 2018.



M. en C. Jesús Ruíz Gallegos.
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **PALOMA MARÍA CAMPOS NAVARRO** con ID **184967** quien realizó la tesis titulada: **EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL ESMALTE EN DIENTES FETALES HUMANOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 23 de noviembre de 2018.



Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Tutor de tesis



Dr. Francisco Javier Gutiérrez Cantú
CO-Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Morfología
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. Jesús Ruíz Gallegos.
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **PALOMA MARÍA CAMPOS NAVARRO** con ID **184967** quien realizó la tesis titulada: **EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL ESMALTE EN DIENTES FETALES HUMANOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 23 de noviembre de 2018.

Dr. Francisco Javier Avelar González.
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Morfología
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

PALOMA MARIA CAMPOS NAVARRO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD DIRECTA
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

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: **"EXPRESION DE LAS PROTEINAS 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., a 23 de noviembre de 2018

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al CONACYT por otorgarme la beca no. 415360.

A Dra. Alma por su continua ayuda y preocupación, dejando a un lado sus propias ocupaciones y su descanso para ayudarme a sacar esta tesis adelante, así como por sus enseñanzas, aliento, paciencia y comprensión; además de que con sabiduría logró forjar mi carácter y sembrar en mí los conocimientos y el amor necesarios para el día de hoy poder decir con orgullo que soy Doctora en Ciencias Biológicas.

A Dr. Paco por siempre apoyarme durante la realización de la tesis, regañarme cuando era necesario, al darme consejos tanto profesionales como personales y haber facilitado en todo momento el desarrollo de mi trabajo.

A Dr. Avelar por el interés mostrado durante la elaboración de este trabajo y sus comentarios siempre acertados, estando al pendiente a pesar de todas sus ocupaciones.

A mis compañeros de generación, Mariel, Daniel, Memo, Rusland, Moy y Miguel por su ayuda y amistad.

A Gladis, Ernesto, Edgar y Diana quienes además fueron mis cómplices y cuidaron de mí casi como hermanos.

A Adri que siempre estuvo dispuesta a apoyarme, dedicándome tiempo extra a su jornada laboral, que era de su familia y sufrió conmigo para obtener las mejores imágenes, y quien en el transcurso de 4 años ahora es una verdadera amiga.

A Moni y Edgarcito por su apoyo técnico, siempre salvándome de mi incompatibilidad con las máquinas.

A mi familia, porque gracias a ellos he logrado la realización de este sueño.

DEDICATORIAS.

Hace 4 años inicié este sueño desde cero, un cero que se convirtió en un diez, un diez dedicado a Dios que fue mi más grande confidente y mi pilar para seguir de pie en los momentos de flaqueo, quien me ha abierto todos los caminos para lograr mis metas en la vida.

A mi más grande motivo de vida, quienes son mi voluntad y el motor para salir adelante mi **familia**... a ustedes les debo todo lo que soy.

A mi madre, **Dra. María Esther Navarro Rincón Gallardo**, que cuando estuve caída sin fuerzas para levantarme y llorando porque me sentía derrotada me dio todo su apoyo y el aliento necesario para seguir adelante y no renunciar a mi sueño.

A mi padre, **Lic. Juan Gustavo Campos Silva**, que es el hombre más importante de mi vida y quien me ha dado todo a su alcance y *más* con tal de verme feliz y realizada.

A ti, que siempre estas al pendiente de mí, y a tu manera me apoyas cuando flaqueo para sacar la casta y no desistir.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN2

ABSTRACT3

INTRODUCCIÓN4

 Odontogénesis.5

 Estadios De Desarrollo Del Diente.5

 Tejidos del diente.7

 Esmalte.....8

 Proteínas De Matriz Orgánica.9

 Amelogenina.....10

 Ameloblastina.11

 Enamelisina.....12

 Enamelina.....13

 Tuftelina.....13

 Parvalbúmina.....14

 Justificación.....15

 Objetivo General.....15

 Objetivos Específicos.16

Capítulo 1. Expresión de Tuftelina en Gérmenes Dentales Humanos17

Capítulo 2. Human Ameloblastin Labeling in Fetuses24

Capítulo 3. Ameloblastin-Tuftelin Spatial Interaction in Human Dental Germs Development.....44

CONCLUSIONES64

REFERENCIAS.....66

RESUMEN

El esmalte dental es el tejido más duro y mineralizado todos los vertebrados. El esmalte se encuentra expuesto a las superficies oclusales y al ambiente químico de la boca, por lo que actúa como una barrera que protege a los dientes de cambios físicos, químicos y térmicos.

El esmalte se forma por ameloblastos, los cuales, durante su diferenciación expresan proteínas (amelogenina, ameloblastina, tuftelina, enamelisina y parvalbúmina), las cuales son necesarias para el correcto desarrollo del esmalte y regulan su mineralización.

La amelogenina es la proteína que se encuentra en mayor cantidad y es esencial para la adecuada formación del esmalte contribuyendo a su organización estructural regulando el crecimiento de los cristales. La ameloblastina actúa como molécula de adhesión celular para el ameloblasto, y también está involucrada en la proliferación y diferenciación del ameloblasto. La enamelisina es la encargada de degradar a la amelogenina. La tuftelina participa en el inicio de la mineralización del esmalte y la parvalbúmina es crucial para la calcificación.

Es importante conocer la distribución e interacciones de las proteínas en el esmalte en el ser humano, y mediante los resultados obtenidos podemos corroborar que al momento de iniciar la calcificación del esmalte las cinco proteínas interactúan entre ellas permitiendo que el esmalte tenga la dureza que lo caracteriza.

Palabras clave: inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, microscopia Confocal, co-localización, esmalte, amelogenina, ameloblastina, tuftelina, enamelisina, parvabumina.

ABSTRACT

Dental enamel is the harder and most highly mineralized tissue of all vertebrates. Enamel is exposed to the occlusal surfaces and chemical environment inside the mouth, so that it acts like a barrier that protects the teeth from physical, chemical and thermal forces.

Enamel is formed by the ameloblasts that, when differentiated, they express proteins (amelogenin, ameloblastin, tuftelin, enamelysin and parvalbumin), which are necessary for the proper development of the enamel and regulate its mineralization.

The amelogenin is the protein that is in greater quantity and is essential for the suitable formation of enamel contributing to its structural organization regulating the growth of the crystals. Ameloblastin acts as a cell adhesion molecule for the ameloblast, and is also involved in the proliferation and differentiation of ameloblast. Enamelysin is responsible for degrading amelogenin. Tuftelin participates in the initiation of enamel mineralization and parvalbumin is crucial for its calcification.

It is important to know the distribution and interactions of proteins in enamel in humans, and through the results obtained we can confirm that at the time of enamel calcification, the five proteins interact with each other, allowing the enamel to have the hardness that characterizes it.

Keywords: immunohistochemistry, immunofluorescence, confocal microscopy, co-localization, enamel, amelogenin, ameloblastin, tuftelin, enamelysin, parvalbumin.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo dental es esencial para sostener y mantener la calidad de vida de los seres humanos.

Los dientes humanos se desarrollan como unidades individuales y siguen una secuencia durante un periodo de tiempo largo, alrededor de 20 años, durante el cual erupcionan totalmente en la boca.¹

En el desarrollo de cabeza se distinguen dos regiones: la región neurocraneana y la región visceral. En la cual se da origen al sistema digestivo y al sistema respiratorio así como, a las estructuras faciales que se forman a partir de los arcos branquiales con sus tejidos duros y blandos.

En la región visceral al finalizar la tercera semana se pliega el embrión trilaminar, formando una depresión llamada estomodeo, depresión estomodeal o cavidad bucal primitiva.

Al finalizar la cuarta semana se establece la comunicación entre la cavidad bucal primaria y la faringe al romperse la membrana bucofaríngea. Las estructuras que rodean al estomodeo crecen y se agrandan rápidamente. Dos semanas después se produce la diferenciación de la lámina dental o listón dental, que es el primer signo del desarrollo de los órganos dentarios.²

En el curso del desarrollo de los órganos dentarios en el hombre, aparecen sucesivamente dos clases de denticiones: la dentición primaria o infantil y los segunda dentición o de adulto.^{2,3}

La dentición infantil consta de 20 pequeños dientes (10 en cada arcada) cuya forma y tamaño satisfacen las necesidades fisiológicas requeridas, coincidiendo armónicamente con el tamaño de la boca, con los huesos y con todo el conjunto anatómico durante el periodo de vida en el que cumplen su función. La segunda

dentición está formada por treinta y dos dientes, dispuestos en ambas arcadas, una que corresponde al maxilar superior y otra a la mandíbula.³

Odontogénesis.

El desarrollo de los órganos de los vertebrados implica una serie continua y recíproca de interacciones entre el epitelio dental y el mesénquima. El desarrollo dental es un ejemplo clásico de este proceso.⁴⁻⁶

El desarrollo individual de los dientes se caracteriza por una serie de interacciones moleculares reiterativas que toman lugar entre el epitelio odontogénico y la cresta neural derivada del ectomesénquima dentro de los primeros primordios de la mandíbula.⁷⁻¹⁴, y experimenta diferentes etapas definidas por las características morfológicas del epitelio dental¹. La invaginación del epitelio oral da lugar al epitelio dental que adquiere progresivamente formas características de forma, tales como las de brotes, casquete y campanas. Después de la iniciación del diente, el potencial odontogénico se desplaza al mesénquima que indica al epitelio formar estructuras específicas del diente.⁸

En la fase de campana, el mesénquima da lugar a la pulpa dental. Las células de la pulpa adyacentes al epitelio dental comienzan a diferenciarse en odontoblastos, mientras que las células epiteliales que se enfrentan a la pulpa dental se diferencian en ameloblastos, los cuales formaran dentina y esmalte respectivamente.^{8,15-17} La diferenciación del ameloblasto comienza una vez que una pequeña capa de predentina es formada y es seguida de un depósito de matriz del esmalte y su mineralización.^{9,18}

Estadios De Desarrollo Del Diente.

Los gérmenes dentarios siguen en su evolución una serie de etapas que, de acuerdo a su morfología se dividen en 3 estadios de desarrollo, los cuales se

denominan *estadio de brote macizo o yema, estadio de casquete estadio de campana y estadio de folículo, terminal o maduro*.^{19,20}

Durante el *estadio de brote o de iniciación* los factores de crecimiento inducen proliferación de células epiteliales, para formar una lámina dental, determinando así el sitio de formación de los dientes.²¹ Además aparecen los brotes que serán los futuros órganos del esmalte que darán lugar al único tejido de naturaleza ectodérmica del diente, el esmalte.^{2,21}

En el *estadio de casquete*, alrededor de la novena semana del desarrollo embrionario, adquiere forma de un verdadero casquete. Su concavidad central encierra una porción del ectomesénquima que lo rodea, la futura papila dentaria, que dará origen al complejo dentinopulpar.¹⁹ Histológicamente se distinguen el epitelio dental interno, el epitelio dental externo y el retículo estrellado, en el órgano del esmalte.²

La *etapa de campana* del desarrollo dental inicia alrededor de la décimo cuarta semana. Se cree que es un proceso controlado por un centro de señalización que se desarrolla en la punta del estadio de brote tardío conocido como nudo del esmalte. Finalmente, el epitelio dental del brote invagina dentro del mesénquima subyacente, formando un germen dental en el estadio de campana tardía.^{13,21,22} Mientras tanto, pequeños divertículos surgen de las papilas epiteliales dentales en la parte superficial, y se convierten en los brotes secundarios de dientes (brotes de dientes permanentes). Estos gérmenes de dientes secundarios se detienen en la etapa de campana y reanudan hasta que se sustituyen los dientes primarios.²¹

En ésta etapa las células más externas de la papila dental empiezan a diferenciarse en odontoblastos que secretan la dentina, y el epitelio interno del esmalte se diferencia en ameloblastos, que son las células productoras de esmalte.^{20,22} La membrana basal que separa al órgano del esmalte y a la papila dental se degrada después de la deposición de predentina y antes que la matriz del esmalte sea secretada por los ameloblastos. Esta membrana es la interfaz

que con el tiempo se convierte en la unión amelodentinaria; su degradación permite el contacto directo entre los odontoblastos y preameloblastos, interacción que puede funcionar como una señalización inductiva entre ellos.²⁰

El periodo de campana también determina la morfología de la corona por señales específicas del ectomesénquima subyacente o papila dental sobre el epitelio interno del órgano dental. Ello conduce a que esta etapa celular se pliegue, dando lugar a la forma, número y distribución de las cúspides, según el tipo de elemento dentario al que dará origen. Es decir, el patrón coronario se establece antes de comenzar la aposición y mineralización de los tejidos dentales.²

La citodiferenciación de las células formadoras de tejido duro comienza en la punta de las cúspides y requiere interacciones entre los odontoblastos y los ameloblastos.²³

Tejidos del diente.

El diente de mamífero está compuesto por 4 tipos de tejidos: esmalte, dentina, pulpa y cemento. La pulpa se encuentra ubicada en la cavidad central de un diente y es un tejido blando, que contiene nervios, vasos sanguíneos, fibroblastos y linfocitos. Los otros tres componentes son tejidos duros calcificados.^{3,24,25}

La corona dental humana está formada en su exterior por el esmalte e internamente por la dentina.^{24,26,27} Estos dos tejidos El esmalte y la dentina actúan como herramienta para la masticación de alimentos.²⁴

El esmalte está expuesto a la superficie oclusal y al entorno químico dentro de la boca como el tejido más duro del cuerpo humano, el esmalte es sometido a fricción y desgaste todos los días. Además, desempeña un papel crucial en el mantenimiento de las severas fuerzas masticatorias y, al mismo tiempo, protege la vital dentina y la estructura pulpar de los dientes.^{26,27}

Esmalte.

El esmalte dental es el recubrimiento compuesto biocerámico de dientes de vertebrados que es único en muchos aspectos²⁸ y, en general se considera un material cerámico biológico natural debido a su componente principal, la hidroxiapatita.²⁹ El esmalte dental es el tejido duro más mineralizado del cuerpo y es único en su composición y proceso de formación.³⁰⁻³² En los humanos y en muchos otros mamíferos, la formación de esmalte se clasifica artificialmente en etapas de preconcepción, secreción y maduración.³³

El esmalte dental es el único material organizado nanoestructuralmente.³⁴ Su compleja organización se debe a las exigencias del medio bucal y el contacto con los dientes antagonistas.³⁵ Este tejido forma la estructura externa del diente que envuelve la corona entera,³⁶⁻⁴⁰ con un grosor de 1 a 2 mm,²⁴ formando una barrera aislante que protege a la dentina subyacente y a la pulpa contra el desgaste mecánico, la erosión ácida y las bacterias que atacan en nuestra vida cotidiana.^{30,36-40} Por lo tanto las propiedades estructurales y compositivas del esmalte son extremadamente importantes para sus funciones biomecánicas inherentes.³⁸ Sin embargo, a diferencia de otros biominerales como por ejemplo la dentina, el esmalte es un tejido no vivo y no tiene capacidad para regenerarse, auto-repararse o remodelarse.⁴¹⁻⁴³

El esmalte es formado mediante un proceso llamado amelogénesis, el cual, es un proceso complicado que se refiere a la interacción entre el crecimiento de cristales de hidroxiapatita y las proteínas extracelulares,^{30,44,45} así como por una serie programada de eventos fisiológicos y químicos incluyendo la expresión genética, la secreción de proteínas, el plegamiento y ensamblaje de las proteínas, el crecimiento de minerales y la degradación de proteínas.^{20,24,46}

A diferencia de la mayoría de los tejidos biomineralizados derivados del colágeno y del mesénquima, el esmalte es creado por un linaje de células derivado del

ectodermo, los ameloblastos.^{26,28,47} El depósito del esmalte inicia en la unión amelo-dentinaria cuando los ameloblastos inician su diferenciación.²⁴

Los ameloblastos son células de origen epitelial cuya diferenciación está estrechamente vinculada a la diferenciación de las células formadoras de la dentina, los odontoblastos, que son de origen mesenquimal.²⁰ Excepcionalmente, los ameloblastos son células que secretan una matriz extracelular mineralizante.⁷ Forman una capa unicelular que cubre al esmalte en desarrollo y son responsables de su composición; forman parte del órgano del esmalte que se compone de una capa epitelial externa, el retículo estrellado, el estrato intermedio y el epitelio interno del esmalte (capa Ameloblasto).⁴⁸ El ameloblasto comienza a depositar matriz adamantina en la predentina durante el estadio de campana tardío.²⁰

La dureza del esmalte se debe a que está químicamente compuesto por materia inorgánica microcristalina organizada de forma nanométrica, (cristales de hidroxiapatita) en un 96%, 3% de agua, y 1% de matriz orgánica.^{2,16,45,49}

Hace aproximadamente 50 años, se demostró que esmalte dental durante su desarrollo tenía un alto contenido en proteínas, mientras que el esmalte maduro no lo tiene.^{50,51} Se descubrió que las proteínas de la matriz del esmalte son removidas durante la etapa de maduración de la amelogénesis.⁵²

Proteínas De Matriz Orgánica.

La matriz orgánica en el esmalte es heterogénea, y las proteínas son los constituyentes más representativos del esmalte en desarrollo; estas proteínas regulan la mineralización del esmalte, controlan la morfología de los cristales y actúan como nucleadores minerales durante la maduración del esmalte.²⁹ Los ameloblastos producen dos clases principales de proteínas de la matriz del esmalte (EMP): proteínas hidrófobas llamadas amelogeninas (90% de la matriz de esmalte en desarrollo) y un grupo heterogéneo de proteínas no amelogeninas (el

10% restante), como las proteínas del esmalte aniónicas ricas en prolina, tuftelina y otras proteínas séricas.⁵³ Las proteínas no amelogeninas incluye ameloblastina, enamelin y tuftelina^{6,49} y la parvalbúmina.⁵⁴⁻⁵⁷

Sobre estas proteínas se destacan dos puntos importantes. En primer lugar, son necesarias para la adecuada formación del esmalte. Sin embargo, más tarde se reabsorben por los ameloblastos que originalmente les secretan en la matriz.³⁰ Así, estas proteínas son necesarias para la formación del esmalte, pero no forman parte del producto final maduro. Sólo pequeñas cantidades de proteína permanecen en esmalte maduro. En segundo lugar, los genes que codifican estas proteínas de la matriz del esmalte han degenerado en pseudogenes en múltiples especies sin dientes o sin esmalte que descendían de antepasados con dientes cubiertos de esmalte.⁴⁸ También se cree que estas proteínas se encuentran presentes para regular el inicio, la propagación, la terminación y la maduración, y son esenciales para el desarrollo adecuado del esmalte.⁵³

Amelogenina.

La amelogenina es la principal proteína estructural del esmalte y constituye el 90% del contenido proteínico de la materia orgánica al comenzar la amelogénesis^{16,20,46} y es un factor clave en controlar la orientación y el crecimiento alargado de los prismas del esmalte durante el proceso de mineralización.⁴⁵

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,⁵⁸⁻⁶⁰ y disminuye progresivamente a medida que aumenta la madurez del esmalte.⁶¹

La amelogenina es crítica para la formación adecuada del esmalte, pero en la actualidad, sabemos por estudios con ratones knock-out/knock-in que la

amelogenina por sí misma no puede iniciar el crecimiento cristalino o promover la formación del esmalte;⁴⁸ sin embargo, controla la organización y el crecimiento de los prismas del esmalte, y es fundamental para la formación normal del esmalte; pero a pesar que la amelogenina es necesaria para la formación correcta del esmalte, es reabsorbida en los ameloblastos secretores.^{48,62} Además, los defectos en la secuencia de la amelogenina conduce a la formación defectuosa de prismas del esmalte y su organización, y, la supresión de los dominios terminales conservados conducen a la formación de esmalte mal definido como es el caso de la amelogénesis imperfecta, resaltando la importancia de estos dominios conservados en la interacción proteína-proteína o proteína-minerales.^{16,63,64}

Ameloblastina.

La Ameloblastina también conocida como sheatelina, envoltulina o amelina^{65,66} es una glicoproteína específica del diente⁶ expresada por los ameloblastos, presente en la matriz orgánica del esmalte,⁶⁷⁻⁶⁹ implicada en la interacción mesénquimo-ectodérmica que precede a la secreción de esmalte y dentina.⁶⁵ Siendo la proteína no amelogenina más abundante^{6,70} constituye casi el 5% del total de las proteínas presentes en la matriz orgánica.²⁰ Es rica en prolina y secretada junto con la amelogenina en gránulos de secreción.⁷¹

Es la segunda glicoproteína no amelogenina esmalte específica, y funciona como una molécula de adhesión celular para el ameloblasto.^{45,48}

La ameloblastina es miembro de la familia de fosfoproteínas (SCPP) calcio secretoras de proteínas.⁷² Es una proteína típica de la matriz extracelular que puede estar involucrada en la regulación de la adhesión, proliferación y diferenciación de los ameloblastos^{6,65} a la matriz del esmalte subyacente⁶⁵, y parece que cumplen funciones esenciales del desarrollo del esmalte.

Las ameloblastinas se sintetizan como proteínas de 65-70 kDa que se convierten rápidamente en varias proteínas de bajo peso molecular, ellas promueven la

formación de minerales y la elongación de los cristales,⁷³ así como en la modulación de su crecimiento.^{65,74}

Inmediatamente después que los ameloblastos secretan ameloblastina para la formación del esmalte, la ameloblastina se escinde en varios fragmentos⁷⁵ por sus propias enzimas proteolíticas tales como la enamelisina (MMP-20) y la calicreína-4.^{76,77}

Existen altos niveles de expresión de ésta proteína en el estadio secretor que disminuye en el estadio de maduración; transitoriamente se expresa en la matriz de dentina y las células epiteliales de la vaina radicular de Hertwig⁶, su rol en dentina y cemento no se ha establecido.

Estudios recientes han notado la expresión de esta proteína en dentina, cemento, pulpa, huesos craneales y osteoblastos primarios.^{78,81} Actúa como molécula de remodelado óseo⁸¹ y actúa directamente en la osteodiferenciación.⁸²

Enamelisina.

La enamelisina (matriz metaloproteínasa-20 MMP20) es la proteinasa expresada durante la secreción a través de la etapa de maduración temprana.⁸³

La MMP20 originalmente fue clonada de una biblioteca de ADNc de órgano del esmalte porcino.⁸⁴ Aunque desde entonces se ha demostrado que es expresada en odontoblastos del órgano pulpar,⁸⁵ su expresión se pensó originalmente para ser confinada en el órgano del esmalte. Por lo tanto, esta MMP fue nombrada "enamelisina".

La enamelisina de 54 kDa sólo es secretada por odontoblastos y ameloblastos. Es expresada en el esmalte de nueva formación, tiene la función de degradar a la amelogenina, la proteína más abundante del esmalte.¹⁶ Su expresión es crítica para mantener la morfología normal del órgano del esmalte durante la etapa de maduración cuando MMP-20 ya no se expresa.^{84,86,87} En su ausencia aparecen

nódulos calcificados en la superficie del esmalte en la etapa de maduración, con pérdida de la continuidad de la capa de ameloblastos casi lineal.⁸⁴

Enamelina.

La Enamelina es la más grande y menos abundante de las tres fosfoproteínas calcio secretoras y representa alrededor del 5% de las proteínas totales en el desarrollo del esmalte.⁸⁸ Hasta la fecha, el gen enamelina (Enam) ha sido considerado comúnmente como un gen específico de diente expresado por el órgano del esmalte y (en un nivel bajo) por odontoblastos.⁸⁹

Tuftelina.

La tuftelina es secretada en la matriz del esmalte y puede detectarse en la unión amelodentinaria.^{28,90} Su expresión (justo antes del inicio de la mineralización del esmalte) y su naturaleza ácida la hacen una buena candidata para la participación en las etapas iniciales de la mineralización del esmalte.⁹¹

La sobreexpresión de tuftelina en la matriz extracelular del esmalte produce imperfecciones de los prismas del esmalte y la estructura del cristalito en un modelo de ratón transgénico.⁹²

La tuftelina, pesa 44 KDa, es una proteína ácida primero clonada y secuenciada⁹³ desde una biblioteca de expresión bovina de cDNA enriquecido de ameloblasto. Se encuentra en el esmalte en desarrollo y en el esmalte extracelular maduro.

El momento de la expresión de la tuftelina (justo antes de que comience la mineralización del esmalte), el lugar donde se acumula, y su naturaleza ácida sugieren que la tuftelina se involucra en las etapas iniciales de la mineralización del esmalte, probablemente a través de nucleación.⁹⁰ Sin embargo, también se expresa en las primeras etapas de la odontogénesis (E13), cuando aún no se han formado ni el esmalte ni la dentina, esto sugiere que la tuftelina puede tener

múltiples papeles, y también está involucrada en la comunicación del mesénquima/ectodermo.^{90,94}

Parvalbúmina.

Otra proteína es la parvalbúmina, la cual se presenta en células nerviosas, musculares y en las generadoras de tejidos mineralizados: odontoblasto y ameloblasto. En cambio, está ausente en estos dos tipos cuando no han alcanzado su grado total de diferenciación. En las células nerviosas interviene en la plasticidad de la membrana durante el desarrollo dendrítico.

En el ameloblasto, la parvalbúmina se encuentra en el citoplasma, Pero sin una relación directa con ningún orgánulo en particular. Durante el periodo secretor se localiza preferentemente en el polo distal del proceso de Tomes. Su función está relacionada con el pasaje del calcio del medio intracelular al extracelular.

La parvalbúmina pertenece a una familia de pequeñas proteínas ácidas de unión al calcio, que se encuentran en el músculo esquelético de los vertebrados y en cerebro y glándulas endocrinas de mamíferos incluyendo al hombre.^{55,56,95}

Tanto la Vitamina D dependiente de proteínas de unión de calcio y la parvalbúmina se han detectado en los ameloblastos y en el cartílago calcificado mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estas dos proteínas de unión a Ca pueden jugar un papel crucial en la acumulación local de iones calcio durante el proceso de mineralización. La parvalbúmina se limita exclusivamente a los ameloblastos en el diente. La inmunoreacción de la parvalbúmina en el ameloblasto esta polarizada hacia el ápice de las células.⁵⁶

Justificación.

Las proteínas de la matriz orgánica 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 enamelinina 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.

Las alteraciones en la producción de las proteínas, pueden conducir a la mala producción del esmalte. Estas alteraciones en la que están implicados desórdenes genéticos, se caracterizan 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.

Por lo anterior es necesario conocer la distribución de las proteínas, durante el desarrollo del órgano del esmalte, en el ser humano a fin de comprender como se lleva a cabo este proceso, ya que en la literatura se mencionan estas relaciones solo en especímenes animales; en humanos solo se ha dado a conocer la amelogenina y la enamelinina, lo cual constituye la justificación de la presente tesis.

Objetivo General

- Conocer la localización espacial y temporal de las proteínas que conforman la matriz orgánica del esmalte en fetos humanos.

Objetivos Específicos.

- Conocer la localización proteínas de la matriz orgánica del esmalte.
- Determinar en qué etapa del desarrollo del órgano del esmalte aparecen las proteínas, así como su posible co-localización.





Capítulo 1.

Expresión de Tuftelina en Gérmenes Dentales Humanos

Int. J. Morphol.,
35(1):293-298, 2017.

Expresión de Tuftelina en Gérmenes Dentales Humanos

Expression of Tuftelin in Human Dental Germs

Campos-Navarro, Paloma María¹; Guerrero-Barrera, Alma Lilian¹; Avelar-González, Francisco Javier²; Navarro-Rincón-Gallardo, María Esther³; Mariel-Murga, Humberto³; Mariel-Cárdenas, Jairo³ & Gutiérrez-Cantú, Francisco Javier⁴

CAMPOS-NAVARRO, P. M.; GUERRERO-BARRERA, A. L.; AVELAR-GONZÁLEZ, F. J.; NAVARRO-RINCÓN-GALLARDO, M. E.; MARIEL-MURGA, H.; MARIEL-CÁRDENAS, J. & GUTIÉRREZ-CANTÚ, F. J. Expresión de tuftelina en gérmenes dentales humanos. *Int. J. Morphol.*, 35(1):293-298, 2017.

RESUMEN: La tuftelina es una proteína secretada en la matriz adamantina en desarrollo durante la formación del esmalte. Su función continúa sin esclarecerse, aunque se presume que juega un papel importante en la biomineralización de esmalte y dentina, así como en el desarrollo del órgano dental. Con el presente estudio se identificó su localización en las diferentes estructuras de gérmenes dentales de fetos humanos, conforme a los resultados se observó su expresión en el estadio pre-secretor observándose en el citoplasma de los ameloblastos, retículo estrellado, papila dental, así como en el estrato intermedio; en el secretor se identificó principalmente en la unión amelodentinaria, y en la superficie externa del esmalte, observando una marcada expresión de la proteína en la porción basal del proceso odontoblástico, pero no en la matriz extracelular de la dentina. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede considerar que su expresión se presenta tanto en la amelogénesis, como en la odontogénesis en tejidos sin mineralizar.

PALABRAS CLAVE: tuftelina; inmunohistoquímica; amelogénesis.

INTRODUCCIÓN

El esmalte dental es el tejido más duro y mineralizado del cuerpo humano. Su formación se caracteriza por un proceso de desarrollo intenso y organizado (Fincham *et al.*, 1999), que se forma químicamente por matriz inorgánica (95 %), agua (3–5 %) y por matriz orgánica (1-2 %) (Gutiérrez-Cantú *et al.*, 2011, 2014). El proceso de amelogénesis involucra a los ameloblastos, los cuales, secretan proteínas de la matriz orgánica que incluyen amelogeninas, ameloblastinas, enamelinas y tuftelinas, las cuales son capaces de guiar la formación de los prismas del esmalte, con la previa producción de dentina (Simmer & Hu, 2002; Lacruz *et al.*, 2010; Jeremias *et al.*, 2013; Tariq *et al.*, 2014). La mayor parte de los estudios realizados previamente se han realizado en modelos animales. La tuftelina se encuentra catalogada dentro del grupo de las proteínas no-amelogeninas, siendo la primera proteína de ellas en ser caracterizada (Zeichner-David, 2001; Catón & Tucker, 2009). El grupo de proteínas no-amelogeninas incluye a la enamulina, ameloblastina y tuftelina (Zeichner-David, 2001; Mihú *et al.*, 2008, Gutiérrez-Cantú *et al.*, 2014).

Esta es una proteína específica no-amelogenina, que originalmente fue identificada y caracterizada en el esmalte extracelular maduro y en desarrollo (Deutsch *et al.*, 2011); se considera que juega un papel importante en la calcificación del esmalte (Deutsch *et al.*, 1995, 1998, 2002). Es glicosilada con sitios de fosforilación de serina y treonina (Deutsch *et al.*, 2002). Las células epiteliales la expresan en etapas tempranas de la odontogénesis (Zeichner-David *et al.*, 1997; Deutsch *et al.*, 1998, 2002; Leiser *et al.*, 2007) y desempeñan un papel importante en la mineralización y organización estructural del esmalte pudiendo ser importante en la nucleación de los cristales adamantinos (Deutsch *et al.*, 2002).

La expresión de esta proteína se ha observado en numerosos tipos de tejidos en diferentes orígenes embriológicos (mesenquimal, epitelial y neuronal) (Mao *et al.*, 2001; Deutsch *et al.*, 2002; Shay *et al.*, 2009), tejidos mineralizados normales y con presencia de células cancerosas (Mao *et al.*, 2001; Deutsch *et al.*, 2002; 2011; Leiser *et al.*, 2007). Su

¹ Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.

² Laboratorio de Ciencias Ambientales, Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.

³ Laboratorio de Disecciones, Departamento de Morfología. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

⁴ Laboratorio de Histología, Departamento de Morfología. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

peso molecular es de 44 KDa con un punto isoelectrónico de 5,7 (Shay *et al.*, 2009), y se considera una proteína no específica del esmalte (Deutsch *et al.*, 2002). Parece restringirse al área de la unión amelodentinaria (DEJ) y aparece como producto de los ameloblastos jóvenes y pre-odontoblastos. Debido a su ubicación restringida se ha propuesto que juega un papel en la inducción y el inicio de la mineralización así como un material de unión que une al esmalte y la dentina (Avery, 2011). Se localiza principalmente dentro del citoplasma de la célula; se acumula en regiones citoplasmáticas definidas, no así en el aparato de Golgi y/o gránulos de secreción, de los ameloblastos. (Luo *et al.*, 2004). Se ha identificado su expresión dentro de los procesos de los odontoblastos durante las primeras etapas de desarrollo de los órganos dentales y en la porción del esmalte adyacente a la DEJ en etapas posteriores (Simmer & Fincham, 1995). Esta proteína, al igual que la amelogenina, se ha considerado de auto-montaje, así como se ha sugerido su relación en el desarrollo y mineralización del esmalte, pero su función específica aun es desconocida (Paine *et al.*, 1998). Se cree que, junto con la enamelin, tienen una función primaria en la nucleación de los cristales del esmalte (Termine *et al.*, 1980; Diekwisch *et al.*, 1997) y se expresa en varios tejidos no mineralizados, lo cual sugiere que tiene una función universal y/o un papel multifuncional (Deutsch *et al.*, 2002; Leiser, *et al.*, 2007; Jeremias, *et al.*, 2013) en el proceso de desarrollo que se activa durante la organogénesis (Leiser, *et al.*, 2007). Deben distinguirse de las proteínas tuft, que son proteínas extremadamente insolubles o fragmentos de proteínas secretadas durante la amelogenesis temprana, que quedan en la matriz calcificada durante la maduración del esmalte y se identifican en los penachos, que son los haces sinuosos de material orgánico que pueden ser reconocidos histológicamente en la DEJ (Deutsch *et al.*, 1995).

Debido a la importancia que tiene la tuftelina en el desarrollo y mineralización del órgano dental, el objetivo del presente estudio fue determinar su localización en las diferentes estructuras de gérmenes dentales en fetos humanos.

MATERIAL Y MÉTODO

Consideraciones éticas. El Comité de Educación, Investigación y Ética del Hospital General de Zacatecas, México; es la institución que realizó la donación de los fetos humanos, y también suministró los permisos para su uso en esta investigación.

Obtención de especímenes. Se analizaron cinco fetos de entre 14 y 22 semanas de gestación; se realizó una valoración macroscópica a cada espécimen, con lo que se descartó cual-

quier malformación, para posteriormente hacer la disección de los fetos, y obtener cinco maxilares superiores y cinco inferiores, cada uno dividido en derecho e izquierdo, con lo que se obtuvieron 20 hemimaxilas, las cuales se fijaron en formalina neutra al 10 %.

Preparación de especímenes

Imunohistoquímica. Las hemimaxilas se colocaron en una solución de descalcificación de ácido etilendiaminetetraacético al 10 % (EDTA) durante 15 días, se tomaron radiografías periapicales para evaluar el progreso de la descalcificación, una vez descalcificados, los especímenes se lavaron en PBS al 1 % durante 30 minutos y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes seriados de 5 mm de grosor realizándose el desmascaramiento de epítopes en una solución de citrato de sodio al 0.01 M con un pH de 6.0 por lapsos de 25, 10, 8, 5 y 5 segundos en un horno de microondas con intervalos de 2 minutos entre cada lapso. Se bloquearon las peroxidases endógenas y se aplicó un anticuerpo policlonal anti-tuftelina contra conejo (Molecular Probes) diluido 1:100, como anticuerpo secundario se utilizó el sistema Dako LSAB HRP (Dako, Glostrup, Denmark), se contratiñó con hematoxilina (Allen *et al.*, 1994). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Leika DM 1000 equipado con el analizador de Leica Acquire. El cálculo del tamaño de la muestra se obtuvo de acuerdo a la fórmula de Cummins y Hulley (Hulley & Cummins, 1988). Obteniendo un total de 20 muestras para analizar.

RESULTADOS

Utilizando un anticuerpo policlonal IgG anti-tuftelina contra conejo, se detectaron patrones significativos de tinción en el esmalte en desarrollo de gérmenes dentales de fetos humanos de entre 14 y 22 semanas de gestación, tanto en el estadio pre-secretor como en el secretor.

Localización de la tuftelina en el estadio pre-secretor. Las microfotografías de los controles como de la inmunotinción de este estadio fueron obtenidas gérmenes dentales en estadios de campana temprana. Las figuras 1a y 1c se tomaron a 40x y la 1b y 1d a 100x. Los controles se tiñeron con hematoxilina-eosina logrando observarse los ameloblastos pre-secretorios (A), el retículo estrellado (SR), la papila dental (P) y el estrato intermedio (SI) (Fig. 1a y 1b).

Los resultados de la inmunotinción con el anticuerpo para tuftelina en el estadio pre-secretor muestra una reacción casi homogénea intensa en todos los componentes del germen dental, siendo un poco más intensa en la porción basal

CAMPOS-NAVARRO, P. M.; GUERRERO-BARRERA, A. L.; AVELAR-GONZÁLEZ, F. J.; NAVARRO-RINCÓN-GALLARDO, M. E.; MARIEL-MURGA, H.; MARIEL-CÁRDENAS, J. & GUTIÉRREZ-CANTÚ, F. J. Expresión de tuftelina en gérmenes dentales humanos. *Int. J. Morphol.*, 35(1):293-298, 2017.

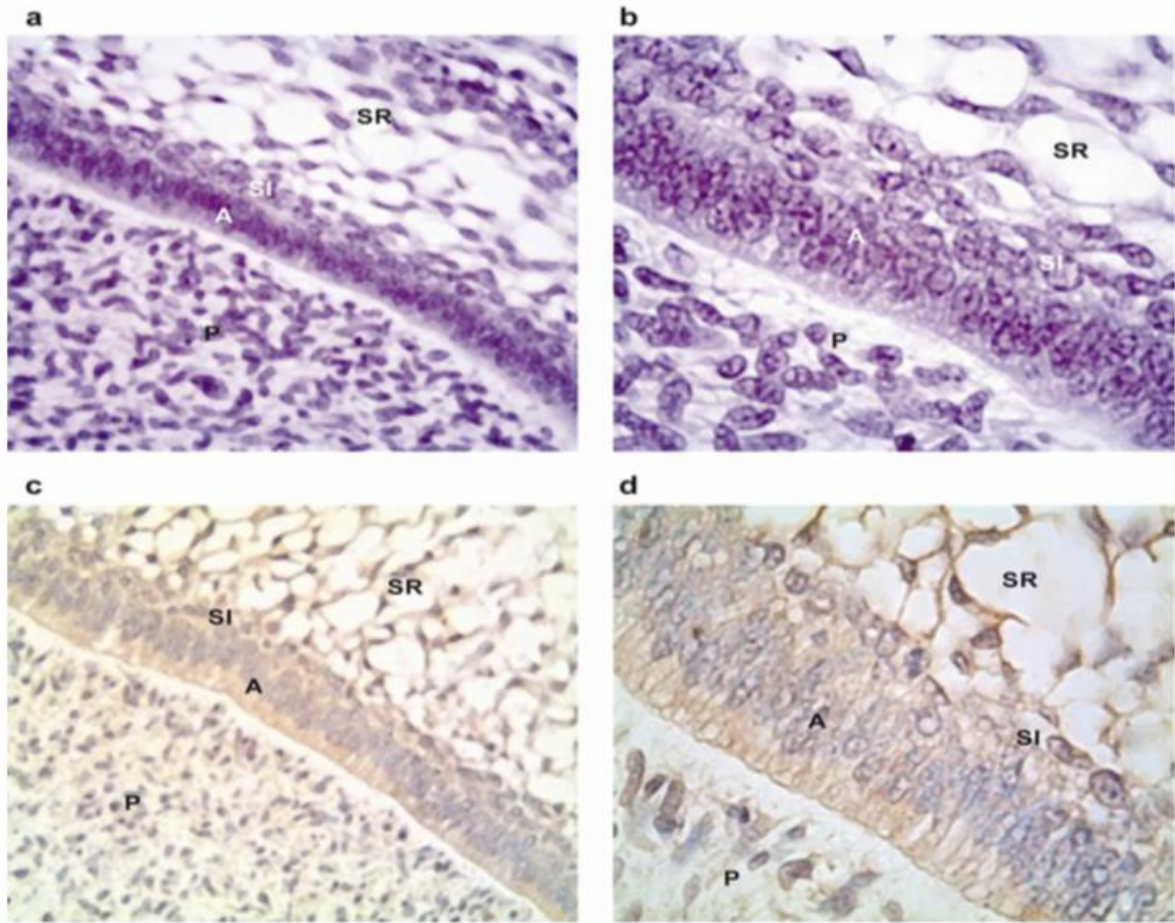


Fig. 1. Reconocimiento específico de tuftelina en fetos humanos en el estadio presecretor del germen dental. Imágenes a 40x (a y c) y a 100x (b y d). Imágenes a 40x (a y c) y a 100x (b y d). Las microfotografías muestran: Controles Tinción H-E (a y b). En el estadio presecretor se encuentra en todo el citoplasma de los ameloblastos (A), en la papila dental (P), en el retículo estrellado (SR) y en el estrato intermedio (SI) (c y d).

del citoplasma de los ameloblastos, disminuye hacia la región apical, el retículo estrellado, la papila dental, así como en el estrato intermedio (Fig. 1c y 1d).

Localización de la tuftelina en el estadio secretor. Las microfotografías de este estadio fueron tomadas de un germen dental en estadio de campaña tardío, periodo en el que ya hay producción tanto de esmalte como de dentina. Las Figuras 1a, 1c y 1e se encuentran a 40x y las 1b, 1d y 1f a 100x.

Las Figuras 2a y 2c pertenecen a la región cuspídea de un molar, en el cual ya se observa una porción de esmalte y dentina mineralizados y, las figuras 2b y 2d corresponden a la región hacia cervical, en donde apenas comienza la secreción de esmalte.

El control de la región cuspídea del estadio secretor teñido con Hematoxilina-eosina, muestra el retículo estrellado, esmalte, odontoblastos, DEJ, la dentina del manto y predentina (Fig. 2a); mientras que en el control de la región cervical solo se observan el esmalte, la dentina del manto y los odontoblastos (Fig. 2b).

Con la inmunotinción en la región cuspídea del estadio secretor se identifica la presencia de la tuftelina principalmente en el esmalte y en la unión amelodentinaria, notando que su distribución en el espesor del esmalte no es homogénea, observándose una fina línea concentrada en la unión amelodentinaria y en el esmalte más superficial (Fig. 2c), entretanto en la región cervical la reacción primordial se percibe en la superficie externa del esmalte (Fig. 2d); hacia el área de

Expresión De Las Proteínas Del Esmalte En Dientes Fetales Humanos.

CAMPOS-NAVARRO, P. M.; GUERRERO-BARRERA, A. L.; AVELAR-GONZÁLEZ, F. J.; NAVARRO-RINCÓN-GALLARDO, M. E.; MARIEL-MURGA, H.; MARIEL-CÁRDENAS, J. & GUTIÉRREZ-CANTÚ, F. J. Expresión de tufelina en gérmenes dentales humanos. *Int. J. Morphol.*, 35(1):293-298, 2017.

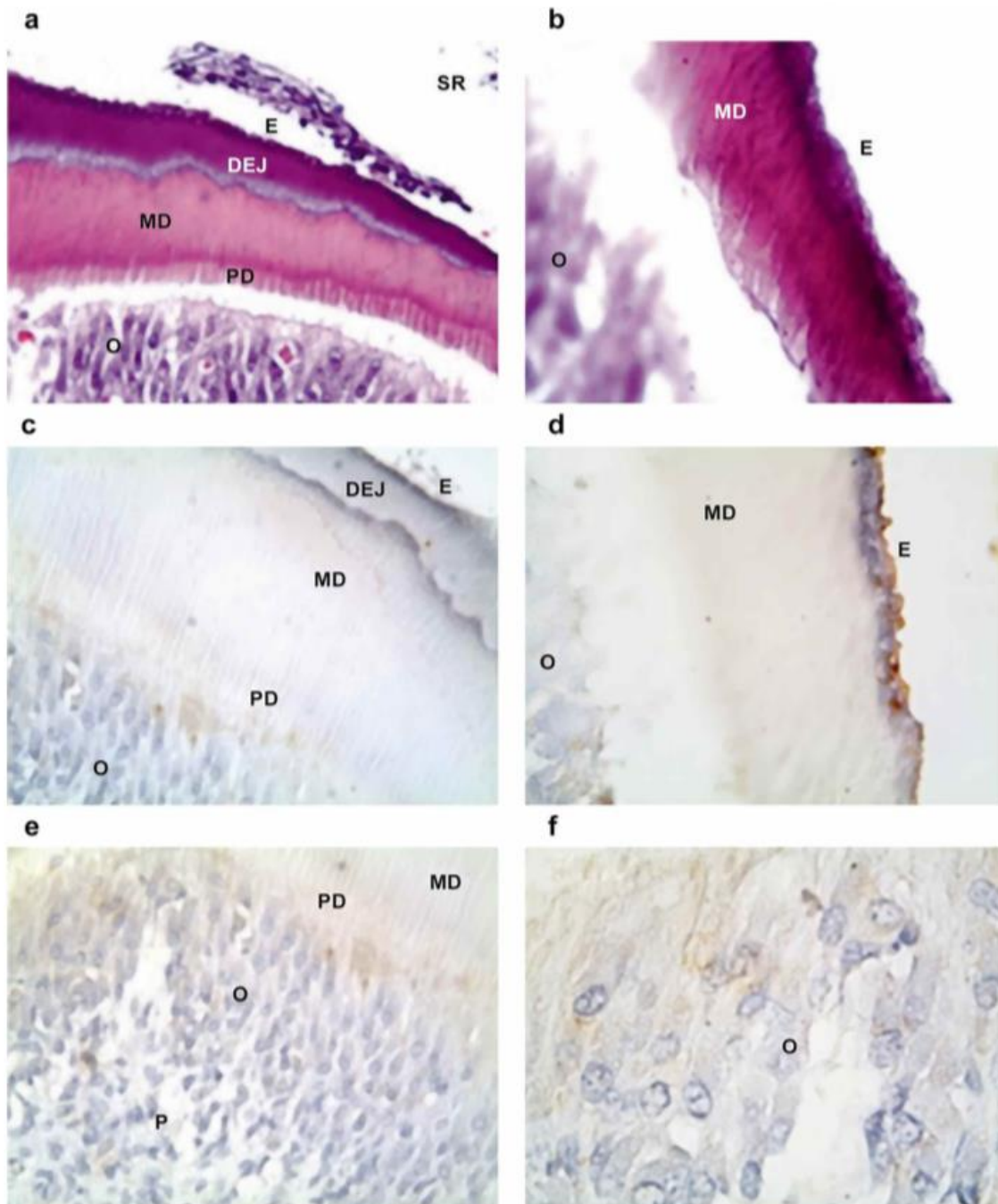


Fig. 2. Reconocimiento específico de tufelina en fetos humanos en el estadio secretor del germen dental. Imágenes de la izquierda a 40x y de la derecha a 100x. Controles Tinción H-E (a y b). Inmunotinción de tufelina (c, d, e y f). En el estadio secretor se encuentra más concentrada en la unión amelodentinaria (DEJ) y en el esmalte más superficial (E) (c y d); se observa una reacción menos intensa en predentina (PD) y en los odontoblastos secretores (O) y vestigios en dentina del manto (DM) y predentina, así como en el esmalte y dentina mineralizados (e y f); en esta etapa no hay expresión de la proteína en papila (P) (e).

CAMPOS-NAVARRO, P. M.; GUERRERO-BARRERA, A. L.; AVELAR-GONZÁLEZ, F. J.; NAVARRO-RINCÓN-GALLARDO, M. E.; MARIEL-MURGA, H.; MARIEL-CÁRDENAS, J. & GUTIÉRREZ-CANTÚ, F. J. Expresión de tuftelina en gérmenes dentales humanos. *Int. J. Morphol.*, 35(1):293-298, 2017.

pre dentina (Fig. 2c y 2e) y en la parte basal de los odontoblastos secretores la reacción disminuye (Fig. 2e y 2f) y, en la dentina del manto (Fig. 2c y 2d) así como en el esmalte y dentina mineralizados solo se pueden distinguir vestigios (Fig. 2c). En esta etapa no se observa presencia en la papila (Fig. 2e).

DISCUSIÓN

Estudios previos realizados en modelos animales indican que la tuftelina es sintetizada por los ameloblastos durante las etapas tempranas del desarrollo del esmalte, y, continúa presente en el esmalte extracelular durante su desarrollo y mineralización (Deutsch *et al.*, 1995; 1998; 2002; MacDougall *et al.*, 1998; Zeichner-David, 2001; Mao *et al.*, 2001; Satchell *et al.*, 2002) En esta investigación se analizaron maxilares superiores e inferiores de fetos humanos; se corroboró que la secreción de la proteína es sintetizada desde etapas tempranas del desarrollo del órgano dental y en el esmalte en desarrollo, no así en el esmalte extracelular mineralizado.

Aunque esta proteína es importante en el desarrollo y mineralización del diente, existen muy pocos conocimientos sobre ella en dientes humanos. (Deutsch *et al.*, 1998; Simmer & Hu *et al.*, 2002). Esta proteína no es específica del órgano dental, ya que se ha encontrado que se expresa en otros tejidos incluyendo riñón, hígado, pulmón y testículos, debido a esto se cree que tiene una función fisiológica más general, que pudiera ser el desarrollo de éstos tejidos, pero aún no ha sido determinada (MacDougall *et al.*, 1998; Satchell *et al.*, 2002).

Previamente se ha referido que la expresión de tuftelina comienza durante el estadio pre-secretor (Mao, *et al.*, 2001), antes de la mineralización, cuando los ameloblastos pre-secretores, pre-odontoblastos y células mesenquimatosas de la papila están presentes (Deutsch *et al.*, 1998). Nuestros resultados concuerdan con los autores ya que se identificó la mayor expresión de la proteína previo al inicio de la mineralización.

Se ha comprobado que el periodo pre-secretor es el periodo en el que la tuftelina tiene mayor expresión, observándose una reacción homogénea en el citoplasma de los ameloblastos (Luo *et al.*, 2004), particularmente en la región secretora de la célula (el proceso de Tomes) (Deutsch *et al.*, 1998), el retículo estrellado y la papila dental. En nuestro estudio se corroboró la expresión de tuftelina en las estructuras mencionadas, así como se logró identificar presencia de la proteína en odontoblastos, tal vez debido que esta juega un papel importante en la inducción de la formación de la primera dentina o de manto, la cual estimu-

la la producción de la matriz del esmalte.

Durante la amelogenesis la tuftelina se expresa en el polo apical del odontoblasto, y se ha especulado que la tuftelina podría haberse producido originalmente en los odontoblastos, así como posteriormente secretarse a través de los procesos de los odontoblastos a la matriz del esmalte recién formado para apoyar la nucleación de los cristales, o la tuftelina pudiera ser secretada originalmente por los ameloblastos, y subsecuentemente traslocarse a la porción mesenquimal del órgano dental (Diekwisch *et al.*, 1997). Los resultados de este estudio difieren en la localización en el odontoblasto, ya que se observa una marcada expresión en la porción basal y más atenuada en la apical lo cual indica la producción de esta proteína por el odontoblasto, además no se identificó marcaje en la matriz extracelular de la dentina.

Deutsch *et al.* (1998) refiere que la expresión de la tuftelina se da en los ameloblastos, especialmente en el proceso de Tomes y en la matriz extracelular del esmalte en desarrollo subyacente, y que aparentemente la proteína no se encuentra presente en odontoblastos y en la matriz extracelular de la dentina, también reacciona con el esmalte maduro de humanos y bovino. En los resultados de esta investigación existe una diferencia con ellos, ya que no obtuvimos reacción en la matriz del esmalte, ni en el esmalte maduro, pero sí en los odontoblastos.

Diversos autores han encontrado que durante la etapa secretora la localización de la tuftelina, en ejemplares animales, se identifica principalmente en la DEJ y en la matriz del esmalte en desarrollo, observándose como una fina línea paralela a la DEJ y al esmalte recién secretado, encontrando altas concentraciones de proteína en la DEJ durante el desarrollo temprano del esmalte (Simmer & Fincham., 1995; Diekwisch *et al.*, 1997; Zeichner-David *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 2001; Satchell *et al.*, 2002), estos acontecimientos coinciden con nuestros resultados realizados en gérmenes de fetos humanos. El que la tuftelina se encuentre en proximidad de la DEJ puede indicar su relación en la nucleación de los cristales del esmalte (Satchell *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2004). De acuerdo a los resultados obtenidos es posible suponer que la tuftelina no solamente se expresa durante el proceso de amelogenesis, sino en el de odontogénesis, pero en tejidos no mineralizados (MacDougall *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2004), por lo que aunque el rol de la tuftelina en el desarrollo del esmalte todavía no se ha clarificado, lo cual puede indicar que esta proteína juega un papel importante en la biomineralización de esmalte y dentina, con lo anterior se deduce que una deficiencia o ausencia de tuftelina derivara en un trastorno de mineralización de esmalte y dentina de manto.

CAMPOS-NAVARRO, P. M.; GUERRERO-BARRERA, A. L.; AVELAR-GONZÁLEZ, F. J.; NAVARRO-RINCÓN-GALLARDO, M. E.; MARIEL-MURGA, H.; MARIEL-CÁRDENAS, J. & GUTIÉRREZ-CANTÚ, F. J. Expresión de tuftelina en gérmenes dentales humanos. *Int. J. Morphol.*, 35(1):293-298, 2017.

AGRADECIMIENTOS. Paloma María Campos Navarro fue apoyada con la beca CONACYT no. 415360. Agradecemos a la Bióloga Adriana Cecilia Moreno Flores del laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al ISC. Edgardo Martínez Martín Del Campo, catedrático de la Facultad de Estomatología de la UASLP, por su apoyo técnico.

CAMPOS-NAVARRO, P. M.; GUERRERO-BARRERA, A. L.; AVELAR-GONZÁLEZ, F. J.; NAVARRO-RINCÓN-GALLARDO, M. E.; MARIEL-MURGA, H.; MARIEL-CÁRDENAS, J. & GUTIÉRREZ-CANTÚ, F. J. Expresión de tuftelin in human dental germs. *Int. J. Morphol.*, 35(1):293-298, 2017.

SUMMARY: The tuftelin is a secreted protein in the adamantine matrix in developing during the enamel formation. Its function continues unclarified, although it plays a role in the biomineralization of the dental organ. With the present studio the location was identified in the different structures of dental germs from human fetuses, according to the results it was observed the expression in the pre-secretor stage being observed in the cytoplasm of ameloblasts, stellate reticulum, dental papilla, also in the intermediate stratum; in the secretor it was mainly identified in the amelodentinal junction and in the outer surface of enamel, observing a marked expression of the protein in the basal portion of the odontoblastic process, but not in the extracellular matrix of the dentine. According to the results obtained it can be considered that its expression occurs in both amelogenesis and odontogenesis in unmineralized tissues.

KEY WORDS: Tuftelin; Immunohistochemistry; Amelogenesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avery, J. K. *Oral Development and Histology*. 3rd ed. Stuttgart, Thieme, 2011.
 Catón, J. & Tucker, A. S. Current knowledge of tooth development: patterning and mineralization of the murine dentition. *J. Anat.*, 214(4):502-15, 2009.
 Deutsch, D.; Leiser, Y.; Shay, B.; Femmon, E.; Taylor, A.; Rosenfeld E., Dafni, L.; Charuvi, K.; Cohen, Y.; Haze, A.; Fuks, A. & Mao, Z. The human tuftelin gene and the expression of tuftelin in mineralizing and nonmineralizing tissues. *Connect. Tissue Res.*, 43(2-3):425-34, 2002.
 Deutsch, D.; Silverstein, N.; Shilo, D.; Lecht, S.; Lazarovici, P. & Blumenfeld, A. Biphasic influence of hypoxia on tuftelin expression in mouse mesenchymal C3H10T1/2 stem cells. *Eur. J. Oral Sci.*, 119 Suppl. 1:55-61, 2011.
 Deutsch, D.; Palmon, A.; Dafni, L.; Catalano-Sherman, J.; Young, M. F. & Fisher, L. W. The enamelin (tuftelin) gene. *Int. J. Dev. Biol.*, 39(1):135-43, 1995.
 Deutsch, D.; Palmon, A.; Dafni, L.; Mao, Z.; Leytin, V.; Young, M. & Fisher, L. W. Tuftelin—aspects of protein and gene structure. *Eur. J. Oral Sci.*, 106 Suppl. 1:315-23, 1998.
 Diekwisch, T. G.; Ware, J.; Fincham, A. G. & Zeichner-David, M. Immunohistochemical similarities and differences between amelogenin and tuftelin in gene products during tooth development. *J. Histochem. Cytochem.*, 45(6):859-66, 1997.
 Fincham, A. G.; Moradian-Oldak, J. & Simmer, J. P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.*, 126(3):270-99, 1999.
 Gutiérrez-Cantú, F. J.; Feria-Velasco, A.; Palacios-Arenas, L. N.; Alvarado-Estrada, K. N.; Avelar-González, F. J.; Flores-Reyes, H.; Mariel-Cárdenas, J., & Guerrero-Barrera, A. L. Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 47(5-6):355-60, 2011.
 Gutiérrez-Cantú, F. J.; Cárdenas, J. M.; Rodríguez, R. O.; Romo Ramírez, G.

F.; Sánchez Méraz, W.; Murga, H. M. & Leal Tobias, L. A. Expression of Mmp-20 in dental germs of human fetus. *Int. J. Morphol.*, 32(4):1261-5, 2014.
 Jeremias, F.; Koruyucu, M.; Küchler, E. C.; Bayram, M.; Tuna, E. B.; Deeley, K.; Pierri, R. A.; Souza, J. F.; Fragelli, C. M.; Paschoal, M. A.; Gencay, K.; Seymen, F.; Caminaga, R. M.; dos Santos-Pinto, L. & Vieira, A. R. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Arch. Oral Biol.*, 58(10):1434-42, 2013.
 Hulley, E. B. & Cummings, S. R. *Designing Clinical Research: An Epidemiologic Approach*. Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1988.
 Lacruz, R. S.; Nanci, A.; Kurtz, I.; Wright, J. T. & Paine, M. L. Regulation of pH during amelogenesis. *Calcif. Tissue Int.*, 86(2):91-103, 2010.
 Leiser, Y.; Blumenfeld, A.; Haze, A.; Dafni, L.; Taylor, A. L.; Rosenfeld, E.; Fermon, E.; Gruenbaum-Cohen, Y.; Shay, B. & Deutsch, D. Localization, quantification, and characterization of tuftelin in soft tissues. *Anat. Rec. (Hoboken)*, 290(5):449-54, 2007.
 Luo, W.; Wen, X.; Wang, H. J.; MacDougall, M.; Snead, M. L. & Paine, M. L. In vivo overexpression of tuftelin in the enamel organic matrix. *Cells Tissues Organs*, 177(4):212-20, 2004.
 MacDougall, M.; Simmons, D.; Dodds, A.; Knight, C.; Luan, X.; Zeichner-David, M.; Zhang, C.; Ryu, O. H.; Qian, Q.; Simmer, J. P. & Hu, C. C. Cloning, characterization, and tissue expression pattern of mouse tuftelin cDNA. *J. Dent. Res.*, 77(12):1970-8, 1998.
 Mao, Z.; Shay, B.; Hekmati, M.; Fermon, E.; Taylor, A.; Dafni, L.; Heikinheimo, K.; Lustmann, J.; Fisher, L. W.; Young, M. F. & Deutsch, D. The human tuftelin gene: cloning and characterization. *Gene*, 279(2):181-96, 2001.
 Mihu, C. M.; Dudea, D.; Melincovici, C. & Boes, a. B. Tooth enamel, the result of the relationship between matrix proteins and hydroxyapatite crystals. *Appl. Med. Inform.*, 23(3-4):68-72, 2008.
 Paine, M. L.; Krebsbach, P. H.; Chen, L. S.; Paine, C. T.; Yamada, Y.; Deutsch, D. & Snead, M. L. Protein-to-protein interactions: criteria defining the assembly of the enamel organic matrix. *J. Dent. Res.*, 77(3):496-502, 1998.
 Satchell, P. G.; Anderton, X.; Ryu, O. H.; Luan, X.; Ortega, A. J.; Opamen, R.; Berman, B. J.; Witherspoon, D. E.; Gutmann, J. L.; Yamane, A.; Zeichner-David, M.; Simmer, J. P.; Shuler, C. F. & Diekwisch, T. G. Conservation and variation in enamel protein distribution during vertebrate tooth development. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet Physiol.*, 294(2):91-106, 2002.
 Shay, B.; Gruenbaum-Cohen, Y.; Tucker, A. S.; Taylor, A. L.; Rosenfeld, E.; Haze, A.; Dafni, L.; Leiser, Y.; Fermon, E.; Danieli, T.; Blumenfeld, A. & Deutsch D. High yield expression of biologically active recombinant full length human tuftelin protein in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.*, 68(1):90-8, 2009.
 Simmer, J. P. & Fincham, A. G. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 6(2):84-108, 1995.
 Simmer, J. P. & Hu, J. C. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect. Tissue Res.*, 43(2-3):441-9, 2002.
 Tariq, A.; Alam Ansari, M.; Owais Ismail, M. & Memon, Z. Association of the use of bacterial cell wall synthesis inhibitor drugs in early childhood with the Developmental Defects of Enamel. *Pak. J. Med. Sci.*, 30(2):393-7, 2014.
 Zeichner-David, M.; Vo, H.; Tan, H.; Diekwisch, T.; Berman, B.; Thiemann, F.; Alcocer, M. D.; Hsu, P.; Wang, T.; Eyna, J.; Caton, J.; Slavkin, H. C. & MacDougall, M. Timing of the expression of enamel gene products during mouse tooth development. *Int. J. Dev. Biol.*, 41(1):27-38, 1997.
 Zeichner-David, M. Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? *Matrix Biol.*, 20(5-6):307-16, 2001.

Dirección para correspondencia:
 Dr. Francisco Javier Gutiérrez Cantú
 Profesor Investigador
 Facultad de Estomatología U.A.S.L.P.
 Av. Manuel Nava 2, San Luis Potosí, S.L.P.
 Código Postal: 78290
 MÉXICO

Recibido : 31-08-2016
 Aceptado: 22-12-2016

Email: pacogtz@uaslp.mx



Capítulo 2.

Human Ameloblastin Labeling in Fetuses

Human Ameloblastin Labeling in Fetuses

Paloma María Campos-Navarro¹, Francisco Javier Avelar-González², Francisco Javier Gutiérrez-Cantú³, Jairo Mariel-Cárdenas⁴, Ricardo Martínez-Rider⁵, Alma Lilian Guerrero-Barrera¹

¹ Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.

² Laboratorio de Ciencias Ambientales, Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.

³ Laboratorio de Histología, Departamento de Morfología. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

⁴ Laboratorio de Disecciones, Departamento de Morfología. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

⁵ Departamento de Cirugía Maxilofacial. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

Alma Lilian Guerrero-Barrera (Corresponding autor)

Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.

Tel. 52-449-9107400 ext. 342.

E-mail: alguerre@correo.uaa.mx

The research is financed by: CONACYT scholarship no. 415360.

Abstract

Human teeth enamel, the hardest tissue in the body, is produced at embryo development during amelogenesis. Its lack of regeneration after the teeth eruption and its destruction susceptibility turn it as a good subject of study. Ameloblastin an abundant, phosphorylated, proline/glutamine-rich protein, secreted during enamel formation is a structural matrix component that participates on the maintaining of prismatic structure of the enamel crystals. It also, has been involved in the animal amelogenesis as adhesion protein, expressed at pre-secretory stage that diminishes in the secretory stage. However its function and distribution in human being remains unclear. In order to contribute to the understanding of ameloblastin distribution during amelogenesis, the present study explores its location in the different structures on human fetal tooth by immunohistochemical labeling using a polyclonal antibody against ameloblastin in 5µm human jaws fetuses' sections. Thus, at pre-secretory stage ameloblastin was detected at the apical membrane and also at basal end of the ameloblast, as well as in the stellate reticulum. At the secretory stage is located at the secretory ameloblast, enamel, and dentin and in the odontoblasts. This ameloblastin location can be related with the enamel crystals organization in both pre-secretory and secretory stages.

Keywords: ameloblastin; immunohistochemistry; ameloblast; dental enamel

1. INTRODUCTION

Tooth development or odontogenesis is the advanced process regulated by several sequential and reciprocal interactions between the epithelial and mesenchymal tissues and polarized growth. Through complex morphogenetic-events that culminates in the formation of three different mineralized tissues: enamel, dentin and cementum (Thesleff, 2003). The odontogenesis starts with intra and inter cellular interactions that induce differentiation of odontoblasts and ameloblasts, which will form dentin and enamel respectively (Gutiérrez-Cantú et al., 2011; Thesleff et al., 1995). The ameloblast differentiation begins once a small predentin layer is formed and then is followed by an enamel matrix deposition and mineralization (Simmer et al., 2010).

The outer structure of the tooth dedicated to mastication (Zanolli et al., 2017), the enamel, surrounds the dental crown (Sa et al., 2014; Yahyazadehfar et al., 2013), a highly well organized and mineralized tissue that is not regenerated once the tooth erupts in human being (Lawn et al., 2010; Zhao et al., 2013). Enamel structure is described as prismatic, scilicet with hydroxyapatite crystallites tightly packed into bundles in an organized pattern with complex orientations (Gasse & Sire, 2015), these physical properties make it the hardest tissue in the vertebrates (Dahal et al., 2014; Nakayama et al., 2015; Simmer et al., 2010).

The enamel is chemically constituted by 95% of inorganic matrix, 1-2% of organic matrix and 3-5% water (Gómez de Ferraris, 2009; Gutiérrez-Cantú et al., 2011). Enamel extracellular matrix is essential for the normal development of its architecture and composition (Wright et al., 2011), this matrix is rich in enamel proteins that really affect the growth of enamel crystals (Diekwisch et al., 2009; Lu et al., 2011; Zanolli et al., 2017), including amelogenins, ameloblastins, enamelines and tuftelins (Zeichner-David et al., 2006).

Ameloblastin is 60-70 kDa protein synthesized by the ameloblasts that are present in the enamel organic matrix (Dhamija et al., 1999; Lee et al., 1996; Nanci et al., 1998),

it is a proline rich protein that is secreted by secretory granules (Zalzal et al., 2008). It is the second most abundant enamel protein after amelogenin and represents almost the 5% of total protein amount in the organic matrix (Moradian-Oldak, 2012). Once the maturation stage is complete, enamel achieves its final hardened form where it ultimately contains less than 1% protein by weight (Lefevre & Manly, 1938).

Apparently, ameloblastin has both roles, as a structural component of the enamel matrix, as well as a growth factor or signaling molecule during tooth growth (Fong et al, 1996a; Nakamura et al., 2006; Tamburstuen et al., 2011). Previous studies in animals and human being have suggested the ameloblastin presence mainly in secreting ameloblasts and in the adjacent newly secreted enamel extracellular matrix (Fong et al., 1996b), but, it has also detected in pulpal mesenchymal cells during early odontogenesis, as well as in differentiating odontoblasts prior to mantle dentin mineralization (Fong et al., 1998).

In despite of all the studies made to understand the role of ameloblastin in odontogenesis, several questions remain unsolved. Thus, the main propose of the present work is to identify the ameloblastin location in human fetal tooth germs at different stages of development and tooth structures in order to relate and make a comparative analysis with the findings done by other researchers in both human being or in animal models.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Ethical considerations

The Education, Research and Ethics Committee of the Zacatecas General Hospital, the institution that made the donation, provided permits for the use of human fetuses in this investigation.

2.2. *Obtaining samples.*

Five fetuses between 14 and 22 weeks of intrauterine life were analyzed. Jaws were dissected and separated into upper, lower and segmented into left and right sections, obtaining 20 samples. A macroscopic evaluation was done to verify that there was no apparent malformation. The specimen dissection was performed to obtain five upper and five lower jaws, which were divided into right and left, in order to get 20 samples, which were fixed in neutral formalin at 10%.

2.3. *Sample preparation.*

2.3.1. Immunohistochemistry.

The specimens were processed for paraffin embedding technique. Samples were decalcified with 10% ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) for 15 days, periapical radiographs were taken to see the progress of decalcification (Gnatus, Zeyco Model Timex 70Kvps ets, wall scisors). Once they were decalcified, the samples were washed in PBS at 1% for 30 minutes. Then the samples were embedded in paraffin and 5 μ m serial sections were made.

After the sections were made, the antigens recovery was done according with Campos-Navarro et al., 2017; briefly, sections were treated with sodium citrate at 0.01M (pH 6.0) in cycles of 25, 10, 8, 5 and 5 seconds, respectively with 2 minutes intervals between each cycle. Each cycle was made in microwave, and at the end of the last cycle, they were maintained for 10 minutes in the sodium citrate buffer at room temperature. The endogenous peroxidase was blocked with 5% skim-milk (Difco). Primary antibody was polyclonal anti-ameloblastin (1:200) (Santa Cruz Biotechnology). The reaction was revealed with the Dako LSAB system HRP (Dako, Glostrup, Denmark). Then, sections were counterstained with hematoxylin (Allen, 1992), dehydrated, cleared and assembled with Entellan resin (Fermont, Mexico City, Mexico). The images were obtained with a Leica DM 1000 microscope and then processed with Leica Acquire system.

The sample size calculation was conducted according to the Cummins and Hulley formula (Hulley et al., 2001) obtaining 20 samples to analyze.

3. RESULTS

3.1. Ameloblastin location in the pre-secretory stage.

The figures 1a to 1d were obtained from the dental germ zone represented by the green circle in the molar tooth germ scheme in early bell stage of development (Figure 1g). While figures 1e to 1f were obtained from the dental germ zone represented by blue circle (Figure 1g). The scheme was taken and modified from Gómez de Ferraris, 2009.

Immunostaining of both pre-secretory stages, early and late, was found in the ameloblasts, identified the ameloblastin presence in the tooth germ structures, it also was recognized in the stellate reticulum, pre-secretory ameloblasts, stratum intermedium and dental papilla. The pre-secretory stage of the ameloblasts is observed in the early bell stage of development.

Figure 1a and 1b show the pre-secretory stage dyed with Hematoxylin-Eosin (H-E), which shows the ameloblasts (A), the stellate reticulum (SR), stratum intermedium (SI) and the dental papilla (P).

Ameloblastin was identified in the early pre-secretory stage showed a strong reaction in the ameloblasts and linear staining in the dentinoenamel junction. A high ameloblastin labeling was observed in the basal end of the ameloblasts, decreasing in the apical end, stratum intermedium and dental papilla; meanwhile a small amount is observed in the stellate reticulum (Figure 1c and 1d). In late pre-secretory stage, the ameloblastin recognition was increased in the ameloblast cytoplasm, stratum intermedium and the dental papilla, meanwhile in the stellate reticulum remains slight (Figure 1e and 1f).

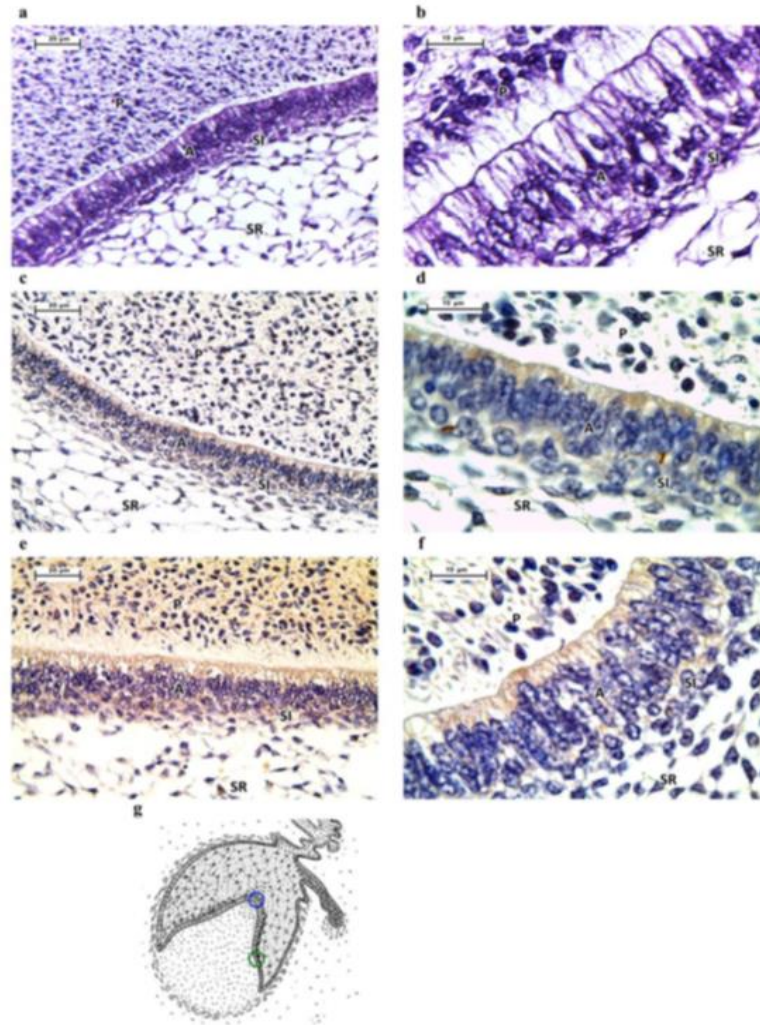


Figure 1. Specific recognition of ameloblastin in human dental tooth germ in fetuses between 14 and 22 weeks of gestation during the pre-secretory stage.

H-E staining controls (a and b). Immunostaining of ameloblastin (c, d, e and f). In the early pre-secretory stage the ameloblastin is in the basal and apical portion of the ameloblasts (A), stratum intermedium (SI), decreasing in the dental papilla (P) and with a little marking in the stellate reticulum (SR) in the early pre-secretory stage (c and d). In the late pre-secretory stage, the reaction increases throughout the cytoplasm

in the ameloblast, stratum intermedium and dental papilla (e and f). The figures on the left were taken with the 40x objective and the figures on right with the 100X. Diagram of the early bell stage (g).

The ameloblasts pre-secretory stage was observed in the early bell stage of a developing tooth.

3.2. Ameloblastin location in the secretory stage.

The secretory stage of the ameloblasts is observed in the late bell stage. Images 2a, 2b, 2c and 2d, taken from the blue circle on the image 2e, diagram from a tooth germ of a molar in the late bell stage of development. The scheme was taken and modified from Gómez de Ferraris, 2009.

The immunostaining in the secretory stage, showed the ameloblastin in the secretory ameloblasts (A), the stellate reticulum (SR), the dental papilla (P), odontoblasts (O) and mantle dentine (MD).

Figures 2a and 2c show the H-E secretory stage; the stellate reticulum, ameloblasts, enamel, mantle dentin, odontoblasts and dental papilla are observed. During the secretory stage, the immunostaining showed greater intensity in the newly secreted enamel and Tomes' processes; in the cytoplasm of the ameloblast, in the mantle dentin and odontoblasts decreases slightly, but remains strong and, in stellate reticulum and papilla is much lower (Figure 2b and 2d).

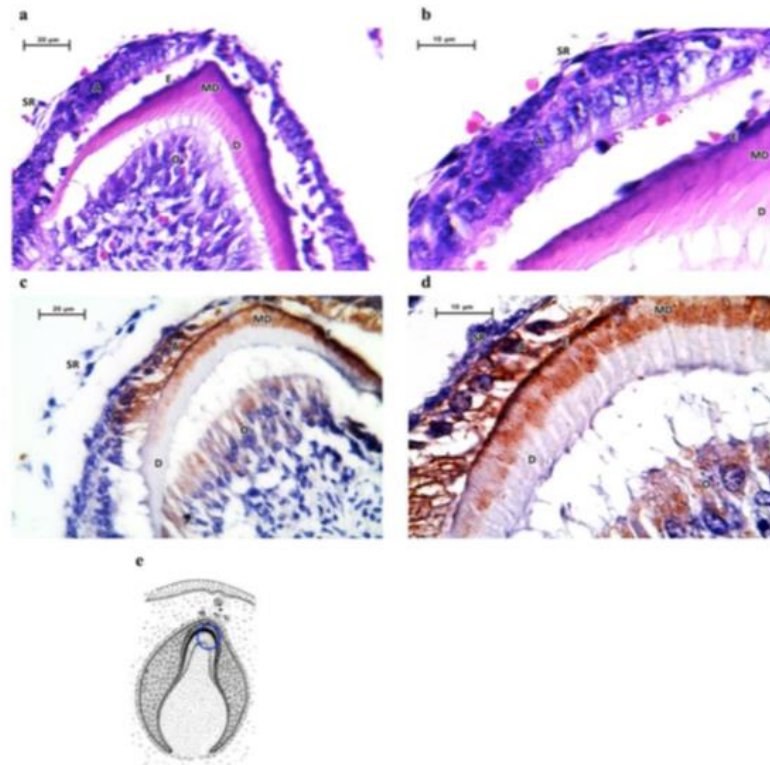


Figure 2. Specific recognition of ameloblastin in human dental tooth germ in fetuses between 14 and 22 weeks of gestation during the secretory stage.
The figures a and b show the stained controls with H-E. The immunostaining of ameloblastin is shown on the figures c and d. Figures a and c were taken at 40X and the figures b and d at 100X. There is more ameloblastin in the enamel (E), there is also a strong reaction in the cytoplasm of the ameloblasts (A), the mantle dentin (MD), and odontoblasts (O) and in the stellate reticulum (SR) and papilla (P) in minor proportion (b and d). Diagram of the late bell stage (e).

4. DISCUSSION

As describe before, embryological, teeth are ectodermal organs that form by sequential and reciprocal interactions between the odontogenic epithelium and neural

crest-derived mesenchyme (Jernvall & Thesleff, 2012).

Organogenesis involves three fundamental processes: *the initiation*, in which positional information is provided and interpreted to initiate organ formation at the right place; *morphogenesis*, cells build up an organ rudiment; and finally, *differentiation*, cells form organ-specific structures (Li et al., 2013; Peters & Balling, 1999).

As described previously, the enamel is a unique and highly mineralized structure that covers the teeth and is almost entirely free from organic components. The enamel biomineralization in animals uses a polyanionic protein matrix that controls the nucleation, growth and orientation of crystals. This formation is regulated by specialized epithelial cells derived from ectoderm known as ameloblasts (Shintani et al., 2006). The ameloblasts, during the amelogenesis keep on differentiation stages that are characterized by changes in cell morphology and function. Cell differentiation during enamel development results in pre-secretory, secretory, transitional, and maturation phase ameloblasts. Cell morphology and chemical composition of the extracellular matrix of the enamel are the basis for defining the different stages of amelogenesis (Smith, 1998). During the pre-secretory stage, pre-ameloblasts, polarize and develop a large capacity to increased protein synthesis. Also they play an important role in degradation and resorption of the basal lamina separating them from the predentin (Ronnholm, 1962).

Secretory stage ameloblasts are tall columnar epithelial cells that are characterized by histological structures called Tomes' processes (Fong et al., 1996a); and their main function is a massive production and secretion of enamel proteins (Moradian-Oldak, 2012).

Ameloblast that secrete various proteins of extracellular matrix involved in process of enamel formation (Shintani et al., 2006). Enamel proteins are classified as amelogenins, that are the most abundant (90%) and non-amelogenins, as ameloblastin

(Gutiérrez-Cantú et al., 2011; Krebsbach et al., 1996; Shintani et al., 2006). Both types of proteins play a major role in the mineralization of the enamel, regardless of the percentage in which they are presented. The ameloblastin is a protein that plays a critical role in controlling the growth of mineral crystals during the enamel formation and the adhesion between ameloblasts and enamel matrix. Given its importance, this protein has been extensively studied in animal specimens as mouse and rat (Fukumoto et al., 2004; Hirose et al., 2013; Lu et al., 2011; Nakayama et al., 2015; Nanci et al., 1998), also in pigs (Chun et al., 2010; Hu et al., 1997; Nakamura et al., 2006) and crocodile (Shintani et al., 2006), showing that its presence is widespread in animal evolutionary scale. It has been performed the identification of the ameloblastin at genetic level, its characterization *in vitro* (Dhamija et al., 1999) as well as its monitoring *in vivo* (Jacques et al., 2014) to try to identify which events are involved in the development.

To contribute to research in humans and determine the distribution and importance of the protein, in this study were analyzed samples of human fetal tooth germs between 14-22 weeks gestation, period in which we can follow the different stages of tooth formation.

Lee et al. (1996) initiated studies on humans comparing the ameloblastin between rat and human demonstrating its presence in the pre-secretory, secretory and maturation stage by immunohistochemistry, the results obtained are in agreement with this observation, because ameloblastin was found in pre-secretor as well as in secretory stage. In contrast, MacDougall et al. in 2000 proposed that ameloblastin appears until secretor stage. On the other side, Hatakeyama and collaborators in 2009, found a high ameloblastin expression during the pre-secretory stage following of a decreased in the secretory stage (Hatakeyama et al., 2009), while the results showed an increasing of ameloblastin expression during secretory stage. To clarify this, more studies are necessary.

The results obtained in this research show a high expression of ameloblastin on the

early pre-secretory stage that increases in the late stage, with expression peak in the secretion stage as seen by Fukumoto et al. in 2004, which propose the high protein levels presence in the secretory-stage. In the pre-secretory stage, the ameloblastin is distributed mainly in the basal portion of ameloblast and decreases both in the apical portion as in the dental papilla. Lee et al. in 1996, point out that at this stage the ameloblastin is confined to the distal portion of the cytoplasm in the ameloblasts. In the secretory stage, several studies showed that the distribution of ameloblastin is restricted to the interface between the Tomes' process and in the secreted extracellular matrix (Fong et al., 1996a; Fong et al., 1996b; Krebsbach et al., 1996; Lee et al., 1996). Additionally, the ameloblastin was distributed throughout the cytoplasm in the ameloblast, mantle dentin and odontoblasts also in the papilla and the stellate reticulum, but in smaller amounts. The observations made by MacDougall and his group found ameloblastin within rounded structures located at the distal end of the cell body, in contrast in the present work the protein was distributed in whole cytoplasm. As well as MacDougall group this research also found ameloblastin associated at the ameloblast apical pole and in the enamel that surrounds this area, at the vicinity of the dentinal-enamel junction. Faint immunostaining was also present in the predentin region and within the developing odontoblast cell layer facing mantle dentin.

The sequential expression of enamel proteins, including ameloblastin, is essential for normal enamel mineralization, because the non-amelogenins proteins are acidic and they are deposited along amelodontal union, they also perform a nucleating and regulatory function in the mineralization (Atsawasuwan et al., 2013; Grandin et al., 2012; Lee et al., 1996). In the pre-secretory stage the ameloblastin only is expressed in the ameloblasts. However, in the secretory stage the odontoblasts are also found. This differs from the findings of Lee et al. on this stage the ameloblastin, apparently, it is not confined to the ameloblasts, but it may be present in developing odontoblasts and it can play an important role in the formation of dentin, particularly in dentin formed at the dentinoenamel junction (Fong et al., 1996a; Fukumoto et al., 2004; Hao

et al., 2005).

The enamel and dentin are joined at the edge enamel dentin, a robust interface that contributes to the strength of the tooth that takes part of the dentinoenamel union, which main function is to transfer mechanical forces from the brittle and hard enamel to the soft and durable dentin (Deshpande et al., 2010). Deshpande et al. have postulated that during the early development of tooth germ there are interactions between the dentin and the enamel proteins that regulate growth and organization of calcium crystals in the dentinoenamel union. They show that the collagen fibrils guide the amelogenin assembly within filamentous structures oriented along the axes of collagen fibers (Deshpande et al., 2010). There has been demonstrated that the amelogenin-calcium phosphate complex leads the orientation of deposition of amorphous mineral particles along the fibers and suggest that these interactions between collagen and amelogenin play an important role in the formation of dentin at the dentino-enamel junction (Deshpande et al., 2010; Gutiérrez-Cantú et al., 2011). According with this, if the production of ameloblastin acts as a core for amelogenin, the results in this study suggest that the secretion precedes the deposition and the arrangement amelogenin to assist in enamel and dentin mineralization. These results contribute to know the tooth mineralization in early development, as several researches seek the cell niches within dental tissues in order to propose in future novel therapeutic solutions (Mitsiadis & Orsini, 2016). More studies are needed to confirm this assumption.

5. CONCLUSION

The results in this study show that the ameloblastin is present during the pre-secretory stage in the development of the enamel in human fetal tooth, not only in the ameloblasts, but also in the papilla and in less amounts in stellate reticulum, and increases in the secretory stage, being located even in the mantle dentin and

odontoblasts, therefore here is substantiated that the ameloblastin is not exclusive from the enamel, but is involved in the formation of other hard tissues of the tooth.

ACKNOWLEDGEMENTS

Paloma María Campos Navarro was supported with the CONACYT scholarship no. 415360. We thank to the Biologist Adriana Cecilia Moreno Flores of the laboratory of Cellular Biology of the University of Aguascalientes, ISC. Edgardo Martinez Martin Del Campo from the University of San Luis Potosi, and PhD Iranzihuatl Torres Gallegos for their technical support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Allen, T. C. (1992). Hematoxylin and Eosin. In *Laboratory Methods in Histotechnology (Armed Forces Institute of Pathology)* (pp. 53–58).
- Atsawasuwan, P., Lu, X., Ito, Y., Zhang, Y., Evans, C. A., & Luan, X. (2013). Ameloblastin Inhibits Cranial Suture Closure by Modulating Msx2 Expression and Proliferation. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052800>
- Campos-Navarro, P., Guerrero-Barrera, A., Avelar-González, F., Navarro-Rincón-Gallardo, M., Mariel-Murga, H., Mariel-Cárdenas, J., & Gutiérrez-Cantú, F. (2017). Expresión de Tufelina en Gérmenes Dentales Humanos. *International Journal of Morphology*, 35(1), 293–298. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000100046>
- Chun, Y.-H. P., Yamakoshi, Y., Yamakoshi, F., Fukae, M., Hu, J. C.-C., Bartlett, J. D., & Simmer, J. P. (2010). Cleavage site specificity of MMP-20 for secretory-stage ameloblastin. *Journal of Dental Research*, 89(8), 785–790.

<https://doi.org/10.1177/0022034510366903>

- Dahal, S., Boaz, K., Srikant, N., & Agrawal, N. (2014). Amelogyphics: A Novel Appraisal of the Enamel Structure in Identification of an individual. *Journal of Institute of Medicine*, 36(3), 64–67. Retrieved from jiom.com.np/index.php/jiomjournal/article/download/752/694
- Deshpande, A. S., Fang, P. A., Simmer, J. P., Margolis, H. C., & Beniash, E. (2010). Amelogenin-collagen interactions regulate calcium phosphate mineralization in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19277–19287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079939>
- Dhamija, S., Liu, Y., Yamada, Y., Snead, M. L., & Krebsbach, P. H. (1999). Cloning and characterization of the murine ameloblastin promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20738–20743. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20738>
- Diekwisch, T. G. H., Jin, T., Wang, X., Ito, Y., Schmidt, M., Druzinsky, R., ... Luan, X. (2009). Amelogenin evolution and tetrapod enamel structure. In *Frontiers of Oral Biology* (Vol. 13, pp. 74–79). <https://doi.org/10.1159/000242395>
- Fong, C. D., Cerný, R., Hammarström, L., & Slaby, I. (1998). Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *European Journal of Oral Sciences*, 106 Suppl, 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.02.009>
- Fong, C. D., Hammarström, L., Lundmark, C., Wurtz, T., & Slaby, I. (1996a). Expression patterns of RNAs for amelin and amelogenin in developing rat molars and incisors. *Advances in Dental Research*, 10(2), 195–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/08959374960100021301>
- Fong, C. D., Slaby, I., & Hammarström, L. (1996b). Amelin: an enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *J. Bone Miner. Res.*, 11(7), 892–898. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110704>
- Fukumoto, S., Kiba, T., Hall, B., Iehara, N., Nakamura, T., Longenecker, G., ... Yamada, Y. (2004). Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *Journal of Cell Biology*, 167(5), 973–983. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409077>
- Gasse, B., & Sire, J. Y. (2015). Comparative expression of the four enamel matrix protein genes, amelogenin, ameloblastin, enamelin and amelotin during amelogenesis in the lizard *Anolis carolinensis*. *EvoDevo*, 6(29), 2–9. <https://doi.org/10.1186/s13227-015-0024-4>
- Gómez de Ferraris, M. (2009). Histología, Embriología e Ingeniería Tisular

- Bucodental. In *Medica Panamericana* (pp. 291–332).
- Grandin, H. M., Gemperli, A. C., & Dard, M. (2012). Enamel matrix derivative: a review of cellular effects in vitro and a model of molecular arrangement and functioning. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 18(3), 181–202. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0365>
- Gutiérrez-Cantú, F. J., Feria-Velasco, A., Palacios-Arenas, L. N., Alvarado-Estrada, K. N., Avelar-González, F. J., Flores-Reyes, H., ... Guerrero-Barrera, A. L. (2011). Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 47(5–6), 355–360. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9407-6>
- Hao, J., He, G., Narayanan, K., Zou, B., Lin, L., Muni, T., ... George, A. (2005). Identification of differentially expressed cDNA transcripts from a rat odontoblast cell line. *Bone*, 37(4), 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.05.013>
- Hatakeyama, J., Fukumoto, S., Nakamura, T., Haruyama, N., Suzuki, S., Hatakeyama, Y., ... Kulkarni, A. B. (2009). Synergistic roles of amelogenin and ameloblastin. *Journal of Dental Research*, 88(4), 318–322. <https://doi.org/10.1177/0022034509334749>
- Hirose, N., Shimazu, A., Watanabe, M., Tanimoto, K., Koyota, S., Sugiyama, T., ... Tanne, K. (2013). Ameloblastin in Hertwig's Epithelial Root Sheath Regulates Tooth Root Formation and Development. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054449>
- Hu, C., Fukae, M., Uchida, T., Qian, Q., Zhang, C., Ryu, O., ... Shimizu. (1997). Sheathlin: cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *Journal of Dental Research*, 76(2), 648–657. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/00220345970760020501>
- Hulley, S. B., Cummings, S., Browner, W., & et al. (2001). *Designing Clinical Research: An Epidemiologic Approach BT - Designing Clinical Research. Designing Clinical Research.*
- Jacques, J., Hotton, D., De La Dure-Molla, M., Petit, S., Asselin, A., Kulkarni, A. B., ... Isaac, J. (2014). Tracking endogenous amelogenin and ameloblastin in vivo. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099626>
- Jernvall, J., & Thesleff, I. (2012). Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development*, 139(19), 3487–3497. <https://doi.org/10.1242/dev.085084>

- Krebsbach, P. H., Lee, S. K., Matsuki, Y., Kozak, C. A., Yamada, K. M., & Yamada, Y. (1996). Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin: A novel tooth-specific gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4431–4435. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.8.4431>
- Lawn, B. R., Lee, J. J.-W., & Chai, H. (2010). Teeth: Among Nature’s Most Durable Biocomposites. *Annual Review of Materials Research*, 40(1), 55–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070909-104537>
- Lee, S. K., Krebsbach, P. H., Matsuki, Y., Nanci, A., Yamada, K. M., & Yamada, Y. (1996). Ameloblastin expression in rat incisors and human tooth germs. *International Journal of Developmental Biology*, 40(6), 1141–1150. Retrieved from <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper/9032019/ameloblastin-expression-in-rat-incisors-and-human-tooth-germs>
- Lefevre, M., & Manly, R. (1938). Moisture, inorganic and organic contents of enamel and dentin from carious teeth. *The Journal of the American Dental Association and The Dental Cosmos*, 25, 233–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.14219/jada.archive.1938.0058>
- Li, Z., Yu, M., & Tian, W. (2013). An inductive signalling network regulates mammalian tooth morphogenesis with implications for tooth regeneration. *Cell Proliferation*, 46(5), 501–508. <https://doi.org/10.1111/cpr.12051>
- Lu, X., Ito, Y., Kulkarni, A., Gibson, C., Luan, X., & Diekwisch, T. G. H. (2011). Ameloblastin-rich enamel matrix favors short and randomly oriented apatite crystals. *European Journal of Oral Sciences*, 119(SUPPL.1), 254–260. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00905.x>
- MacDougall, M., Simmons, D., Gu, T. T., Forsman-Semb, K., Mårdh, C. K., Mesbah, M., ... Berdal, a. (2000). Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *European Journal of Oral Sciences*, 108(9), 303–310. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.108004303.x>
- Mitsiadis, T., & Orsini, G. (2016). A New Era in Dentistry: Stem Cell-Based Approaches for Tooth and Periodontal Tissue Regeneration. *Frontiers in Physiology*, 19(7), 357. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00357>
- Moradian-Oldak, J. (2012). Protein-mediated enamel mineralization. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17, 1996–2023. <https://doi.org/10.2741/4034>
- Nakamura, Y., Slaby, I., Spahr, A., Pezeshki, G., Matsumoto, K., & Lyngstadaas, S. P. (2006). Ameloblastin fusion protein enhances pulpal healing and dentin formation in porcine teeth. *Calcified Tissue International*, 78(5), 278–284. <https://doi.org/10.1007/s00223-005-0144-2>

- Nakayama, Y., Holcroft, J., & Ganss, B. (2015). Enamel hypomineralization and structural defects in amelotin-deficient mice. *Journal of Dental Research*, *94*(5), 697–705. <https://doi.org/10.1177/0022034514566214>
- Nanci, A., Zalzal, S Lavoie, P., Kunikata, M., Chen, W., Krebsbach, P., ..., & Snead, M. (1998). Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *46*(8), 911–934. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/002215549804600806>
- Peters, H., & Balling, R. (1999). Teeth - Where and how to make them. *Trends in Genetics*. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(98\)01662-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(98)01662-X)
- Ronnholm, E. (1962). An electron microscopic study of the amelogenesis in human teeth. I. The fine structure of the ameloblasts. *Journal of Ultrastructure Research*, *6*, 229–248. [https://doi.org/DOI:10.1016/S0022-5320\(62\)90055-2](https://doi.org/DOI:10.1016/S0022-5320(62)90055-2)
- Sa, Y., Liang, S., Ma, X., Lu, S., Wang, Z., Jiang, T., & Wang, Y. (2014). Compositional, structural and mechanical comparisons of normal enamel and hypomaturational enamel. *Acta Biomaterialia*, *10*(12), 5169–5177. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.023>
- Shintani, S., Kobata, M., Toyosawa, S., & Ooshima, T. (2006). Expression of ameloblastin during enamel formation in a crocodile. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *306*(2), 126–133. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21077>
- Simmer, J. P., Papagerakis, P., Smith, C. E., Fisher, D. C., Rountrey, A. N., Zheng, L., & Hu, J. C. (2010). Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res*, *89*(10), 1024–1038. <https://doi.org/10.1177/0022034510375829>
- Smith, C. E. C. E. (1998). Cellular and chemical events during enamel maturation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *9*(2), 128–161. <https://doi.org/10.1177/10454411980090020101>
- Tamburstuen, M. V., Reseland, J. E., Spahr, A., Brookes, S. J., Kvalheim, G., Slaby, I., ... Lyngstadaas, S. P. (2011). Ameloblastin expression and putative autoregulation in mesenchymal cells suggest a role in early bone formation and repair. *Bone*, *48*(2), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.09.007>
- Thesleff, I. (2003). Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *Journal of Cell Science*, *116*(9), 1647–1648. <https://doi.org/10.1242/jcs.00410>
- Thesleff, I., Vaahtokari, A., Kettunen, P., & Aberg, T. (1995). Epithelial-

- Mesenchymal Signaling during Tooth Development (A COM). *Connective Tissue Research*, 32(1-4), 9-15. <https://doi.org/10.3109/03008209509013700>
- Wright, J. T., Li, Y., Suggs, C., Kuehl, M. A., Kulkarni, A. B., & Gibson, C. W. (2011). The role of amelogenin during enamel-crystallite growth and organization in vivo. *European Journal of Oral Sciences*, 119(SUPPL.1), 65-69. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00883.x>
- Yahyazadehfar, M., Bajaj, D., & Arola, D. D. (2013). Hidden contributions of the enamel rods on the fracture resistance of human teeth. *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4806-4814. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.020>
- Zalzal, S. F., Smith, C. E., & Nanci, A. (2008). Ameloblastin and amelogenin share a common secretory pathway and are co-secreted during enamel formation. *Matrix Biology*, 27(4), 352-359. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.01.003>
- Zanolli, C., Hourset, M., Esclassan, R., & Mollereau, C. (2017). Neanderthal and Denisova tooth protein variants in present-day humans. *PLoS ONE*, 12(9), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183802>
- Zeichner-David, M., Chen, L. S., Hsu, Z., Reyna, J., Caton, J., & Bringas, P. (2006). Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. In *European Journal of Oral Sciences* (Vol. 114, pp. 244-253). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00322.x>
- Zhao, X., O'Brien, S., Shaw, J., Abbott, P., Munroe, P., Habibi, D., & Xie, Z. (2013). The origin of remarkable resilience of human tooth enamel. *Applied Physics Letters*, 103(24). <https://doi.org/10.1063/1.4842015>



Capítulo 3.
Ameloblastin-Tuftelin Spatial Interaction in Human Dental Germs
Development

Journal of Histochemistry & Cytochemistry

Ameloblastin-Tuftelin Spatial Interaction in Human Dental Germs Development

Journal:	<i>Journal of Histochemistry & Cytochemistry</i>
Manuscript ID	JHC-18-0171
Manuscript Type:	Articles
Date Submitted by the Author:	15-Nov-2018
Complete List of Authors:	Campos Navarro, Paloma; Universidad Autonoma de Aguascalientes, Morfologia Avelar Gonzalez, Francisco; Universidad Autonoma de Aguascalientes, Fisiologia y Farmacologia Gutierrez Cantu, Francisco; Universidad Autonoma de San Luis Potosi, Histologia Mariel Cardenas, Jairo; Universidad Autonoma de San Luis Potosi, Laboratorio de Disecciones Moreno Flores, Adriana; Universidad Autonoma de Aguascalientes, Morfologia Ruiz Rodriguez, Maria; Universidad Autonoma de San Luis Potosi, Pediatria Guerrero-Barrera, Alma Lilian; Universidad Autonoma de Aguascalientes, Morfologia
Editorial Board Member:	Antonio Nanci
Keywords:	human teeth germs, co-localization, confocal microscopy
Abstract:	Enamel teeth formation in human being is matter of study. Among other important proteins during enamel formation are present ameloblastin, involved in the adhesion, proliferation and ameloblast differentiation. Also is present tuftelin, which participates in the induction and initiation of mineralization as well as a bonding material between enamel and dentin. Recently, our group has reported tuftelin presence in dental germs at the pre-secretory and secretory stage, related to the ameloblast cytoplasm, stellate reticulum, dental papilla intermediate stratum, odontoblasts and newly formed enamel. In this work, the main objective is to show the interaction between both, tuftelin and ameloblastin in human tooth germs in order to study the enamel formation process using confocal microscopy. In the pre-secretory stage the proteins only co-localize around the ameloblast nucleus, whereas the secretory stage co-localizes in the newly formed enamel, suggesting an important interaction during the tooth mineralization.

Ameloblastin-Tuftelin Spatial Interaction in Human Dental Germs Development

Paloma M Campos-Navarro, Francisco J Avelar-González, Francisco J Gutiérrez-Cantú, Jairo Mariel-Cárdenas, Adriana C Moreno-Flores, María S Ruíz Rodríguez, Alma L Guerrero-Barrera. Cellular and Tissue Biology Laboratory, UAA (PMCN, ACMF, ALGB), Environmental Sciences Laboratory, UAA (FJAG), Histology Laboratory, UASLP (FJGC), Dissection Laboratory, UASLP (JMC) and Pediatric Dentistry Department, UASLP (MSRR).
Corresponding author: Alma Lilian Guerrero-Barrera, Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Edificio 203. Avenida Universidad 940, Universidad Autónoma de Aguascalientes, CP 20131 Aguascalientes, Ags. México.
E-mail: alguerre@correo.uaa.mx

Running Headline: Human Ameloblastin-Tuftelin Interaction.

Summary

Enamel teeth formation in human being is matter of study. Among other important proteins during enamel formation are present ameloblastin, involved in the adhesion, proliferation and ameloblast differentiation. Also is present tuftelin, which participates in the induction and initiation of mineralization as well as a bonding material between enamel and dentin. Recently, our group has reported tuftelin presence in dental germs at the pre-secretory and secretory stage, related to the ameloblast cytoplasm, stellate reticulum, dental papilla intermediate stratum, odontoblasts and newly formed enamel. In this work, the main objective was to show the interaction between both, tuftelin and ameloblastin in human tooth germs in order to study the enamel formation process using confocal microscopy. In the pre-secretory stage, the proteins only co-localize around the ameloblast nucleus, whereas the secretory stage co-localizes in the newly formed enamel, suggesting an important interaction during the tooth mineralization.

Keywords: human teeth germs, co-localization, confocal microscopy.

Introduction

Four types of tissues form teeth. Three of them are hard, mineralized and they form the cover of the fourth tissue known as pulp that is soft.¹ The mineralized tissues are in decreasing hardness order: enamel, dentin and cementum,^{2,3} all of them are harder than bone tissue^{1,4}

Generally, teeth hard tissues formation follows a common pattern that includes the mesenchymal cell recruitment, proliferation, differentiation, and finally extracellular matrix secretion and biomineralization.^{5,6}

The enamel, highly organized, mineralized and without regeneration capability is the less reactive of the three hard tissues mentioned above.^{7,8} This highly organized and mineralized structure confers it physically exceptional properties, and is considered as the harder tissue in vertebrates.⁹⁻¹² Actually, is the unique hard tissue formed by ectodermic cells known as ameloblasts. These cells are the responsables of the adamantin matrix deposit in pre-dentin. This deposit starts during the late bell stage.¹³

The specific process that produce the enamel is the amelogenesis, in which is used a protein group composed by amelogenins and non-amelogenins. Amelogenin proteins represent the 90% of the extracellular matrix proteins. The non-amelogenins include ameloblastin, enamelin and tuftelin.^{5,14-16}

The ameloblastin, amelin or sheathlin, is member of a family of secretor calcium phosphoproteins typical of extracellular matrix that is seems involved in the adhesion regulation, proliferation and ameloblast differentiation^{14,17-20} and also it could be had an essential role for the enamel development.

The ameloblastins are synthetized as 65-70 kDa proteins which are rapidly transformed in several molecular low weight proteins, that promote the mineral formation,²¹ the elongation and growth modulation of crystals.^{18,22,23}

Information regarding expression of ameloblastin in human tooth germ is limited as the information on its expression is scarce and there are inconsistencies in reporting that hinder the meaningful interpretation of the results.²⁴

The acidic protein tuftelin (MW 44 KDa, i.p. 5,7) has been cloned and sequenced from an enriched cDNA expression library of bovine ameloblasts.²⁵ Tuftelin has been found in the development enamel as well as in the mature extracellular enamel.²⁶

It is suggested that tuftelin is involved by nucleation at the initial stages of enamel mineralization. However, it also is expressed during the first odontogenesis stages, when neither the enamel nor the dentine has been formed, suggesting that tuftelin could have a multi-functional role. This protein is also involved with the communication mesenchyme/ectoderm that is crucial in odontogenesis.²⁷

However, the role of tuftelin and ameloblastin is not yet completely understood in the early development of the dental germ. Thus, the objective of the present work was to contribute to this, seeking the location of both: ameloblastin and tuftelin, as well as their co-localization in human dental germs during pre-secretory and secretory stage.

Materials and Methods

Ethical considerations

The human ethics committee from the institution that donated the fetuses, General Hospital of Zacatecas, approved the protocol of the present work. The human fetuses were obtained from amphitheater. They had had been in formol during at least 14 years.

Obtaining samples.

Five fetuses between 14-22 gestation weeks were analyzed macroscopically, to check that there was no any malformation. After that, the dissection of the fetuses was done, to obtain five

maxilla and five jaws. Every of them were divided in right and left. Thus 20 samples were obtained and then they were fixed in 10% neutral formalin.^{28,29,30}

Specimens preparation.

The detailed protocol for tissue preparation and unmasking the antigenic epitopes is described in our previous reports.^{28,29} Briefly, the specimens were processed for paraffin embedding technique. Samples were decalcified with 10% ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) for 15 days, periapical radiographs were taken to see the progress of decalcification (Gnatus, Zeyco Model Timex 70Kvps cts, wall scissors). Once they were decalcified, the samples were washed in PBS at 1% for 30 minutes. Then the samples were embedded in paraffin and 5 µm serial sections were made.

In order to diminish the basal fluorescence, after rehydration, every section was washed once with 1X PBS. Then each section was given 10 quick washes with distilled water, 2 seconds every washing.

After this, the antigens recovery was done according with Campos-Navarro et al., 2017.²⁹ Sections were treated with sodium citrate at 0.01M (pH 6.0) in cycles of 25, 10, 8, 5 and 5 seconds, respectively with 2 minutes intervals between each cycle. Each cycle was made in microwave, and at the end of the last cycle, they were maintained for 10 minutes in the sodium citrate buffer at room temperature. The endogenous peroxidase was blocked with 6% bovine serum albumin-10% bovine fetal serum.

Double labeling immunofluorescence and confocal imaging construction.

Endogenous peroxidases were blocked as was previously described.^{28,29} After that, polyclonal anti-ameloblastin (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:200) was applied and incubated 2 h at 37°C, then the samples were washed with PBS 1X three times during 5 minutes. After this, Alexa

Fluor 594 goat-anti rabbit (dilution 1:500) was applied and incubated 1h at room temperature. Then polyclonal antibody against tuftelin (Molecular Probes, dilution 1:25) was applied during 2 h at 37°C, washed three times with PBS1X during 5 minutes and after this, Qdot 565 goat anti-rabbit (Molecular Probes, dilution 1:50) was applied and incubated during 1 h at room temperature. After this, double labeling samples were washing three times with PBS 1X during 5 minutes. Then, sections were counterstained with hematoxylin to avoid basal fluorescence,³¹ and then was washed with running water.

Then the samples were dehydrated in ascending ethanol concentrations from 30 to 100% during 5 second with every concentration. Then were clarified with toluene (JT Baker) twice during 5 and 10 seconds, respectively and then were mounted with Entellan (Merck). Images were obtained using a confocal microscopy CLSM model 700, ZEISS and software Zen Black.

The sample size calculated according to formula Cummins and Hulley was of 20 samples to analyze.³²

Results

Co-localization of ameloblastin and tuftelin in the pre-secretory stage.

The results of the immunofluorescence labeling of pre-secretory stage in Fig. 1a shows the ameloblastin with intense fluorescence inside pre-secretory ameloblasts (A), and is linear in the dentino-enamel junction. There is mainly ameloblastin labeling in the basal and apical regions of the cytoplasm of ameloblasts as well as in the cells of the intermediate stratum (IS). Fluorescence is diminished in the dental papilla (P) area, related with cytoplasmic processes. The stellate reticulum (SR) shows fluorescent labeling in cytoplasmic processes. Figure 1b displays tuftelin immunofluorescence labeling in the pre-secretory stage, it is homogeneous inside the ameloblasts cytoplasm, dental papilla cells related to nuclei as well as in the nuclei of the intermediate stratum

cells and in to dentinoenamel junction. This fluorescence diminishes in the stellate reticulum cells.

The yellow areas in the confocal images of the pre-secretory section indicate that the ameloblastin and tuftelin are present in the same spatial region; colocalization is showed only perinuclear in the ameloblast (Fig. 1c).

Ameloblastin and tuftelin co-localization in secretory stage

In the secretory stage, the immunofluorescence labeling against ameloblastin shows intense fluorescence in the recently secreted enamel (E), and a lightly reaction in the mantle dentin area (MD) (Fig. 2a). While the tuftelin labeling is concentrated mainly in the enamel recently secreted (Fig. 2b). It is very low fluorescence at the intermediate strata, the stellate reticulum adjacent and vestiges in the mantle dentin. Tuftelin and ameloblastin only shows colocalization in the new enamel as yellow labeling (Fig. 2c).

Discussion

As was mentioned, odontogenesis is not completely understood in human³⁰ so to try to know the interaction of the ameloblastin and tuftelin proteins, in this research, a comparison by confocal microscopy was made about the distribution of these proteins, as well as their possible co-localization in human dental germs in fetus between 14-22 weeks of intrauterine life. As was described above, the enamel is formed during a highly complex process known as amelogenesis⁴ in which enamel proteins direct and control the mineral deposition.⁵ These proteins are amelogenin, ameloblastin, enamelin, tuftelin and enamelin.⁶

According with obtained results ameloblastin and tuftelin are present with different distribution in the most part of the dental germ structures, only some regions shows colocalization, this seems correlated with the roles proposed to each one.

Originally, ameloblastin was described as a tooth-specific enamel matrix protein expressed only by ameloblast cells,³³ Fong and collaborators (1998) and our group (2018) found that ameloblastin was also expressed during the development of mesenchymal hard tissues of the tooth,^{28,34} in trauma-induced reparative dentin formation³⁵ as well as during the embryonic and post-natal stages of bone formation.⁶

Ameloblastin is the second protein most abundant in the enamel organic matrix³⁶⁻³⁸ and is involved in the ectodermic interaction that occurs before to enamel secretion and dentin.¹⁸ It has cell adhesion properties and it is proposed that controls ameloblast differentiation.¹³ Ameloblastin affinity for calcium ions is also involved in the mineralization and elongation of hidroxyapatite crystals,^{13,21} also it may be involved in very early processes of cell commitment and differentiation.³⁹ Its expression starts in the pre-secretory stage of ameloblast but it's mainly observed in the secretory stage,^{14,28,40} it has intense staining in Tomes' processes,^{14,20,28,34,40} and within the matrix at the dentino-enamel junction,^{20,23,28,41} this last research is in agreement with our results; otherwise Fong et al. in 1998 mention that ameloblastin has limited expression in early preodontoblasts³⁴ and MacDougall et al. in 2000 found intense staining in the distal cytoplasm of ameloblasts,²⁰ but in this research is noted a great expression in preodontoblast and in the basal and apical regions of the ameloblasts cytoplasm, a result also found by Yan et al. in 2006.⁴²

The timing of tuftelin protein expression begins just before the mineralization of enamel commences,⁴¹ when pre-secretory ameloblasts, pre-odontoblasts and the mesenchymal cells of the papilla are still present,²⁷ confirming that its highest expression is observed in the pre-secretory stage^{29,43} at the dentino-enamel junction level,⁴⁴ which is consistent with the results shown in this research.

The results obtained in this study also show that the expression of tuftelin in the secretory stage decreases with respect to the pre-secretory stage, observed mainly in the dentino-enamel junction, continuing parallel to the newly secreted non-mineralized enamel. This was also observed by MacDougall group (2000); Luo and collaborators (2004) and Diekwisch, et al. 1997.^{20,29,43,44} Tuftelin function continues unclear but it has suggested that it might be involved in the initial stages of enamel mineralization and structural organization being able to have an important role in the nucleation of adamantine crystals.^{26,41,45}

In biological meaning, co-localization occurs when two or more molecules are occupying the same position in space, suggesting molecular interactions.^{30,46} Ameloblastin and tuftelin have a co-localization around the nucleus of the pre-secretory ameloblast and in the newly secreted enamel. According to the function of both proteins, this co-localization could indicate that these proteins interact so that a correct mineralization of the enamel is carried out, keeping the hydroxyapatite crystals with the appropriate structural organization, obtaining with it the hardness that characterizes to enamel.

During the secretory stage Gutiérrez-Cantú et al. in 2011 found that the co-localization of amelogenin and enamelysin were on the surface of the extracellular matrix of a newly formed dentin and enamel.³⁰ The co-localization of the ameloblastin and tuftelin, proteins of interest in this study, initiate secretion during the pre-secretory stage around the ameloblast nucleus, later during the secretory stage both co-localize in the newly formed enamel. These results suggest that at the moment of initiating enamel calcification the four proteins are present, and probably interact with each other. Probably this interaction allows the enamel to have the hardness that characterizes it.

Acknowledgements

We thank to ISC. Edgardo Martinez Martin Del Campo from the University of San Luis Potosi, for his technical support.

Competing Interests

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding Statement

Paloma María Campos Navarro was supported with the CONACYT scholarship no. 415360. This work was supported by project PIB 16-5 UAA, it was also supported by Special Resource UAA for Research 2017 and 2018.

Author Contributions

PMCN performed the immunofluorescence experiments, the analyses of the results and drafted the manuscript, FJGC and JMC contributes to the design of the study, MSRR and FJAG revised the manuscript, ACMF made the confocal analysis of the results, and ALGB proposed the design, directed and coordinated the research project and revised the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Literature cited

1. Esponda Vila R. Anatomía Dental. (C. de D. C. Universidad Nacional Autónoma de México, Ed.) 2011 (8a ed.).
2. Astekar M, Kaur P, Dhakar N, Singh J. Comparison of hard tissue interrelationships at the cervical region of teeth based on tooth type and gender difference. *J Forensic Dent Sci.* 2014;6(2), 86.
3. Teodorovici P, Iovan G, Stoleriu S, Andrian S. On the ratio among tough dental tissues at cervical level on various groups of teeth. *J Rom Med Dent.* 2010;14(3), 198–202.
4. Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dentistry*, 2013;2013:684607.
5. Tamburstuen MV, Reseland JE, Spahr A, Brookes SJ, Kvalheim G, Slaby I, Snead ML, Lyngstadaas SP. Ameloblastin expression and putative autoregulation in mesenchymal cells suggest a role in early bone formation and repair. *Bone.* 2011;48(2), 406–413.
6. Spahr A, Lyngstadaas SP, Slaby I, Pezeshki G. Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(6), 504–511.
7. Zhao X, O'Brien S, Shaw J, Abbott P, Munroe P, Habibi D, Xie Z. The origin of remarkable resilience of human tooth enamel. *Appl Phys Lett.* 2013;103(24).
8. Lawn BR, Lee JJW, Chai H. Teeth: Among Nature's Most Durable Biocomposites. *Annu Rev Mater Res.* 2010;40(1):55–75.
9. Nakayama Y, Holcroft J, Ganss B. Enamel hypomineralization and structural defects in amelotin-deficient mice. *J Dent Res.* 2015;94(5):697–705.
10. Dahal S, Boaz K, Srikant N, Agrawal N. Amelogyphics: a novel appraisal of the enamel structure in Identification of an individual. *JIOM.* 2014; 36(3):64–67.

11. Sadashivamurthy P, Deshmukh S. Missing links of Molar Incisor Hypomineralization : A review. *J Int Oral Health*. 2012;4(1):1–12.
12. Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, Hu JC. Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res*. 2010;89(10):1024–1038.
13. Moradian-Oldak, J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci*. 2012;17:1996–2023.
14. Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach PH, Nanci A, Kulkarni AB, Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol*. 2004;167(5):973–983.
15. Moradian-Oldak J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol*. 2001;20(5–6):293–305.
16. Fincham A, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix. *J Struct Biol*. 1999;126(3):270–299.
17. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev*. 2017;97(3):939-993.
18. Nakamura Y, Slaby I, Spahr A, Pezeshki G, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. Ameloblastin fusion protein enhances pulpal healing and dentin formation in porcine teeth. *Calcif Tissue Int*. 2006;78(5):278–284.
19. Kawasaki K, Weiss KM. Mineralized tissue and vertebrate evolution: The secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(7):4060–4065.
20. MacDougall M, Simmons D, Gu TT, Forsman-Semb K, Mårdh CK, Mesbah M, Forest N, Krebsbach PH, Yamada Y, Berdal A. Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(9):303–310.

21. Usuga-Vacca MV. [Remineralizing effect of a substance modified in filling tooth enamel defects]. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Odontología. Bogotá D.C, Colombia. 2012.
22. Ding C, Chen Z, Li J. From molecules to macrostructures: recent development of bioinspired hard tissue repair. *Biomater sci.* 2017;5(8):1435-1449.
23. Uchida T, Murakami C, Wakida K, Dohi N, Iwai Y, Simmer JP, Fukae M, Satoda T, Takahashi O. Sheath proteins: synthesis, secretion, degradation and fate in forming enamel. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(S1):308-314.
24. Panneer Selvam S, Ponniah I. Expression of ameloblastin in the human tooth germ and ameloblastoma. *Oral dis.* 2018;24(8):1-7.
25. Shay B, Gruenbaum-Cohen Y, Tucker AS, Taylor AL, Rosenfeld E, Haze A, Dafni L, Leiser Y, Fermon E, Danieli T, Blumenfeld A, Deutsch D. High yield expression of biologically active recombinant full length human tuftelin protein in baculovirus-infected insect cells. *Prot Expr Purif.* 2009;68(1):90-98.
26. Deutsch D, Leiser Y, Shay B, Fermon E, Taylor A, Rosenfeld E, Dafni L, Charuvi K, Cohen Y, Haze A, Fuks A, Mao Z. The Human Tuftelin Gene and the Expression of Tuftelin in Mineralizing and Nonmineralizing Tissues. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):425-434.
27. Deutsch D, Palmon A, Dafni L, Mao Z, Leytin V, Young M, Fisher LW. Tuftelin - aspects of protein and gene structure. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(S1):315-323.
28. Campos-Navarro PM, Avelar-González FJ, Gutiérrez-Cantú FJ, Mariel-Cárdenas J, Martínez-Rider R, Guerrero-Barrera AL. Human Ameloblastin Labeling in Fetuses. *Wulfenia.* 2018;25(2):170-188.

29. Campos-Navarro PM, Guerrero-Barrera AL, Avelar-González FJ, Navarro-Rincón-Gallardo ME, Mariel-Murga H, Mariel-Cárdenas J, Gutiérrez-Cantú F. Expresión de Tuftelina en Gérmenes Dentales Humanos. *Int J Morphol.* 2017;35(1):293–298.
30. Gutiérrez-Cantú FJ, Feria-Velasco A, Palacios-Arenas LN, Alvarado-Estrada KN, Avelar-González FJ, Flores-Reyes H, Mariel-Cárdenas J, Guerrero-Barrera, AL. Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2011;47(5-6):355-360.
31. Allen, TC. Hematoxylin and Eosin. In *Laboratory Methods in Histotechnology (Armed Forces Institute of Pathology)* 1992;53–58.
32. Hulley SB, Cummings S, Browner W, Grady D, Newman T. *Designing Clinical Research: An Epidemiologic Approach* BT - *Designing Clinical Research.* 2001.
33. Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, Yamada Y. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 1996;271(8):4431-4435.
34. Fong CD, Cerný R, Hammarström L, Slaby I. Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *Eur J Oral Sci* 1998;106 Suppl:324–330.
35. Spahr A, Lyngstadaas SP, Slaby I, Haller B, Boeckh C, Tsoulfidou F, Hammarstrom L. Expression of amelin and trauma-induced dentin formation. *Clin Oral Investig* 2002;6(1):51–57.
36. Yan WJ, Ma P, Tian Y, Wang JY, Qin CL, Feng JQ, Wang XF. The importance of a potential phosphorylation site in enamelin on enamel formation. *Int J Oral Sci* 2017;9(11), e4.

37. Kuroda S, Wazen R, Moffatt P, Nanci A. Full-Length ameloblastin is not implicated in bone remodeling and repair. *Eur Cell Mater.* 2011;22:56-66.
38. Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Wood SR, Slaby I, Robinson C. Amelin extracellular processing and aggregation during rat incisor amelogenesis. *Arch Oral Biol.* 2001;46(3):201-208.
39. Jacques J, Hotton D, Asselin A, De La Dure-Molla M, Coudert AE, Isaac J, Berdal A. Ameloblastin as a putative marker of specific bone compartments. *Connect Tissue Res.* 2014;55:117-120.
40. Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, Krebsbach P, Yamada Y, Hammarström L, Simmer JP, Fincham AG, Snead ML, Smith CE. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem.* 1998;46(8):911-934.
41. Leiser Y, Blumenfeld A, Haze A, Dafni L, Taylor AL, Rosenfeld E, Fermon E, Gruenbaum-Cohen Y, Shay B, Deutsch D. Localization, quantification, and characterization of tuftelin in soft tissues. *Anat Rec.* 2007;290(5):449-454.
42. Yan Q, Zhang Y, Li W, DenBesten PK. Differentiation of human ameloblast-lineage cells in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):154-158.
43. Luo W, Wen X, Wang HJ, MacDougall M, Snead ML, Paine ML. In vivo overexpression of tuftelin in the enamel organic matrix. *Cells Tissues Organs.* 2004;177(4):212-220.
44. Diekwisch TGH, Ware J, Fincham AG, Zeichner-David M. Immunohistochemical similarities and differences between amelogenin and tuftelin gene products during tooth development. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(6):859-866.
45. Jágr M, Eckhardt A, Pataridis S, Broukal Z, Dušková J, Mikšik I. Proteomics of human teeth and saliva. *Physiol Res.* 2014;63:S141.

46. Nohe A, Petersen NO. Analyzing for co-localization of proteins at a cell membrane. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004;5(2):213–220.

Figure Legends

Figure 1. Ameloblastin and tuftelin expression in human tooth germs, during pre-secretory stage 40x. Ameloblastin expression was showed with specific recognition with a polyclonal anti-ameloblastin followed of Alexa Fluor 594 goat-anti rabbit (a), tuftelin expression was showed with specific recognition with a polyclonal antibody anti-tuftelin followed of Qdot 565 goat anti-rabbit (b), merge for ameloblastin-tuftelin during ameloblast presecretor stage (c): yellow areas indicate co-localization is showed only perinuclear in the ameloblast. Bar= 20µm.

Figure 2. Ameloblastin and tuftelin expression in human tooth germs, during secretory stage 40x. Ameloblastin expression was showed with specific recognition with a polyclonal anti-ameloblastin followed of Alexa Fluor 594 goat-anti rabbit (a), tuftelin expression was showed with specific recognition with a polyclonal antibody anti-tuftelin followed of Qdot 565 goat anti-rabbit (b), merge for ameloblastin-tuftelin during ameloblast secretor stage (c): the co-localization only is observed in the new enamel as yellow labeling. Bar= 20µm.

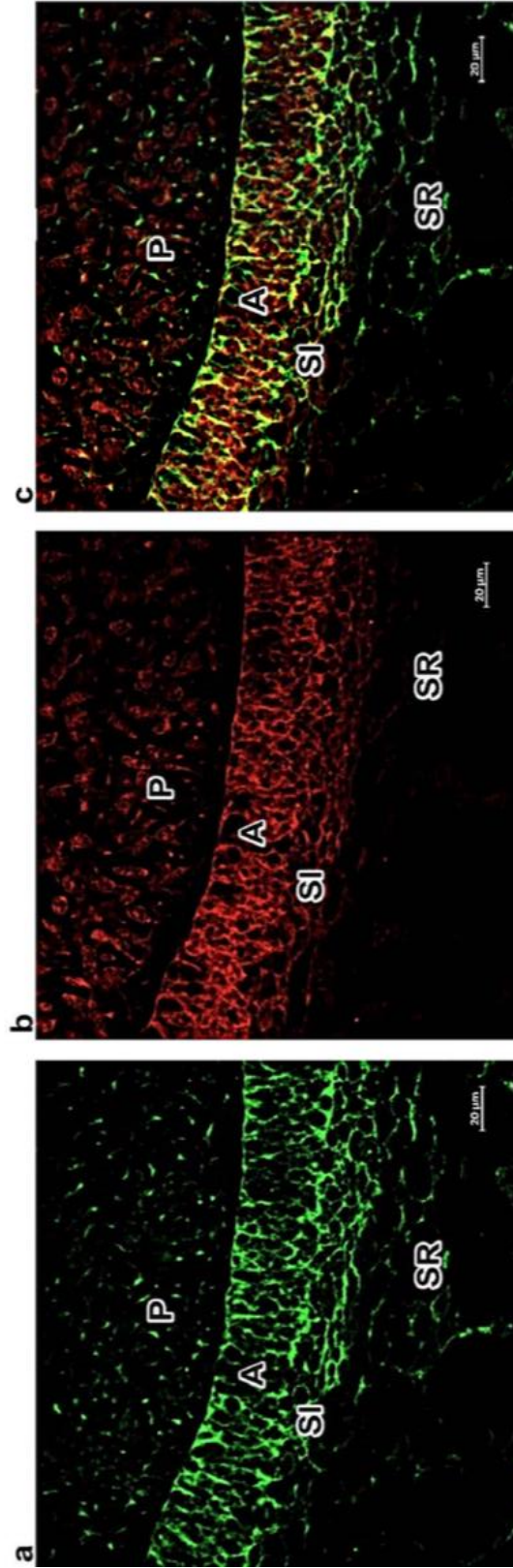


Figure 1. Ameloblastin and tuftelin expression in human tooth germs, during pre-secretory stage 40x. Ameloblastin expression was showed with specific recognition with a polyclonal anti-ameloblastin followed of Alexa Fluor 594 goat-anti rabbit (a), tuftelin expression was showed with specific recognition with a polyclonal antibody anti-tuftelin followed of Qdot 565 goat anti-rabbit (b), merge for ameloblastin-tuftelin during ameloblast presecretor stage (c): yellow areas indicate co-localization is showed only perinuclear in the ameloblast. Bar= 20μm.

<http://mc.manuscriptcentral.com/hcs>

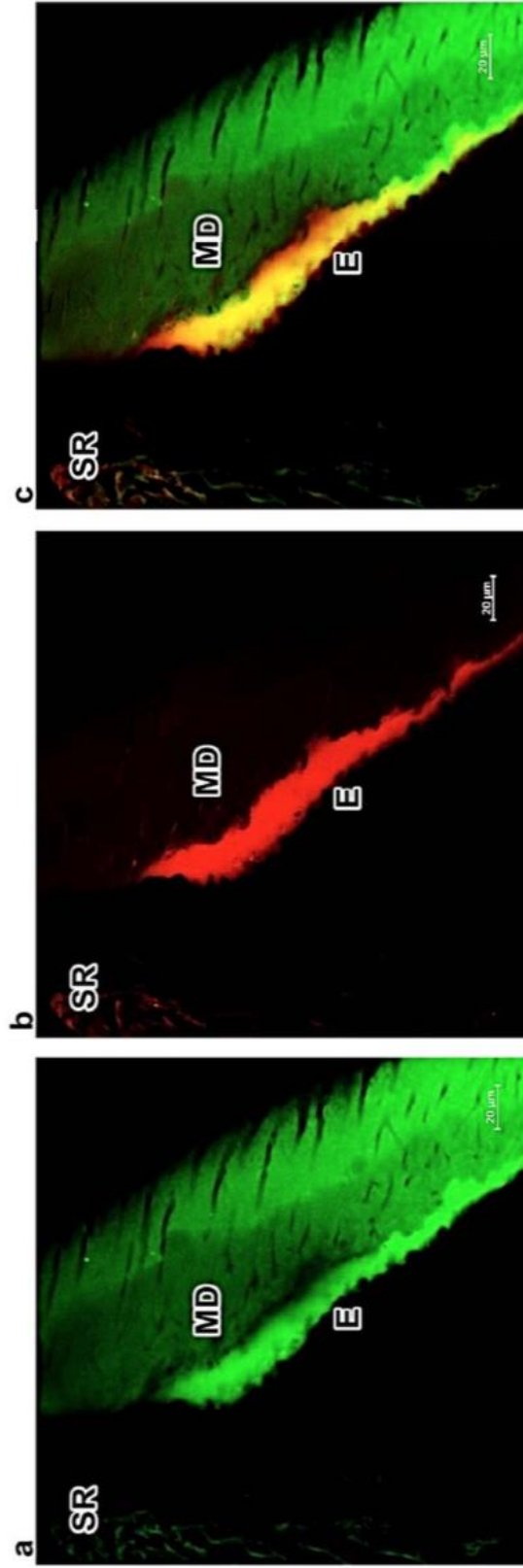


Figure 2. Ameloblastin and tuftelin expression in human tooth germs, during secretory stage 40x. Ameloblastin expression was showed with specific recognition with a polyclonal anti-ameloblastin followed of Alexa Fluor 594 goat-anti rabbit (a), tuftelin expression was showed with specific recognition with a polyclonal antibody anti-tuftelin followed of Qdot 565 goat anti-rabbit (b), merge for ameloblastin-tuftelin during ameloblast secretor stage (c): the co-localization only is observed in the new enamel as yellow labeling. Bar= 20µm.

<http://mc.manuscriptcentral.com/hyc>

CONCLUSIONES

Para conocer el desarrollo adecuado del esmalte dental en humanos es necesario conocer la manera en que el ameloblasto produce a las proteínas de la matriz orgánica. Este tema es ampliamente estudiado en animales, pero al realizarlo en humanos hemos encontrado que existe una gran diferencia en su expresión. Lo anterior nos indica que a pesar que los animales tienen los mismos tejidos dentales que el humano y, debido a ello se tenía la creencia que se desarrollaban igual, esta aseveración es incorrecta.

Los hallazgos encontrados durante el desarrollo de esta tesis muestran que la ameloblastina está presente durante la etapa pre-secretora en el desarrollo del esmalte en el diente fetal humano, no sólo en los ameloblastos, sino también en la papila y en menor cantidad en el retículo estrellado, y aumenta en la etapa secretora, que se encuentra incluso en el manto de la dentina y los odontoblastos, con lo que se demuestra que la ameloblastina no es exclusiva del esmalte, sino que participa en la formación de otros tejidos duros del diente. En cuanto a la tuftelina, encontrarla en la proximidad de la unión amelodentinaria puede indicar su relación en la nucleación de los cristales del esmalte, suponiendo que la tuftelina no solamente se expresa durante el proceso de amelogénesis, sino en el de odontogénesis, por lo que se podría indicar que esta proteína es importante en la biomineralización de esmalte y dentina, por lo que su déficit o ausencia derivará en un trastorno de mineralización de esmalte y dentina de manto.

Los resultados de la parvalbúmina apuntan a que está involucrada en el inicio de la calcificación, presentándose solo cuando los tejidos duros del diente se formarán y al final de su calcificación, la expresión de la proteína termina.

Al observar todos los resultados obtenidos se sugiere que al momento de iniciar la calcificación del esmalte, las cinco proteínas están presentes e interactuando

entre sí. Probablemente esta interacción permita que el esmalte tenga la dureza que lo caracteriza.

Cabe destacar que a pesar de los hallazgos encontrados en esta investigación se necesitan más estudios referentes a ellas, para tener el mayor conocimiento del desarrollo del esmalte.



REFERENCIAS

1. Elamin, F., & Liversidge, H. M. (2013). Malnutrition has no effect on the timing of human tooth formation. *PloS one*, 8(8), e72274.
2. Gómez de Ferraris, M. (2009). Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. In *Medica Panamericana*. 291–332.
3. Esponda Vila R. (2011) Anatomía Dental. (C. de D. C. Universidad Nacional Autónoma de México, Ed.) (8a ed.).
4. Li, Q., Guo, Y., Yao, M., Li, J., Chen, Y., Liu, Q., & Feng, Y. (2018). Methylation of *Cdkn1c* may be involved in the regulation of tooth development through cell cycle inhibition. *Journal of molecular histology*, 49(5), 459-469.
5. Lee, H. K., Park, J. W., Seo, Y. M., Kim, H. H., Lee, G., Bae, H. S., & Park, J. C. (2016). Odontoblastic inductive potential of epithelial cells derived from human deciduous dental pulp. *Journal of molecular histology*, 47(3), 345-351.
6. Fukumoto, S., Kiba, T., Hall, B., Iehara, N., Nakamura, T., Longenecker, G., & Yamada, Y. (2004). Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol*, 167(5), 973-983.
7. Robinson, C., Kirkham, J., & Shore, R. C. (2017). (Eds.). *Dental Enamel Formation to Destruction*. CRC Press.
8. Mitsiadis, T. A., Orsini, G., & Jimenez-Rojo, L. (2016). Dental stem cells for tooth regeneration. In *Dental Stem Cells: Regenerative Potential*. 187-202. Humana Press, Cham.

9. Mitsiadis, T. A., Filatova, A., Papaccio, G., Goldberg, M., & Papagerakis, P. (2014). Distribution of the amelogenin protein in developing, injured and carious human teeth. *Frontiers in physiology*, 5, 477.
10. Jussila, M., and Thesleff, I. (2012). Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a008425. doi: 10.1101/cshperspect. a008425.
11. Jernvall, J., and Thesleff, I. (2012). Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development* 139, 3487–3497. doi: 10.1242/dev.085084.
12. Mitsiadis, T. A., and Graf, D. (2009). Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 87, 199–211. doi: 10.1002/bdrc.20160.
13. Tucker, A. S., and Sharpe, P. (2004). The cutting edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat. Rev. Genet.* 5, 499–508.
14. Thesleff I, Nieminen P. (1996) Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol*; 8:844-50.
15. Mitsiadis T, Papagerakis P (2013) Development and structure of teeth and periodontal tissues. In: Rosen CJ (ed) *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Wiley-Blackwell, New Jersey (United States), pp 904–913.

16. Gutiérrez-Cantú, FJ; Feria-Velasco, A; Palacios-Arenas, LN; Alvarado-Estrada, KN; Avelar-González, FJ; Flores-Reyes, H; Mariel-Cárdenas, J; Guerrero-Barrera AL. (2011). Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal* 47:355–360.
17. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA (2008) Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater* 16:1–9.
18. Simmer, J. P., Papagerakis, P., Smith, C. E., Fisher, D. C., Rountrey, A. N., Zheng, L., et al. (2010). Regulation of dental enamel shape and hardness. *J. Dent. Res.* 89, 1024–1038.
19. Li, Z., Yu, M., & Tian, W. (2013). An inductive signalling network regulates mammalian tooth morphogenesis with implications for tooth regeneration. *Cell proliferation*, 46(5), 501-508. doi: 10.1111/cpr.12051.
20. Moradian-Oldak, J. (2012). Protein-mediated enamel mineralization. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 17, 1996-2023.
21. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP (2005) Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 15, 301–316.
22. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer B, Francis-West PH (2009) Larsen's human embryology, 4th edn. Churchill Livingstone, Elsevier.
23. Xuefeng Hu, Shan Xu, Chensheng Lin, Lishan Zhang, YiPing Chen, Yanding Zhang (2014). Precise chronology of differentiation of developing human primary dentition. *Histochem Cell Biol* 141:221–227.

24. Ding, C., Chen, Z., & Li, J. (2017). From molecules to macrostructures: recent development of bioinspired hard tissue repair. *Biomaterials science*, 5(8), 1435-1449.
25. Astekar, M., Kaur, P., Dhakar, N., & Singh, J. (2014). Comparison of hard tissue interrelationships at the cervical region of teeth based on tooth type and gender difference. *Journal of forensic dental sciences*, 6(2), 86.
26. Zhang, Y. F., Zheng, J., Yu, J. X., & He, H. T. (2018). Impact of strain rate on the hardness and elastic modulus of human tooth enamel. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 78, 491-495.
27. Zheng, J., Zhou, Z.R. (2007). Friction and wear behavior of human teeth under various wear conditions. *Tribol. Int.* 40, 278–284.
28. Paine, C. T., Paine, M. L., Luo, W., Okamoto, C. T., Lyngstadaas, S. P., & Snead, M. L. (2000). A tuftelin-interacting protein (TIP39) localizes to the apical secretory pole of mouse ameloblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 22284-22292.
29. Zheng, L., Li, Y., Zheng, J., Wen, M., Zhang, Y. F., Qian, L. M., & Zhou, Z. R. (2013). A comparative study on the sliding wear behaviors of human tooth enamel, Cu–Zn alloy and Al₂O₃ ceramic. *Wear*, 301(1-2), 308-315.
30. Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiological reviews*, 97(3), 939-993.

31. Nakayama, Y., Holcroft, J., & Ganss, B. (2015). Enamel hypomineralization and structural defects in amelotin-deficient mice. *Journal of dental research*, 94(5), 697-705.
32. Dahal, S., Boaz, K., Srikant, N., & Agrawal, N. K. (2015). Amelogyphics: A Novel Appraisal of the Enamel Structure in Identification of an individual. *Journal of Institute of Medicine*, 38(1).
33. Yan, W. J., Ma, P., Tian, Y., Wang, J. Y., Qin, C. L., Feng, J. Q., & Wang, X. F. (2017). The importance of a potential phosphorylation site in enamelin on enamel formation. *International journal of oral science*, 9(11), e4.
34. Chatzistavrou, X., Papagerakis, S., Ma, P. X., & Papagerakis, P. (2012). Innovative approaches to regenerate enamel and dentin. *International journal of dentistry*, 2012:856470.
35. Durso, G., Tanevitch, A., Abal, A., Llompарт, G., Pérez, P., & Felipe, P. (2017). Estudio de la microestructura del esmalte dental humano en relación con la microdureza y la composición química. *Revista Ciencias Morfológicas*, 19(2), 1-9.
36. Fowler, C. E., Li, M., Mann, S., & Margolis, H. C. (2005). Influence of surfactant assembly on the formation of calcium phosphate materials—A model for dental enamel formation. *Journal of Materials Chemistry*, 15(32), 3317-3325.

37. Chai, H., Lee, J. J. W., Kwon, J. Y., Lucas, P. W., & Lawn, B. R. (2009). A simple model for enamel fracture from margin cracks. *Acta Biomaterialia*, 5(5), 1663-1667.
38. Sa, Y., Liang, S., Ma, X., Lu, S., Wang, Z., Jiang, T., & Wang, Y. (2014). Compositional, structural and mechanical comparisons of normal enamel and hypomaturational enamel. *Acta biomaterialia*, 10(12), 5169-5177.
39. Yahyazadehfar, M., Bajaj, D., & Arola, D. D. (2013). Hidden contributions of the enamel rods on the fracture resistance of human teeth. *Acta biomaterialia*, 9(1), 4806-4814.
40. White, S. N., Luo, W., Paine, M. L., Fong, H., Sarikaya, M., & Snead, M. L. (2001). Biological organization of hydroxyapatite crystallites into a fibrous continuum toughens and controls anisotropy in human enamel. *Journal of dental research*, 80(1), 321-326.
41. Zhao, X., O'Brien, S., Shaw, J., Abbott, P., Munroe, P., Habibi, D., & Xie, Z. (2013). The origin of remarkable resilience of human tooth enamel. *Applied Physics Letters*, 103(24), 241901.
42. Lawn, B. R., Lee, J. J. W., & Chai, H. (2010). Teeth: among nature's most durable biocomposites. *Annual Review of Materials Research*, 40, 55-75.
43. Chen, H.F.T.Z., Tang, Z., Liu, J., Sun, K., Chang, S.R., Peters, M.C., & Clarkson, B.H. (2006). Acellular synthesis of a human enamel-like microstructure. *Advanced Materials*, 18(14), 1846-1851.

44. Ji, M., Xiao, L., Xu, L., Huang, S., & Zhang, D. (2018). How pH is regulated during amelogenesis in dental fluorosis. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(5), 3759-3765.
45. Jayasudha, Baswaraj, Navin H.K, Prasanna K.B (2014). Enamel Regeneration-Current Progress and Challenges. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol-8(9): ZE06-ZE09.
46. Fincham, A. G., Moradian-Oldak, J., and Simmer, J. P. (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.* 126, 270–299. doi: 10.1006/jsbi.1999.4130.
47. Scricciu, M., Mercuț, V., Popescu, S. M., Tărăță, D., & Osiac, E. (2018). OCT aspects of dental hard tissue changes induced by excessive occlusal forces. In *2nd Canterbury Conference on OCT with Emphasis on Broadband Optical Sources* (Vol. 10591, p. 105910L). International Society for Optics and Photonics.
48. Bartlett, J. D. (2013). Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN dentistry*, 2013:684607.
49. Gutiérrez-Cantú, FJ, Cárdenas, J.M., Rodríguez, R.O., Fernando, G., Ramírez, R., Méraz, W. S., & Oliva, R. (2014). Expression of Mmp-20 in dental germs of human fetus. *Int. J. Morphol*, 32(4), 1261-1265.
50. Eastoe, J.E. (1960). Organic matrix of tooth enamel, *Nature*, vol. 187, no. 4735, pp. 411–412.

51. Eastoe, J.E. (1960). The amino acid composition of proteins from the oral tissues-II. The matrix proteins in dentine and enamel from developing human deciduous teeth, *Archives of Oral Biology*, vol. 8, no. 5, pp. 633–652.
52. Burgess, R.C. and Maclaren, C.M. (1960). Proteins in developing bovine enamel, in *Tooth Enamel I*, M. V. Stack and W. FR, Eds., pp. 74–82, JohnWright & Sons LTD, Bristol, England.
53. Sanadi, R., Bhakkand, S., & Ramteke, K. (2018). Enamel Matrix Proteins: A Paradigm Shift from Repair to Regeneration. *International Journal of Scientific Research*, 6(8).
54. Davideau, J. L., Celio, M. R., Hotton, D., & Berdal, A. (1993). Developmental pattern and subcellular localization of parvalbumin in the rat tooth germ. *Archives of oral biology*, 38(8), 707-715.
55. Berchtold, M. W., Celio, M. R., & Heizmann, C. W. (1984). Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. Quantitation and immunohistochemical localization. *Journal of Biological Chemistry*, 259(8), 5189-5196.
56. Celio, M. R., Norman, A. W., & Heizmann, C. W. (1984). Vitamin-D-dependent calcium-binding-protein and parvalbumin occur in bones and teeth. *Calcified tissue international*, 36(1), 129-130.
57. Heizmann, C.W. (1984). Parvalbumin, and intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia*, 40(9), 910-921.

58. Ravindranath, R. M., Tam, W. Y., Bringas, P., Santos, V., & Fincham, A. G. (2001). Amelogenin-cytokeratin 14 interaction in ameloblasts during enamel formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36586-36597.
59. Hoang, A. M., Klebe, R. J., Steffensen, B., Ryu, O. H., Simmer, J. P., & Cochran, D. L. (2002). Amelogenin is a cell adhesion protein. *Journal of dental research*, 81(7), 497-500.
60. Bourd-Boittin, K., Fridman, R., Fanchon, S., Septier, D., Goldberg, M., & Menashi, S. (2005). Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Experimental cell research*, 304(2), 493-505.
61. Akita, H., Fukae, M., Shimoda, S., & Aoba, T. (1992). Localization of glycosylated matrix proteins in secretory porcine enamel and their possible functional roles in enamel mineralization. *Archives of oral biology*, 37(11), 953-962.
62. Bidlack FB, Huynh C, Marshman J and Goetze B (2014) Helium ion microscopy of enamel crystallites and extracellular tooth enamel matrix. *Front. Physiol.* 5:395. doi: 10.3389/fphys.2014.00395.
63. Paine, M. L., Luo, W., Zhu, D. H., Bringas Jr, P., & Snead, M. L. (2003). Functional domains for amelogenin revealed by compound genetic defects. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(3), 466-472.

64. Tanimoto, K., Le, T., Zhu, L., Witkowska, H. E., Robinson, S., Hall, S., Hwang P.; Denbesten P., & Li, W. (2008). Reduced amelogenin-MMP20 interactions in amelogenesis imperfecta. *Journal of dental research*, 87(5), 451-455.
65. Nakamura, Y., Slaby, I., Spahr, A., Pezeshki, G., Matsumoto, K., & Lyngstadaas, S. P. (2006). Ameloblastin fusion protein enhances pulpal healing and dentin formation in porcine teeth. *Calcified tissue international*, 78(5), 278-284.
66. Hirose, N., Shimazu, A., Watanabe, M., Tanimoto, K., Koyota, S., Sugiyama, T., ... & Tanne, K. (2013). Ameloblastin in Hertwig's epithelial root sheath regulates tooth root formation and development. *PloS one*, 8(1), e54449.
67. Lee, S.K., Krebsbach, P.H., Matsuki, Y., Nanci, A., Yamada, K.M., Yamada, Y., (1996). Ameloblastin expression in rat incisors and human tooth germs. *The International journal of developmental biology*. 40(6), 1141–1150.
68. Nanci, A., Zalzal, S., Lavoie, P., Kunikata, M., Chen, W.Y., Krebsbach, P.H., & Snead, M.L. (1998). Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(8), 911-934.
69. Dhamija, S., Liu, Y., Yamada, Y., Snead, M. L., & Krebsbach, P. H. (1999). Cloning and characterization of the murine ameloblastin promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20738-20743.
70. Krebsbach, P. H., Lee, S. K., Matsuki, Y., Kozak, C. A., Yamada, K. M., & Yamada, Y. (1996). Full-length sequence, localization, and chromosomal

- mapping of ameloblastin a novel tooth-specific gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4431-4435.
71. Zalzal, S. F., Smith, C. E., & Nanci, A. (2008). Ameloblastin and amelogenin share a common secretory pathway and are co-secreted during enamel formation. *Matrix Biology*, 27(4), 352-359.
72. Kawasaki, K., and Weiss, K. M. (2003). Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4060–4065.
73. Úsuga Vacca, M.V. (2012). Efecto de una sustancia remineralizante modificada en el llenado de defectos de esmalte dental. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Odontología. Bogotá D.C, Colombia.
74. Uchida, T., Murakami, C., Wakida, K., Dohi, N., Iwai, Y., Simmer, J. P., & Takahashi, O. (1998). Sheath proteins: synthesis, secretion, degradation and fate in forming enamel. *European journal of oral sciences*, 106(S1), 308-314.
75. Uchida T, Murakami C, Wakida K, Satoda T, Dohi N (1997). Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies. *J Histochem Cytochem* 45: 1329–1340.
76. Iwata T, Yamakoshi Y, Hu JCC, Ishikawa I, Bartlett JD, et al. (2007) Processing of ameloblastin by MMP-20. *J Dent Res* 86: 153–157.

77. Chun, Y. H., Yamakoshi, Y., Yamakoshi, F., Fukae, M., Hu, J. C., Bartlett, J. D., & Simmer, J. P. (2010). Cleavage site specificity of MMP-20 for secretory-stage ameloblastin. *Journal of dental research*, 89(8), 785-790.
78. Spahr A, Lyngstadaas SP, Slaby I, Haller B, Boeckh C, et al. (2002) Expression of amelin and trauma-induced dentin formation. *Clin Oral Investig* 6: 51–57.
79. Spahr A, Lyngstadaas SP, Slaby I, Pezeshki G (2006) Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats. *Eur J Oral Sci* 114: 504–511.
80. Tamburstuen MV, Reseland JE, Spahr A, Brookes SJ, Kvalheim G, et al. (2010). Ameloblastin expression and putative autoregulation in mesenchymal cells suggest a role in early bone formation and repair. *Bone* 48: 406–413.
81. Atsawasuwan P, Lu X, Ito Y, Zhang Y, Evans, C. A., & Luan, X. (2013). Ameloblastin inhibits cranial suture closure by modulating MSX2 expression and proliferation. *PloS one*, 8(4).
82. Jacques, J., Hotton, D., Asselin, A., De la Dure-Molla, M., Coudert, A. E., Isaac, J., & Berdal, A. (2014). Ameloblastin as a putative marker of specific bone compartments. *Connective tissue research*, 55(sup1), 117-120.
83. Bègue-Kirn, C., Krebsbach, P. H., Bartlett, J. D., & Butler, W. T. (1998). Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin, tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *European journal of oral sciences*, 106(5), 963-970.

84. Bartlett, J. D., Skobe, Z., Nanci, A., & Smith, C. E. (2011). Matrix metalloproteinase 20 promotes a smooth enamel surface, a strong dentino–enamel junction, and a decussating enamel rod pattern. *European journal of oral sciences*, 119, 199-205.
85. Fukae, M., Tanabe, T., Uchida, T., Lee, S. K., Ryu, O. H., Murakami, C., & Bartlett, J. D. (1998). Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *Journal of dental research*, 77(8), 1580-1588.
86. Caterina, J. J., Skobe, Z., Shi, J., Ding, Y., Simmer, J. P., Birkedal-Hansen, H., & Bartlett, J. D. (2002). Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49598-49604.
87. Bartlett, J. D., Skobe, Z., Lee, D. H., Wright, J. T., Li, Y., Kulkarni, A. B., & Gibson, C. W. (2006). A developmental comparison of matrix metalloproteinase-20 and amelogenin null mouse enamel. *European journal of oral sciences*, 114(Suppl 1), 18-23.
88. Uchida T, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M. (1991) Immunocytochemical and immunochemical detection of a 32 kDa nonamelogenin and related proteins in porcine tooth germs. *Archives of histology and cytology*, 54(5), 527-538.
89. Nagano, T., Oida, S., Ando, H., Gomi, K., Arai, T., & Fukae, M. (2003). Relative levels of mRNA encoding enamel proteins in enamel organ epithelia and odontoblasts. *Journal of dental research*, 82(12), 982-986.

90. Deutsch D, Palmon A, Dafni L, Mao Z, Leytin V, Young M, et al. (1998). Tuftelin—aspects of protein and gene structure. *Eur J. Oral Sci* 106(Suppl 1):315-323.
91. Mao Z., Shay B., Hekmati, M., Fermon E., Taylor A., Dafni L., & Deutsch D. (2001). The human tuftelin gene: cloning and characterization. *Gene*, 279(2), 181-196.
92. Luo, W., Wen, X., Wang, H.J., MacDougall, M., Snead, M.L., & Paine, M.L. (2004). In vivo overexpression of tuftelin in the enamel organic matrix. *Cells Tissues Organs*, 177(4), 212-220.
93. Deutsch, D., Silverstein, N., Shilo, D., Lecht, S., Lazarovici, P., & Blumenfeld, A. (2011). Biphasic influence of hypoxia on tuftelin expression in mouse mesenchymal C3H10T1/2 stem cells. *European journal of oral sciences*, 119, 55-61.
94. Zeichner-David, M., Vo, H., Tan, H., Diekwisch, T., Berman, B., Thiemann, F., Alcocer MD., Hsu P., Wang T., Eyna J., Caton J., Slavkin H.C. and MacDougall M. (2003). Timing of the expression of enamel gene products during mouse tooth development. *International Journal of Developmental Biology*, 41(1), 27-38.
95. Eberhard, M., & Erne, P. (1994). Calcium and magnesium binding to rat parvalbumin. *European Journal of Biochemistry*, 222(1), 21-26.