



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**FENOTIPO DENTARIO Y DEL HUESO MANDIBULAR EN RATONES
TRANSGÉNICOS CON SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN Runx2**

**AUTORA: MARXLENIN CONTRERAS G.
C.I: V- 15743551**

VALENCIA, NOVIEMBRE 2014



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**FENOTIPO DENTARIO Y DEL HUESO MANDIBULAR EN RATONES
TRANSGÉNICOS CON SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN Runx2**

Trabajo de Grado presentado para optar al Título de Magister en Biología Oral

AUTORA: MARXLENIN CONTRERAS G.

TUTOR: DOMINIQUE HOTTON

VALENCIA, NOVIEMBRE 2014

AVAL DEL TUTOR

Dando cumplimiento a lo establecido en el reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo en su artículo 133, quien suscribe **DOMINIQUE HOTTON**, titular del pasaporte N° **08CI38414**, en mi carácter de Tutor del Trabajo de Magister titulado: **FENOTIPO DENTARIO Y DEL HUESO MANDIBULAR EN RATONES TRANSGÉNICOS CON SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN Runx2** Presentado por la ciudadana **MARXLENIN F. CONTRERAS G.** Titular de la Cédula de Identidad N° **V-15.743.551**, para optar por el título de **MAGISTER EN BIOLOGÍA ORAL**, hago constar que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En Valencia a los cinco días del mes de Agosto del año Dos Mil Catorce.

DOMINIQUE HOTTON

Pasaporte N° **08CI38414**

Dedicatoria:

A mi papá Dios, autor de mis sueños y logros.

A mis padres Florencio y Ana, mis primeros amores.

A mi Rebe, mi mejor amiga en el mundo, mi amor chiquito, por ti seguiré sembrando y cosechando.

A Rommel, por tu significativo apoyo y paciencia, siempre agradecida.

A Daisy, María Cristina y Maribel, sin nuestros momentos de compañerismo, complicidad y motivación, no habría sido posible este fruto.

En agradecimiento por su contribución:

Al Dr. Marco Tulio Mérida, mi papá académico, por creer en mí, darme a conocer éste sueño suyo y hacerme parte él aún antes de que se convirtiera en realidad.

Al Dr. Dominique Hotton y la Dra. Alba Bolaños, quienes confiaron en mis manos el desarrollo de éste tema. Por su acompañamiento y lo que he aprendido de ustedes dentro y fuera del marco de la Maestría. Los quiero y respeto como mi familia.

A los valiosos profesores de la Maestría en Biología Oral, todos expertos, dedicados, y con mucho amor por lo que aportaban, **especialmente a la Prof. Emilia Barrios y al Prof. Cirilo Orozco**, cada uno con su estilo y en su área fueron los más grandes motivadores al aprendizaje y a la excelencia.

Al **INSERM**, U 606, Hôpital Lariboisière, al Physiopathologie Orale Moleculaire, Cordeliers Research Center, y a las investigadoras **Valerie Geoffroy y Ariane Berdal** por su valioso aporte con antecedentes, especímenes de estudio y materiales usados en la investigación.

A **UNIMPA, BIOMOLP y al CIMBUC** por prestarnos no solo su infraestructura, sino además su tiempo y colaboración.

A mi **Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo** y a la **Comisión Coordinadora de la Maestría en Biología Oral** por sus valiosos esfuerzos para encaminar a nuestra primera cohorte en el logro de ésta meta.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
Genética y Biología Oral	4
Runx2: Generalidades y Hallazgos en Huesos y Cartílagos	5
Runx2 y Tejido Dentario	7
Características anatómicas mandibulares	9
Objetivos	
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS	10
Naturaleza, tipo y diseño de investigación	10
Animales de experimentación	11
Técnica histológica	12
Tinción Van Gieson	13
III. RESULTADOS	14
Ratones WT y Runx2 TG de 7 días	14
Ratones WT y Runx2 TG de 15 días	16
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	18
V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL



**FENOTIPO DENTARIO Y DEL HUESO MANDIBULAR EN RATONES
 TRANSGÉNICOS CON SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN Runx2**

RESUMEN

En el campo de la genética se ha hecho necesaria la profundización de sus hallazgos para dar respuesta a las interrogantes que emergen y las necesidades terapéuticas que persisten. En concordancia, el fenotipo del esqueleto de ratones de la línea transgénica Runx2 se considera un buen modelo para el estudio de la osteoporosis por la vinculación de éste gen con el aumento de los espacios medulares, adelgazamiento del hueso cortical y disminución de la densidad ósea. Sin embargo, en el estudio del fenotipo dentario apenas se han dado los primeros adelantos, surgiendo la necesidad de comprobar la hipótesis de que la modificación del gen Runx2 podría determinar cambios a nivel de la estructura dentaria y del hueso alveolar. Se planteó como objetivo general comparar el fenotipo dentario y del hueso mandibular entre ratones transgénicos con sobreexpresión del gen Runx2 y ratones WT de 7 y 15 días de nacidos. Para tal efecto se realizó una investigación descriptiva-explicativa, preexperimental en la modalidad ex post facto, en la que se procesaron las muestras mediante técnica histológica convencional y tinción Van Gieson, concluyéndose que la sobreexpresión de Runx2 se manifiesta en mandíbula mediante una marcada actividad osteoclástica en el interior de los espacios medulares, y una leve disminución de la expresión de colágeno dentinario, afectando la mineralización de éstas estructuras. Tal hallazgo genera un importante aporte al estudio de malformaciones dentarias y mandibulares como punto de interés científico de la biología oral.

Palabras Clave: Biología Oral, Fenotipo Dentario, Gen Runx2, Medicina Bucal.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**DENTAL AND MANDIBULAR PHENOTYPE IN TRANSGENIC MICE WITH
OVEREXPRESSION OF Runx2 GENE**

ABSTRACT

In the field of genetics it has been necessary to deepen their findings, to answer the questions that emerge and the therapeutic needs that persist. In this sense, the skeletal phenotype of transgenic mice of line Runx2 is considered a good model to study osteoporosis by linking this gene with increased marrow spaces, cortical thinning and reduction of bone density. However, in the study of dental phenotype, have barely taken the first advances, with the need to test the hypothesis that modification of Runx2 gene could lead to changes at the level of the tooth and bone structures. In the context of this research, the general objective was to compare the dental and mandibular bone phenotype between transgenic mice with overexpression of Runx2 gene and WT mice with 7 and 15 days old. For this purpose a descriptive-explanatory and pre-experimental research was conducted in the form ex post facto, in which the samples were processed by conventional histological technique and Van Gieson staining; concluding that overexpression of Runx2 could manifest with change in the amount of dentin collagen and increased osteoclast activity within the marrow spaces of the jaw, affecting these structures mineralization. Such a finding generates an important contribution to the study of dental and mandibular malformations as scientific landmark oral biology.

Keywords: Oral Biology, Dental Phenotype, Runx2 Gene, Oral Medicine.

I. INTRODUCCIÓN

En el marco de la investigación genética y de los potenciales alcances que puedan derivarse de sus descubrimientos, ha surgido un intenso movimiento científico en torno a la búsqueda de hallazgos que permitan conocer la base molecular de muchas enfermedades hereditarias, lograr acertados diagnósticos clínicos, presintomáticos o prenatales, e incluso el logro de tratamientos específicos y eficaces para dolencias de base genética. En tal sentido, desde la década de los ochenta se agudizó la búsqueda de respuestas en ésta disciplina, hasta consolidarse en 1990 el lanzamiento del Proyecto Genoma Humano (PGH), cuyo objetivo fundamental fue determinar la secuencia de pares de bases químicas que componen el ADN e identificar y cartografiar los aproximadamente 30.000 genes del genoma humano desde un punto de vista físico y funcional, lo cual generó la posibilidad de avanzar en la terapia génica, facilitar la terapia farmacológica e incursionar en la medicina predictiva, entre otros adelantos.

En función del propósito informativo de la investigación, cabe aclarar algunos términos implicados en la argumentación del mismo. Por ejemplo, en biología y ciencias de la salud, se denomina fenotipo a la manifestación visible del genotipo en un determinado ambiente, en efecto, algunos fenotipos están determinados por múltiples genes, y además influenciados por factores del medio ambiente, por lo que la identidad de uno, o de unos pocos alelos conocidos, no siempre permite la predicción del fenotipo.

En ese sentido, la familia de genes Runx en mamíferos, que incluye a Runx1, Runx2 y Runx3, codifican factores de transcripción con funciones específicas, que los hacen esenciales para el desarrollo embrionario adecuado de determinados tejidos,

como ha sido evidenciado en modelos de ratones knockout de éstos genes. Runx1, por ejemplo, es esencial para la hematopoyesis definitiva. Runx2, objeto de éste estudio, se requiere tanto para el desarrollo de huesos y para la morfogénesis dental, y el Runx3 interviene en la regulación del crecimiento celular del epitelio gástrico y la neurogénesis de los ganglios de la raíz dorsal⁽¹⁾.

En razón de lo anterior, las propiedades antiproliferativas de Runx2 en el contexto óseo tienen relación con las propiedades antiproliferativas descritas para los otros miembros de la familia Runx, por ejemplo, se ha observado en líneas celulares de cáncer de colon y de cáncer gástrico que hay falta de expresión de Runx3, explicada por la hipermetilación de su promotor; también que deleciones, mutaciones y translocaciones de Runx1 y Runx3 se relacionan con leucemia mielógena aguda y cáncer gástrico respectivamente ⁽²⁾.

En ese orden de ideas, el gen Runx2, anteriormente conocido como Cbfa1 (por sus siglas en inglés Core binding factor α 1), ha sido objeto de diversos estudios en las últimas dos década reseñados por Geoffroy⁽³⁾, en los que se ha podido comprobar funciones específicas como la activación transcripcional de la diferenciación de los osteoblastos, su expresión en la condensación mesenquimática que tiene lugar en las etapas tempranas del desarrollo (alrededor del día 11 postconcepción), y su acción como factor de regulación de la expresión de proteínas de la matriz ósea y de los condrocitos prehipertróficos. Además, se ha demostrado que el gen Runx2 desarrolla un papel importante en la invasión vascular del cartílago⁽⁴⁾.

Dado lo anterior, resulta evidente la función clave del gen Runx2 en ambos procesos de formación ósea, intramembranosa y endocondrial, lo cual ha sido corroborado por varios autores en diversos países, cuyos aportes serán detallados durante el desarrollo del trabajo.

Con respecto a la intervención de Runx2 en el desarrollo de las estructuras dentarias, se han publicado algunos estudios que intentan esclarecer, los mecanismos mediante los cuales éste importante factor de transcripción regula y conduce la morfogénesis y diferenciación del epitelio y mesénquima que dan origen a esmalte, dentina, cemento, ligamento periodontal y hueso mandibular, especialmente con algunas técnicas particulares de biología molecular (cultivo de tejidos, hibridación in situ, análisis por PCR, análisis enzimático, entre otras). Al respecto, se considera de interés para contribuir con aportes en esta línea de investigación, responder las siguientes interrogantes:

¿Qué técnicas y vías de indagación permitiría precisar algunas consecuencias de variación de tejidos bucales debidas a la modificación del gen Runx2?

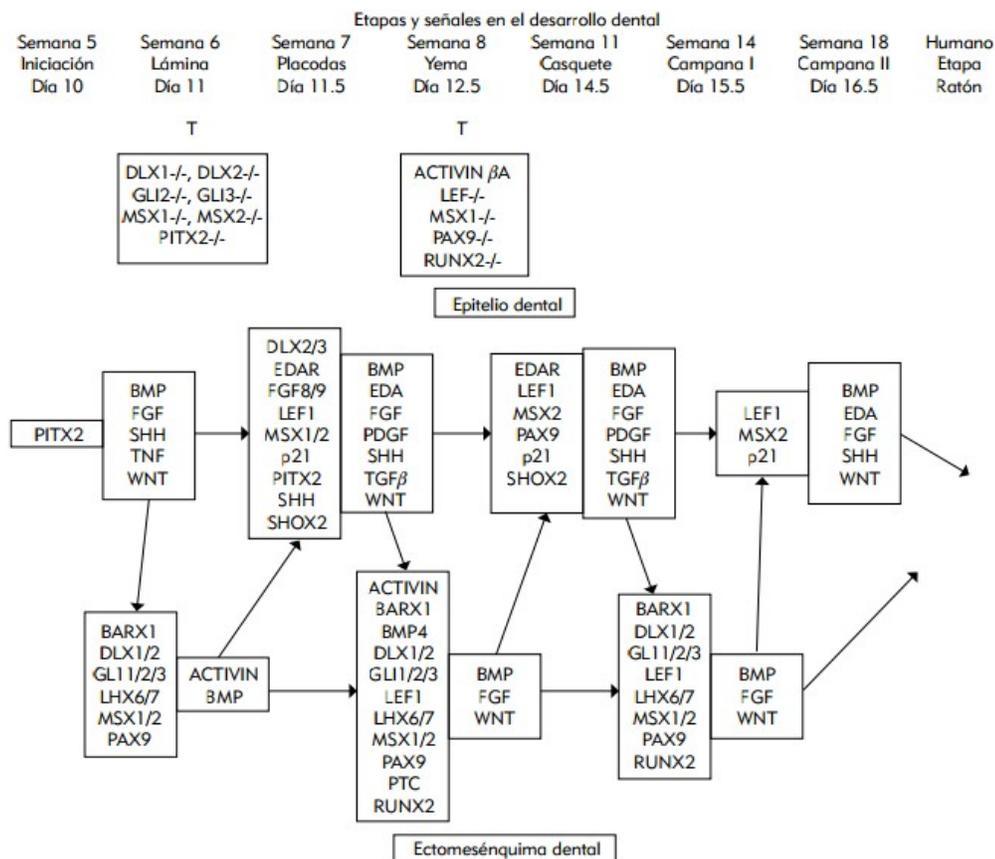
¿Cuáles variaciones morfogénicas determinará el gen Runx2 en el fenotipo de las estructuras dentarias y de hueso alveolar mandibular?

En tal sentido, el propósito de la investigación giró en torno a la necesidad de argumentar un discurso de actualización del tema con el fin de aplicar, con conocimiento de causa, algunos procedimientos destinados a complementar una descripción fenotípica que permitan aclarar y/o precisar los efectos y el papel que cumple el gen Runx2 en la morfogénesis de las estructuras dentarias y hueso alveolar mandibular, mediante la comparación y establecimiento de patrones diferenciales de éstos tejidos entre ratones transgénicos con sobreexpresión del gen Runx2 y ratones salvajes o WT (wild type) de 7 y 15 días de nacidos.

GENÉTICA Y BIOLOGÍA ORAL

Como se describió anteriormente, para el interés de los profesionales de la odontología y de la comunidad científica dedicada a la biología oral y a la medicina bucal, hoy se reconoce que algunos factores genéticos afectan a los fenotipos, y las etapas del desarrollo dental no son la excepción. En ese sentido, hay líneas de investigación dedicadas a la identificación y explicación de las funciones de algunas moléculas de señalización expresadas en los componentes epiteliales y mesenquimales de los dientes en desarrollo.

En tal sentido, Zerón ha precisado que si bien la mayoría de los dientes presentan genes relacionados, en general presentan patrones de expresión similares en los dientes en desarrollo de humanos y ratones, y sólo algunos genes, incluyendo MSX1, Fgf8, PAX9 y SHOX2, muestran una ligera diversidad y diferente expresión⁽⁵⁾. **(Esquema 1)**



Esquema 1. Etapas y señales en el desarrollo dental. Los componentes epiteliales y ectomesenquimales de los dientes en desarrollo presentan genes relacionados en la morfogénesis en diversas especies (humano y ratón). Fuente: Zerón, A. ⁽⁵⁾

RUNX2: GENERALIDADES Y HALLAZGOS EN HUESOS Y CARTÍLAGOS

El gen del Runx2, está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21), éste se considera esencial para la formación de los huesos de mamíferos y actúa a nivel molecular como un factor de transcripción de genes que se expresan en condrocitos hipertróficos y osteoblastos. La expresión génica del Runx2 y la función de las proteínas están reguladas en varios niveles, incluyendo la transcripción, traducción, y modificación post-traduccional. Además, se ha reportado que el gen

Runx2 está involucrado en numerosas interacciones proteína-proteína, ya sea para activar o reprimir la transcripción de genes diana ⁽⁴⁾.

Por otra parte, se ha descrito que los osteoblastos son las células responsables de la producción de los constituyentes de la matriz ósea, ya que son capaces de secretar colágeno tipo I, osteocalcina y fosfatasa alcalina. Derivan de precursores mesenquimáticos y su diferenciación está asociada a una serie de eventos modulados por una cascada de expresión de genes relacionados con la biosíntesis, organización y mineralización de la matriz extracelular ósea ⁽⁶⁾. Es precisamente en éste proceso que la intervención del Runx2, (regulado por citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, incluyendo TGF- β , BMP, FGF, vitamina D3, y estrógeno) obtiene el papel principal.

Con base en lo anterior, desde hace algunos años se han hecho indagaciones respecto a algunos trastornos causados por mutación en el gen del Runx2, entre las más relevantes se encuentran los hallazgos relacionados a la displasia cleidocraneal (CCD) y la osteoporosis.

La displasia cleidocraneal, causada por una haploinsuficiencia como mutación de un alelo⁽³⁾, es una rara displasia ósea generalizada en la que se afectan los huesos de procedencia membranosa (clavículas y bóveda craneal), y puede extenderse al resto del sistema esquelético (pelvis, vértebras y extremidades). Se transmite de forma autosómica dominante, presentando una penetrancia completa y una expresividad variable. Las anomalías dentales son también características y consisten en retraso en la erupción de los dientes y presencia de múltiples piezas supernumerarias que permanecen impactadas de forma permanente en los maxilares ⁽⁷⁾.

Con respecto a la Osteoporosis, Geoffroy y Cols ⁽³⁾ han realizado importantes aportes mediante estudios en ratones transgénicos con sobreexpresión del gen Runx2 como modelo animal que se desarrolla no sólo la osteopenia, sino también fracturas vertebrales espontáneas con alta remodelación ósea, imitando estrechamente la osteoporosis y mejorando en gran medida la capacidad para predecir la eficacia clínica de tratamientos.

En su primer informe, los científicos citados, describieron el fenotipo óseo de estos ratones transgénicos, que inesperadamente presentaron osteopenia severa, además, la actividad en algunos sitios del esqueleto durante la edad adulta y envejecimiento, demostró una resorción superior a la formación ósea. También proporcionaron evidencia de que la maduración de los osteoblastos se ve afectada en estos ratones transgénicos y que sus osteoblastos adquieren propiedades osteoclastogénicas⁽³⁾. Posteriormente, se dedicaron a evaluar la efectividad del tratamiento con bisfosfonatos (risedronato), en la reducción de fracturas en mujeres postmenopáusicas y en la osteoporosis juvenil ⁽⁸⁾. Corroborando con su línea de investigación, que el alcance de la misma no está limitada al logro de un nuevo conocimiento, sino que puede generarse una aplicación terapéutica valiosa para un problema de salud pública, como el desarrollo de fármacos con una mayor capacidad preventiva de fracturas y menores efectos adversos, tanto en casos de osteoporosis primarias (bien sea postmenopausica o senil) como en secundarios al uso de medicamentos o por trastornos sistémicos.

RUNX2 Y TEJIDO DENTARIO

Según Ryoo y Wang ⁽⁹⁾, el gen Runx2 conocido en la comunidad científica como un factor osteogénico relevante, parece intervenir además en el complejo proceso de la odontogénesis, de acuerdo a las evidencias que se han ido acumulando

señalándolo como un importante factor de transcripción. Entre ellas las que comprueban que en ratones *Runx2*^{-/-} la odontogénesis molar no avanza más allá de la etapa de brote tardía.

Según se ha citado, la importancia de *Runx2* en el desarrollo de los dientes se ha podido deducir por las anomalías dentales observadas en individuos con displasia condrocralear (CCD). En ésta condición se expresan, además de las manifestaciones óseas anteriormente descritas, dientes supernumerarios, retraso en la erupción, o ectopia de dientes permanentes.

En efecto, la expresión del *Runx2* es inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos epitelial (FGF), lo que la convierte en una molécula importante del mesénquima dental, implicado en la regulación y señalizaciones que intervienen en la morfogénesis epitelial.

En el ratón transgénico, una ausencia de la expresión de *Runx2* conduce a la detención de la morfogénesis del diente en la fase de brote tardía, lo que sugiere que *Runx2* es necesaria para la transición de la etapa de brote a casquete. Si bien el desarrollo del diente se ve afectada a nivel general en los ratones *Runx2*^{-/-}, los incisivos fueron menos afectados que los molares superiores y los molares superiores se vieron menos afectadas que los molares inferiores, lo que sugiere que la importancia de la función de *Runx2* durante el desarrollo varía entre estos órganos. Además, se desarrollaron yemas epiteliales de dientes accesorios, lo que sugiere que otra función normal de *Runx2* es inhibir la formación de los dientes de sucesión⁽¹⁰⁾.

Siguiendo la misma línea, Kobayashi y Cols demostraron *In vitro* que la expresión del gen *Runx2* resulta necesaria para la diferenciación de las células odontogénicas en ambos: odontoblastos y ameloblastos⁽¹¹⁾. Como consecuencia, es

posible que estos ratones no desarrollen odontoblastos diferenciados, ameloblastos, dentina normal, o matriz de esmalte.

CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS MANDIBULARES

El ratón utilizado en éste estudio tiene una dentición única de 16 dientes.

Posee dos pares de incisivos en forma de cincel y sin raíz que crecen continuamente; tiene un diastema entre incisivos y molares. No posee caninos ni premolares, solo tres molares los cuales presentan varios prismas triangulares alternados⁽¹⁷⁾, y presentan un patrón de erupción estimado de 7 días de nacido para el primer molar, 14 días para el segundo molar y 21 días para el tercero. En tal sentido, pese a estar descrita la anatomía normal de los ratones estudiados, no se ha indagado hasta ahora en el fenotipo del tejido dentario y del hueso mandibular del mismo, de allí la importancia de ésta línea de investigación.

OBJETIVOS

General:

Comparar el fenotipo dentario y del hueso mandibular entre ratones transgénicos con sobreexpresión del gen Runx2 y ratones WT de 7 y 15 días de nacidos.

Específicos:

1. Escoger los elementos a considerar como patrón de diferenciación entre ratones WT y con sobreexpresión de runx2, de la misma edad
2. Interpretar mediante coloración especial de Van Gieson, la presencia de fibras colágenas de origen mesenquimático en cortes de mandíbula de ratones con sobreexpresión del gen Runx2 y WT.

3. Describir las características de las células del epitelio del esmalte en cortes de mandíbula de ratones con sobreexpresión del gen Runx2 y WT
4. Describir las características de los espacios medulares en cortes de mandíbula de ratones con sobreexpresión del gen Runx2 y WT

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Naturaleza, tipo y diseño de investigación

Por la naturaleza concreta y verificable del fenómeno biológico en estudio la presente investigación enmarcada en el enfoque experimental científicista, que según Orozco, Labrador y Palencia, pretende producir nuevo conocimiento o verificar hallazgos previos derivados de descubrir respuestas o afinar preguntas de investigación e hipótesis, a través de procedimientos estandarizados como parte del proceso de investigación.⁽¹²⁾

Una vez descrita la naturaleza del trabajo, es importante señalar que la investigación, en su propósito, fue descriptiva-explicativa. Descriptiva porque tuvo como objeto desplegar con precisión la caracterización diferencial de los cambios en el fenotipo dentario y de hueso mandibular atribuibles a la sobreexpresión del gen Runx2 en ratones. Explicativa, porque mediante contraste de hipótesis de causalidad, estimó las diferencias observadas, presentando hallazgos y respuestas hasta ahora desconocidas, sobre el fenómeno en estudio.

Ahora bien, el diseño de investigación empleado fue preexperimental en la modalidad de investigación ex post facto, debido a que la manipulación genética para el logro de la sobreexpresión del gen Runx2 fue realizada previamente y sin participación directa del investigador en la manipulación de esta variable independiente.

Con respecto al acopio de datos se utilizó la técnica de recolección directa, es decir, un registro autónomo de la información desde la perspectiva calibrada de la misma investigadora, con lo cual se garantizó uniformidad de la discriminación de los atributos observados. Para este efecto se diseñó una hoja de registro de las características que resultaron de interés para la investigadora, descritas en los objetivos del estudio.

Animales de Experimentación

Se utilizaron como modelos animales ratones tipo Swiss de 7 y 15 días de nacidos clasificados en WT (Wild Type o salvajes) y transgénicos Runx2, logrados mediante un promotor del mencionado gen para sobreexpresarlo. Los ratones machos adultos positivos para la presencia de la Runx2 transgénicos se aparearon con hembras B6CF1 (Harlan, Bicester, Reino Unido) para generar las hembras transgénicas⁽⁸⁾.

Considerándose para efectos de esta investigación que la población es infinita tanto para ratones WT como para ratones mutantes Runx2, la selección de la muestra fue definida a criterio de la investigadora, para lo cual se procesaron 3 especímenes para cada edad, sin discriminación del sexo.

Los sujetos de estudio se mantuvieron en la animalería de Paris bajo condiciones de ciclo luz-día de 12 horas, temperatura 22-26 °C, agua y comida estándar para ratones ad libitum. Fueron sacrificados por elongación cervical bajo narcosis con CO₂; todo lo anterior con la aprobación del gobierno Francés y bajo las políticas de protección animal de la Comunidad Europea, siguiendo las normas de

Bioética reglamentadas por el Centro de Investigaciones de Cordeliers, certificado con el número A-7506-12 y regidos por las normas del Consejo Europeo de 1985 y la convención STE 123.

Cabe agregar que la posibilidad de contar hace más de 80 años con líneas de roedores de laboratorio que están genéticamente definidas, ha sido uno de los principales avances de la ciencia de los animales de laboratorio, según señala Benavides⁽¹⁵⁾ el valor de éste avance radica en la posibilidad de hacer estudios eliminando la variabilidad de origen genético y el establecimiento de modelos de estudios para determinadas condiciones, enfermedades y síndromes.

Técnica histológica

El procesamiento de los especímenes WT y Runx2TG para la obtención de los bloques de parafina fue llevado a cabo en el INSERM de Paris, mediante la disección y descalcificación con EDTA de hemimandíbulas que fueron de inmediato sometidas a todos los pasos de técnica histológica convencional descritos por Gardner⁽¹³⁾, a saber:

- Fijación: por inmersión en formalina amortiguada,
- Deshidratación: mediante la aplicación de una serie gradual de baños de alcohol desde 50% a 100%,
- Aclaramiento: con xilol
- Inclusión en parafina y conformación del bloque.

Una vez conformados los bloques de parafina, fueron concedidos a la investigadora, quien realizó la clasificación por edad, sexo y número asignado, la selección de los mismos y a continuación, los cortes histológicos en micrótopo de 8 a 10 micras de espesor, completando el proceso con los pasos subsecuentes de la

técnica histológica y logrando la obtención de un total de 623 cortes que sirvieron como fuente de información para el presente estudio.

Tinción Van Gieson

Ésta coloración especial corresponde a la mezcla de [ácido pícrico-fucsina ácida](#) y [hematoxilina férrica de Weigert](#). Es según Bruce-Gregorios, el método más simple mediante tinción para diferenciar [colágeno](#) de otros tejidos conectivos ⁽¹⁴⁾, y sus resultados derivan en las siguientes características:

- Núcleos celulares: Color marrón a negro.
- Colágeno (tejido conectivo fibroso): Color rosa o rojo.
- Músculo y Citoplasma: Color amarillo.

El protocolo de tinción que llevó a cabo la investigadora se describe a continuación:

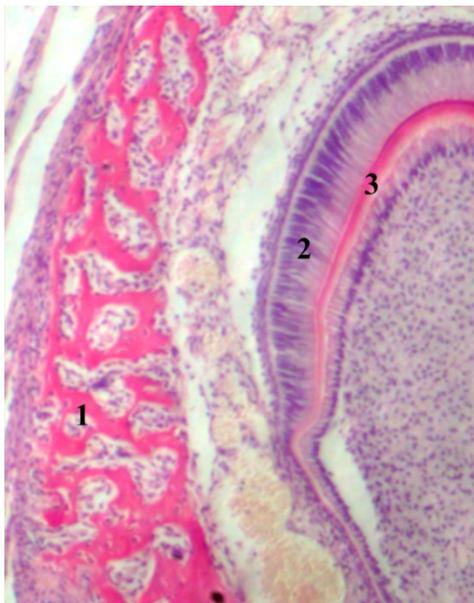
- lavado en agua por unos 5 minutos.
- Primera tinción sumergiendo las muestras por 5 minutos en hematoxilina férrica de Weigert.
- Lavado en agua corriente (hasta que no liberar más colorante).
- Diferenciación rápida en alcohol ácido
- lavado con abundante agua destilada
- Segunda tinción en solución Van Gieson (ácido pícrico-fucsina ácida) por 5 minutos.
- Diferenciación rápida en etanol al 95% (5-10 segundos)
- Sumergir en Alcohol absoluto las muestras en 2 ocasiones de 1 minuto en el frasco 1 y otro en el frasco 2
- Clarificar con [xilol](#) en 2 ocasiones, 3 minutos en cada frasco.
- Montaje con láminas cubreobjetos y medio de montaje DPX

III. RESULTADOS

Previa selección sistemática de las muestras que serían procesadas, se procedió a utilizar un microscopio óptico con cámara integrada para la obtención de imágenes digitales, en este caso se utilizó un equipo marca Nikon, modelo Labophot-2, con objetivo de 4X y el programa de procesamiento de imágenes Infinity Capture. A continuación serán presentadas algunas de las imágenes resultantes para su análisis cualitativo:

RATONES WT Y RUNX2 TG DE 7 DÍAS

Figura 1: Microfotografía de cortes de mandíbula de ratones WT y R2tg con 7 días de nacidos. Tinción Van Gieson. Aumento de objetivo 10x.



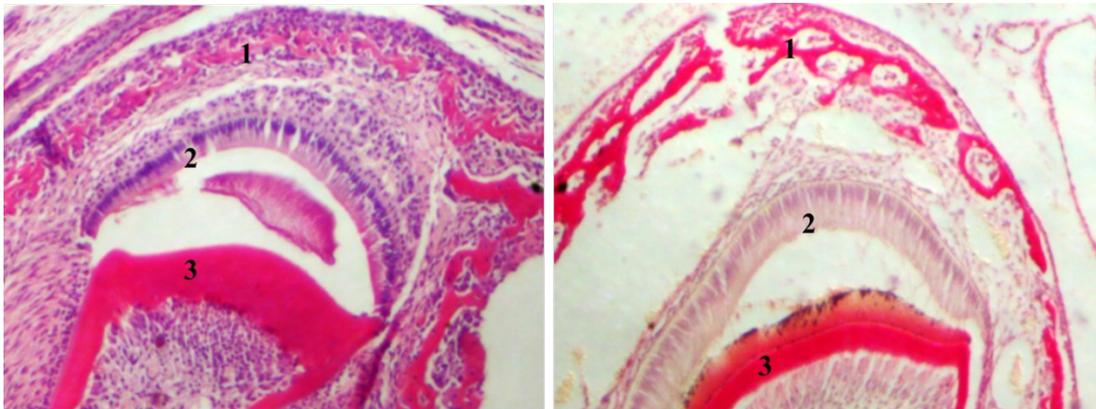
WT 7 días. Hueso e incisivo en fase secretora



R2tg 7 días. Hueso e incisivo en fase secretora

Al contrastar ambas imágenes correspondientes a cortes de mandíbula a nivel de la fase secretora del incisivo, se puede observar cualitativamente una importante diferencia respecto al hueso alveolar; los espacios medulares se encuentran más amplios en el caso del ratón Runx2 TG, y al mismo tiempo las trabéculas son más delgadas (1). En ésta imagen, no parece haber una diferencia significativa respecto a la calidad y morfología de las células cilíndricas productoras de esmalte (ameloblastos) (2), y podría interpretarse según la tinción, una leve disminución en la cantidad de mesenquima dentinario (3)

Figura 2: Microfotografía de cortes de mandíbula de ratones WT y R2tg con 7 días de nacidos. Tinción Van Gieson. Aumento de objetivo 10x.



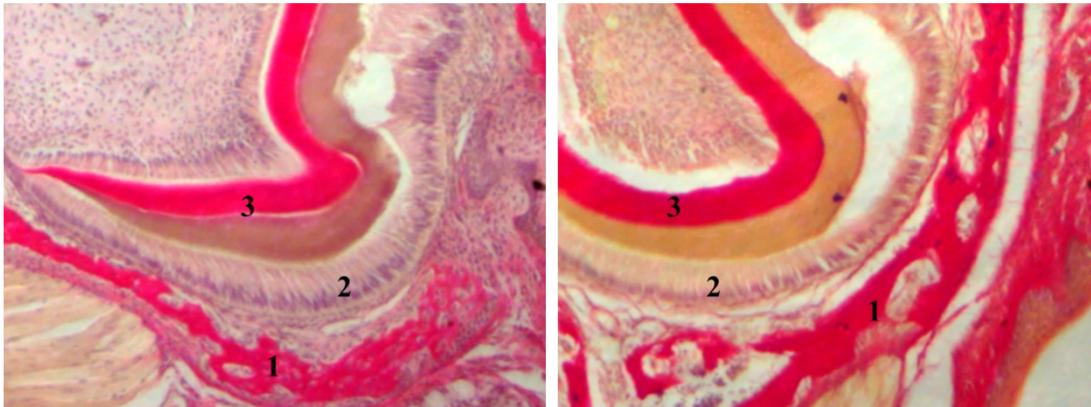
WT 7 días (4b) incisivo y hueso

R2tg 7 días (18) incisivo y hueso

En concordancia con la imagen anterior, se observa cualitativamente una importante diferencia en la amplitud de los espacios medulares (1), además de escaso tejido conectivo y pocos cambios respecto a los ameloblastos (2), según la interpretación de la coloración Van Gieson, la cantidad de colágeno a nivel dentario parece estar afectada en cuanto su espesor (3) en el caso del Runx2 TG

RATONES WT Y RUNX2 TG DE 15 DÍAS

Figura 3: Microfotografía de cortes de mandíbula de ratones WT y R2tg con 15 días de nacidos. Tinción Van Gieson. Aumento de objetivo 10x.



WT 15 días (8). 1er molar

R2tg 15 días (40). 1er molar

En presencia de un tejido más maduro, el cambio más relevante vuelve a estar relacionado con la mayor amplitud de los espacios medulares (1) en el caso del ratón Runx2 TG. Con respecto al tejido dentario no se aprecian cambios significativos en ésta imagen comparativa, puesto que la interpretación permitida por la tinción Van Gieson muestra una cantidad similar de colágeno dentinario (3) y una morfología ameloblástica aparentemente sin alteraciones (2).

Figura 4: Microfotografía de cortes de mandíbula de ratones WT y R2tg con 15 días de nacidos. Tinción Van Gieson. Aumento de objetivo 40x.



WT 15 días (8b). Hueso



R2tg 15 días (10b) . Hueso

En una imagen de mayor aumento que permite apreciar la diferencia en la amplitud de los espacios medulares en el caso del ratón Runx2 TG, dado el adelgazamiento de las trabéculas y la escases del tejido óseo, que a su vez presenta espacios medulares muy amplios (1), este resulta al parecer, el hallazgo cualitativo más notorio en los sujetos empleados en la investigación como modelos de estudio.

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Dado que los cambios observados en la estructura ósea fueron los más notorios, resulta oportuno citar a Etchart⁽²⁶⁾, quien describe respecto a la fisiología de la osificación y estructura normal del hueso dos tipos de osificación: la membranosa (o desmal) y la endocondral. La membranosa se observa en la calota y parte de la mandíbula, consiste en una transformación directa del tejido fibroso en tejido óseo: así se forma tejido óseo esponjoso central (díploe) delimitado por tejido óseo denso en las superficies (tablas). La osificación endocondral, en cambio, se efectúa sobre un substrato cartilaginoso, mediante remodelaciones y procesos de calcificación relativamente complejos.

Hay tres tipos celulares propios del hueso: el osteoblasto, que es la célula formadora del tejido; es de tamaño mediano, poliédrica, con núcleo ovoideo, citoplasma basófilo y se la observa adosada a las trabéculas. Su actividad se demuestra por la presencia de fosfatasa alcalina. El osteocito que ha quedado incluido en el espesor de una trabécula; se ubica en una "laguna" y está encargado probablemente de la nutrición de la trabécula; posee prolongaciones citoplasmáticas que lo conectan con otros osteocitos. Y en tercer lugar el osteoclasto: Es una célula gigante, multinucleada, adosada a la trabécula, en un nicho o laguna de Howship; mide 30 a 50 micrones, posee 3 a 6 núcleos ovoideos y está encargada de la remoción del tejido óseo como tal, no del calcio iónico.

Por otro lado, por el tipo de cambios observados en el tejido óseo de los ratones transgénicos con sobreexpresión del gen Runx2, resulta también conveniente considerar en contraparte la descripción hecha por Guercio, quien define a la Osteoporosis como una enfermedad compleja y multifactorial, originada por un desorden en el metabolismo óseo esquelético, lo cual se traduce en una reducción en

la cantidad de hueso, sin producir variaciones en la composición química del mismo. ⁽²⁴⁾ También es descrita como una alteración esquelética sistémica caracterizada por una disminución de la masa ósea, deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, con un aumento subsecuente en la fragilidad del hueso y susceptibilidad al riesgo de fractura ⁽²²⁾.

Esta investigación se condujo tomando como principales referencias los estudios realizados por Geoffroy en Francia y Aberg en Finlandia, quienes han hecho algunos de los aportes más relevantes con respecto a los fenotipos óseos y dentarios, respectivamente, se pretendió con esto complementar el conocimiento orientando la investigación a establecer una comparación sistemática desde el punto de vista histológico entre cortes de tejido dentario y mandibular de ratones transgénicos con sobreexpresión del gen Runx2 y ratones WT de 7 y 15 días de nacidos, donde pudieron observarse diferentes hallazgos microscópicos relacionados con los objetivos planteados.

En tal sentido puede concluirse que los principales cambios están asociados al tejido óseo alveolar, dando como resultado una notable diferencia cualitativa en cuanto a la cantidad y calidad del mismo, evidenciada por un adelgazamiento del trabeculado y un mayor diámetro de los espacios medulares, con lo que se corroboraría la osteopenia severa descrita por Geoffroy⁽³⁾ (en aquella oportunidad en huesos vertebrales). A pesar de lo ya mencionado, ocurren dos fenómenos que llaman la atención y obligan a seguir indagando en ésta línea de investigación: el primero de ellos está relacionado a la acción diferente de los bifosfonatos en el hueso mandibular, dado que en numerosos casos, lejos de ejercer su acción terapéutica, ha generado el controvertido efecto secundario de osteonecrosis, y por otra parte se distingue el hecho de que no se evidencian fracturas espontáneas en mandíbulas de pacientes con osteoporosis.

La predisposición de tales fracturas determinan la diferencia clínica entre osteopenia y osteoporosis, en esta última suelen ocurrir ante pequeños traumas o en ausencia de los mismos, siendo los sitios mayormente afectados las vértebras y la cabeza del fémur, según reportó Cummings.⁽²³⁾

Por otra parte, Benson describe esta condición como un fenómeno que ha sido demostrado en diversos sitios del esqueleto: radio, cúbito, húmero, fémur, columna vertebral y mandíbula. Algunos huesos con gran proporción de tejido trabecular son afectados en mayor cantidad en forma precoz respecto a otros, pero en general la tendencia hacia la pérdida ósea en pacientes osteoporóticos persiste alrededor del esqueleto. Además sugiere la existencia de una relación entre la pérdida ósea mandibular y la osteopenia del resto del esqueleto.⁽²²⁾

En el orden de las ideas anteriores, es importante recordar para efectos del propósito del presente trabajo, la información que corresponde al origen embriológico de las estructuras craneofaciales, en contraste con los huesos esqueléticos estudiados en el trabajo de Geoffroy, dado que de éste dato pueden derivarse las diferencias a nivel clínico-patológico del efecto de los bifosfonatos y de las manifestaciones de la osteoporosis entre el hueso mandibular y el resto del esqueleto óseo.

En base a trabajos de investigación embriológica, Gómez de Ferraris⁽²⁷⁾ postula que las células de las crestas neurales emigran hacia el mesodermo de los arcos branquiales, dando origen a componentes esqueléticos, óseos y cartilagosos. Algunos de estos cartílagos forman estructuras a veces temporarias, tales como el cartílago de Meckel. Este núcleo de cartílago se halla ubicado en forma tal que más tarde, será el guía o centro de mecanismo de osificación del cuerpo de la mandíbula que se forma a su alrededor. El cuerpo de la mandíbula se desarrolla de manera

independiente a partir del tejido conectivo embrionario que rodea al cartílago de Meckel.

De las células de las crestas neurales derivan además los componentes de los tejidos conectivos que formaran entre otros, las siguientes estructuras dentarias: el tejido dentino-pulpar, el periodonto de inserción, hueso, ligamento y cemento.

Tomando en cuenta que el mesénquima originado de las células de las crestas neurales se denomina ectomesenquima, en términos generales el viscerocráneo da origen al cartílago de los dos primeros arcos faríngeos, de los cuales el primero origina en su porción dorsal a la apófisis maxilar, y en la porción ventral al proceso mandibular (cartílago de Meckel y luego mandíbula). El tejido óseo que forma las láminas compactas o corticales de los procesos alveolares tiene un doble origen: la compacta periodóntica que crece por oposición a partir de las regiones osteogénicas del ligamento periodontal, y el origen interno que se forma a expensas de los osteoblastos del tejido medular adyacente ⁽¹⁸⁾.

Dado su origen en el ectomesenquima y la función vital para efectos de la alimentación, y por ende de supervivencia, es de suponer, que el hueso alveolar se encuentre dotado de algún mecanismo que proteja su integridad ante condiciones metabólicas que comprometan su importante función como en el caso de la osteoporosis, que si bien llega a afectar el trabeculado de la mandíbula, ésta no se reporta significativamente susceptible a fracturas espontáneas como ya se explicó anteriormente. De hecho, Montanegro⁽²⁵⁾ resalta que fisiológicamente los huesos maxilares poseen un recambio metabólico mucho más elevado que cualquier otro, especialmente en las áreas peridentales o alveolares.

Cabe decir por otra parte, que es indiscutible el valor de los bifosfonatos en osteoporosis y en pacientes oncológicos con metástasis óseas o con enfermedades metabólicas, debido a que aumentan la supervivencia y reducen las complicaciones esqueléticas y el dolor asociado a las mismas, mejorando su calidad de vida⁽¹⁹⁾. Sin embargo aún no se comprende del todo la fisiopatología de la osteonecrosis maxilar o mandibular por bifosfonatos⁽²⁰⁾ y se ha generado confusión debido a la dificultad para curar por completo la enfermedad, de hecho, se debe considerar a todo paciente tratado con bifosfonatos (especialmente intravenosos) como susceptible de presentar osteonecrosis en caso de someterse a procedimientos odontológicos invasivos o a cirugía ósea maxilar o mandibular, según concluye Barrientos en su trabajo⁽²¹⁾.

Aparte de la observación anterior, también se deben comentar a manera de conclusión los otros aspectos observados en los resultados obtenidos, a saber: por un lado no se evidenciaron cambios significativos en el epitelio del esmalte, con respecto a la cantidad y morfología de ameloblastos (cabe recordar el origen embrionario ectodérmico⁽²⁷⁾ de este tejido como posible explicación al hecho de no presentar cambios asociados a la sobreexpresión del gen Runx2); por otra parte, lo que puede interpretarse como zonas correspondientes a fibras colágenas dentinarias mediante la tinción especial de Van Gieson en el tejido dentario se apreciaron levemente reducidas, por lo que puede sospecharse que se encuentra comprometida la dentinogénesis, y la formación de la matriz colágena calcificada de éste importante tejido.

Sin embargo, para corroborar estos probables cambios referidos específicamente a la expresión de colágeno, se hace necesaria la indagación mediante técnicas de biología celular y molecular más sensibles y específicas como la inmunohistoquímica, histoenzimología e incluso el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que permitirían comparar de una manera más confiable la cantidad y calidad de osteocitos y odontoblastos marcados y la verdadera expresión del colágeno

como por ejemplo el colgeno de tipo I, que es el principal constituyente del tejido óseo.

Además de lo anterior, y con el fin de incrementar el alcance del conocimiento en ésta línea de investigación, se sugiere planificar estudios relacionados, la realizar análisis consecutivos y experimentos complementarios que pretendan obtener otros hallazgos, entre los cuales se podrían mencionar:

- Determinación de las edades de erupción de los 1ros, 2dos y 3ros molares en el ratón con sobreexpresión de Runx2
- Comparación de la cantidad y calidad de osteoblastos, osteoclastos, odontoblastos y la superficie de los espacios medulares mediante un programa de procesamiento digital de imagen (Software imagenJ).
- Detección de la actividad osteoclástica en los espacios medulares mediante Histoenzimología TRAP (Fosfatasa ácida tartrato-resistente) o histoquímica enzimática TRAP. Técnica mediante la cual se ha permitido comprobar que La Fosfatasa Acida Tartrato Sensible ha sido localizada en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, mientras que la Fosfatasa Acida Tartrato Resistente (TRAP) se ubica únicamente en osteoclastos, y ha demostrado ser un marcador citoquímico para estas células ⁽²⁸⁾.

Con respecto a lo anterior resulta oportuno señalar que algunos de éstos análisis como la histoenzimología TRAP y la inmunohistoquímica para colágeno tipo I, se encontraban en un inicio trazados como objetivos de la investigadora, y por motivos afines al momento país, (a saber: falta de reactivos y recursos) fueron planteados para ser estudios complementarios dentro de la misma línea de investigación en un próximo trabajo, dada la relevancia del conocimiento que puede ser aportado.

A juicio de la investigadora, resultó oportuno realizar esfuerzos por describir el fenotipo dentario en ratones transgénicos que ya han sido establecidos como modelos animales útiles para el estudio de alteraciones óseas y cartilagosas; y dado que el principal regulador encontrado en la formación de hueso y dientes es el gen *Runx2*, resulta conveniente en el campo de la odontología, seguir indagando en el papel que juega el mismo en la formación y desarrollo de las estructuras dentarias y craneofaciales. Tomando en cuenta el potencial alcance de tal conocimiento, por ejemplo, ayudaría a comprender la aparición de determinadas anomalías de número, tamaño y estructura dentaria, así como sembrar las primeras bases de una nueva terapéutica odontológica basada en la genética. Además, cualquier cambio congénito o adquirido, primario o secundario, en la anatomía de la mandíbula implica una importante variable durante la planificación de tratamientos odontológicos, por ejemplo, una pérdida de tejido óseo mandibular reduciría o complicaría la posibilidad de una rehabilitación de las funciones bucales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jonason, J. H., Xiao, G., Zhang, M., Xing, L., & Chen, D. Post-translational regulation of Runx2 in bone and cartilage. *Journal of dental research*, 2009; 88(8), 693-703.
2. Villegas, L. K.. Caracterización de la expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular, en células ROBmtert y MC3T3 [tesis]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2008.
3. Geoffroy, V., Kneissel, M., Fournier, B., Boyde, A., & Matthias, P. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Molecular and cellular biology* 2002; 22(17), 6222-6233.
4. Garzón Alvarado D., Roa Garzón M., Ramírez Martínez A. Factores que influyen en el crecimiento endocondral: experimentos y modelos. *Rev Cubana Ortop Traumatol* [revista en la Internet]. 2008 Jun; 22(1)
5. Zerón, A. Biotipos, fenotipos y genotipos. ¿De qué tipo somos?. *Educación* 2010; 1(1).
6. Henríquez Cabezas, B. C., & Montecino Leonard, M. A. Mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación transcripcional del gen RUNX2 [tesis doctoral]. Universidad de Concepción; 2009
7. Olmos Martínez, J. M., Martínez García, J., & González Macías, J. Displasia cleidocraneal. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas* 2007; 16(4), 82-83.
8. Geoffroy, V., Paschalis, E. P., Libouban, H., Blouin, S., Ostertag, A., Chappard, D., & de Vernejoul, M. C. Effects of risedronate in Runx2 overexpressing mice, an animal model for evaluation of treatment effects on bone quality and fractures. *Calcified tissue international*, 2011; 88(6), 464-475.
9. Ryoo, H. M., & Wang, X. P. Control of tooth morphogenesis by Runx2. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2006; 16(2), 143-154.
10. Åberg, T., Cavender, A., Gaikwad, J. S., Bronckers, A. L., Wang, X., Waltimo-Sirén, J., & D'Souza, R. N. Phenotypic changes in dentition of Runx2 homozygote-null mutant mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2004; 52(1), 131-139
11. Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Wada, H., Matsuo, K., Nonaka, K., Honda, J. Y. & Sakai, H. Type II/III Runx2/Cbfa1 is required for tooth germ development. *Bone* 2006; 38(6), 836-844.
12. Orozco, C., Labrador, M., Palencia, A Metodología. Manual Teórico- Práctico. 2002 Editorial Otomax de Venezuela, C.A., Venezuela
13. Gartner, L., Hiatt, J., Texto Atlas de Histología. 2002. Editorial McGraw Hill Interamericana. Chile
14. Bruce-Gregorios, J.: Histopathologic Techniques, 1974. JMC Press Inc., Quezon

City, Philippines.

15. Benavides, G. Manual de Genética de Animales de Laboratorio, 2003. Documento en línea consultado en agosto de 2014 y disponible en: http://www.transtechsociety.org/benavides_guenet_2003.php
16. Manual de Curso Básico de Técnicas Histológicas, Universidad de los Andes, Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Morfológicas, Unidad Académica de Histología. Documento en línea consultada en agosto de 2014 y disponible en: www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/.../cursolabo.doc
17. Jara Silva, D. Estudio Osteológico comparativo del cráneo del Hamster Golden (*Mesocricetus auratus*) con el del ratón (*Mus musculus*). 2009. Documento en Línea consultado en agosto de 2014 y disponible en: <http://www.anato.cl/global/1-osteologia/c-cabeza/1Agc00002/1Agc00002.pdf>
18. Cartagena, L., Universidad Nacional Autónoma de Honduras. 2013. Documento en línea consultado en agosto de 2014 y disponible en: <http://prezi.com/7z9xxsgiod4b/hueso-alveolar/>
19. Ruggiero S, Mehrotra B, Rosenberg T, Engroff S. Osteonecrosis of the jaws Associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:527-34.
20. Gutiérrez Restrepo Johnayro. Osteonecrosis De Mandíbula Asociada Al Tratamiento Con Bifosfonatos En Pacientes Con Osteoporosis: Una Revisión. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* [serial on the Internet]. 2013 June [cited 2014 Sep 24] ; 24(2): 307-320
21. Barrientos Lezcano F.J., Peral Cagigal B., la Peña Varela G. de, Sánchez Cuéllar L.A., García Cantera J.M., Serrat Soto A. et al. Osteonecrosis de los maxilares inducida por bifosfonatos: prevención y actitud terapéutica. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* [revista en la Internet]. 2007 Oct [citado 2014 Sep 24] ; 29(5): 309-317.
22. Benson B., Prihoda T., Glass B., 1991. Variations in adult cortical bone mass as measured by a panoramic mandibular index. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 71: 349-356.
23. Cummings S., Black L. (1995). Symposium on Osteoporosis. *Am J Med*, 98 (suppl 2^a): 25-28.
24. Guercio Mónaco, Elisabetta. La osteoporosis: sus efectos sobre la cavidad bucal. *Acta Odontológica. Venezuela*; 37(2):95-7, mayo-ago. 1999. tab.
25. Montangero, Víctor; Capigliani, Ricardo. Perfil densitométrico diferencial en la mandíbula de pacientes afectados por enfermedades raras: observación de casos. *Actual. osteol*;4(1):30-35, ene.-abr. 2008. tab.
26. Etchart, Martin. Anatomía Patológica Osteoarticular. Patología ósea. Documento en línea consultado en Octubre de 2014 y disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/AnatomiaPatologica/12Osteoarticular/12osea.html#metabolicas>
27. Gomez de Ferraris, M., Campos Muñoz, A. Histología y embriología Bucodental.

- 2da edición. Editorial Médica Panamericana. 2002. Santiago de Chile
28. Rey Droghetti P, Cruzat F, Smith Ferrer P, Oyarzún Droguett A. Participación de MT1-MMP en la Remodelación del Ligamento Periodontal Durante la Movilización Dentaria. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral [revista en la Internet]. 2010 Dic [citado 2014 Oct 31]; 3(3): 113-117.