

## ARTICULO DE REVISION BIBLIOGRAFICA

### MONOGRAFÍA SOBRE ESMALTE ARTIFICIAL

Germán Andrés Trujillo Ocampo\*

#### RESÚMEN

Revisando la literatura existente acerca de la formación de esmalte dental *in vitro*, se pudo encontrar que es posible, en el laboratorio, la secreción de matriz del esmalte de animales, y el cultivo de gérmenes dentales, logrando desarrollo avanzado de éstos, e incluso depósito de las proteínas de la matriz. El avance es tal que ha sido determinada la secuencia de aminoácidos de la principal proteína de la matriz del esmalte humano (la amelogenina). Así mismo, se ha logrado la mineralización *in vitro* de la matriz del esmalte. En la búsqueda del esmalte artificial, se han obtenido algunos datos que aumentan el conocimiento acerca de los procesos del desarrollo y formación del esmalte dental, que aún es un acontecimiento escasamente entendido. Cuando conozcamos claramente estos eventos y sus factores reguladores, podremos lograr alguna utilidad clínica de la formación *in vitro* de esmalte y gérmenes dentales. El desafío ahora, es lograr el desarrollo de gérmenes dentales humanos *in vitro* y síntesis de esmalte humano en el laboratorio, utilizando herramientas como la manipulación genética y la biología molecular.

#### Palabras claves:

Esmalte dental, Esmalte Artificial, Germen dental.

#### ABSTRACT

Reviewing the available literature about *in vitro* tooth enamel formation, it is found that it is possible the secretion, *in vitro*, of animal enamel matrix and culture of animal tooth germs, achieving their advanced development including deposition of enamel matrix proteins. The advances even reach the point that the amino acid sequence of the major human enamel matrix protein (amelogenin) has been established.

Also, mineralization of the dental enamel matrix *in vitro* has been obtained. Looking for the artificial enamel it has been possible to achieve some knowledge in order to increase the understanding about the formation and development process of the tooth enamel, although this is a poorly understood event yet. When we can know clearly these events and their regulating factors, we could have any clinical application of the *in vitro* tooth enamel and tooth germs formation. The challenge is to gain the *in vitro* human tooth germ development and human tooth enamel synthesis using the advances in genetic engineering and molecular biology.

#### Keywords:

Tooth enamel, Artificial Enamel, Tooth germ.

---

\* Odontólogo CES.

## INTRODUCCIÓN

Por años se ha tenido un limitado conocimiento acerca de la formación dental desde sus estadios más tempranos, hasta la erupción de las estructuras dentales. Para lograr nuevos avances y buscar alguna utilidad clínica, debemos aclarar nuestro conocimiento y entendimiento del desarrollo y del proceso molecular requerido para la formación del esmalte dental. Las investigaciones y nuevos trabajos se encaminan a buscar un modelo de formación dental *in vitro*, con el fin de entender dichos eventos. Cada día se le da más importancia a la genética y a la biología molecular, puesto que el avance en estas áreas es cada vez mayor. A la vez, se quieren encontrar los iniciadores y moduladores del proceso de formación, así como también se investiga con respecto a la mineralización de la matriz del esmalte. Los logros han llegado hasta el punto que es posible el cultivo *in vitro* de gérmenes dentales y formación de esmalte dental, que por la forma de obtención se podría decir que se trata de «esmalte artificial».

## MATRIZ DEL ESMALTE: PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

Aunque la formación del esmalte dental es un proceso que se lleva a cabo en un tiempo bien definido, poco se sabe acerca del mecanismo de control por medio del cual este tejido mineralizado único es formado. Durante la etapa inicial de la formación de la matriz del esmalte, los ameloblastos se elongan y diferencian con el fin de sintetizar y secretar amelogeninas en la matriz del esmalte adyacente (Frank, 1970; Kallenbach, 1971; Weinstock y Leblond, 1971; Slavkin y col, 1976; Warshawsky, 1979; Slavkin y col, 1982; Snead y col, 1984; Nanci y col, 1985; Nanci y col, 1987; Snead y col, 1987; Snead y col, 1988).(1) El esmalte es inicialmente secretado como una proteína matriz. Es de nuestro conocimiento que la matriz del esmalte en formación esta compuesta casi enteramente de proteínas: las amelogeninas ricas en prolina, histidina, glutamina y leucina (Termine y col, 1980), son un grupo de proteínas extremadamente hidrofóbicas, con pesos moleculares en el rango de 20 a 27 kDa (Eastoe, 1979; Fincham, 1979; Termine y col, 1979) que constituyen mas del 90% de la matriz extracelular del

esmalte dental en desarrollo y son secretadas por los ameloblastos antes de la mineralización del esmalte en forma de materiales granulares (Termine y col, 1980; Hayashi y col, 1986), mientras que otras proteínas que son componentes menores del esmalte en formación son conocidas como "enamelinas" ácidas (Eastoe 1979; Termine y col, 1980; Belcourt y col, 1982; Hayashi y col, 1986; Ogata y col, 1988; Menanteau y col, 1988). Estudios *in vitro* han sugerido que la amelogenina juega un importante papel en el control de la biomineralización de la matriz del esmalte (Eastoe, 1965; Termine y col, 1980; Doi y col, 1984; Jodaiken y col, 1986; Aoba y col, 1987) (2), interviniendo directamente en la formación y elongación de los cristales de hidroxiapatita (Simmer y Snead, 1995).(3) Es sugerido que las enamelinas regulan la formación de los cristales y quizá proveen el ambiente hidrofóbico necesario para la iniciación y el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita de calcio (Deutsch, 1989). La naturaleza y función de las enamelinas no está completamente clara (Robinson y col, 1989); los reportes recientes sostienen que las principales formas de enamelinas son en efecto la albúmina y otras proteínas séricas (Strawich y Glimcher, 1990). Las amelogeninas y las enamelinas son degradadas luego de su secreción y entonces removidas substancialmente (casi completamente en el caso de las amelogeninas) durante la amelogénesis, resultando en el más organizado y cristalino tejido en el cuerpo de los mamíferos, el esmalte dental. La matriz madura del esmalte no tiene esencialmente amelogeninas, siendo reemplazada por los cristales de hidroxiapatita (Eastoe, 1965; Dalcusi y col, 1984). Las enamelinas mientras que comprenden únicamente una pequeña proporción (menos del 10%) de la matriz total, parecen estar concentradas en áreas inmediatas a las superficies de los cristales del esmalte (Yanagisawa y col, 1981). De otra manera, las amelogeninas que son las proteínas más abundantes aparecen distribuidas difusamente entre los cristales que se están formando (Yanagisawa y col, 1981). Durante la maduración del esmalte hay una disminución en la matriz proteica total y un incremento en el contenido mineral (Deakins, 1942; Stack, 1960; Glimcher y col, 1977; Robinson y col, 1978). Mientras que las amelogeninas y enamelinas se empiezan a degradar en moléculas más pequeñas antes de la maduración (Termine y col, 1980; Fincham y col, 1981, 1982; Belcourt y col,

1982), las amelogeninas parecen degradarse más rápidamente cuando la maduración comienza (Termine y col, 1979, 1980).(4) La heterogeneidad de las amelogeninas en la matriz del esmalte es debida en parte a la degradación proteolítica que ocurre durante el desarrollo del esmalte (Shimizu y col, 1979; Carter y col, 1989; Fincham y col, 1981). Se sugiere una participación funcional de las proteínas de la matriz, en el mecanismo de mineralización del esmalte (Eastoe, 1979; Fearnhead, 1979; Glimcher, 1979; Nylen, 1979; Fincham, 1983).(4) Se dispone de investigaciones para esclarecer todas estas afirmaciones. Los resultados de algunas de éstas, indican que una amelogenina específica puede regular el crecimiento, cinética y el hábito de formación de cristales a través de la absorción selectiva sobre las superficies específicas del cristal (Aoba y col, 1987). Se cree que el papel funcional de las amelogeninas está íntimamente relacionado con su proceso de degradación postsecretoria, y su transición de especie insoluble a especie soluble, antes que a la pérdida masiva (reabsorción) de las amelogeninas. Como conclusión importante de las investigaciones realizadas en este aspecto, se tiene que, aunque el contenido total de proteínas permanece constante, la naturaleza de éstas cambia significativamente.

La secreción de una matriz en la amelogénesis esta probablemente relacionada con un mecanismo inhibitorio del crecimiento de cristales de apatita, en lugar de una nucleación inducida del material en formación. Y probablemente juegan un papel activo en la amelogénesis, además de llenar un espacio hasta completarse el evento.(5)

Es indispensable estudiar las proteínas del esmalte, puesto que ellas, son la principal matriz proteica y muestran dramáticos cambios en cuanto a su naturaleza y cantidad durante el progreso de la mineralización del esmalte.(6)

#### **EXAMEN DE LA COMPLEJIDAD DE LAS PROTEÍNAS DEL ESMALTE.**

Se han llevado a cabo estudios, con el fin de examinar cada uno de los tres locus capaces de contribuir con la complejidad observada en las amelogeninas de ratón en formación: El genoma (gen); el aparato de transcripción (RNA mensajero); y el aparato de translación (proteínas).

Así un ameloblasto artificial fue ingeniado. Se llegó a la conclusión que el genoma probablemente no es responsable de la complejidad de la amelogenina. Así, las señales instructivas derivadas del ectomesénquima para la diferenciación de los ameloblastos, no conduce al reordenamiento o amplificación del gen de la amelogenina. Al construir "ameloblastos artificiales", el aparato de translación puede ser examinado. Se cree que las proteínas del esmalte inician, propagan y terminan la fase mineral de la formación del esmalte de los vertebrados. Los mecanismos moleculares y las especies proteicas directamente involucradas en la amelogénesis permanecen enigmáticas.

Alguna aproximación en el entendimiento de la biomineralización del esmalte, ha sido determinar el número de las secuencias de aminoácidos de las proteínas, desde las fases sintéticas hasta la maduración en la formación del esmalte. Por consiguiente, las amelogeninas podrían examinadas (Revisado por: Weiner, 1986; ver también Jodaikin y col., 1986; Addadi y Weiner, 1985; Warshawsky y col, 1984; Deutsch y col, 1984; Robinson y Kirkham, 1984; Doi y col, 1984; Termine y col, 1980; Weiner y Hood, 1975).

El incremento en la complejidad de las proteínas del esmalte ha sido atribuido a diferentes procesos moleculares ocurridos durante las diversas etapas del desarrollo del esmalte.

El propósito de los experimentos realizados en este campo, ha sido el de reconocer los varios loci que pudieran dirigir el complejo control biológico necesario para la expresión de la amelogénesis en mamíferos. Hasta la fecha, el RNA mensajero (mRNA) que describe el fenotipo del ameloblasto para ciertas especies, ha sido caracterizado *in vitro* (Zeichner David y col, 1980, 1984; Shimokawa y col, 1984; Slavkin y col, 1982). Una completa documentación de los DNAs complementarios sintéticos (cDNAs) ha sido producida para los mRNAs de molares de ratón (Snead y col, 1983) y dientes de bovino (Shimokawa y col, 1987). El clon de ratón se ha usado para clasificar el repertorio genético de ratones y hombres (Snead y col, 1983). Los resultados indican que estos genomas contienen únicamente un gen de amelogenina, aunque más de una proteína ha sido sintetizada *in vitro*. Para examinar esta paradoja, se realizaron

algunos estudios en el laboratorio. Algunos de los cuales presentan un "ameloblasto artificial", a partir del cual el mRNA funcional pudo ser transcrito, trasladado *in vitro* y comparado con los productos de síntesis de ameloblastos auténticos. Datos previos indicaron que el gen de la amelogenina natural, existe como una copia sencilla en células somáticas de humano (Snead y col, 1983). El DNA de los tejidos dentales humanos ya ha sido examinado.

Algunos investigadores han logrado construir un "ameloblasto artificial", con el fin de producir y aislar una proteína amelogenina, sin proteínas contaminantes, para posteriores análisis (Kreig y Melton, 1984). El gran avance logrado utilizando un sistema de "ameloblasto artificial", para el análisis en este caso, reside principalmente en el hecho de que el sistema artificial es controlable y obligado; aunque el sistema artificial no es estrictamente una célula "simplificada" y no suplanta la investigación derivada de los tejidos animales, no obstante, éste sistema ofrece una aproximación para sintetizar grandes cantidades de la proteína amelogenina, pudiendo ésta ser utilizada para otros tipos de análisis o manipulación, así como para ingeniar mutaciones dentro de la proteína amelogenina.(7)

#### **AGREGACIÓN DE LAS AMELOGENINAS IN VITRO.**

Al parecer las amelogeninas forman agregados moleculares al tiempo de ser secretadas.

Se han diseñado estudios *in vitro*, con el fin de estudiar las propiedades de agregación de amelogeninas. El estudio del fenómeno de agregación en diferentes solventes, indicó que las interacciones intermoleculares fueron hidrofóbicas, que los residuos hidrofílicos fueron expuestos en la superficie de los agregados y que los agregados fueron partículas esféricas que tenían entre 13-18 nm de diámetro. De lo anterior se ha podido concluir que agregados de amelogeninas formados *in vitro*, son comparables con el material irregular secretado por los ameloblastos, en el frente de la mineralización.(8)

#### **AMINOÁCIDOS QUE FORMAN LAS PROTEÍNAS DEL ESMALTE**

Cerca del 75% de la estructura primaria de la amelogenina fue determinada.(9) Esta secuencia fue

complementada con estudios de la secuencia del cDNA, los cuales revelaron la cadena predicha para esta macromolécula. Ofreciendo así, la secuencia completa de una importante proteína humana del esmalte. Los análisis han mostrado que en las etapas tempranas del desarrollo del esmalte, primero las enamelinas son secretadas en la matriz extracelular. En cuanto la formación progresa, la secreción de los ameloblastos cambia.(Robinson y col, 1977; Termine y col, 1980; Deutsch y col, 1984; Deutsch y Alayoff, 1987; Slavkin y col, 1988, Deutsch, 1989)

Poco se conoce acerca de la estructura primaria de la amelogenina humana secretada, pero la secuencia de nucleótidos y aminoácidos han sido predichos para el cDNA de la amelogenina humana.(9) La secuencia de aminoácidos en algunas especies animales demostró que la primera mitad de esta proteína es altamente conservada (Snead y col, 1985; Shimokawa y col, 1987). Comparación entre las secuencias de aminoácidos de diferentes especies revelan un alto grado de homología, en particular en los primeros 50 aminoácidos. Esto podría implicar que esta región es importante para la función biológica de la proteína en desarrollo y para la mineralización del esmalte. Anteriormente, sólo secuencias parciales de proteína fueron disponibles (Fincham y col, 1983, 1989).

Muchos investigadores han establecido la estructura primaria de la amelogenina humana y sus genes correspondientes (Salido y col, 1992, Shimokawa y col, 1989, Nakahori y col, 1989 Fincham y col, 1983, 1989, 1990. (9) Lo que se quiere obtener es la secuencia total de aminoácidos de la amelogenina humana.

#### **LA INFORMACIÓN GENÉTICA Y LAS PROTEÍNAS DEL ESMALTE.**

Se ha reportado la localización de los genes que codifican las amelogeninas en los brazos cortos de los cromosomas X y Y.(10) Los investigadores han querido obtener en los últimos años la caracterización del gen de la amelogenina, que codifica la proteína principal encontrada en la matriz del esmalte en formación. Esto establecería un eslabón genético entre el gen(es) de la amelogenina con la formación normal y/o anormal del esmalte.(2) Las amelogeninas, son sugeridas como participantes en la biomineralización anormal de la matriz del esmalte, como es vista en la AI.

Recientemente se ha venido asociando el gen de la amelogenina, localizado en el cromosoma X con la AI. Se ha propuesto que un gen de la amelogenina mutado, del cromosoma X, produce los polipéptidos de la amelogenina alterados, siendo ésta defectuosa en su habilidad para participar en la mineralización de la matriz del esmalte, por lo que se habla de fenotipos de la AI ligados al cromosoma X. Se ha rastreado la amelogénesis imperfecta asociada al cromosoma X, en un sitio de dicho cromosoma (Lagerström y col, 1990), sugiriendo que los defectos en la estructura del gen de la amelogenina podría ser la causa de la amelogénesis imperfecta asociada al cromosoma X.

En efecto, una delección en el gen de la amelogenina, ha sido hallada en una familia con AI asociada al cromosoma X (Lagerström y col, 1981). En cuanto al cromosoma Y, no se conoce como el locus de la amelogenina codifica una proteína funcional y para establecerlo se ha estudiado la expresión del locus de la amelogenina en el cromosoma Y, en gérmenes dentales de humanos en desarrollo. Lo obtenido indica que la secuencia de amelogenina en el cromosoma Y es transcrita, aunque en un nivel más bajo que la de su homólogo X.(10) La secuencia para la amelogenina en el cromosoma Y humano AMGY, ha sido localizada sólo tentativamente en un sitio específico de dicho cromosoma.(10)

Se concluye que las líneas celulares derivadas de ameloblastos, son el único tipo celular conocido, para expresar genes de amelogenina. Aunque no hay evidencia directa para la inactivación del locus del gen de la amelogenina en el cromosoma X (AMGX), esto es factible, debido al patrón en mosaico de la formación normal y anormal del esmalte, en los cargadores femeninos de la amelogénesis imperfecta (AI) ligada al cromosoma X (Witkop, 1967). Se ha encontrado que individuos con un cromosoma X extra, por ejemplo femeninos tales como 47, XXX y masculinos 47, XXY; tienen esmalte más delgado que los femeninos y masculinos normales, sugiriendo esto, que ese cromosoma X extra podría estar activo en la amelogénesis (Alvesalo y Portin, 1980; Alvesalo y col, 1987). También es posible que en el cromosoma X haya otros genes que podrían estar involucrados en la amelogénesis. Con respecto al gen del cromosoma Y, se cree que controla el tamaño den-

tal (Alvesalo y de la Capelle, 1979; Alvesalo y Varrel, 1980).(10)

### ESTUDIOS SOBRE GENES DE AMELOGENINA.

En 1983, un DNA complementario (cDNA) para la amelogenina de ratón fue construida exitosamente a partir de un RNA mensajero (mRNA), extraído de los órganos dentales de ratones jóvenes (Snead y col, 1983), la secuencia de nucleótidos fue determinada (Snead y col, 1985) y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de ésta. Se piensa que es posible realizar lo mismo con humanos y así obtener la secuencia de nucleótidos, para la amelogenina, por lo menos parcialmente. (2) Los progresos en el entendimiento de la formación del esmalte normal o patológico, generará información concerniente al papel biológico de la amelogenina.

### MINERALIZACIÓN DEL ESMALTE

Parece que la fuerza conducente para la mineralización del esmalte, se incrementa con el suplemento de calcio, al menos en la vecindad del ameloblasto (Aoba y Moreno, 1987). Por microscopía electrónica (Warshawsky, 1984) demuestra que los cristales delgados crecen muy cerca de la membrana del ameloblasto. La proteína progenitora, podría jugar un papel esencial en la inhibición del crecimiento de los cristales en una dirección específica, en el momento del transporte activo de calcio a través del ameloblasto. En conclusión, los resultados presentes son consistentes con un mecanismo para la formación del esmalte, en el cual las amelogeninas juegan un papel importante en la regulación del crecimiento inicial de los cristales del esmalte, en todas direcciones.

Algunos autores han establecido, con base en sus resultados, el papel de aquellos componentes que son normalmente solubles en el tejido.(11)

### PROCESOS REGULATORIOS DURANTE EL DESARROLLO CRANEOFACIAL TEMPRANO.

Poco se conoce con respecto a: la naturaleza, posición y tiempo de la(s) señal(es) inductivas de crecimiento y desarrollo, los mecanismos de transducción señal-receptor; ó la naturaleza molecu-

lar de competencia por medio de las células del ectomesénquima, que responden a las señales específicas derivadas del epitelio de cartilago, hueso y tejido dental). Probablemente para las estructuras dentales existen ciertos factores reguladores que controlan la formación dental.(12)

### **PRECURSORES DE LA FORMACIÓN CRISTALINA.**

La mineralización del esmalte permite investigar la formación de carbonatoapatita *in vivo*. La abundancia de inhibidores protéicos del crecimiento cristalino, en particular de amelogeninas, contribuye significativamente al proceso de mineralización. El fluido del esmalte, adyacente a los cristales en formación, contiene altas concentraciones de iones carbonato y magnesio (Mg), los cuales parecen modular el proceso de mineralización. Los iones de Mg se pueden absorber hacia la superficie de los cristales del esmalte, y es una manera de competir con los iones de calcio. La mineralización inicial del esmalte comprende dos eventos: la precipitación inicial de cintas delgadas que tienen el contenido más alto de fosfato ácido y el sobrecrecimiento posterior de los cristales de apatita. Estas presentaciones morfológicas y de composición hacen pensar en la formación de precursores, uno de ellos: el Octacalcio Fosfato (OCP).(13)

### **MECANISMOS MOLECULARES DE LA FORMACIÓN DEL ESMALTE DENTAL.**

La forma y patrón de crecimiento de los cristales del esmalte, se puede interpretar como la evidencia de una fase precursora de Octacalcio Fosfato (OCP). Un cristal de OCP muestra sobre sus caras, una superficie que podría actuar como un molde para la precipitación de la hidroxiapatita (HAP). El OCP es menos estable que la HAP y puede hidrolizarse. Durante este proceso, una unidad celular de OCP es convertido en dos unidades celulares de HAP. Las proteínas en la matriz del esmalte, podrían amortiguar las concentraciones del ion Calcio (Ca) y de Hidrógeno (H), como una estrategia para impedir la precipitación de las fases sólidas de Ca y Fosfato en competencia. La tuftelina es una proteína ácida, que se concentra en la unión dentina esmalte y podría participar en la nucleación de los cristales del esmalte. Algunos análisis están de acuerdo con su

papel funcional de establecer y mantener el espacio entre los cristales del esmalte.(14)

### **PRECURSOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (FCE).**

El factor de crecimiento epidérmico (FCE) es comúnmente aceptado en la inducción de tejido cartilaginoso, óseo y dental. Hace varias décadas, un factor fue aislado de las glándulas salivares de roedor adulto, el cual inducía la erupción dental en ratones neonatos. Esta actividad biológica fue llamada factor de crecimiento epidérmico (Rall y col, 1985). El FCE no ha sido encontrado en embriones. Lo que es evidente es que el mRNA precursor del FCE y el producto protéico, son expresados tempranamente en tiempos y posiciones específicas durante el desarrollo craneofacial.(12)

### **ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE LA ALBÚMINA.**

Ciertas biomoléculas han sido implicadas para el control de la mineralización. La distribución de la albúmina desde el principio hasta el fin del desarrollo del esmalte, fue investigada utilizando un incisivo mandibular de ratón de laboratorio. La albúmina intacta fue detectada en todas las etapas del desarrollo del esmalte, pero ésta estuvo con mayor evidencia durante la etapa de transición temprana. Su concentración fue reducida posteriormente durante la maduración. Los productos de degradación de la albúmina aparecieron durante el estadio de maduración, indicando que la degradación de la albúmina precedió a su remoción. Como la albúmina inhibe el crecimiento de los cristales de apatita, su degradación y remoción, podría ser un prerrequisito necesario para el crecimiento normal de los cristales del esmalte. La albúmina podría, por eso, formar parte del control del proceso natural de crecimiento cristalino, y si ésta no es removida, podría impedir la maduración, y conllevar a hipoplasias de tipo manchas blancas.(15)

### **EFFECTOS DE LA ADRIAMICINA.**

Se ha encontrado que la exposición a la adriamicina en las primeras 2 horas de cultivo, no tuvo efecto sobre la biosíntesis total de la matriz

proteica. Sin embargo, se incrementó la cantidad de proteínas de la matriz del esmalte hidrosolubles (Amelogeninas). Por esto, parece ser que una exposición a la adriamicina, causa sobre los gérmenes dentales *in vitro*, una aceleración de la etapa secretoria de la amelogénesis. De otro lado, ésta también induce a las células pulpares para formar osteodentina.(16)

### **PERSPECTIVA EN EL ENTENDIMIENTO DE LOS FACTORES REGULADORES.**

El reto, es definir la expresión de los factores reguladores y de sus receptores, para discriminar entre las señales permisivas e instructivas, y para definir la secuencia molecular específica, de eventos requeridos para determinar irreversiblemente los fenotipos indispensables para la morfogénesis craneofacial. Las reglas aprendidas del desarrollo normal, podrían volverse extremadamente útiles hacia las aplicaciones clínicas.(12)

### **UTILIZANDO LOS FACTORES REGULADORES EN APLICACIONES CLÍNICAS.**

Los factores reguladores del crecimiento, participan en la reparación y regeneración de tejidos blandos y duros. Es fascinante considerar las posibilidades de identificar los factores de crecimiento pertinentes para la inducción de tejido cartilaginoso, óseo y dental y evaluar su aplicación en cirugía craneofacial clínica.(12)

En la década de los 60, Urist y col, descubrieron que la matriz orgánica del hueso desmineralizado, poseía una única actividad biológica para inducir nuevo hueso en tejidos de músculo esquelético (Urist, 1965; Urist y col, 1983). La matriz ósea contiene proteína ósea morfogenética (POM) (Urist y col, 1983). También es evidente que los tejidos dentales mineralizados contienen POM.(12) ¿Cuál es la identidad molecular para esta actividad biológica?, ¿Podría(n) esta(s) molécula(s) ser usadas para la inducción de cartilago, hueso y tejido dental?

### **ESTRUCTURAS DENTALES Y CONTROL DE LA FORMACIÓN DENTAL**

Actualmente se tiene que la expresión del mRNA del Factor 4 del crecimiento de fibroblastos (Fgf-4),

está estrictamente localizado en las células no mitóticas del brote del esmalte. Sin embargo, cuando la proteína Fgf-4 fue introducida en tejido dental aislado *in vitro*, ésta estimuló la proliferación de las células epiteliales y mesenquimales.

Basado en esto, se sugiere, que el brote del esmalte podría controlar la morfogénesis dental por medio de la estimulación del crecimiento cuspídeo (sintetizando el Fgf-4).(17)

### **DESARROLLO DENTAL IN VITRO**

Trescientos gérmenes dentales de molar de fetos de rata y conejo fueron cultivados *in vitro* por Glasstone (1936, 1938, 1952), desde el noveno día de gestación hasta 15 días después del nacimiento; y de fetos de rata por Lefkowitz y sus colegas (Lefkowitz, Mardfin y Bodecker, 1954; Lefkowitz y Swayne, 1956).(18)

Todos los cultivos de incisivos inferiores degeneraron luego de estar fijados entre 12 y 14 días *in vitro*. Los preameloblastos y los odontoblastos lograron diferenciarse y hubo una pequeña capa de dentina en la parte terminal anterior del germen dental y en la pulpa, dentina irregular había comenzado a formarse. Algunos gérmenes dentales mantuvieron su forma característica durante el cultivo, aunque frecuentemente se distorsionaron en gran magnitud. La diferenciación histológica, más lenta que *in vivo*, procedió normalmente, sólo hasta que toda una capa gruesa de dentina fue sintetizada. En este punto, la diferenciación *in vitro* frecuentemente se detuvo, aunque algunos cultivos permanecieron saludables por periodos mayores de 10 días después de que esta etapa fue alcanzada. Pocos gérmenes dentales se desarrollaron a una etapa más avanzada en la cual, un poco de esmalte fue producido. Se concluyó que 10 días de desarrollo *in vitro* es equivalente aproximadamente a 6 días de desarrollo *in vivo*.(18)

En unos pocos cultivos de molares inferiores, un poco de esmalte también fue formado. En algunos cultivos, sólo poco esmalte fue depositado. Muchos de los gérmenes de molar incrementaron considerablemente su tamaño. Los ameloblastos no mostraron signos de regresión incluso después de 21 días de cultivo. Las células del tejido conectivo no invadieron el retículo estrellado, y éste no se

degeneró.(20) En el 23% de los gérmenes dentales aislados después que una capa de dentina se había depositado, cierta cantidad de esmalte apareció en algunos cultivos. El desarrollo *in vitro* de gérmenes dentales ha confirmado las observaciones de investigaciones previas, en las cuales algunos dientes de mamíferos son capaces de continuar su desarrollo en una forma normal (Glasstone, 1954). El estudio de tejido injertado, generalmente se alcanza un estado más avanzado de diferenciación que en los cultivos *in vitro*. Una gruesa capa de esmalte, tal como nunca ha sido vista en los cultivos, se ha obtenido en los implantes, y esto se atribuye a la vascularización. Fleming (1952) dijo que un buen aporte sanguíneo, era necesario para la amelogenénesis en gérmenes dentales de ratón implantados. Se observó que el Ca juega un papel indispensable en la mineralización del esmalte *in vitro*.(18) Bajos niveles de Ca en el medio, evitaban la mineralización inicial de la dentina, y la formación del esmalte. Variaciones en la concentración de fosfato en el medio no mostraron afectar los cultivos adversamente. La exposición al flúor (F), tuvo efectos adversos sobre la mineralización del esmalte. Muchos de los cambios inducidos por el F en el órgano del esmalte fueron reversibles cuando el F fue removido del medio. Se cree que el F induce a una hipocalcemia local en el fluido del esmalte adyacente a los cristales, por medio de la estimulación de una hipermineralización de los cristales del esmalte preexistentes.(19)(20)

El cultivo de gérmenes dentales ofrece un método donde el proceso de desarrollo puede ser manipulado en condiciones controladas.(21) Sería posible transplantar gérmenes dentales de feto de una especie a otra, inmunosuprimiendo esta última, para impedir la reabsorción del diente transplantado ya formado en la nueva especie, sólo hasta que el diente se forme completamente y tenga un LPD normal?

### CRECIMIENTO DE CRISTALES.

Las interacciones entre amelogenina y minerales fueron investigadas *in vitro*. Las amelogeninas parcialmente degradadas y en formación están asociadas con los cristales. Así mismo, otras especies moleculares podrían estar involucradas junto con las amelogeninas. Robinson y col en 1992

mostraron que la albúmina, un componente no amelogenina o también llamado fracción "enamelina" (Robinson y col, 1989) podría inhibir el crecimiento de los cristales del esmalte *in vitro*.

El efecto protector de la amelogenina podría tener consecuencias clínicas. Si la albúmina en exceso entra al tejido debido a hiperemia una vez que la amelogenina ha sido removida, asociada por ejemplo con trauma mecánico, entonces el crecimiento cristalino final podría ser perjudicado. Esto podría llevar a la erupción de tejido inmaduro poroso blanco que explica muchas de las hipoplasias de mancha blanca vistas sobre dientes erupcionados.(11)

*In vitro*, se observó que las enamelinas fueron inhibidores considerablemente más potentes para el crecimiento de los cristales que las amelogeninas.(4)

### BIOMINERALIZACIÓN DEL ESMALTE IN VITRO EN AUSENCIA DE DENTINA MINERALIZADA.

Los ameloblastos *in vitro* pueden secretar y sintetizar matriz extracelular del esmalte mineralizada (MEM) en ausencia de algún cristal de dentina preexistente, con capacidad de nueva biomineralización, en ausencia de cristales de dentina preexistentes.(25)

Se tienen estudios que comprueban que las células epiteliales derivadas del ectodermo sintetizan y secretan proteínas del esmalte cuya función es servir de núcleos y de reguladoras de crecimiento de los cristales de fosfato de calcio del esmalte, independiente de la matriz de dentina adyacente. Los resultados indican que la nucleación y nuevo crecimiento de los cristales del esmalte son independientes del proceso de mineralización de la dentina.(26)

Algunos estudios han sugerido que los cristales iniciales del esmalte crecen y provienen de cristales de dentina preexistentes en la unión amelodental, mientras otros trabajos muestran que la mineralización del esmalte se lleva a cabo mediante las proteínas de la matriz del esmalte.(25) Se han detectado cristales iniciales del esmalte separados de la dentina adyacente.

## FUTURAS APLICACIONES CLÍNICAS.

Por medio de la investigación en este campo, tendremos la esperanza de controlar ameloblastos y sintetizar matriz protéica del esmalte en una cavidad formada en el tejido duro dental, y lograr que esta matriz se mineralize? Se podrían obtener ameloblastos artificiales y hacer que estos produzcan matriz del esmalte que posteriormente sea mineralizada *in vitro* o *in vivo* con Ca y fosfato procedente de fluidos corporales como sangre o saliva?

## CONCLUSIONES

1. Analizando los trabajos con gérmenes dentales y esmalte *in vitro*, se puede concluir que en última instancia los investigadores quieren obtener un método por medio de la cual sea posible generar matriz protéica del esmalte y su subsecuente mineralización en el laboratorio, es decir, crear estructuras con todas las características de los dientes de humanos completamente formados total o parcialmente *in vitro*.

2. Parece ser que la biología molecular y la manipulación genética son herramientas prometedoras para lograr "esmalte artificial".

3. Si esto se pudiera lograr, y hacia allá apuntan las investigaciones, las aplicaciones clínicas serían inmensas, y van desde poder ofrecerle a un paciente que por cualquier causa es edentado parcial o total, la posibilidad de adquirir un(os) implante(s) o trasplante(s) de gérmenes dentales cultivados *in vitro*, para que se desarrollen en su propia cavidad oral y tenga la posibilidad de volver a tener dientes en boca, reemplazando los faltantes como una alternativa menos invasiva, más biológica y estética que las que se tienen actualmente. Los alcances también pueden llegar a la creación de un material restaurador que tenga las mismas características bioquímicas y físicas del esmalte humano normal.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Iván Darío Jiménez Vargas que de manera directa y durante una charla suya me motivó para la

elaboración de esta monografía, así mismo, me ofreció orientación intelectual al inicio del trabajo.

A Mauricio Vélez que colaboró con la preparación del manuscrito.

A Lina María Congote, a mis padres y hermana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Deutsch, D; Catalano-Sherman, J; Dafni, L; David, S; Palmon, A. Enamel matrix proteins and ameloblast biology. *Connect-Tissue-Res* 1995; 97-107. Medline 1995.
2. Lau, E; Slavkin, H; Snead, M. Analysis of human enamel genes: Insights into genetic disorders of enamel. *Cleft Palate Journal* 1990; 27: 121-130.
3. Li, R; Li, W; DenBesten, P. Alternative splicing of amelogenin mRNA from rat incisors ameloblasts. *J Dent Res* 1995; 74: 1880-1885.
4. Doi, Y; Eanes, E; Shimokawa, H; Termine, J. Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and enamelin proteins *in vitro*. *J Dent Res* 1984; 63: 98-105.
5. Aoba, T; Tanabe, T; Moreno, E. Function of amelogenins in porcine enamel mineralization during the secretory stage of amelogenesis. *Adv Dent Res* 1987; 1: 252-260.
6. Termine, J; Torchia, D; Conn, K. Enamel matrix: Structural proteins. *J Dent Res* 1979; 58: 773-778.
7. Snead, M; Lau, E. Examining the possible molecular origins for enamel protein complexity. *Adv Dent Res* 1987; 1: 298-305.
8. Moradian-Oldak, J; Lau, E; Diekwisch, T; Slavkin, H; Fincham, A. Amelogenin aggregation *in vitro* compared to an enamel extracellular matrix structure. *J Dent Res* 1994; 73: 112.
9. Catalano-Sherman, J; Palmon, A; Burstein, Y; Deutsch, D. Amino acid sequence of a major human amelogenin protein employing Edman degradation and cDNA sequencing. *J Dent Res* 1993; 72: 1566-1572.
10. Salido, E; Yen, P; Koprivnikar, K; Yu, L; Shapiro, L. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 303-316.

11. Robinson, C; Brookes, S; Kirkham, J; Bonass, W; Shore, R. Crystal growth in dental enamel: The role of amelogenins and albumin. *Adv Dent Res* 1996; 10: 173-180.

12. Slavkin, H. Regulatory issues during early cranio-facial development: A summary. *Cleft Palate Journal* 1990; 27: 101-109.

13. Aoba, T. Recent observations on enamel crystal formation during mammalian amelogenesis. *Anat Rec* 1996; 245: 208-218. Medline 1996.

14. Simmer, J; Fincham, A. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 84-108. Medline 1995.

15. Robinson, C; Brookes, S; Kirkham, J; Shore, R; Bonass, W. Uptake and metabolism of albumin by rodent incisor enamel *in vivo* and *postmortem*: Implications for control of mineralization by albumin. *Calcif Tissue Int* 1994; 55: 467-472. Medline 1994.

16. Karim, A; Bervoets, T; Lyaruu, D; Woltgens, J; Bronckers, A. The effects of adriamycin on dental proteins formation and mineralization *in vitro*. *Exp Toxicol Pathol* 1993; 45: 41-46. Medline 1993.

17. Jernvall, J; Kettunen, P; Karavanova, I; Martin, L; Thesleff, I. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 463-469. Medline 1994.

18. Hay, M. The development *in vivo* and *in vitro* of the lower incisor and molars of the mouse. *Arch Oral Biol* 1961; 3: 86-109.

19. Woltgens, J; Lyaruu, D; Bronckers, A; Bervoets, T; Van-Duin, M. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 203-212. Medline 1995.

20. Simmelink, J. Mode of enamel matrix secretion. *J Dent Res* 1982; 61: 1483-1488.

21. Kjoelby, M; Thesleff, I; Sahlberg, C; Fejerskov, O; Josephsen, K. Degradation of the dental basement membrane during mouse tooth development *in vitro*. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 455-462. Medline 1994.

22. Takano, Y. Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res* 1995; 33: 127-137. Medline 1995.

23. Robinson, C; Kirkham, J; Brookes, S; Bonass, W; Shore, R. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 145-152. Medline 1995.

24. Ishikawa, K; Eanes, E; Tung, M. The effect of supersaturation on apatite crystal formation in aqueous solutions at physiologic pH and temperature. *J Dent Res* 1994; 73: 1462-1469. Medline 1994.

25. Macdougall, M; Thiemann, F; Diekwisch, T. Enamel biomineralization *in vitro* in the absence of mineralized dentin. *J Dent Res* 1994; 73: 112.

26. Berman, B; Gentner, S; Slavkin, H. Initial enamel crystals are not associated with mineralized dentine. *J Dent Res* 1994; 73: 112.

27. Diekwisch, T; Berman, B; Gentner, S; Slavkin, H. Initial enamel crystals are not spatially associated with mineralized dentine. *Cell Tissue Res* 1995; 279: 149-167. Medline 1995.

28. Kukita, A; Harada, H; Kukita, T; Inai, T; Matsushashi, S; Kurisu, K. Primary and secondary culture of rat ameloblasts in serum-free medium. *Calcif Tissue Int* 1992; 51: 393-398. Medline 1992.

29. Palmon, A; Laskov, R; Deutsch, D. cDNA cloning of human amelogenin. *J Dent Res* Vol 69: 1033.

30. Shimokawa, H; Sasaki, S. Study on the biosynthesis of bovine enamel protein *in vitro*. *J Dent Res* 1978; 57: 133-138.

31. Fukae, M; Tanabe, T; Uchida, T; Yamakoshi, Y; Shimizu, M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 257-261. Medline 1993.

32. Slavkin, H; Zeichner-David, M; Macdougall, M; Bessem, C; Bringas, P; Honig, L; Lussky, J; Vides, J. Enamel gene products during murine amelogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J Dent Res* 1982; 61: 1467-1471.

33. Nishikawa, S; Sasaki, S. DNA localization in nuclear fragments of apoptotic ameloblasts using anti-DNA immunoelectron microscopy: programmed cell death of ameloblasts. *Histochem cell Biol* 1995; 104: 151-159. Medline 1996.

Correspondencia:  
Germán Andrés Trujillo Ocampo  
Calle 48C # 67-83  
Medellín, Colombia  
Correo Electrónico: germantrujillo@usa.net