

Estudio de la proliferación celular en gérmenes dentarios humanos

Cell proliferation study in human tooth germs

Vanesa Pereira-Prado¹, Gabriela Vigil-Bastitta², Estefania Sicco³, Ronell Bologna-Molina⁴, Gabriel Tapia-Repetto⁵

DOI: 10.22592/ode2018n32a10

Resumen

El objetivo de este estudio fue conocer la expresión de MCM4-5-6 en gérmenes dentarios humanos en estado de campana. **Materiales y Métodos:** Se obtuvieron preparados histológicos de 4 maxilares fetales incluidos en parafina en el archivo de bloques de la cátedra de Histología de la Facultad de Odontología, UdelaR. Se procedió al corte de los mismos en secciones para técnica de rutina (HE) y de IHQ para MCM 4, 5 y 6. **Resultados:** Las diferentes regiones del órgano del esmalte mostraron 100 % de positividad en el estrato intermedio, una variación de 100 % a 0 % en el epitelio interno del órgano del esmalte, desde el sector cervical al sector incisal del mismo, y 0% tanto en el retículo estrellado como en el epitelio externo del órgano del esmalte. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos permitieron evidenciar y confirmar la acción proliferativa de las diferentes zonas del órgano del esmalte.

Abstract

The aim of this study was to determine the expression of MCM4-5-6 in human tooth germs in the bell stage. **Materials and Methods:** Histological samples were collected from four fetal maxillae placed in paraffin at the block archive of the Histology Department of the School of Dentistry, UdelaR. Sections were made for HE routine technique and for immunohistochemistry technique for MCM4-5-6. **Results:** Different regions of the enamel organ showed 100% positivity in the intermediate layer, a variation from 100% to 0% in the inner epithelium from the cervical loop to the incisal area, and 0% in the stellar reticulum as well as the outer epithelium. **Conclusions:** The results show and confirm the proliferative action of the different areas of the enamel organ.

Palabras clave: MCM4, MCM5, MCM6, germen dentario, proliferación celular.

Keywords: MCM4, MCM5, MCM6, tooth germ, cell proliferation.

- 1 Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0001-7747-671
- 2 Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0002-0617-1279
- 3 Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0003-1137-6866
- 4 Área de Patología Molecular Estomatológica, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0001-9755-4779
- 5 Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de la República, Uruguay. ORCID: 0000-0003-4563-9142

Introducción

La organogénesis dental es un proceso que implica una amplia gama de funciones celulares en las cuales se involucran de manera alternada la participación de los elementos ectomesenquimáticos y epiteliales, representados por la papila dental y el órgano del esmalte respectivamente⁽¹⁾. Durante el transcurso del desarrollo dental existen diversas etapas en las cuales el germen pasa por diferentes estadios morfológicos, estas etapas incluyen el brote, el casquete y la campana temprana y avanzada¹. Desde el punto de vista estructural, el germen dentario presenta tres sectores, dos de ellos de origen ectomesenquimático (la papila y el folículo o saco dental), y uno epitelial (el órgano del esmalte)⁽²⁾. La papila dental es responsable de la formación de la pulpa y la dentina, tanto coronaria como radicular; por su parte el saco o folículo dental se encarga del desarrollo de los componentes del paradencio profundo y de los elementos conectivos del paradencio superficial; por último, el órgano del esmalte participa en la formación del esmalte, en especial a punto de partida del epitelio interno⁽³⁾. Todos estos procesos fisiológicos se dan, entre otras cosas, por la proliferación celular, producto del incremento del número de células, resultado de la división celular⁽⁴⁾.

Existen diversos marcadores de proliferación celular, dentro de los cuales encontramos al complejo MCM 2-7 (minichromosome maintenance)⁽⁵⁾. El complejo MCM2-7 está compuesto por 6 proteínas diferentes (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7) y forma parte del complejo pre-replicativo del ciclo celular, por lo que tiene un rol esencial en la replicación del ADN^(6,7). Una de sus funciones consiste en dar inicio a la replicación, permitiendo que ésta se dé en el momento oportuno, para lo cual el complejo debe cambiar su estructura tridimensional. El complejo MCM2-7 en estado inactivo presenta una discontinuidad reversible de su estructura toroidal; al unirse las proteínas MCM2 y MCM5 éstas cierran dicha discontinuidad permitiendo la activación de

todo el complejo^(8,9). Entre otras de sus funciones encontramos su rol helicasa⁽¹⁰⁾, detiene la replicación⁽¹¹⁾, cuida que todo el ADN sea replicado⁽¹²⁾, y evita la replicación del ADN más de una vez en un mismo ciclo celular⁽¹³⁾. Las proteínas de este complejo se expresan durante todo el ciclo celular desde la fase G1 temprana en adelante, así como en células con potencial proliferativo, pero están ausentes en células quiescentes (G0)⁽¹⁴⁾.

Este trabajo tiene como objetivo conocer la actividad proliferativa de los gérmenes dentarios humanos en estadio de campana mediante la expresión de moléculas del complejo MCM 4-5-6 en el epitelio externo, retículo estrellado, estrato intermedio y epitelio interno del órgano del esmalte.

Materiales y métodos

Se estudiaron 8 gérmenes dentarios humanos clasificados en estadio campana, provenientes del archivo de la Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de la República (FO – UdelaR), Uruguay. Los mismos se obtuvieron de 4 maxilares fetales incluidos en bloques de parafina de entre 17 y 24 semanas de desarrollo, los cual figuran como procesados en el año 1970. Estos fueron cortados con micrótopo de precisión, en cortes de 4 micras y montados en láminas silanizadas. Se realizó un corte por muestra para ser coloreados con la técnica de Hematoxilina Eosina, así como 3 cortes para la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para las proteínas MCM 4-5-6.

Para la técnica de inmunohistoquímica los cortes fueron desparafinados en estufa a 60°C por 60 min y posteriormente colocados en xilol durante 5 minutos. Luego se hidrataron en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 90, 80%, 70% y 50%) y dos lavados con agua destilada. Para el desmascaramiento de los epítopes se realizó la recuperación antigénica con solución de citrato de sodio 10mM (pH 6.2) en olla a presión en

microondas a potencia máxima (750 W) por 6 min., dejando enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se enjuago con agua destilada. Las peroxidasa endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno al 0.9% durante 5min., seguidos por lavados con agua destilada y solución salina amortiguada de fosfatos pH 7.4 (PBS). Se montaron las laminillas en placas de cubiertas y se colocaron en bastidores para la realización de inmunohistoquímica por capilaridad. Se incubaron los anticuerpos primarios monoclonales contra MCM 4, 5, 6 (Leica Biosystems, Newcastle, UK, dilución 1:100) por un período de 45 min. Posteriormente, los cortes fueron incubados con el segundo anticuerpo biotinilado anti-ratón/anti-conejo y con el complejo streptavidina/peroxidasa (LSA-B + Labeled streptavidin-biotin, Dako Corporation, Carpinteria CA, USA) por 30 min, cada uno. Los productos de la reacción fueron visualizados con sustrato de 3,3'-diaminobenzidina-H₂O₂ (Dako Corporation, Carpintería, CA, USA). Las secciones fueron contra teñidas con hematoxilina de Mayer. Se utilizó como testigos preparados de ameloblastomas.

Se realizó el conteo de células positivas en el epitelio externo, retículo estrellado y estrato intermedio, así como en los tercios cervical, medio y apical del epitelio interno del órgano del esmalte acorde al método descrito por Bologna y colaboradores⁽¹⁵⁾.

La evaluación de la expresión de cada anticuerpo fue realizada en áreas seleccionadas ricas en células epiteliales. Se tomaron 5 microfotografías por caso, a 40x en cada campo, con un microscopio de Luz marca Olympus®. La imagen fue convertida en archivo JPEG. Cada archivo fue abierto con el uso del programa de Microsoft Power Point y con el uso de la función tabla, se creó una tabla de 10x10 que fue superpuesta en la imagen de la microfotografía para facilitar el conteo. El número de células positivas y negativas fueron contadas manualmente. Se realizó una regla de tres (el total de células positivas

x100/el total de células). El porcentaje de células positivas fue calculado para cada campo.

Resultados

Una vez analizados los preparados se observó que la distribución de la positividad de las células en cada uno de los tercios del epitelio interno del órgano del esmalte es uniforme para todos los componentes del complejo MCM estudiados (Fig.1).

Sin embargo, la expresión de estos marcadores de proliferación celular está ausente en las células del epitelio externo del órgano del esmalte y del retículo estrellado, presentando un 100 % de positividad en las células del estrato intermedio.

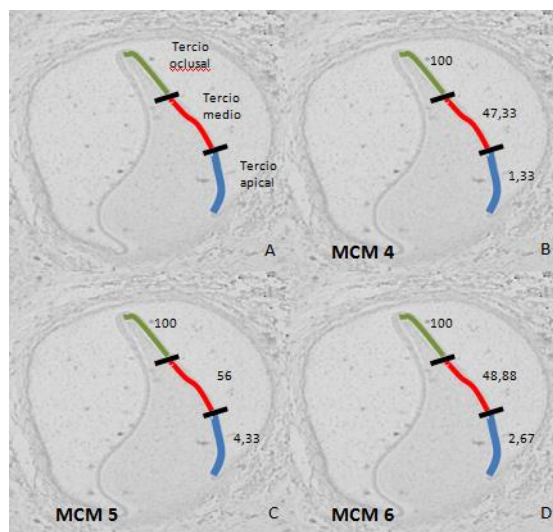


Fig. 1 – En la imagen se observa la forma en que fueron sistematizadas las áreas del epitelio interno (A). Porcentaje promedio de células marcadas positivamente en cada uno de los sectores del epitelio interno del órgano del esmalte de los gérmenes estudiados para MCM 4 (B), MCM 5 (C) y MCM 6 (D).

Aumento 10x.

La porción periférica de la papila dental presenta una distribución inversa para los tres marcadores, mostrando un gradiente de menor tasa de proliferación en la porción cervical de la pa-

pila, algo mayor en el tercio medio y una alta tasa de positividad celular en el tercio incisal u oclusal (Figs. 2 y 3).



Fig. 2. Panorámica del germen dentario en estado de campana. Se observa la inmunoexpresión de MCM4, positiva en la región interna del órgano del esmalte, y negativa en la región del epitelio externo. Aumento 10x.

Discusión

La inmunodetección de proteínas involucradas en el proceso de proliferación celular se realiza de forma rutinaria utilizando biomarcadores como Ki-67 que es considerado el Gold standard⁽¹⁶⁾. En este trabajo se propone por primera vez identificar 3 marcadores de proliferación celular no estudiados hasta ahora en gérmenes dentarios, MCM4, 5 y 6. Una de las diferencias de este complejo con la proteína Ki-67, entre otras, radica en que la proteína Ki-67 no se expresa en la etapa temprana de G1 sino que a partir de G1 tardía, y continúa durante todo el ciclo celular, exceptuando en células quiescentes (G0). Las moléculas del complejo MCM se expresan incluso en G1 temprana, siendo consideradas más sensibles en cuanto a su detección molecular⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

Estudios previos realizados por Muica et al. 2014 determinaron que la expresión de KI-67 decrece con el avance de las etapas del desarrollo dental en todos los tejidos y estratos que componen al germen dental⁽¹⁹⁾. Kero et al. apoyan estos resultados tras su estudio realizado en el mismo año, en donde determinan que el aumento de la proliferación celular permite el crecimiento del órgano del esmalte, mientras que su disminución selectiva en los diferentes componentes del germen conlleva a la desin-



Fig. 3. Inmunoexpresión de MCM6 en la región interna del órgano del esmalte, donde podemos observar los gradientes de positividad en el epitelio interno a nivel cervical (A), medio (B) y cúspideo (C). En los tres sectores existe casi un 100% de positividad a nivel de las células del estrato intermedio (flecha). Aumento 40x.

tegración de determinadas estructuras dentales⁽²⁰⁾. La caída del índice de proliferación celular coincide con el inicio de la diferenciación de ameloblastos y odontoblastos⁽²⁰⁾. A su vez, se distingue que cada capa celular que compone el germen dental exhibe una actividad proliferativa específica. El índice de proliferación del epitelio interno del órgano del esmalte y la papila dental marcan su pico máximo en la semana 14, cayendo en la semana 21 durante el estado de campana tardía, coincidiendo con la aparición del esmalte maduro en la región coronal, o diferenciación ameloblastica-odontoblástica⁽²⁰⁾. Por otra parte, tanto el epitelio externo como el retículo estrellado mostraron una disminución constante en la actividad proliferativa a lo largo de esta fase. La distribución de las células proliferantes se mostró más uniformes a nivel de la papilla dental en todas las etapas estudiadas, comparado con el resto de las capas celulares⁽²⁰⁾. Comparando nuestros resultados con los estudios citados, observamos que en nuestro estudio hay una disminución gradual del porcentaje de MCM4, 5 y 6 en el epitelio interno del órgano del esmalte, lo cual podría estar marcando un descenso en la proliferación para favorecer la desintegración selectiva dentaria, permitiendo pasar a un estado más maduro del tejido, coincidiendo con la diferenciación de los ameloblastos y odontoblastos. Esto se acompaña de igual forma con la expresión negativa de los marcadores a nivel del epitelio externo y el retículo estrellado.

Tomando en cuenta que a pesar de que los marcadores MCM son más sensibles en determinados tejidos comparados con la acción de Ki-67^(17, 18) consideramos que estos estudios son comparables con nuestros resultados.

Estudios basados en los patrones de invaginación de la vaina radicular epitelial de Hertwig y la formación radicular mesial así como la formación de la bifurcación dental, determinan que estas regiones se correlacionan con la condensación de células mesenquimales altamente proliferativas, observando a nivel de molares

que el porcentaje de Ki-67 era el doble comparando las zonas de raíz mesial con la bifurcación, sugiriendo que la proliferación pulpar induce la migración epitelial en esta etapa⁽²¹⁻²²⁾. Por lo tanto, basándonos en nuestros resultados, en donde la positividad de expresión de estas tres proteínas del complejo MCM decrece, siendo 100% a nivel incisal, pasando por 47-56% a nivel medio y llegando a valores de 1,33-4,33% a nivel cervical en la etapa de campana, nos conlleva a pensar que a medida que avanzan las fases de la odontogénesis conjuntamente con la diferenciación celular, los diferentes estratos de formación dentaria expresan sus niveles de proliferación celular de manera diferencial, con una inducción epitelio-mesenquimal, para concluir con el desarrollo normal de las piezas dentales.

Conclusiones

De acuerdo con los datos obtenidos podemos considerar a las proteínas del complejo MCM 4, 5 y 6 como indicadoras de la actividad proliferativa en el proceso de Odontogénesis. Nuestros hallazgos permiten evidenciar un gradiente de concentraciones de estas moléculas con diferencias marcadas entre las regiones cervical, medio y cusplídea del epitelio interno del órgano del esmalte, lo cual se condice con la actividad celular descrita por diversos autores en la bibliografía. Dicha evidencia se constata a sí mismo en las células de la papila dental donde debemos continuar profundizando en el estudio de la misma.

Referencias

1. Mass R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1997; 8 (1): 4-39.
2. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology*. 8th. ed. London: Elsevier, 2013.
3. Thesleff I, Keränen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogene-

- sis and odontoblast differentiation. *Adv. Dent. Res.* 2001; 15: 14-18.
4. Alver RC, Chadha GS, Blow JJ. The contribution of dormant origins to genome stability: from cell biology to human genetics. *DNA Repair.* 2014; 19 (100): 182-9.
 5. Forsburg SL. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68 (1), 109-131.
 6. Laskey R. The Croonian Lecture 2001 hunting the antisocial cancer cell: MCM proteins and their exploitation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005; 360 (1458): 1119-1132.
 7. Simon NE, Schwacha A. The MCM2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *BioMed Research International.* 2014; 2014: 14.
 8. Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature.* 2007; 445 (7125): 328.
 9. Zegerman P, Diffley JF. DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint. *DNA repair (Amst).* 2009; 8 (9): 1077-1088.
 10. Byun TS, Pacek M, Yee MC, Walter JC, Cimprich KA. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 2005; 19 (9): 1040-1052.
 11. Cortez D, Glick G, Elledge SJ. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 (27): 10078-10083.
 12. Zhai Y, Li N, Jiang H, Huang X, Gao N, Tye BK. Unique Roles of the Non-identical MCM Subunits in DNA Replication Licensing. *Mol Cell.* 2017; 20;67(2): 168-179.
 13. Deegan TD, Diffley JF. MCM: one ring to rule them all. *Curr Opin Struct Biol.* 2016; 37: 145-51.
 14. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon HJ, Kimura H, Yamada K, Song SY. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem.* 2003; 270 (6): 1089-1101.
 15. Bologna-Molina R, Damián-Matsumura P, Molina-Frechero N. An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology.* 2011; 59 (4): 801-3.
 16. Pontes HA, Pontes FS, Silva BS, Cury SE, Fonseca FP, Salim RA, Pintor Júnior Ddos S. Immunoeexpression of ki67, proliferative cell nuclear antigen, and Bcl-2 proteins in a case of ameloblastic fibrosarcoma. *Ann Diagn Pathol.* 2010; 14 (6): 447-52.
 17. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182: 311-22.33.
 18. Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, Ito H. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32 (8): 468-74. 34.
 19. Muica Nagy-Bota MC, Pap Z, Denes L, Ghizdavăț A, Brînzaniuc K, LupCoșarcă AS, Chibelea Cires-Mărginean M, Păcurar M, Pávai Z. Immunohistochemical study of Ki67, CD34 and p53 expression in human tooth buds. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55 (1):43-8.
 20. Kero D, Govorko D K, Vukojevic K, Cubela M, Soljic V, Saraga-Babic M. Expression of cytokeratin 8, vimentin, syndecan-1 and Ki-67 during human tooth development. *Journal of molecular histology,* 2014; 45 (6): 627-640.
 21. Sohn WJ, Choi MA, Yamamoto H, Lee S, Lee Y, Jung JK, Jin MU, An CH, Jung HS, Suh JY, Shin HI, Kim JY. Contribution of Mesenchymal Proliferation in tooth root Morphogenesis. *J Dent Res.* 2014; 93 (1): 78-83.
 22. Iwamoto T, Nakamura T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Sugimoto A, Ida-Yonemochi H, Masahiro Saito, Yoshihiko Yamada, Satoshi Fukumoto. Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177557>

Vanesa Pereira: vanesapereira91@hotmail.com

Fecha de recibido: 14.05.2018- Fecha de aceptado: 09.08.2018