



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL

TESIS  
REQUISITO PARA OPTAR A  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
MENCIÓN PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
**“ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS, INMUNOHISTOQUÍMICAS Y  
ULTRAESTRUCTURALES DE DIENTES DE PACIENTES CON  
AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA Y  
ODONTODISPLASIA REGIONAL”**

NOMBRE DEL ESTUDIANTE: Dra. Claudia Gabriela Camacho Escalera  
DIRECTOR DE TESIS: Prof. Dra. Ana Verónica Ortega Pinto  
CO-DIRECTORES: Prof. Dra. Blanca Urzúa Orellana  
Prof. Dra. Sandra Rojas Flores  
FINANCIAMIENTO: Proyecto Fondecyt Regular N° 1140905

## 1. RESUMEN

**Introducción:** En el presente estudio se analizan tres tipos de patologías que pueden afectar los dientes: Amelogénesis imperfectas, Dentinogénesis imperfectas y Odontodisplasia regional, cuya caracterización histopatológica, inmunohistoquímica y ultraestructural es parcialmente conocida.

**Objetivo General:** Comparar las características histopatológicas, ultraestructurales y expresión inmunohistoquímica de las proteínas amelogenina y dentina sialofosfoproteína en esmalte y dentina de pacientes con Amelogénesis imperfecta (AI), Dentinogénesis imperfecta (DI) y Odontodisplasia regional (ODR) con dientes controles sanos.

**Material y Método:** Se analizaron 12 casos con Amelogénesis imperfecta (tres con AI hipoplásica, seis con AI hipomadura y tres con AI hipocalcificada), cinco casos con Dentinogénesis imperfecta (tres casos de dentinogénesis imperfectas aisladas y dos casos asociadas a osteogénesis imperfecta), tres dientes de un paciente con odontodisplasia regional y 14 dientes controles. Para el diagnóstico clínico de cada caso se realizó anamnesis, examen clínico y exámenes *radiográficos*. Se realizó tres tipos de análisis morfológico: a) Cortes por desgaste observados con microscopía de luz corriente y con luz polarizada, b) muestras descalcificadas para técnicas de rutina e inmunohistoquímica para las proteínas amelogenina (AMEL-X) y dentina sialofosfoproteína (DSPP) y c) estudio con microscopía electrónica de barrido (MEB).

**Resultados:** En las **Amelogénesis imperfectas**, se encontró los siguientes cambios: 1) *AI hipoplásicas*: Esmalte con marcada disminución de grosor, prismas irregulares o ausentes y dentina sin alteraciones evidentes. Dentina similar a los controles. 2) *AI hipomaduras*: Esmalte con grosor normal, mantención de estructura prismática y áreas de menor mineralización. Dentina

sin alteraciones. 3) *Al hipocalcificadas*: Esmalte de grosor normal y marcada disminución de mineralización evidenciada con luz polarizada en que la birrefringencia es similar a cemento radicular. Después de descalcificar el esmalte y del tratamiento histológico de rutina permaneció abundante matriz de esmalte con estructura prismática e inmunomarcación positiva para amelogenina. Dentina similar a los controles.

En ambos tipos de **Dentinogénesis imperfectas**, se observó el esmalte desprendido y/o fracturado y totalmente perdido al descalcificar los dientes. En dentina se observó disminución del número de túbulos dentinarios, pérdida de paralelismo y alteraciones de diámetro de estos. Con técnica inmunohistoquímica se observó las principales diferencias entre las DI ya que en *Dentinogénesis imperfecta aislada* se detectó ausencia de marcación de DSPP en los escasos túbulos dentinarios presentes y en *Dentinogénesis imperfecta asociada a osteogénesis imperfecta* se detectó intensa marcación de DSPP en dentina peritubular.

En **Odontodisplasia regional** se encontró gran disminución de grosor tanto de esmalte como de dentina. El esmalte presentó estructura y ultraestructura irregular y ausencia de prismas, con superficie ondulada, al descalcificarlo se detectó matriz orgánica rica en amelogenina. La dentina presentó escasos túbulos y abundante dentina interglobular y con luz polarizada se observó mayor birrefringencia en dentina que en esmalte.

**Conclusión:** Las Amelogénesis imperfectas, Dentinogénesis imperfectas y Odontodisplasia regional presentan alteraciones estructurales y ultraestructurales particulares a cada una de ellas, por lo que el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural puede ser de alta relevancia en el diagnóstico diferencial de estas patologías.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ODONTOGÉNESIS

La Odontogénesis es un proceso complejo y sigue una serie de pasos secuenciales que comienzan al final de la sexta semana de vida intrauterina. Presenta dos fases fundamentales: morfogénesis, diferenciación e histogénesis o citodiferenciación. Durante la sexta semana de vida intrauterina, el epitelio ectodérmico comienza a engrosarse por proliferación de células basales del epitelio de la cavidad oral, las que se introducen en el mesénquima subyacente y dan lugar a la lámina dentaria. A medida que esto ocurre, el órgano del esmalte va adoptando diferentes formas, como botón, copa y campana, que marcan una actividad importante en el desarrollo de la futura pieza dental (Montenegro, 1997).

La formación del patrón coronario se da en tres etapas fundamentalmente: estadio de brote o botón, en el cual hay una gran actividad mitótica de la lámina dentaria permitiendo la formación de 20 botones, los cuales darán lugar a la dentición temporal o decidua; estadio de copa o casquete, donde existe una marcada proliferación e invaginación del epitelio del órgano del esmalte que presenta una depresión en su zona central, la que está ocupada por la papila dental, ambas estructuras darán lugar al germen dentario; estadio de campana, que se subdivide en campana inicial, donde se diferencian las células formadoras de esmalte y dentina y campana avanzada, donde comienza la formación de la matriz de predentina y la matriz del esmalte (Montenegro y cols. 1997; Ten Cate, 2003; Stephanopoulos y cols. 2005).

La formación dentaria es producto de la interacción de una variedad amplia de genes que regulan cada uno de estos procesos. Estos genes codifican factores de crecimiento, factores de transcripción, moléculas de señalización y proteínas encargadas de regular las actividades celulares y determinar la posición, número y forma de los dientes. Varios de estos genes pertenecen a la familia de genes Homeobox como *MSX1*, *MSX2* y *PAX9*, mientras que otros están relacionados con alteraciones de tipo sindrómico, como *AXIN2* y *PITX2*.

## 2.2. ESTRUCTURA DEL ESMALTE

El esmalte maduro es un tejido con una dureza que le permite soportar las fuerzas masticatorias, debido a su composición química que contiene un 96% de sales inorgánicas en forma de cristales de hidroxiapatita. La sustancia orgánica sólo representa un 2 a 3% y forma la matriz extracelular, que durante el desarrollo del tejido contiene proteínas y proteasas, y cuya expresión y secreción están controladas por diversos genes y vías de señalización. Las principales proteínas secretadas por los ameloblastos son: amelogenina, enamelina, ameloblastina, amelotina y metaloproteinasas MMP-20 y kalikreina-4 (KLK-4). Durante la etapa secretora proteínas como amelogenina que corresponde a un 90% durante la formación del tejido y ameloblastina forman complejos en la zona de nucleación de cristallitos (Mazumder y cols. 2016). En esta etapa los ameloblastos expresan y secretan otras proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos como biglican y dentina sialofosfoproteína (DSPP), (Moradian-Oldak, 2013) y queratinas de cabello como KRT75 que se expresan en ameloblastos secretores y esmalte maduro (Duverger y cols. 2016). Esta matriz es rápidamente degradada durante la etapa de maduración cuando los cristales crecen en ancho y espesor, en esta etapa participan enzimas como KLK4 y MMP-20 y son removidas del espacio extracelular hasta completar la mineralización. Finalmente, el esmalte maduro está formado por un bajo porcentaje de agua que no supera el 2% (Moradian-Oldak, 2013).

Las proteínas del esmalte son de corta duración y eventualmente se degradan en componentes funcionales más pequeños por proteinasas tales como metaloproteinasa de matriz 20 y calicreína 4, que son segregado por ameloblastos. En el esmalte de maduro, estas proteínas residuales se concentran en la matriz orgánica y se acumulan para formar la vaina de la varilla. Estos fragmentos se ensamblan para servir como una malla orgánica apoyando la integridad de las barras, manteniendo la microestructura del esmalte (Mazunder y cols. 2016).

### *Prismas del esmalte*

La unidad fundamental de la estructura del esmalte se organiza en conjuntos de cristales de hidroxiapatita denominados prismas del esmalte. En una vista longitudinal de dientes humanos, los prismas tienen forma de varillas que se extienden desde la unión amelodentinaria hacia la superficie, siendo paralelas entre si, pero en su trayecto presenta entrecruzamientos y decusaciones (Figura 1). En un corte transversal, los prismas tienen forma ovoidal o hexagonal donde el diámetro que varía entre 50 y 1000 nm, va aumentando a medida que se acerca a la superficie (Ten Cate, 2003).

Otra unidad estructural importante es el área interprismática, que corresponde una acumulación de cristales de hidroxiapatita desorganizada que está alrededor de cada prisma, en el cual los cristales están orientados en direcciones diferentes de aquellos que componen la varilla (Gómez de Ferraris y cols. 2002; Ten Cate, 2003).

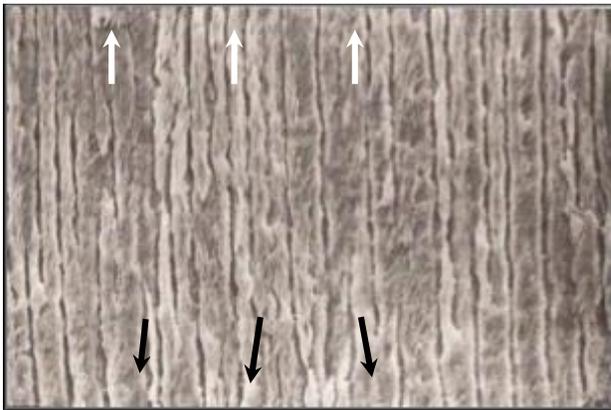


Figura 1. Prismas dispuestos paralelamente en corte longitudinal de esmalte (MEB), la flechas blancas indican hacia donde está la superficie del esmalte y las flechas negras indican la zona del límite amelodentinario (Gómez de Ferraris y cols. 2002).

### *Estructuras secundarias del esmalte*

También se pueden distinguir, en la estructura del esmalte, las **estriaciones cruzadas** “cross-striations” que marcan un ritmo diario de aposición de esmalte (Antoine y cols. 2009) y que presentan un grosor de 3 a 4  $\mu\text{m}$  (Berkovitz y cols. 2002; Hillson, 2005), que se ha planteado que corresponden a la aposición realizada en un período de 24 horas (Antoine y cols. 2009). Por otro lado, las **estrías de Retzius**, son estrías transversales y también son líneas incrementales de esmalte que corresponderían a períodos de 6 a 12 días en humanos, son más marcadas que las estriaciones cruzadas (Reid y cols. 2000; Smith y cols. 2007).

Las **líneas de imbricación** son surcos pequeños observables en dientes recién erupcionados. Los **periquematíes** corresponden a la expresión en la superficie del esmalte de la zona en que terminan las estrías de Retzius. Cada una de estas tiene una profundidad de 2 a 5  $\mu\text{m}$  (Elhechmi y cols, 2013). Son visibles como una serie de surcos y crestas perpendiculares al eje mayor del diente observables en el tercio medio o cervical de la superficie de los dientes (Boyde1989; Beynon 1992; Shellis 1998; Antoine y cols 2009). Según algunos estudios, el número de periquematíes en la superficie dentaria corresponde al número total de estrías de Retzius dentro de la microestructura del diente (Beynon1992) (Figura 2).

Los **penachos del esmalte** son áreas con menor cantidad de mineral que se extienden desde el límite amelodentinario hacia el esmalte, adquiriendo una forma ramificada y ocupando un grosor menor a un cuarto del grosor del esmalte. Por otro lado, las **laminillas** se extienden desde la superficie del esmalte hacia la profundidad de éste y corresponden a zonas hipomineralizadas, que se producen durante la formación de esmalte. Los **husos adamantinos** constituyen espacios que han dejado las prolongaciones de los odontoblastos en el esmalte (Figura 3) (Montenegro y cols. 1997).

Además, los filtros de luz polarizada permiten visualizar

compuestos o estructuras anisotrópicas, de tal modo que otro fenómeno que se puede visualizar con filtros de luz polarizada es la birrefringencia. La birrefringencia es la característica de un objeto de transmitir luz polarizada en una superficie plana a diferentes velocidades, de tal manera que ciertos cuerpos se observan brillantes en un campo oscuro. Por lo tanto, objetos que no tienen brillo o son opacos, carecen de este fenómeno (Wolman, 1975). La luz polarizada permite observar también las **bandas de Hunter-Schreger** que corresponden a fenómenos ópticos producidos por la decusación o entrecruzamiento de los prismas, que se ven como bandas blancas y oscuras.



Figura 2. Muestra de diente con corte por desgaste con un grosor de 100  $\mu\text{m}$  donde se observa esmalte (E), dentina (D), estrías de Retzius irradiados hacia la superficie (puntos blancos), estrías pronunciadas o marcadas (flechas blancas), zona de esmalte cervical (flechas negras) (Antoine y cols. 2009).

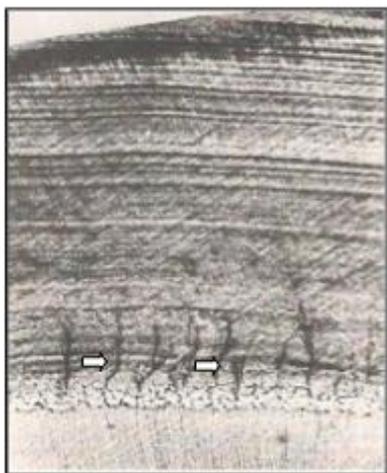


Figura 3. Estrías de Retzius: se disponen como anillos concéntricos. Penachos: zonas ramificadas de menor mineralización (Flechas blancas) (Modificado de Ten Cate, 2003).

### 2.3. ESTRUCTURA DE LA DENTINA

El tejido más abundante del diente es la dentina, que está constituida por matriz dentinaria calcificada y por prolongaciones celulares; los procesos odontoblasticos. La dentinogenesis, es un proceso durante el cual se forma la dentina, incluye crecimiento de la dentina, mineralización y formación de túbulos dentinarios. Los odontoblastos sintetizan colágeno tipo I y lo secretan. Además, se expresan proteínas no colágenas, como la fosfoproteína de la dentina (DPP), asociada con a la formación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita (Niño-Barrera y cols. 2013).

Su componente inorgánico corresponde a un 70%, principalmente cristales de hidroxiapatita, 18% de materia orgánica y 12% de agua. La materia orgánica de la dentina está constituida por 90% de colágeno y 10% de proteínas no colágenas. Las proteínas colágenas corresponden a 89% de colágeno I, 11% de colágeno I trimer y 1 a 3 % de colágenos III y V. El colágeno tipo I forma una plantilla dinámica y estructural que permite la deposición de fosfato de calcio

polimorfo y su posterior transformación en cristales de hidroxiapatita, y los procesos de mineralización están controlados por proteínas no colágenas (Ravindran y cols, 2015) Estas proteínas no colágenas se subdividen en proteínas fosforiladas y proteínas no fosforiladas. Entre las proteínas fosforiladas se encuentran las Small Integrin-BindingLigand N-linkedGlycoproteins (SIBLINGs) que incluyen a: Dentina sialofosfoproteína (DSPP), Dentina matrix proteína 1 (DMP-1), bone sialoproteína (BSP), osteopontina (OPN) y matrix extracelular fosfoglicoproteína (MEPE) (Goldberg M y cols. 2011).

El gen dentinasialofosfoproteína (DSPP) se localiza en cromosoma 4q21 y codifica los principales proteínas no colágenas en la matriz de la dentina. DSPP sufre escisiones por proteasas y da lugar a tres proteínas: sialoproteína de dentina (DSP), glucoproteína de dentina (DGP) y fosfoproteína de dentina (DPP) (Sook-Kyung Lee y cols, 2012).

La dentina normal u **ortodentina**, tiene como característica principal la presencia de túbulos dentinarios, los que corresponden a cilindros que se disponen entre la cámara pulpar y el límite amelodentinario y contienen en su interior a los procesos odontoblásticos (Golberg y cols. 2011).

Entre otras estructuras superficiales podemos mencionar: la **dentina del manto** que presenta un grosor aproximado de 30  $\mu\text{m}$  y se ubica adyacente al esmalte en la región coronaria del diente. En la raíz existen otras capas superficiales que son: 1) **capa granulosa de Tomes** formada por calcosferitas fusionadas y 2) la **capa hialina Hopewell-Smith** con 15 a 30 micrones de grosor que se ubica periféricamente a la capa granulosa (Goldberg y cols. 2012).

La **Dentina circumpulpar**, que se ubica entre la dentina del manto y la cámara pulpar, presenta otras estructuras de importancia que son: dentina peritubular, que está alrededor del lumen de los túbulos dentinarios y dentina intertubular ubicada entre túbulos dentinarios. El límite entre la matriz peritubular e intertubular es la **vaina de Neumann** (Figura 4). Las fibras de colágeno tipo I se encuentran en mayor porcentaje en la dentina intertubular que en la dentina

peritubular. Se ha demostrado continuidad de fibras colágenas entre la dentina intertubular y dentina peritubular con un alto porcentaje de cristales de hidroxipatita en esta última (Xu C. y cols. 2012).

La matriz extracelular no mineralizada que se encuentra rodeando a la pulpa, corresponde a la predentina que está formada por colágeno tipo I al igual que la dentina, pero carece de cristales de hidroxipatita (Goldberg y cols. 2012). También se puede observar entre el componente estructural: las líneas de **contorno de Owen**, que son líneas producidas por alteraciones en el proceso de mineralización y que se disponen en ángulo recto respecto a los túbulos dentinarios; las **líneas incrementales de Von Ebner** que son líneas finas que cruzan a los túbulos dentinarios y representan los incrementos aposicionales de la dentina entre los períodos de descanso; la **dentina interglobular** que corresponde a zonas sin mineralizar o hipocalcificadas que se formaron por falta de fusión de calcosferitas (Montenegro y cols. 1997).

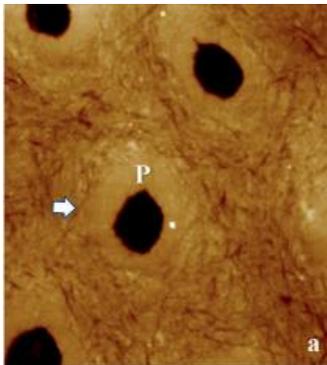


Figura 4. Dentina normal mostrando dentina peritubular (P) alrededor de los túbulos. Flecha blanca= Vaina de Neumann (Bertassoni y cols. 2010)

## 2.4. AMELOGÉNESIS IMPERFECTA

Las Amelogenesis Imperfectas (AI) son un conjunto de condiciones hereditarias que pueden presentar variados tipos de alteraciones en la formación del esmalte, las cuales pueden seguir patrones de herencia autosómico dominante, recesivo y/o ligado al cromosoma X (Aldred, 2003).

La prevalencia de AI es extremadamente baja y varía ampliamente dependiendo de la población estudiada. En Suecia se han reportado cifras de 1,4:1000 (Bäckman B y Holm AK, 1986) y 1:4000 (Sundell S, 1986); en israelitas judíos, 1:8000 (Chosack A y cols., 1979) y en Estados Unidos, 1:14000 (Kim JW y cols., 2008). En Chile, no se cuenta con datos de prevalencia ni incidencia de esta anomalía del esmalte. Estas entidades hereditarias afectan a la estructura y la apariencia clínica del esmalte, que se caracterizan por hipoplasias e hipomineralizaciones dentarias o ambas. (Crawford 2007).

Se ha descrito una serie de genes relacionados con AI, entre los que podemos mencionar: Amelogenina (*AMELX*), enamulina (*ENAM*), ameloblastina (*AMBN*), Cad $\beta$ 3 laminina (*LAMB3*), Fosfoproteína ácida *C4orf26*, kalikreina 4 (*KLK4*), enamelisina (*MMP20*), Molécula 1 de interacción estromal (*STIM1*), Proteína 72 con repetidos WD (*WDR72*), Familia similitud secuencia 83 miembro H (*FAM83H*), *Distal-less homeobox 3* (*DLX3*) y un nuevo posible gen Intercambiador K/Na/Ca (*SLC24A*) (Tabla I)(Wrighty cols. 2009; Lee y cols. 2010).

**Tabla I: Etiología genética de las Amelogenesis Imperfecta (AI).**

<b>GENES Y N°DE MUTACIONES</b>	<b>FENOTIPO CLÍNICO DE AI</b>	<b>PATRÓN DE HERENCIA</b>	<b>FUNCIÓN DEL GEN/PROTEÍNA</b>
<b>1) AMELX, Xp22.3 (Amelogenina; 19 mutaciones)</b>	Hipopláscica/Hipo mineralizada	AI ligada X (AD o AR)	Esqueleto o andamiopara la formación y mineralización de la matriz del esmalte completa.
<b>2) ENAM, 4q21 (Enamelina; 16 mutaciones)</b>	Hipopláscica severa generalizada	AI AD AI AR	Ayudante de amelogenina en la función de esqueleto y nucleador del proceso de mineralización.
<b>3) AMBN, 4q13.3 (Ameloblastina; 1 mutación)</b>	Hipopláscica generalizada	AI AR	Los productos proteolíticos de ameloblastina de 13 a 17 KDa forman la vaina del prisma.
<b>4) LAMB3, 1q32.3 (Cadβ3 laminina-5; 6 mutaciones)</b>	Hipopláscica Severa generalizada con fositas en esmalte coronal	AI AD	Componente de la membrana basal entre odontoblastos y ameloblastos durante la odontogénesis.

<b>5) <i>ITGB6</i>, 2q24.2 (<i>Cadβ6</i> integrina; 4 mutaciones)</b>	Hipoplásica severa generalizada	AI AR	Proteína transmembrana, receptora de la MEC esmalte en formación. Interacciones célula-matriz durante la etapa secretora y madurativa.
<b>6) <i>MMP20</i>, 11q22.3-q23 (<i>Enamelisina</i>; 7 mutaciones)</b>	Hipomadura	AI AR	Metaloproteasa del esmalte encargada del procesamiento de proteínas en la etapa secretora de la amelogenesis.
<b>7) <i>KLK4</i>, 19q13.4 (<i>Calicreína</i> 4; 2 mutaciones)</b>	Hipomadura	AI AR	Proteasa de serina encargada del procesamiento de proteínas en la etapa de maduración de la amelogenesis.
<b>8) <i>WDR72</i>, 15q21.3 (Proteína 72 con repetidos WD; 7 mutaciones)</b>	Hipomadura	AI AR	Proteína intracelular, citoplásmica. Intercambio de vesículas dependientes de Ca <sup>++</sup> en la etapa de maduración de la amelogenesis.
<b>9) <i>C4orf26</i>, 4q21.1 (Fosfoproteína ácida; 5 mutaciones)</b>	Hipomineralizada Generalizada,	AI AR	Fosfoproteína ácida que promueve la nucleación de

	con leve hipoplasia		hidroxiapatita y participa en mineralización del esmalte durante la amelogénesis.
<b>10) SLC24A, 14q32.12 (Intercambiador K/Na/Ca; 5 mutaciones)</b>	Hipomadura, Hipomineralizada	Al AR	Proteína transmembrana. Intercambiador Na/Ca dependiente de K. Participa en transporte de Ca <sup>++</sup> en la etapa de maduración de la amelogénesis.
<b>11) STIM1, 11p15.4 (Molécula 1 de interacción estromal; 1 mutación)</b>	Hipomadura (1 caso sindrómico y 1 caso aislado)	Al AR	Activa el canal de Ca <sup>++</sup> llamado ORAI1. Media la entrada de Ca <sup>++</sup> operado por almacenamiento.
<b>12) FAM83H, 8q24.312 (Familias imitadas secuencia 83 miembro H; 20 mutaciones)</b>	Hipocalcificada	Al AD	Proteína intracelular, citosólica, asociada con la red Trans del Aparato de Golgi. Asociada a tráfico vesicular.

Al: Amelogénesis Imperfecta, AD: Autosómica Dominante, AR: Autosómica Recesiva.

Desde un punto de vista funcional, las proteínas codificadas a partir de estos genes se clasifican en grupos tales como: Proteínas del esmalte: AMELX, ENAM y AMBN; las proteasas de matriz de esmalte: MMP20 y KLK4; así como los involucrados en la adhesión célula-célula y célula-matriz: ITGB6, LAMB3, LAMA3, COL17A1, AMTN y FAM83H, encargados del transporte: WDR72 y SLC24A4 y controladores maestros de amelogenesis: FAM20A y DLX3, entre otros grupos en estudio (Smith y cols. 2017).

Las AI tienen también gran variabilidad desde el punto de vista clínico, con manifestaciones que van desde la ausencia completa (aplasia) o parcial (hipoplasia) de formación del esmalte, hasta defectos en su mineralización (hipomineralización) y en su contenido proteico (hipomaduración), con cambios en el aspecto normal del esmalte que muestra descoloraciones más o menos graves y opacidades blancas, amarillo-anaranjadas o marrones (Martín-González y cols. 2012).

La clasificación más utilizada es la propuesta por Witkop (1989), que está basada en el fenotipo y la herencia. Describe cuatro grupos: AI hipoplásica (el esmalte no desarrolla grosor normal, en la radiografía el esmalte contrasta normalmente con la dentina), AI hipomadura (esmalte de grosor normal, con apariencia moteada, levemente más blando que lo normal y se desprende de la corona. Radiográficamente se observa aproximadamente la misma radiodensidad en esmalte y dentina). AI hipocalcificada (inicialmente desarrolla grosor normal, al erupcionar el esmalte es anaranjado-amarillo, que consiste en una matriz pobremente calcificada que se pierde rápidamente, dejando dentina expuesta. En la radiografía, el esmalte es menos radiopaco que la dentina), y el tipo AI Hipoplásica-hipomadura con Taurodontismo (esmalte moteado color blanco-amarillo-marrón, con fositas principalmente en la superficie vestibular o es delgado con áreas de hipomaduración. Los molares tienen apariencia

taurodonte. En la radiografía se observa esmalte con radioopacidad similar o levemente mayor que la dentina) (Witkop, 1989).

El diagnóstico de AI involucra examen clínico, radiográfico, histológico y genético. Los dos primeros exámenes permiten realizar un diagnóstico presuntivo, mientras que los dos últimos permiten un diagnóstico definitivo (Martín-González, 2012). Se describió hipoplasias del esmalte en dientes primarios, las cuales afectan solo algunos ameloblastos generando grosor disminuido y menor grado de mineralización (Sabel y cols. 2010).

El tratamiento de las AI debe basarse en la prevención antes que en la intervención. La edad del paciente es importante para decidir sobre el mejor tratamiento a seguir, restauraciones directas con resinas compuestas son recomendadas para niños y adolescentes, mientras que las restauraciones indirectas son recomendadas para pacientes adultos. En el futuro, el tratamiento apropiado será elegido en base a un diagnóstico con base genética, logrando así un mejor resultado (Alachioti y cols. 2014).

### **Amelogenina y Amelogénesis imperfecta**

Como ya se mencionó, la amelogenina es la proteína más abundante del esmalte, es esencial para la formación de este tejido y se le considera una proteína estructural junto a la ameloblastina y enamelinina. Es secretada por ameloblastos, principalmente durante la fase secretora, y en esta misma etapa se secreta MMP-20, la proteinasa que degrada amelogenina. Una vez que el esmalte alcanza su grosor total, los ameloblastos pasan a la etapa de maduración, durante la cual se acortan y tienen un rol predominantemente reabsortivo, secretando principalmente KLK4, esta proteinasa también puede degradar amelogenina y otras proteínas. El gen que codifica la proteína amelogenina se ubica en los cromosomas X e Y (John D. Bartlett, 2013).

Aún, cuando no se conoce exactamente el rol de la amelogenina, se ha observado en ratones *Knockout* que tienen cristales de menor tamaño y menos

organizados (Wright J. T. y cols. 2011). En humanos, la delección de *AMELX* genera un esmalte delgado con mayor rugosidad. Estos hallazgos sugieren que la amelogenina no es necesaria para la nucleación de cristales, pero sí tendría un rol relevante para el crecimiento en longitud de los cristales del esmalte y su organización (Hu J.C. y cols. 2012).

El gen *AMELX* humano se transcribe originando 5 mRNA's que se traducen en diferentes isoformas proteicas de amelogenina, que se expresan en etapas tempranas de la amelogénesis (Salido E.C. y cols. 1992).

A través de estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos anti-amelogenina (C-19 Santa Cruz, CA, USA), se ha demostrado que los epítomos de amelogenina se expresan en pre-ameloblastos, ameloblastos secretores y matriz de esmalte en molares de ratón en desarrollo (Feng J. y cols. 2012) y que amelogenina se co-localiza con ameloblastina en matriz de esmalte en desarrollo (Mazumder P y cols. 2014). Recientemente, se ha demostrado con técnicas inmunohistoquímicas, la presencia de amelogenina en dientes de pacientes afectados por Amelogénesis imperfecta hipocalcificada (Urzúa B y cols. 2015). Sin embargo, existe escasa información respecto a la expresión de esta proteína en dientes de pacientes afectados por otros tipos de Amelogénesis imperfecta.

## **2.5. DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA**

### **Cambios en la Clasificación de las Dentinogénesis Imperfectas**

La dentinogénesis imperfecta (DI) es una condición hereditaria que ha sido clasificada de diversas formas, la clasificación más antigua es la de Shields del año 1973, que la clasifica en tres tipos en base a los aspectos clínicos, radiográficos e histológicos: 1) Dentinogénesis Imperfecta tipo I (DGI-I), en que se observa dientes opalescentes asociados con Osteogénesis Imperfecta (OI). 2) Dentinogénesis Imperfecta tipo II, que sólo presenta dientes opalescentes y 3) Dentinogénesis Imperfecta tipo III, en la cual se observa dientes opalescentes con cámaras pulpares amplias con múltiples exposiciones pulpares (Shields y cols. 1973).

En esa época, Shields consideraba en un grupo diferente de patologías de la estructura de la dentina a las Displasias dentinarias, que las subdividía en Displasia dentinaria tipo I y tipo II. La Displasia dentinaria tipo I se consideraba como una condición caracterizada por presentar obliteración de la cámara pulpar con dentina tubular atípica, osteodentina y masas irregulares globulares que se describen como "Flujo de lava alrededor de la roca" con escaso desarrollo de dentina radicular y con temprana pérdida de los dientes. La Displasia dentinaria tipo II se describe como una condición con características clínicas y radiográficas similares a la Dentinogénesis Imperfecta. En la dentición temporal los dientes con Displasias dentinarias presentan una longitud radicular normal, con dentina translúcida y coloración que varía entre azul y marrón. Según esta descripción los dientes presentarían coronas bulbosas, constricción apical, raíces delgadas y temprana obliteración de la pulpa, mientras que los dientes permanentes muestran coloración clínica normal, sin embargo, las cámaras pulpares exhiben elongación de la cámara pulpar hacia apical (Shields y cols. 1973; Neville y cols. 2008).

Posteriormente, los estudios moleculares con relación a mutaciones asociadas a las alteraciones de la dentina permitieron reclasificar estas patologías. Actualmente, se ha identificado mutaciones en dos genes que pueden afectar la estructura de la dentina, estos son los genes que codifican el colágeno I (COL1A1, COL1A2) y la dentina sialofosfoproteína (DSPP). En base a esas consideraciones en la actualidad, se han reclasificado las alteraciones de la dentina.

**Osteogénesis imperfecta con dientes opalescentes:** Es un desorden genético que se caracteriza por fracturas múltiples frente a traumas mínimos en niños y adultos. Cerca de un 90% está relacionado con mutaciones en los genes que codifican el colágeno I: COLA1-COLA2. Se han descrito al menos 15 subtipos de OI, causadas por mutaciones en 11 genes que presentan diferentes fenotipos con diversos grados de severidad. Muchas de las otras formas raras de OI se

deben a defectos en las proteínas implicadas en el entrecruzamiento, hidroxilación, y la mineralización del colágeno tipo I (Shaker y cols. 2010). Se ha evidenciado que no todos los tipos de OI presentan como rasgo fenotípico los dientes opalescentes (Kavitha y cols. 2010). Por lo tanto, actualmente este grupo de pacientes están claramente diferenciados de las Dentinogénesis imperfectas puras.

**Dentinogénesis imperfecta DI:** Actualmente se sabe que ocurre por mutaciones del gen que codifica DSPP e incluye la Dentinogénesis Imperfecta tipo II y tipo III según la clasificación de Shields y a la Displasia dentinaria tipo II de este mismo autor. Estas tres patologías dentinarias en la actualidad se consideran con los mismos rasgos fenotípicos y relacionados a mutación del gen DSPP. Recientemente, La Dure Molla y cols. (2014) propusieron la clasificación que se presenta en la Tabla II.

**Displasia dentinaria:** Actualmente se considera como una entidad diferente a las Dentinogénesis imperfectas. Este desorden se divide en dos, Displasia Dentinaria tipo I (DD-1) y Displasia dentinaria tipo II (DD-2). La DD-1 se encuentra asociada a mutación de genes VPS4B, SSUH2 y SMOC2y la DD-2, como ya se mencionó esta asociada a mutación de DSPP (Chen, 2018). La Dure Molla propone denominar a la DD-1 como Displasia dentinaria radicular (Tablall).

<b>Tabla II Antigua y Nueva clasificación de enfermedades de dentina aislada</b>		
<b>OMIM</b>	<b>Clasificación de Shields de enfermedades dentinarias aisladas</b>	<b>Clasificación propuesta de enfermedades dentinarias aisladas</b>
125400	Displasia Dentinaria Tipo I	Displasia Dentinaria Radicular
125420	Displasia Dentinaria Tipo II	Dentinogénesis imperfecta Forma Leve
125490	Dentinogénesis Imperfecta tipo II	Forma Moderada
125500	Dentinogénesis imperfecta tipo III	Forma severa

(La Dure Molla y col., 2014)

### **Características de las Dentinogénesis imperfectas**

La Dentinogénesis Imperfecta es una condición que sigue un patrón de herencia autosómica dominante. Presenta una incidencia de 1:8000 casos en los Estados Unidos (Neville y cols. 2008). Se caracteriza por presentar la estructura de la dentina anormal, afectando la dentición primaria y permanente. Clínicamente, los dientes tienen una apariencia opalescente de color ámbar, marrón y marrón claro. Radiográficamente, las coronas aparecen bulbosas, en algunos casos las cámaras pulpares aparecen pequeñas u obliteradas y las raíces son angostas y con conductos pulpares obliterados (Barron y cols. 2008).

La característica clínica típica de la DI-II es la presencia de dientes translúcidos-opalescentes de color azul-marrón claro en ausencia de anomalías óseas. La afectación de los dientes primarios suele ser más grave que la de los permanentes. Aunque el esmalte no está afectado, tiende a fracturarse por existir una unión amelodentinaria anómala y estar soportado por una dentina muy blanda, dando a los dientes un aspecto de pseudo-amelogénesis imperfecta. En la DI-III los dientes presentan una decoloración de color ámbar, grave atrición, exposiciones pulpares múltiples, y un aspecto radiográfico característico de

dientes en cáscara (Martín-González y cols. 2012). Lo importante para el tratamiento en estos pacientes, es proteger los dientes del desgaste y evitar fuentes de infección y aliviar el dolor, restauraciones estética y proteger a los dientes del desgaste (Barron y cols. 2008).

Recientemente, se ha descrito en análisis histológicos de dentinogénesis imperfecta cambios displásicos en la dentina, que se caracterizaron por una matriz de dentina granular anormal debido a la presencia de mineralización interglobular y túbulos dentinales irregulares reducidos en número, dispuestas al azar, y de mayor tamaño. El límite amelo-dentinario se caracterizaba por una falta de festoneado (Taleb y cols. 2018).

#### **DSPP y Dentinogénesis imperfecta**

DSPP es una proteína no colágena que pertenece a la familia SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoprotein), las cuales son proteínas altamente fosforiladas que participan en el proceso de mineralización de matrices colágenas mineralizadas (Deshpande y cols. 2011). Al ser procesada por proteasas, DSPP genera tres proteínas: Dentina sialoproteína (DSP), Dentina glicoproteína (DGP) y Dentina Fosfoproteína (DPP). DPP es la proteína no colágena más abundante de la dentina y presenta afinidad por las zonas de entrecruzamiento de las fibras de colágeno. DPP no fosforilada puede estabilizar fosfato de calcio amorfo (ACP), sin embargo DPP fosforilada sola inhibiría la mineralización, pero al estar con colágeno induce mineralización intra y extra fibrilar (Desphane y cols 2011).

DSPP ha sido detectada mediante inmunohistoquímica en predentina y en bajo porcentaje en dentina de dientes humanos sanos, localizándose principalmente en la dentina peritubular, mientras que en dentina esclerótica asociada a caries se ha observado en mayor concentración y presente además en dentina intertubular (Martini D., 2013).

Por otro lado, en ratones nulos para DSPP se han observado alteraciones en los dientes similares a Dentinogénesis imperfecta tipo III, tales como:

hipomineralización de la dentina, extensa cámara pulpar, aumento de grosor de la pre dentina y reducción de la zona de dentina (Sreenath T. y cols. 2003). En ratones transgénicos cuyos odontoblastos sobre-expresan el factor de transcripción Trps 1 (ratones Col 1a1-Trps), se han detectado alteraciones similares a dentinogénesis imperfecta con hipomineralización severa de la dentina y disminución del grosor de la dentina, lo que se explicaría por una inhibición directa del promotor de DSPP (Napierala D. y cols. 2012).

Se ha descrito también la expresión de DSPP en otros tejidos como hueso alveolar y periodonto, incluso en tejidos no mineralizados como glándulas salivales y riñones (Ritchie 2018).

## **2.6. ODONTODISPLASIA REGIONAL**

La Odontodisplasia regional es una rara anomalía dental que afecta generalmente un cuadrante tanto de la dentición primaria como secundaria, afectando con mayor frecuencia la maxila. La prevalencia reportada de esta anomalía es de 1/1.000.000. Esta condición afecta a los tejidos duros del diente tanto de origen ectodérmico como mesodérmico. La Odontodisplasia regional es una condición de etiología desconocida y se han propuesto muchos factores causales, tales como: trauma, infección, isquemia o defectos en la vascularización, daño neural, deficiencias nutricionales, drogas teratogénicas y mutaciones somáticas. Esta condición afecta más a mujeres que a hombres y generalmente afecta un cuadrante (Rashidian y cols. 2013), aunque se ha reportado casos en que la afección es generalizada o asociada a síndromes como el óculo dento digital (Mostafa I. y cols. 2013).

Los escasos reportes clínicos de dientes afectados con ODR indican suelen ser más pequeños que lo normal, con una textura de superficie rugosa, con fosas extensas y presencia de surcos. Este esmalte sería hipocalcificado y/o hipoplásico (All-Mullahi y cols. 2016). Los dientes se han descrito con una coloración café o amarillenta, generalmente acompañado con una falla en la

erupción dentaria, aumento de volumen y absceso gingival e infección periapical (Rashidian y cols. 2013). Estos dientes afectados serían más susceptibles a caries dental por mineralización defectuosa (Al-Mullahi y cols. 2016).

Los estudios radiográficos de ODR también son limitados, y se ha descrito una apariencia de “diente fantasma”, debido a la reducción en el grosor y radiodensidad del esmalte y la dentina. En algunos casos el diente aparece con signos de poco desarrollo, tales como: cámaras pulpares amplias y raíces cortas con ápices abiertos (Al-Tuwirqi y cols. 2014).

Histológicamente, se ha encontrado una gran variedad de grosores de esmalte, con patrones irregulares de sus prismas. Se ha descrito una marcada reducción cuantitativa de la dentina, con túbulos dentinarios irregulares y presencia de dentina interglobular. La pulpa presentaría varios grados de calcificación y calcificaciones enameloides (Al-Tuwirqi y cols. 2014, Mostafa I. y cols. 2013). Otros estudios revelaron dentina atubular con varias zonas de material amorfo (Jahanimoghadam y cols. 2016). Sin embargo, a nuestro entender no se han realizado estudios de MEB o de inmunohistoquímica en este tipo de alteración.

El manejo de esta condición requiere de atención multidisciplinaria, ya que el objetivo del tratamiento es mejorar la estética y proporcionar una buena función dental y oral de los niños afectados. En general, existe mucha controversia en relación al mejor tratamiento a utilizar con los pacientes afectados (Rashidian y cols. 2013).

Actualmente se desconoce la etiología de la Odontodisplasia regional, y a nuestro entender no hay reportes de la expresión de proteínas del esmalte o de la dentina en esta condición, respecto de la cual la mayoría de la información corresponde a reportes de casos (Al-Tuwirqi y cols. 2014, Mostafa I. y cols. 2013).

## 2.7. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En general, existe escasa información respecto a la expresión de las proteínas amelogenina (AMELX) y Dentina sialofosfoproteína (DSPP) en dientes de pacientes afectados por patologías como Amelogénesis imperfecta, Dentinogénesis imperfecta u Odontodisplasia regional, y escasos estudios que caractericen microscópicamente estas condiciones en poblaciones latinoamericanas.

Las definiciones y clasificaciones de las Amelogénesis imperfectas han variado a través de los años, las primeras definiciones de amelogénesis imperfecta la consideraban como una alteración exclusiva del esmalte: “Grupo de condiciones hereditarias que afectan la apariencia clínica del esmalte de todos o casi todos los dientes, que ocurre en familias, en las cuales los individuos afectados presentan esencialmente el mismo defecto y que **no está asociado con cambios morfológicos o bioquímicos en otra parte del cuerpo**” (Witkop y Rao,1971). Sin embargo, posteriormente la definición de Amelogénesis imperfecta se amplió siendo definida por Aldred, Savarirayan y Crawford en el año 2003 (Aldred, 2003) como “Grupo de condiciones, de origen genómico, que afecta la estructura y apariencia clínica del esmalte de todos o casi todos los dientes y que **puede estar asociada con cambios morfológicos o bioquímicos en cualquier parte del cuerpo**”. Adicionalmente, se sabe que más de 80 síndromes de base genética presentan Amelogénesis imperfecta como parte de las manifestaciones de la entidad (Prasad, 2015).

Los recientes hallazgos respecto de las mutaciones participantes en diferentes alteraciones de la estructura dentaria no están bien caracterizados desde el punto de vista morfológico y ultraestructural y se desconoce en muchos casos la correlación entre el genotipo y el fenotipo de estas alteraciones. También se desconoce cómo las mutaciones en diferentes regiones de un mismo gen pueden originar alteraciones morfológicas diversas que en el pasado fueron clasificadas como patologías diferentes, como es el caso de las Dentinogénesis

imperfectas y Displasia dentinaria. Por lo que se requiere profundizar y caracterizar la morfología y ultraestructura en dientes humanos afectados.

Por otro lado, recientemente se describió en integrantes de dos familias con mutaciones en el gen DSPP, que se consideraba la mutación causal exclusivamente de Dentinogénesis imperfecta, el hallazgo de malformaciones en el esmalte dentario. Estos autores atribuyen el defecto en el esmalte a que la DSPP mutada se expresa en forma transitoria en los pre-ameloblastos alterando su función y por lo tanto la estructura del tejido adamantino (Wang, 2011). En un estudio más reciente, se encontró que la mayoría de las Amelogénesis imperfectas autosómicas dominantes presentaban mutaciones de COL17A1, mutaciones que hasta la fecha sólo se habían asociado a Epidermolisis bulosa de la unión en que junto a alteraciones funcionales severas de la unión dermoepidérmica se presenta Amelogénesis imperfecta hipoplásica severa. (Prasad, 2015).

Debido a estos nuevos descubrimientos que muestran que la etiopatogenia de las Amelogénesis imperfectas y Dentinogénesis imperfecta es mucho más compleja de lo que se pensaba hace algunos años y que la interacción entre genes que codifican para proteínas que se expresan tanto en esmalte como en dentina es más estrecha, es importante estudiar la estructura de los diferentes tejidos que forman parte del diente, incluyendo no sólo el esmalte, sino también la dentina a través de diferentes técnicas como la inmunohistoquímica o el microscopio electrónico, en base a los nuevos conocimientos respecto a las alteraciones genéticas asociadas a algunos tipos de amelogénesis imperfecta y contrastarlo con las alteraciones observadas en las Dentinogénesis imperfectas.

Por lo tanto, el principal objetivo del presente trabajo es caracterizar el fenotipo histológico y ultraestructural tanto del esmalte como de dentina en patologías que afectan su estructura donde se realizará una comparación histopatológica, ultra estructural e inmunohistoquímica de dientes donados por

pacientes chilenos con Amelogénesis imperfecta (AI), Dentinogénesis imperfecta (DI) y odontodisplasia regional (ODR) con dientes controles sanos.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis:**

Los dientes con Amelogénesis imperfecta, Dentinogénesis imperfecta y Odontodisplasia regional presentarán alteraciones histopatológicas, ultraestructurales e Inmunohistoquímicas de las proteínas amelogenina y dentinsialofosfoproteína, tanto en esmalte como en dentina respecto de los controles sanos.

### **Objetivo General:**

Comparar las características histopatológicas, ultraestructurales y expresión inmunohistoquímica de las proteínas amelogenina y dentina sialofosfo proteína en esmalte y dentina de pacientes con Amelogénesis imperfecta, Dentinogénesis imperfecta y Odontodisplasia regional con dientes controles sanos.

### **Objetivos específicos:**

- 1.- Comparar características histopatológicas de esmalte y dentina de dientes de pacientes con Amelogénesis imperfecta, Dentinogénesis imperfecta y Odontodisplasia regional con dientes controles sanos.
- 2.- Comparar la conformación ultra estructural de esmalte y dentina de dientes de pacientes con Amelogénesis imperfecta, Dentinogénesis imperfecta y Odontodisplasia regional con dientes controles sanos.
- 3.- Comparar la expresión y localización de las proteínas amelogenina y dentinsialofosfoproteína en esmalte y dentina de pacientes chilenos con Amelogénesis imperfecta, Dentinogénesis imperfecta y Odontodisplasia regional con dientes controles sanos.

#### **4. MATERIAL Y MÉTODO**

Este trabajo es parte del proyecto FONDECYT N° 1140905 titulado “Mutational analysis of causal genes of Amelogenesis Imperfecta and a search for new genes involved in its etiology through techniques of exome capture and massive parallel sequencing”, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

**4.1 TIPO DE ESTUDIO:** Descriptivo, serie de casos, transversal.

#### **4.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

El muestreo corresponde al tipo no probabilístico de conveniencia.

#### **4.3 JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Debido a la escasa prevalencia de estas patologías dentarias, ya que es difícil de determinar qué porcentaje de estas familias accederán a participar del estudio, el tamaño de la muestra se determinó por conveniencia.

#### **4.4 ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD DE LA INVESTIGACIÓN**

Para todos los casos de Amelogenesis imperfecta se cuenta con un consentimiento informado de los participantes y/o de sus tutores en los casos de menores de edad, que se encuentra bajo el marco del proyecto FONDECYT N° 1140905.

Para los casos de Dentinogenesis imperfecta y de Odontodisplasia regional se cuenta con consentimientos informados generales que autorizan la utilización del diente con fines de investigación.

Todos los dientes estudiados en este trabajo corresponden a dientes primarios exfoliados en forma natural, dientes permanentes como terceros molares extraídos por propósitos de ortodoncia, o dientes no funcionales extraídos por imposibilidad de tratamiento.

Para los casos de Amelogénesis imperfecta se cuenta con la autorización del Comité de Bioseguridad del Campus. Los procedimientos histopatológicos y de inmunohistoquímica fueron aplicados considerando las normas de bioseguridad del laboratorio de Anatomía Patológica.

#### **4.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

Se incluyó en este estudio los siguientes casos:

Pacientes: con alteraciones dentarias de estructura que clínicamente cumplieron con los criterios diagnósticos clínico-radiográficos de Amelogénesis imperfecta según Witkop (1989), Dentinogénesis imperfecta según Hart (2007) u Odontodisplasia regional según Crawford y Aldred (1989), con afección ya sea de dentición temporal o permanente y que donaron dientes exfoliados o extraídos por motivos distintos a esta investigación.

Controles: personas sanas con dentición temporal y definitiva que presenten esmalte y dentina de color, grosor y dureza normal, no relacionados con los pacientes en estudio, estos individuos fueron pareados por género, edad, origen étnico y estatus socio-económico.

#### **4.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

Personas que no autorizaron su participación a través del consentimiento informado. Personas que presentaron alteraciones sistémicas como Epidermólisis bulosa, Epilepsia, Displasia ectodérmica u otras.

Personas que vivieron los primeros 6 años de vida en ciudades con alto contenido de flúor en el agua potable o que recibieron fluoruros en forma de gotas o comprimidos durante los 6 primeros años de vida.

Personas que recibieron tetraciclinas o derivadas de estas durante los primeros 6 años de vida.

## **4.7 PROCEDIMIENTO**

### ***Sujetos en estudio***

En el estudio se incluyó pacientes con diagnóstico de AI, DI y ODR a los que se les solicitó consentimiento o asentimiento informado y que accedieron a donar dientes en las siguientes condiciones: dientes temporales exfoliados, terceros molares con indicación de exodoncia, o dientes que han requerido exodoncia por presentar malformaciones extremas que los hacen no funcionales e impiden su restauración.

Se analizó 12 dientes con diagnóstico Clínico-Radiográfico de Amelogénesis imperfecta (tres con AI hipoplásica, seis con AI hipomadura y tres con AI hipocalcificada) según criterios de Witkop, cinco dientes con Dentinogénesis imperfecta y tres dientes con Odontodisplasia Regional. Los dientes controles corresponden a 14 casos con apariencia clínica y radiográfica normal de los cuales ocho son dientes temporales exfoliados y siete dientes permanentes sanos que corresponden a terceros molares o premolares extraídos por causas ortodóncicas.

Para la caracterización y diagnóstico clínico radiográfico de cada uno de los participantes que donaron dientes, se realizó anamnesis, examen clínico y exámenes radiográficos de los dientes aportados. El análisis histológico se realizó a través de dos métodos: a) muestras sin desmineralizar, las cuales fueron cortadas con sierra diamantada y observadas con microscopía óptica de luz corriente y con luz polarizada; b) muestras descalcificadas para técnicas de rutina así como inmunohistoquímica. El estudio ultraestructural se realizó con microscopía electrónica de barrido.

### ***Diagnóstico Clínico Radiográfico***

El estudio y diagnóstico clínico radiográfico fue realizado previamente mediante consenso por dos cirujanas dentistas especialistas en Patología Oral, basándose en los hallazgos clínicos y radiográficos. Adicionalmente se cuenta con las genealogías de las familias respectivas. Los datos fueron registrados en una ficha ad-hoc (Anexo1). La anamnesis fue dirigida a condiciones ambientales o genéticas que puedan estar asociadas con alteraciones del desarrollo de la dentición tales como: Ciudad de residencia los primeros 6 años de vida, consumo de fluoruros en diversas formas, consumo de antibióticos como tetraciclina, etc. El examen extra e intraoral se llevó a cabo en un sillón dental con instrumental de examen y se tomaron registros fotográficos de las arcadas dentarias.

### ***Análisis morfológicos de los dientes***

Se recolectaron los dientes donados por los pacientes ya sea que se encuentren almacenados en seco o fijados en formalina. Cuando los pacientes donaron varios dientes primarios se realizó un tipo de estudio morfológico por diente, en el caso de 3ros molares se dividió el molar hasta en 3 segmentos para realizar diferentes estudios morfológicos a cada segmento. En aquellos casos en que se contó solo con un diente temporal se decidió, según el tipo de patología presente, el tipo de análisis morfológico.

### ***Cortes por desgaste***

Estos dientes se incluyeron enacrílico, se cortaron con sierra diamantada en una máquina rotatoria marca BUEHLER y se adelgazaron hasta obtener cortes de aprox. 70  $\mu$ , los que fueron deshidratados en alcohol y acetonas ascendentes y montados en portaobjetos con medio de montaje Flotex para observación por microscopía de luz óptica.

### ***Análisis con microscopía con luz polarizada de dientes con técnica de corte por desgaste***

Los dientes donados para cortes por desgaste que han sido previamente cortados, adelgazados y montados en portaobjetos, fueron

analizados con el mismo microscopio de luz al que se agregó dos filtros de luz polarizada.

#### ***Técnica histológica de rutina***

Los dientes fueron fijados en formalina al 10% a pH 7.2 a temperatura ambiente por 48 a 72 horas. Una vez terminado el proceso de fijación, las muestras fueron descalcificadas en etilendiaminotetraacético (EDTA) (Hu, 2014, Bosshardt, 2003) al 5% a pH 7, bajo agitación, cambiando la solución una vez por semana.

Una vez completado el proceso de descalcificación, las muestras fueron lavadas en agua corriente durante 24 hrs. Se sometió a técnica histológica de rutina y se obtuvieron cortes de 5µm con navajas para tejidos duros (marca Feather®) en micrótopo (marca E. LeitzWetzlar®), posteriormente fueron colocadas en un baño de estirado (marca Labline®) a 38°C; cada corte fue recogido en portaobjetos y secados a 60° C por 30 minutos en estufa (marca Memmert®), y se realizó tinción de rutina Hematoxilina-Eosina.

#### ***Análisis inmunohistoquímico***

Los dientes fueron procesados con la técnica histológica descrita en el ítem anterior hasta la etapa de cortes, los que fueron montados en portaobjetos silanizados. Para la recuperación antigénica, los cortes fueron expuestos a buffer citrato 0,01M (pH 6) con calor por 20 minutos. Luego se aplicó peróxido de hidrógeno al 3% en metanol para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena por 10 minutos a temperatura ambiente. Los cortes fueron incubados por 20 minutos a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios: Amelogenina (C-19) para péptido en el extremo C-terminal, Amelogenina (F-11) toda la extensión de la proteína, DSPP (LFMb-21) corresponde a segmento dentina fosfoproteína (DPP) y DSPP ab122321 (Abcam) corresponde a segmento dentina sialoproteína-dentina glicoproteína (DSP- DGP) (tabla III).

**Tabla III. Características de los anticuerpos empleados.**

ANTICUERPO	TIPO	CLON	ISOTIPO	CATALOG NO.	LOCALIZACION	EPITOPO
Amelogenina(C-19)	Cabra/ policlonal	(C-19)	IgG	sc-33109	Citoplasmática, Matriz extracelular	Péptido en extremo C- terminal
Amelogenina (F-11)	Ratón monoclonal	(F-11)	IgG <sub>1</sub>	sc-365284	Nuclear, Citoplasmática, Matriz extracelular	Aminoácidos 1-191
DSPP (LFMb-21)	Ratón monoclonal	(LFMb- 21)	IgG2b	Sc- 73632	Citoplasmática, Matriz extracelular	Aminoácidos 487-502 (DPP)
DSPP ab122321	Conejo/ policlonal		IgG	ab122321	Citoplasmática, Matriz extracelular	Aminoácidos 292-387 (DSP- DGP)

Posteriormente fueron lavados en PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado por 20 minutos a 37°C. Finalmente, se aplicó el complejo avidina-biotina-peroxidasa para unir el anticuerpo primario con el uso de VECTASTAIN ® ABC. Los productos de reacción se visualizaron mediante inmersión de los cortes histopatológicos en diaminobenzidina (DAB) por 3 a 5 min. La tinción nuclear de contraste se realizó con hematoxilina de Harris. Para el estudio de controles negativos del anticuerpo, los cortes se trataron con buffer fosfato salino en lugar del anticuerpo primario. Para controles positivos se empleó un germen dentario humano asociado a una lesión tumoral.

#### **Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Los dientes fueron limpiados con hipoclorito de sodio al 5%, fracturados y luego lavados con EDTA al 5% por 5 minutos para eliminar el barro dentinario y otros detritus. Luego fueron deshidratados en acetonas ascendentes de 70%, 90% y 100%. El secado final y metalizado se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, en un microscopio Zeiss

modelo DMS 940, de la Facultad de Medicina y de Odontología de la Universidad de Chile.

#### **4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El tamaño muestra no se calculó porque corresponde a un censo de todos los casos detectados con diagnóstico de Amelogénesis imperfecta, Dentinogénesis imperfecta y Odontodisplasia regional en los que se contó con donación de piezas dentarias de estos pacientes en el tiempo del estudio. En dichos casos se determinó las características clínicas, radiográficas, histopatológicas y ultraestructurales de los dientes afectados.

Estas características fueron descritas con medidas de tendencia central como porcentajes, mediana con rango intercuartílico o desviación estándar.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA UTILIZADA EN EL ESTUDIO.

La **tabla IV** resume las características generales de la muestra de dientes y de sus respectivos donantes.

**Sujetos donantes de dientes y muestras donadas.** En este estudio participaron 28 sujetos voluntarios que donaron un total de 34 dientes temporales y/o permanentes incluyendo los dientes controles para ser analizados morfológicamente. La edad registrada fue la edad en que se examinó a los pacientes y en que ellos firmaron el consentimiento informado, aun cuando varios pacientes donaron dientes temporales que habían exfoliado algunos años antes del actual estudio. La mediana y rango de edad de los individuos estudiados fue de 13 (4-69) años (tabla IV).

Del número total de pacientes, 12 sujetos se encontraban afectados con Amelogénesis Imperfecta (AI), cinco presentaban Dentinogénesis Imperfecta (DI), un paciente presentaba Odontodisplasia Regional (ODR) quien donó tres dientes y 10 personas controles donaron 14 dientes.

**Pacientes con Amelogénesis Imperfecta:** De los 12 individuos clasificados clínica y radiográficamente como AI, tres eran del tipo AI Hipoplásicas, seis del tipo AI Hipomadura y tres del tipo AI Hipocalcificada, cada uno de ellos donó un diente. En todos estos pacientes se descartó una condición sindrómica. Clínicamente las AI hipoplásicas correspondieron a dos pacientes del sexo femenino y uno del sexo masculino. De los casos de sexo femenino uno presentó esmalte delgado generalizado y uno con fositas. En el caso del paciente de sexo masculino, este presentó esmalte delgado generalizado, con fositas y bandas de esmalte adelgazado.

De los seis pacientes con AI Hipomadura, tres eran del sexo femenino y tres de sexo masculino, y de los tres pacientes con AI Hipocalcificada uno es de sexo femenino y dos del sexo masculino (Tabla IV).

**Pacientes con Dentinogénesis Imperfecta:** De los cinco pacientes, tres presentan DI aislada y dos están asociadas a osteogénesis imperfecta. Los pacientes con DI aislada son un adulto varón que donó un premolar permanente y dos niñas que donaron dientes temporales. Es importante señalar que el niño con OI presenta cambios clínicos en sus dientes, mientras que la niña con OI no presenta cambios clínicos como dentina opalescente (Tabla IV, Tabla V).

**Paciente con Odontodisplasia Regional:** Respecto al caso con ODR el sujeto en estudio es del sexo femenino y donó tres dientes. Esta paciente presenta la afección en el cuadrante inferior izquierdo desde incisivo central a segundo premolar, en el maxilar superior izquierdo sólo presenta afectado el incisivo central el que se encuentra incluido. El diente permanente donado corresponde a un incisivo central inferior izquierdo que se encontraba incluido con extensa área radiolúcida pericoronaria bien delimitada. Se decidió realizar la exodoncia de este incisivo permanente debido a que presentaba paredes dentinarias coronarias y radiculares excesivamente delgadas con cámara y canal radicular muy amplio lo que no permitiría su restauración (Tabla IV). Los dos dientes temporales eran incisivos inferiores izquierdos.

**Pacientes controles:** El grupo control estaba formado por 10 individuos quienes donaron 14 dientes. Todos estos pacientes eran sistémicamente sanos y presentaban dientes clínica y radiográficamente normales (Tabla IV, Tabla V).

**Tabla IV.** Descripción general de la muestra de dientes y de sus respectivos donantes.

PACIENTES DONANTES	CONDICIÓN DEL DIENTE	SUBTIPO DE PATOLOGÍA	GÉNERO DONANTE (F ó M)		EDAD DONANTE (años)	TIPO DENTICIÓN (T ó P)		TIPO DENTICIÓN TEMPORAL				TIPO DENTICIÓN PERMANENTE		
			F	M	Mediana (Rango)	DT	DP	I	C	M	Fg	I	PM	M
PACIENTES CON AI n=12	DIENTES CON AI n = 12	AI Hipoplásica n= 3	2	1	9 (5-15)	3	0	1	1	1	0	0	0	0
		AI Hipomadura n= 6	3	3	12,5 (9-18)	6	0	1	1	4	0	0	0	0
		AI Hipocalcificada n= 3	1	2	17 (17-21)	1	2	0	0	0	1	0	0	2
PACIENTES CON DI n=5	DIENTES CON DI n= 5	DI n= 3	2	1	6 (4-69)	2	1	2	0	0	0	0	1	0
		DI + OI n= 2	1	1	6,5 (5-8)	2	0	1	0	1	0	0	0	0
PACIENTES CON ODR n=1	DIENTES CON ODR n=3	ODR n=3	1	0	13 (13-13)	2	1	2	0	0	0	1	0	0
PACIENTES CONTROLES SANOS n=10	DIENTES SANOS n = 14	Controles n=14	6	8	18 (7-24)	7	7	2	2	3	0	0	1	6
<b>TOTAL n=28</b>	<b>TOTAL n = 34</b>	--	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>(4-24)</b>	<b>23</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>8</b>

AI = Amelogénesis Imperfecta; DI= Dentinogenesis Imperfecta ODR= Odontodisplasia Regional F = Femenino; M = Masculino; Me = Mediana; DT = Diente Temporal; DP = Diente Permanente; I = Incisivo; C = Canino; M = Molar; PM = Premolar. Fg= Fragmento dentario

**Tabla V.** Características clínicas del esmalte y dentina de los dientes estudiados.

CONDICION DEL DIENTE	SUBTIPO DE PATOLOGIA	ESMALTE						DENTINA			
		Grosor			Color			Grosor	Color		Sintoma
		Normal	Delgado generalizado	Fositas o bandas	Normal	blanco opaco	Marrón	Normal	Normal	Opalescente	Sensibilidad dentinaria
AMELOGENESIS IMPERFECTA n=12	AI Hipoplásica n=3	0	2	1	2	1	0	3	3	0	0
	AI Hipomadura n=6	6	0	1	0	6	0	6	6	0	3
	AI Hipocalcificada n=3	3	0	0	0	1	3	3	3	0	3
DENTINOGENESIS IMPERFECTA n=5	DI n=3	3	0	0	3	0	0	0	0	3	-
	DI + OI n=2	2	0	0	2	0	0	0	0	2	-
ODR n=3	OD n=3	0	3	3	0	0	3	0	0	0	-
DIENTES SANOS n=14	Controles n=14	14	0	0	14	0	0	14	14	0	0
TOTAL n=34		28	5	5	21	8	6	26	26	5	6

AI = Amelogénesis Imperfecta; DI = Dentinogénesis Imperfecta

## 5.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE ESMALTE Y DENTINA DE DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGENESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CONTROLES SANOS.

Para el estudio histopatológico de los dientes se emplearon tres técnicas:

- 1) Cortes por desgaste observados con luz corriente.
- 2) Cortes por desgaste observados con luz polarizada.
- 3) Dientes descalcificados procesados con técnica histológica corriente con tinción hematoxilina-eosina.

### 5.2.1 Muestras analizadas por técnica de cortes por desgaste observados con luz corriente:

El total de muestras analizadas con la técnica de cortes por desgaste fue de 23 dientes.

**Dientes con Amelogénesis Imperfecta (AI):** De los pacientes con AI, se contó con una muestradentaria por cada paciente.

*AI Hipoplásica:* Al analizar con microscopía óptica con luz corriente los tres dientes presentaron esmalte de grosor disminuido generalizado, de los cuales una muestra presentó menor densidad de prismas, en otra muestra no se detectó estructura prismática y presentó disminución de translucidez (Figura 5A). La tercera muestra presentó grosor disminuido en algunas zonas dando una superficie ondulada, este esmalte presentó estructura prismática y zonas con pérdida de translucidez. El diente sin estructura prismática presentó leves alteraciones en dentina como ondulaciones más marcadas de los túbulos y presencia de dentina interglobular (Figura 6A; Tabla VI).

*AI Hipomadura:* Los seis dientes analizados presentaron grosor normal con pérdida de translucidez, en cinco casos la pérdida de translucidez se observó principalmente en tercio medio y externo del esmalte y en un caso pérdida de translucidez en todo el grosor del esmalte. Los seis casos presentaron estructura prismática (Figura 5B y 6B). Y en cuatro casos se observó dentina interglobular (Tabla VI).

*AI Hipocalcificada:* En los tres dientes se observó grosor normal, salvo en las zonas en que se fracturó el esmalte, en todos los casos se detectó pérdida de translucidez en tercios externo y medio del esmalte, estrías de Retzius muy marcadas y presencia de estructura prismática (Figura 5C y 6C). Sólo uno de estos casos presentó dentina interglobular en el tercio externo de la dentina coronaria (Figura 5C y 6C; Tabla VI).

**Dientes con Dentinogénesis Imperfecta (DI):** De los cinco dientes con DI, tres se destinaron para estudio con cortes por desgaste, uno corresponde a DI aislada y dos casos asociadas a Osteogénesis Imperfecta.

*Dentinogénesis imperfecta aislada:* En este diente gran parte del esmalte dentario se desprendió de la dentina, en el esmalte remanente se observó pérdida de translucidez, presencia de estructura prismática y abundantes husos.

La dentina presentó menor densidad de túbulos dentinarios cuya dirección está alterada observándose zonas de túbulos arremolinados cercanos a áreas con muy escasa densidad de túbulos (Figura 5E). Estos túbulos dentinarios presentaron un diámetro aparentemente normal, salvo escasos túbulos de mayor diámetro en los cuales se observó marcada ramificación lateral. También destacó la presencia de marcadas líneas incrementales en la dentina (Figura 6E; Tabla VI).

*Dentinogénesis imperfecta asociados a Osteogénesis Imperfecta:* Se han procesado y analizado dos casos para cortes por desgaste. Un caso corresponde a un incisivo temporal exfoliado el cual presentó esmalte con menor translucidez y con presencia de prismas. En la dentina se observó menor densidad de túbulos en todo el corte coronario, los cuales presentaron múltiples ramificaciones. La dentina del tercio superficial de la zona incisal fue la más alterada con presencia de dentina interglobular y algunos túbulos superficiales con curvaturas dando forma de “U” o túbulos que se fusionan en ángulo recto dando forma de “T”. También se observó túbulos dentinarios con mayor número de ramificaciones que los túbulos de dientes controles. El otro diente corresponde a un molar temporal exfoliado que presentó menor número de túbulos dentinarios los cuales presentaban curvaturas en forma de “U” en el tercio superficial de la dentina y (Figura 5F y 6F; Tabla VI).

**Dientes con Odontodisplasia Regional (ODR):** De los tres dientes con ODR, se procesaron dos dientes temporales para cortes por desgaste. El esmalte de estos dientes presentaba grosor muy disminuido, con superficie irregular ondulada y con prismas muy irregulares o ausentes. La dentina también presentaba muy escaso grosor, en el tercio externo se identificó túbulos relativamente normales, y en la dentina del tercio medio e interno se observó abundante dentina interglobular (Figura 5D y 6D; Tabla VI).

**Dientes controles sanos:** Del total de controles, se analizaron hasta ahora para esta técnica seis casos controles sanos, quedando pendientes ocho muestras

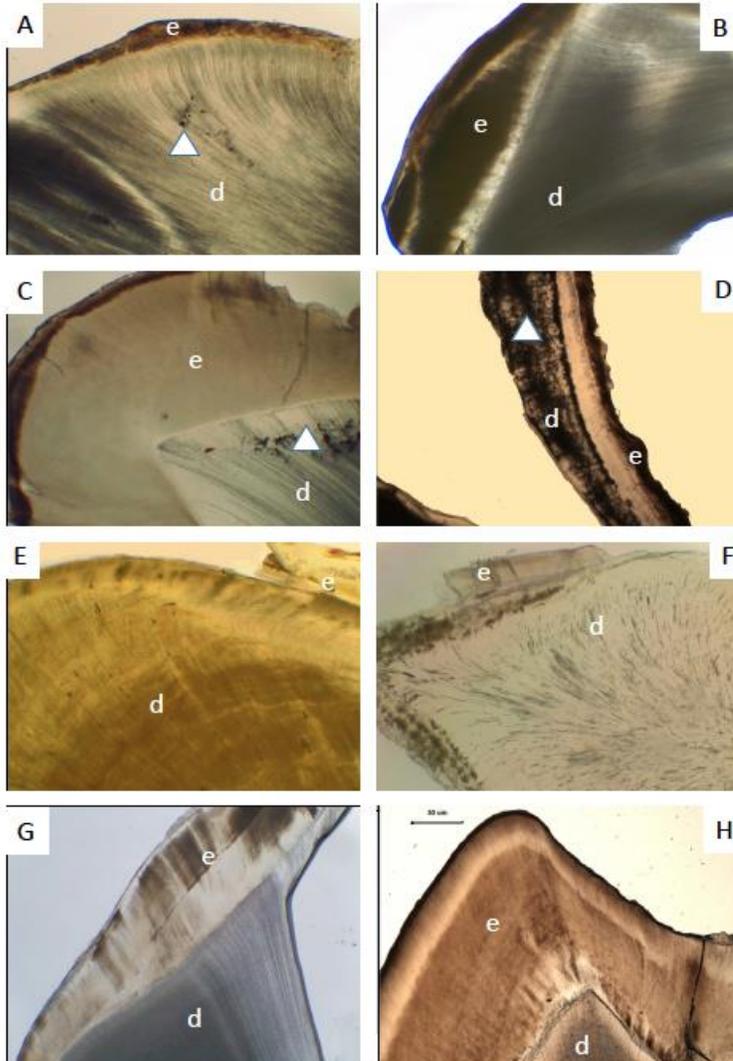
que están en proceso de preparación (Tabla VI). Con esta técnica se observó la estructura normal descrita en esmalte y en dentina tal como: presencia de prismas, presencia de túbulos dentinarios en organización normal (Figura 5G y 5H y Figura 6G y 6H).

**Tabla VI.** Dientes con técnica de cortes por desgaste observados con luz corriente.

CONDICIÓN DEL DIENTE	SUBTIPO DE PATOLOGÍA	Características del esmalte			Características de la dentina			
		Grosor normal (N° casos)	Presencia de prismas (N° casos)	Presencia de translucidez (N° casos)	Grosor normal (N° casos)	Paralelismo entre túbulos (N° casos)	Diámetro normal (N° casos)	Dentina interglobular (N° casos)
DIENTES CON AI n = 12	AI Hipoplásica n= 3	0	2	1	3	3	3	1
	AI Hipomadura n= 6	6	6	0	6	6	6	4
	AI Hipocalcificada n= 3	3*	3	0	3	3	3	1
DIENTES CON DI n=3	DI aislada n= 1	1*	1	0	1	0	0	1
	DI con OI n= 2	2*	2	0	0	0	0	1
DIENTES CON ODR n=2	ODR n=2	0	0	0	0	0	0	2
DIENTES SANOS n = 6	Controles n=6	6	6	6	6	6	6	0
TOTAL n = 23	--	18	21	7	19	18	18	10

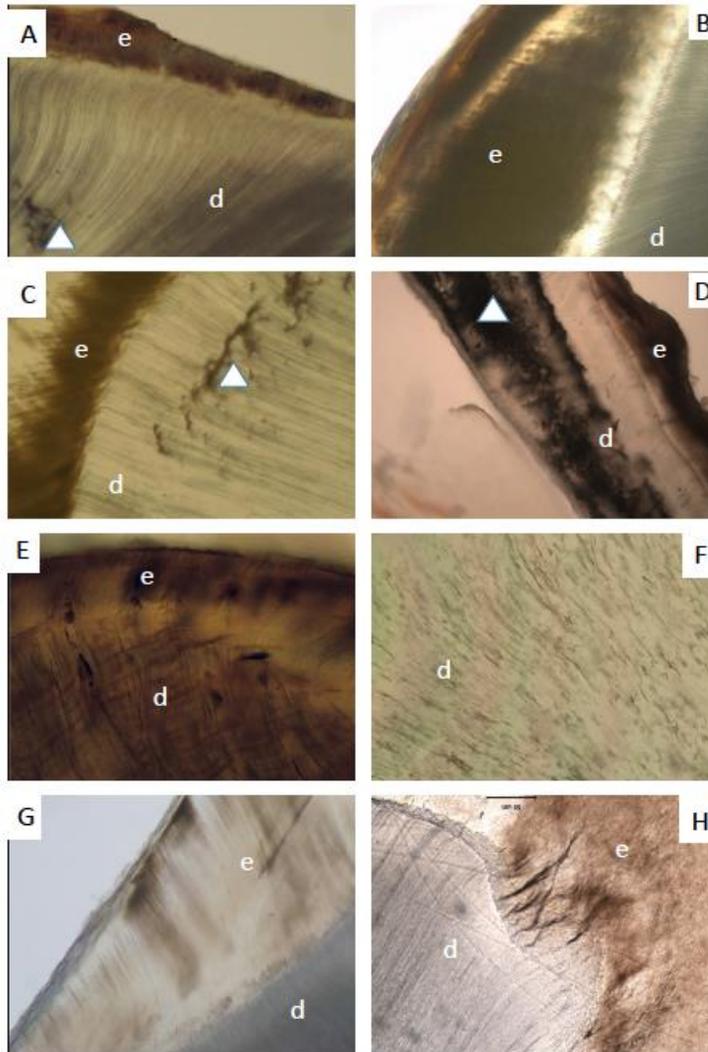
AI = Amelogénesis Imperfecta; DI= Dentinogénesis Imperfecta ODR= Odontodisplasia Regional. \*=Esmalte fracturado en gran parte de la muestra.

**FIGURA 5: CORTES POR DESGASTE DE DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CON LUZ CORRIENTE CON AUMENTO MENOR.**



**Fig. 5. Corte por desgaste con aumento 4x de dientes con:** **A.** AI Hipoplásica (dt) (molar), nótese el menor grosor del esmalte. **B.** AI Hipomadura (dt) (canino), se observa esmalte con menor traslucidez. **C.** AI Hipocalcificada (dp), (tercer molar extraído) el esmalte dentario presenta escasa traslucidez. **D.** ODR (dt), tanto el esmalte como dentina están adelgazados y estructura alterada. **E.** DI (dp), se observa escasa presencia de túbulos dentinarios. **F.** DI + OI (dt), la dentina presenta túbulos en forma de U. **G.** Control incisivo temporal (dt), se observa esmalte y dentina de grosor y estructura normal. **H.** Control molar permanente (dp) con esmalte y dentina de estructura normal. e=esmalte, d=dentina, cp=cámara pulpar.

**FIGURA 6: CORTES POR DESGASTE DE DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CON LUZ CORRIENTE CON AUMENTO MEDIO.**



**Fig. 6. Corte por desgaste con aumento 10x de dientes con:** **A.** Al Hipoplásica (dt), nótese el menor grosor del esmalte. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa esmalte con menor translucidez. **C.** Al Hipocalcificada (dt), el esmalte dentario presenta escasa translucidez. **D.** ODR (dt), tanto el esmalte como dentina están adelgazados y estructura alterada. **E.** DI (dp), se observa escasa presencia de túbulos dentinarios. **F.** DI + OI (dt), la dentina presenta túbulos irregulares con muchas ramificaciones. **G.** Control (dt), se observa esmalte y dentina de grosor y estructura normal. **H.** Control (dp) con esmalte y dentina de estructura normal. e=esmalte, d=dentina, cp=cámara pulpar, Triangulo blanco=dentina interglobular.

### **5.2.2. Muestras analizadas por técnica de cortes por desgaste observados con luz polarizada:**

Los 23 dientes analizados en cortes con desgaste con luz corriente se analizaron también con luz polarizada. En estos dientes, se analizaron dos parámetros:

1. Presencia de birrefringencia
2. Presencia de bandas de Hunter Schreger.

**Dientes con Amelogenesis Imperfecta (AI):** De los pacientes con AI, se contó con muestras dentarias en todos los casos.

*AI Hipoplásica:* Al analizar con microscopía óptica con luz polarizada de los tres casos, en uno se observó birrefringencia evidente y además se observaron bandas de Hunter Schreger. En los otros dos casos, en uno se observó escasa birrefringencia y el otro diente no presentó ninguna de estas dos características. (Figura 7 y 8; Tabla VII).

*AI Hipomadura:* Al analizar con microscopía óptica con luz polarizada, en los seis casos, se observó que la birrefringencia estaba marcada en dos casos y en los otros dientes se detectó exigua birrefringencia y las bandas de Hunter Schreger estaban presentes en todos los casos (Figura 7; Tabla VII).

*AI Hipocalcificada:* Al analizar con microscopía óptica con luz polarizada, en los tres casos estudiados, se observó que la birrefringencia está ausente en todos los casos al igual que las bandas de Hunter Schreger (Figura 7 y 8; Tabla VII).

#### **Dientes con Dentinogénesis Imperfecta (DI):**

*Dentinogénesis imperfecta aislada:* Al analizar con microscopía óptica con luz polarizada, se observó que el caso de Dentinogénesis Imperfecta aislada, carecía tanto de birrefringencia como de bandas de Hunter Schreger (Figura 7 y 8; Tabla VII).

*Dentinogénesis imperfecta asociados a Osteogénesis Imperfecta:* Al analizar con microscopía óptica con luz polarizada, no se observó birrefringencia en los dos casos ni se observaron las bandas de Hunter Schreger, en un caso la birrefringencia fue muy leve (Figura 7 y 8; Tabla VII).

**Dientes con Odontodisplasia Regional (ODR):** En los dos dientes con ODR se observó birrefringencia muy leve a nivel de la dentina, la que no se detectó en el esmalte. Las bandas de Hunter Schreger tampoco fueron observadas. (Figura 7D y 8D; Tabla VII).

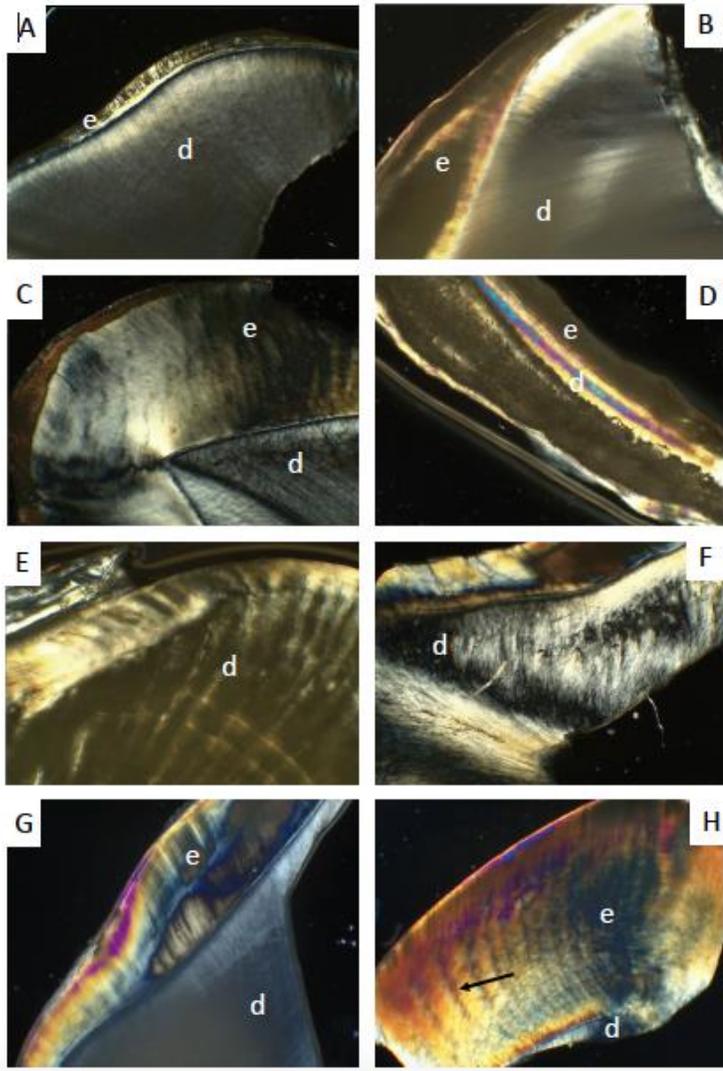
**Dientes controles sanos:** Del total de controles, se analizaron hasta ahora para esta técnica seis casos controles sanos, en el esmalte la birrefringencia era muy marcada y las bandas claras y oscuras Hunter Schreger se observaron muy claramente (Figura 7 y 8; Tabla VII).

**Tabla VII.** Dientes con técnica de cortes por desgaste observados con luz polarizada.

CONDICIÓN DEL DIENTE	SUBTIPO DE PATOLOGÍA	ESMALTE		DENTINA
		Birrefringencia (N° casos)	Presencia de bandas de Hunter Schreger (N° casos)	Birrefringencia (N° casos)
DIENTES CON AI n = 12	AI Hipoplásica n= 3	2*	1	0
	AI Hipomadura n= 6	2	6	0
	AI Hipocalcificada n= 3	0	0	0
DIENTES CON DI n=3	DI aislada n= 1	0	0	0
	DI con OI n= 2	1	0	0
DIENTES CON ODR n=2	ODR n=2	1	0	1
DIENTES SANOS n = 6	Controles n=6	6	6	0
TOTAL n = 23	--	12	13	1

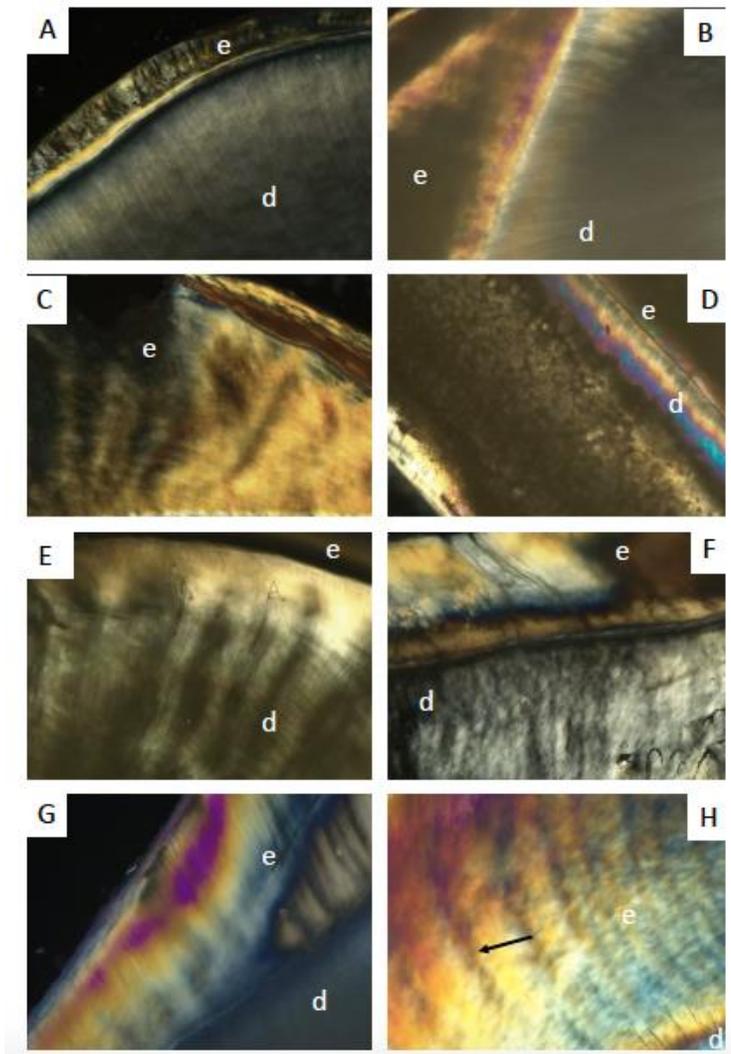
AI = Amelogénesis Imperfecta; DI= Dentinogénesis Imperfecta ODR= Odontodisplasia Regional. \*=Esmalte escaso

**FIGURA 7. CORTES POR DESGASTE CON LUZ POLARIZADA DE DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CONTROLES. AUMENTO MENOR.**



**Fig. 7. Corte por desgaste con luz polarizada aumento 4x de dientes con: A.** Al Hipoplásica (dt), nótese que no hay birrefringencia. **B.** Al Hipomadura (dt), esmalte con escasa birrefringencia. **C.** Al Hipocalcificada (dp), no existe birrefringencia. **D.** ODR (dt), nótese birrefringencia en dentina. **E.** DI (dp), se observa que no hay birrefringencia. **F.** DI + OI (dt), nótese poca birrefringencia. **G.** Control (dt), presencia de birrefringencia y bandas de Hunter Schreger. **H.** Control (dp) presencia de birrefringencia y bandas de hunter Schreger. e=esmalte, d=dentina.

**FIGURA 8. CORTES POR DESGASTE CON LUZ POLARIZADA DE DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CONTROLES SANOS. AUMENTO MEDIO.**



**Fig. 8. Corte por desgaste con luz polarizada aumento 10x de dientes con:**  
**A.** Al Hipoplásica (dt), nótese que no hay birrefringencia. **B.** Al Hipomadura (dt), esmalte con escasa birrefringencia. **C.** Al Hipocalcificada (dp), no existe birrefringencia. **D.** ODR (dt), nótese birrefringencia en dentina. **E.** DI (dp), se observa que no hay birrefringencia. **F.** DI + OI (dt), nótese poca birrefringencia. **G.** Control (dt), presencia de birrefringencia y bandas de Hunter Schreger. **H.** Control (dp) presencia de birrefringencia y bandas de hunter Schreger. e=esmalte, d=dentina, flecha=Bandas de Hunter Schreger.

### **5.2.3. Dientes descalcificados analizados por técnica histológica corriente y teñidos con hematoxilina-eosina.**

Se analizaron 29 muestras de dientes descalcificados con EDTA y procesados con técnica histológica corriente y teñidos con hematoxilina-eosina.

**Dientes con Amelogenesis Imperfecta:** Se estudiaron 12 dientes de pacientes con Amelogenesis Imperfecta, tres muestras del tipo AI Hipoplásica, seis del tipo AI Hipomadura y tres del tipo Hipocalcificada.

*AI Hipoplásica:* Se analizaron tres dientes, en los cuales después del proceso de descalcificación se perdió todo el esmalte, en los tres dientes analizados se observó dentina con túbulos dentinarios de dirección y diámetro normal y en un caso se observó presencia de dentina interglobular en menos de un décimo de la dentina (Figura 9A; Tabla VIII).

*AI Hipomadura:* De los seis casos estudiados con esta técnica, un caso presentó escasa presencia de matriz de esmalte donde se pudo verificar levemente la presencia de prismas, en cinco casos, la matriz de esmalte se perdió completamente después del proceso de descalcificación. A nivel de la dentina, se observó túbulos de forma y densidad normal en los seis casos y en tres casos hubo escasa presencia de dentina interglobular (menos de un décimo de la dentina observada) (Figura 9B; Tabla VIII).

*AI Hipocalcificada:* Los tres dientes en estudio después del proceso de descalcificación presentaron matriz de esmalte en la que se distinguió estructura prismática; sin embargo, esta matriz se observó separada de la dentina. Al analizar la dentina, se observó en los tres casos, túbulos dentinarios con forma, densidad y número normal. Sólo en un caso se detectó dentina interglobular (Figura 9C; Tabla VIII).

**Dientes con Dentinogénesis Imperfecta:** Se analizaron cuatro casos de Dentinogénesis Imperfecta, dos del tipo aislada y dos casos asociados a OI.

*Dentinogénesis imperfecta aislada:* Se analizaron dos dientes. En los dos casos de DI aislada, después del proceso de descalcificación, no se observó matriz de

esmalte. Al analizar la dentina, se observó muy escasos túbulos dentinarios con dirección y formas irregulares y límite amelodentinario plano, sin ondulaciones. En los dos casos se observó dentina interglobular. Otra característica observada fue la prolongación de cámara pulpar hacia borde incisal (Figura 9E; Tabla VIII).

*Dentinogénesis imperfecta asociada a OI:* Se analizaron dos dientes con DI asociada a OI. En los dos casos no se observó matriz de esmalte. En los dos casos la dentina presentó muy escasos túbulos dentinarios algunos de gran diámetro y presencia de dentina interglobular hacia límite con cámara pulpar, en uno de los casos se observó zonas con nula presencia de túbulos y otras zonas con escasos túbulos. (Figura 9F; Tabla VIII).

*Dientes con Odontodisplasia regional:* Se estudiaron tres dientes de la misma paciente con esta patología dentaria. A nivel de esmalte se observó en dos casos escasa matriz de esmalte muy irregular y sin prismas, en el diente temporal esta matriz estaba cerca de la zona cervical y en el diente permanente esta matriz era mínima. Con relación a la dentina, los tres dientes presentaron dentina muy delgada e irregular con ondulaciones, abundante dentina interglobular y túbulos dentinarios de diámetros variables. El diente temporal incluyó pulpolitos con inclusiones celulares y en el capuchón pericoronario se vio proliferación celular tipo fibroblasto con estructuras calcificadas redondeadas concéntricas múltiples y epitelio odontogénico dispuesto en nidos y cordones. El diente permanente presentó una cámara pulpar con pulpavital cuya capa odontoblástica tenía núcleos a distintos niveles. Esta cámara pulpar se extendía hacia el borde incisal hasta muy cerca del límite amelodentinario (Figura 9D; Tabla VIII).

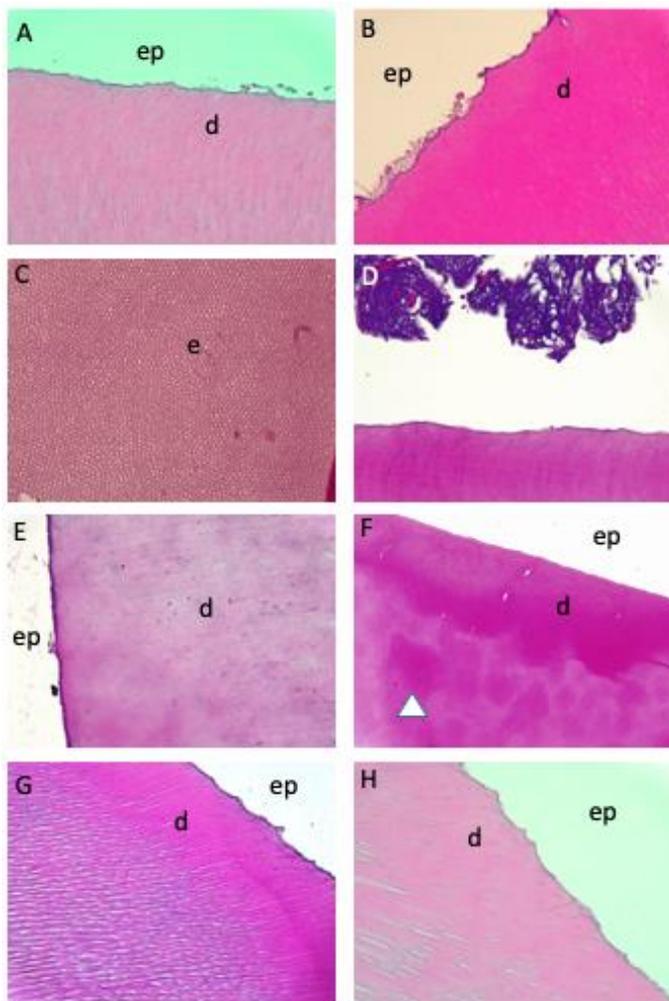
**Dientes controles sanos:** Se estudiaron diez dientes sanos. En todos ellos al ser procesados con técnicas de descalcificación, perdieron su matriz de esmalte. La dentina presentó túbulos dentinarios normales, paralelos entre sí y sin presencia de dentina interglobular, con superficie ondulada (Figura 9G-9H; Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Dientes descalcificados analizados con técnica histológica corriente y teñidos con H-E observados con luz corriente.

CONDICION DEL DIENTE	SUBTIPO DE PATOLOGÍA	CARACTERÍSTICAS DEL ESMALTE		CARACTERÍSTICAS DE LA DENTINA		
		Persistencia de matriz de esmalte N° casos	Estructura prismática N° casos	Presencia de túbulos dentinarios N° casos	Paralelismo entre túbulos N° casos	Dentina interglobular N° casos
DIENTES CON AI n = 12	AI Hipoplásica n= 3	0	0	3	3	1
	AI Hipomadura n= 6	1	1	6	6	3
	AI Hipocalcificada n= 3	3	3	3	3	1
DIENTES CON DI n=4	DI aislada n= 2	0	0	2	0	2
	DI con OI n= 2	0	0	2	0	2
DIENTES CON ODR n=3	ODR n=3	2	0	3	0	3
DIENTES SANOS n = 10	Controles n=10	0	0	10	10	2
TOTAL n = 29	--	7	4	29	22	14

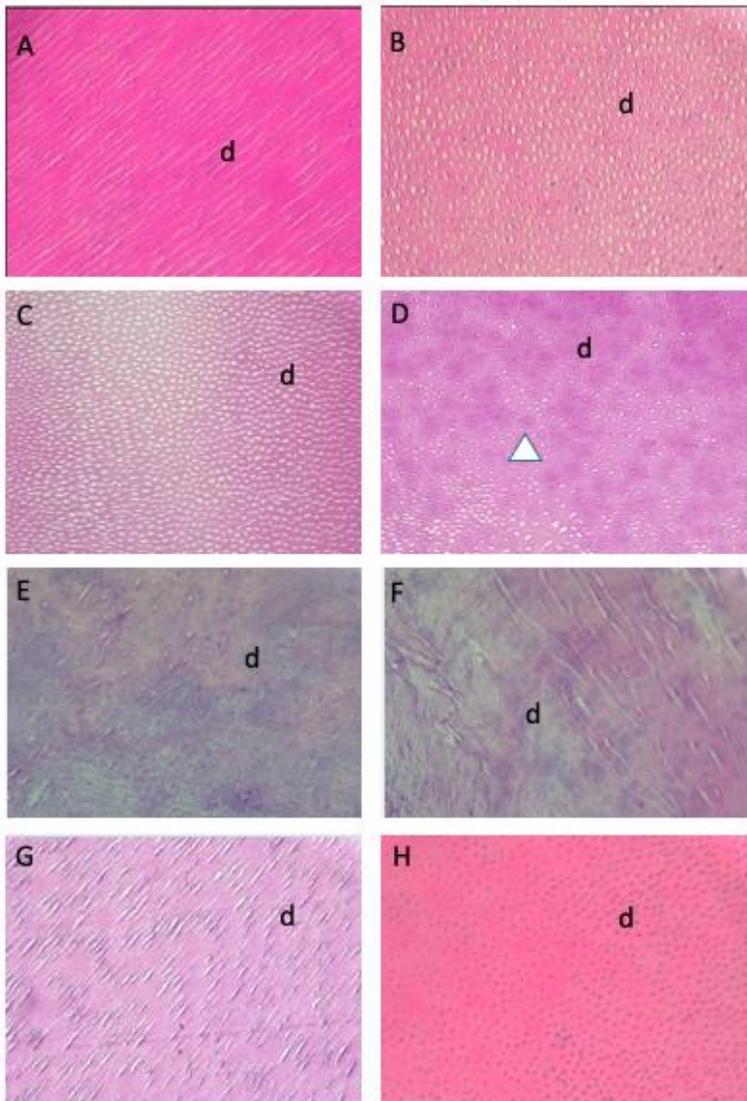
AI = Amelogénesis Imperfecta; DI= Dentinogénesis Imperfecta ODR= Odontodisplasia Regional

FIGURA 9. DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CONTROLES DESCALCIFICADOS Y ANALIZADOS POR TÉCNICA HISTOLÓGICA CORRIENTE CONTINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA. DENTINA CERCANA A LÍMITE AMELODENTINARIO.



**Fig 9. Dientes descalcificados teñidos con H-E con aumento 40x de dientes con:** **A.** Al Hipoplásica (dt), nótese la pérdida del esmalte. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa esmalte perdido y dentina de características estructurales normales. **C.** Al Hipocalcificada (dt), matriz de esmalte desprendida de la dentina y dentina con túbulos dentinarios de grosor normal. **D.** ODR (dt), el esmalte se observa arremolinado e irregular y la dentina se observa con escasos túbulos y presencia de dentina interglobular. **E.** DI (dp), se observa escasa, casi nula presencia de túbulos dentinarios. **F.** DI + OI (dt), se observa nula presencia de túbulos dentinarios y mucha dentina interglobular. **G.** Control (dt), se observa esmalte perdido por la descalcificación y dentina con túbulos de grosor y estructura normal. **H.** Control (dp) con esmalte perdido por descalcificación y dentina con túbulos de estructura normal. e=esmalte, d=dentina, triangulo blanco=Dentina interglobular.

**FIGURA 10. DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CONTROLES DESCALCIFICADOS ANALIZADOS POR TÉCNICA HISTOLÓGICA CORRIENTE CON TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA. ZONA MEDIA DE DENTINA CORONARIA.**



**Fig. 10. Dientes descalcificados teñidos con H-E con aumento 40x de dientes donde se observa dentina con:** **A.** Al Hipoplásica (dt), nótese la dirección de túbulos es normal. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa túbulos dentinarios de grosor normal. **C.** Al Hipocalcificada (dt), se observa túbulos dentinarios de grosor normal. **D.** ODR (dt), se observa escasos túbulos con grosor diferente y presencia de dentina interglobular. **E.** DI (dp), se observa escasa, casi nula presencia de túbulos dentinarios. **F.** DI + OI (dt), se observa nula presenta túbulos dentinarios y dentina interglobular. **G.** Control (dt), se observa dentina con túbulos de grosor y dirección normal. **H.** Control (dp) se observa dentina con túbulos de estructura normal. e=esmalte, d=dentina, triangulo blanco=Dentina interglobular.

### **5.3 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AMELOGENINA Y DENTINA SIALOFOSFOPROTEÍNA EN ESMALTE Y DENTINA DE PACIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA (AI), DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA (DI) Y ODONTODISPLASIA REGIONAL (OD) CON DIENTES CONTROLES SANOS.**

Se analizaron 21 muestras de dientes descalcificados con EDTA y procesados con técnica inmunohistoquímica con el fin de observar expresión y localización de proteínas Amelogenina y Dentina sialofosfoproteína en esmalte y dentina de muestras de pacientes con Amelogénesis Imperfecta, Dentinogénesis Imperfecta y Odontodisplasia regional.

Cada una de las muestras fueron analizadas con los anticuerpos AMELX C-19, AMELX F-11 para la proteína amelogenina y los anticuerpos LFMb 21 y ab122321 para Dentina sialofosfoproteína (DSPP). En cada caso se analizaron los siguientes parámetros: inmunomarcación y distribución tanto en matriz de esmalte como en dentina. A nivel de esmalte, se evaluó la distribución de estas proteínas en la periferia o al interior del prisma, tercio interno o medio y superficial de la matriz de esmalte. A nivel dentinario se evaluó la distribución en dentina peritubular, dentina intertubular y dentina interglobular.

**Dientes con Amelogénesis Imperfecta:** Se estudiaron 12 muestras de pacientes con Amelogénesis Imperfecta, tres muestras del tipo AI Hipoplásica, seis del tipo AI Hipomadura y tres del tipo Hipocalcificada.

*AI Hipoplásica:* Cuando analizamos la presencia de matriz de esmalte y prismas, en dos casos presentó pérdida de esmalte (PE) debido al proceso de descalcificación. En un caso se observó trazas o remanentes de matriz de esmalte que fueron levemente positivo para AMELX C-19. Al analizar dentina, la marcación con AMELXC-19 fue negativa en dentina peritubular, dentina intertubular y con relación al análisis de los procesos odontoblásticos, se observó que en un caso, este proceso se marcó levemente. Al analizar esmalte con AMELX F-11, un caso de los tres se observó trazas o remanentes de matriz de

esmalte que inmunomarcó levemente, con relación a la dentina analizada con AMELX F-11, se observó marcación negativa en dentina peritubular, dentina intertubular y en un caso se observó inmunomarcación leve para procesos odontoblásticos (Figura 11A y 12A; Tabla IX).

A continuación, se analizó con los anticuerpos DSSPP LFMb21 y DSPP ab122321. Para este anticuerpo, el esmalte estaba perdido en los tres casos, debido al proceso de descalcificación. Al analizar la dentina con el anticuerpo anti DSPP LFMb 21 se observó en los tres casos estudiados, inmunomarcación negativa, con relación al proceso odontoblástico, un caso marcó levemente para este anticuerpo. Con relación al anticuerpo anti DSPP ab122321, al analizar la dentina, se detectó inmunopositividad moderada en los tres casos en dentina peritubular y muy intensa en los procesos odontoblásticos en los dos casos (Figura 13A y 14A; Tabla X).

*Al Hipomadura:* Cuando se analizó con el anticuerpo AMELX C-19 en los seis casos estudiados, se observó que en cuatro casos existió trazas o remanentes de matriz de esmalte, donde se marcó levemente el anticuerpo mencionado. Al analizar la dentina con el anticuerpo AMELX C-19, se observó inmunomarcación negativa para dentina peritubular e intertubular y en cuatro casos donde estuvieron presentes los procesos odontoblásticos, se observó inmunomarcación positiva.

Al analizar con el anticuerpo AMELX F-11, se observó que en cuatro casos existió inmunomarcación positiva para las trazas o remanentes de matriz de esmalte encontrados. Al analizar la dentina con el anticuerpo AMELX F-11, se observó leve marcación en la dentina intertubular en cuatro de los seis casos estudiados y se observó inmunomarcación muy intensa en los seis casos de AIHpm en procesos odontoblásticos encontrados (Figura 11By 12B; Tabla IX).

Cuando se analizó el esmalte con el anticuerpo anti DSPP LFMb 21 en los seis casos de AIHpm, se observó que en cinco casos se presentó inmunomarcación positiva leve. Al analizar la dentina con el anticuerpo DSPP LFMb 21, se observó

marcación positiva para dentina peritubular en los seis casos y negativo para dentina intertubular. Con relación a los procesos odontoblásticos encontrados en los seis casos, se presentó inmunomarcación positiva.

Cuando analizamos esmalte con el anticuerpo anti DSPP ab122321, se detectó marcación negativa para matriz de esmalte excepto en un caso donde la marcación fue muy leve y al analizar dentina con DSPP ab122321, se observó inmunomarcación positiva en los seis casos estudiados y inmunomarcación positiva muy intensa en procesos odontoblásticos encontrados en los seis casos de AIHpm (Figura 13B y 14B; Tabla X).

*Al Hipocalcificada:* Se estudiaron tres casos de AIHpcal, de los cuales se observó inmunomarcación con AMELX F-11 en los tres casos. Con relación a la dentina, este anticuerpo presentó inmunomarcación negativa para dentina peritubular e intertubular, y también inmunomarcación negativa para los procesos odontoblásticos encontrados (Figura 11C; Tabla IX y X).

Para el anticuerpo anti AMELX c-19, anti DSPP LFMb 21 y anti DSPP ab122321 no existe registro e información debido a que las muestras están agotadas (Figura 12, 13 y 14; Tabla IX y X).

**Dientes con Dentinogénesis Imperfecta:** Se analizaron cuatro casos de Dentinogénesis Imperfecta, dos del tipo aislada y dos casos de DI asociada a OI.

*Dentinogénesis imperfecta aislada:* En todos los casos de DI al descalcificar los dientes se perdió completamente la matriz de esmalte, por lo que solo se describirá los hallazgos a nivel de dentina. Cuando analizamos los anticuerpos anti AMELX C-19 Y anti AMELX F-11, no se presentó inmunomarcación en ninguno de los casos estudiados de DI ni aislada ni en dentina peritubular ni dentina intertubular al igual que procesos odontoblásticos para estos anticuerpos (Figura 11E -11Fy 12E-12F; Tabla IX).

Cuando analizamos la dentina con el anticuerpo anti DSPP LFMb 21, se observó inmunomarcación negativa para la dentina peritubular, intertubular y no se

encontraron procesos odontoblásticos inmunomarcados con los anticuerpos estudiados.

*Dentinogénesis imperfecta asociada a OI:* Cuando analizamos los anticuerpos anti AMELX C-19 Y anti AMELX F-11 en esmalte, no se detectó inmunomarcación en ninguno de los casos debido a que se perdió la matriz de esmalte. En dentina ninguno de los anticuerpos para amelogenina marcó positivo salvo en un caso que marcó levemente procesos odontoblásticos. (Figura 11E -11Fy 12E-12F; Tabla IX).

Al analizar con la proteína DSPP con los anticuerpos LMFb 21 y DSPP ab122321, se observó que hay una intensa inmunomarcación en dentina peritubular tanto en túbulos de diámetro regular como en túbulos mayor diámetro y marcación positiva en algunas zonas de dentina interglobular. Esta mayor marcación de DSPP se observó principalmente en la dentina circumpulpar, siendo muy escasa la marcación en dentina del manto.(Figura 13F y 14F; Tabla X).

Al analizar con el anticuerpo DSPP LMFb 21, se detectó inmunomarcación de distribución similar a la observada con el anticuerpo DSPP ab122321 pero de menor intensidad (Tabla X).

***Dientes con Odontodisplasia regional:*** Se analizaron tres casos de ODR, las muestras se obtuvieron de una sola paciente y correspondieron a dos incisivos temporales y uno permanente.

Cuando analizamos el esmalte de las tres muestras con ODR con el anticuerpo anti AMELX C-19, se observó que no hay marcación positiva para la matriz de esmalte para ninguno de los casos, para la dentina también la inmunomarcación fue negativa en los tres casos.

Con el anticuerpo anti AMELX F-11, se observó que la matriz de esmalte tenía una estructura irregular sin presencia de prismas y presentó inmunomarcación positiva en uno de los casos que corresponde a un incisivo temporal. Al analizar la dentina, se observó inmunomarcación positiva en la dentina adyacente al límite

amelodentinario en el mismo incisivo temporal estudiado (Figura 11D y 12D; Tabla IX).

Cuando se analizó la matriz de esmalte con el anticuerpo anti DSPP LFMb 21, se observó marcación positiva en dos de los tres casos estudiados con ODR que corresponden a los dos incisivos temporales estudiados, donde se observó una matriz de esmalte irregular. En relación con la dentina se observó marcación positiva para la dentina peritubular en uno de los tres casos con ODR que corresponde a un incisivo temporal. Al analizar los procesos odontoblásticos de las tres muestras, es importante mencionar que, en dos de las tres muestras, los procesos odontoblásticos estaban presentes, de tal manera que en nuestro análisis observamos que hubo marcación positiva en uno de los procesos odontoblásticos encontrados y que corresponde a un diente temporal.

Cuando analizamos los tres casos con ODR con el anticuerpo anti DSPP ab122321, la matriz de esmalte presenta marcación positiva en dos casos. Cuando analizamos la dentina, se observó inmunomarcación positiva en dentina peritubular y en un caso se marcó levemente procesos odontoblásticos (Figura 13D y 14D; Tabla X).

**Dientes controles sanos:** Se analizaron dos casos controles sanos. Al analizar la matriz de esmalte con los cuatro anticuerpos, se observó que el esmalte estaba perdido debido al proceso de descalcificación. Cuando analizamos la dentina con el anticuerpo anti AMELX C-19, se observó inmunomarcación en dentina peritubular en uno de los dos casos y en los dos casos se detectó marcación en los procesos odontoblásticos, los cuales estaban presentes en los dos controles estudiados.

Al estudiar la dentina con el anticuerpo anti AMELX F-11, presentó inmunomarcación positiva de dentina peritubular en un caso y con relación a los procesos odontoblásticos se observó inmunomarcación positiva en los dos casos estudiados (Figura 11G-11H y 12G-12H; Tabla IX).

Al estudiar la dentina en los casos controles con el anticuerpo anti DSPP LFMb 21, se marcó positivo la dentina peritubular de un caso y en los dos casos se observó marcación positiva de los procesos odontoblásticos encontrados en las dos muestras.

Cuando analizamos la dentina con el anticuerpo anti DSPP ab122321, la inmunomarcación fue positiva en dentina peritubular en un caso y en los dos casos los procesos odontoblásticos encontrados se observó inmunomarcación positiva(Figura 13G-13H y 14G-14H; Tabla X).

**Tabla IX.** Dientes descalcificados analizados con técnica Inmunohistoquímica para anticuerpo Amelogenina (AMELX).

CONDICIÓN DEL DIENTE	SUBTIPO DE PATOLOGÍA	DETECCION INMUNOHISTOQUIMICA							
		AMELX C-19				AMELX F-11			
		Matriz de esmalte N° casos	Dentina peritubular N° casos	Dentina intratubular N° casos	Proceso odontoblastico N° casos	Matriz de esmalte N° casos	Dentina peritubular N° casos	Dentina intratubular N° casos	Proceso odontoblastico N° casos
AMELOGENESIS IMPERFECTA n=12	AI HIPOPLASICA n= 3	1#	0	0	1	1#	0	0	1
	AI HIPOMADURA n= 6	4#	0	0	4	4#	0	0	6
	AI HIPOCALCIFICADA n= 3	-	-	-	-	3	0	0	0
DENTINOGENESIS IMPERFECTA n=4	DI AISLADA n= 2	0	0	0	0	0	1	0	1
	DI+ OI n= 2	0	0	0	1	0	0	0	0
ODONTODISPLASIA REGIONAL n=3	ODR n=3	1	0	0	0	1	0	0	1
CONTROLES N=2	CONTROLES n=2	EP	1	0	2	EP	1	0	2
TOTAL n = 21	-	6	1	0	8	9	2	0	11

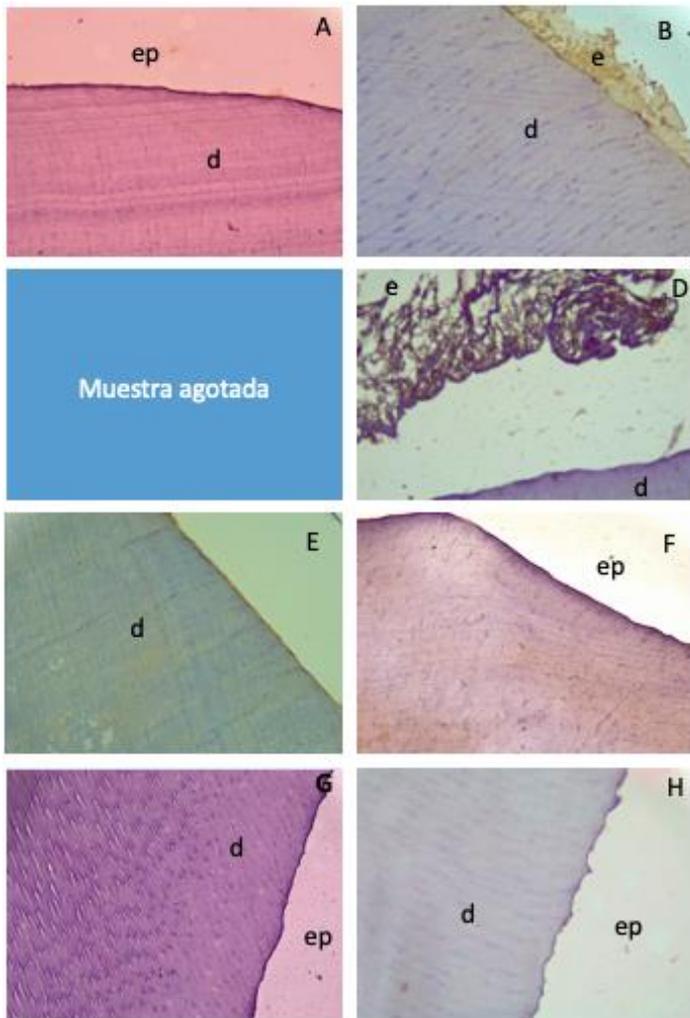
AI = Amelogénesis Imperfecta; DI= Dentinogénesis Imperfecta ODR= Odontodisplasia Regional; EP= Esmalte perdido; # = trazas o remanente menor a 10 micrones de matriz de esmalte; " = sólo en algunas zonas de la muestra se observa inmunomarcación; - = ausencia de muestra.

**Tabla X.** Dientes descalcificados analizados con técnica Inmunohistoquímica para anticuerpo Dentina sialofosfoproteína (DSPP).

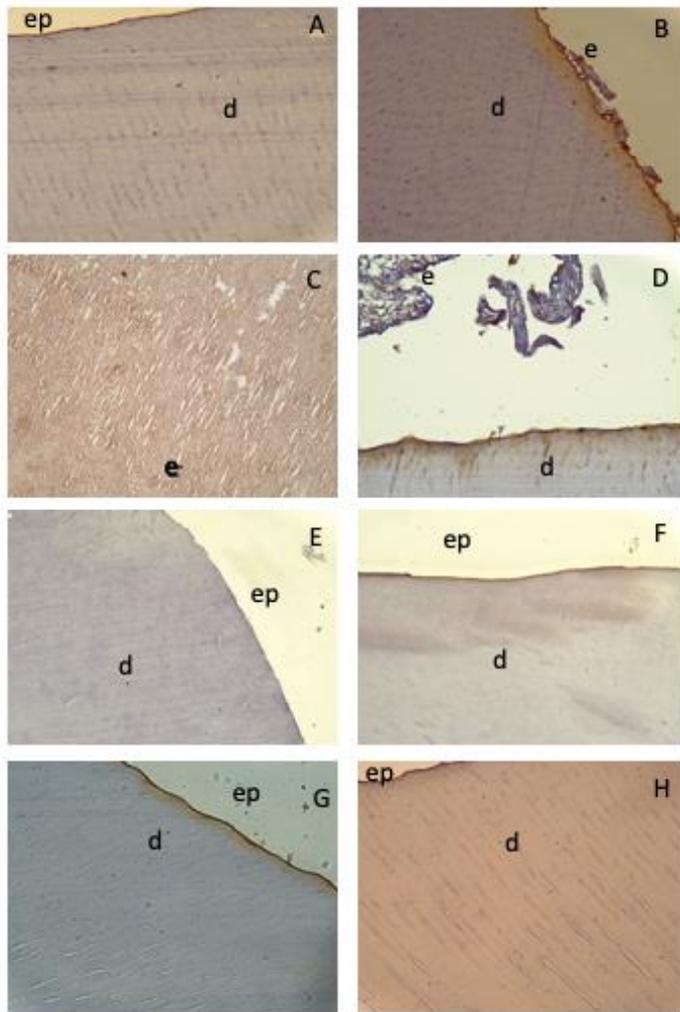
CONDICIÓN DEL DIENTE	SUBTIPO DE PATOLOGÍA	DETECCION INMUNOHISTOQUIMICA							
		DSPP LfMb 21				DSPP ab122321			
		Matriz de esmalte N° casos	Dentina peritubular N° casos	Dentina <del>inter</del> tubular N° casos	Proceso odontoblástico N° casos	Matriz de esmalte N° casos	Dentina peritubular N° casos	Dentina <del>inter</del> tubular N° casos	Proceso odontoblástico N° casos
AMELOGENESIS IMPERFECTA n=12	AI HIPOPLASICA n= 3	EP	0	0	1+	EP	3+	0	3++
	AI HIPOMADURA n= 6	5+	6+	0	6++	1+	6+	0	6+++
	AI HIPOCALCIFICADA n= 3	-	-	-	-	-	-	-	-
DENTINOGENESIS IMPERFECTA n=3	DI AISLADA n=2	EP	0	0	0	EP	0	0	0
	DI+ OI n= 1	EP	1	0	0	EP	1	0	0
ODONTODISPLASIA REGIONAL n=3	ODR n=3	2	1+	0	1+	2+	2+	0	1+
CONTROLES N=2	CONTROLES n=2	EP	1+	0	2++	EP	1+	0	2++
TOTAL n = 20	-								

AI = Amelogénesis Imperfecta; DI= Dentinogénesis Imperfecta ODR= Odontodisplasia Regional; EP= Esmalte perdido; - = muestra agotada.

**FIGURA 11. DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTESCONTROLES DESCALCIFICADOS ANALIZADOS POR TÉCNICA INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETERCTAR EXPRESION DE AMELX C-19.**



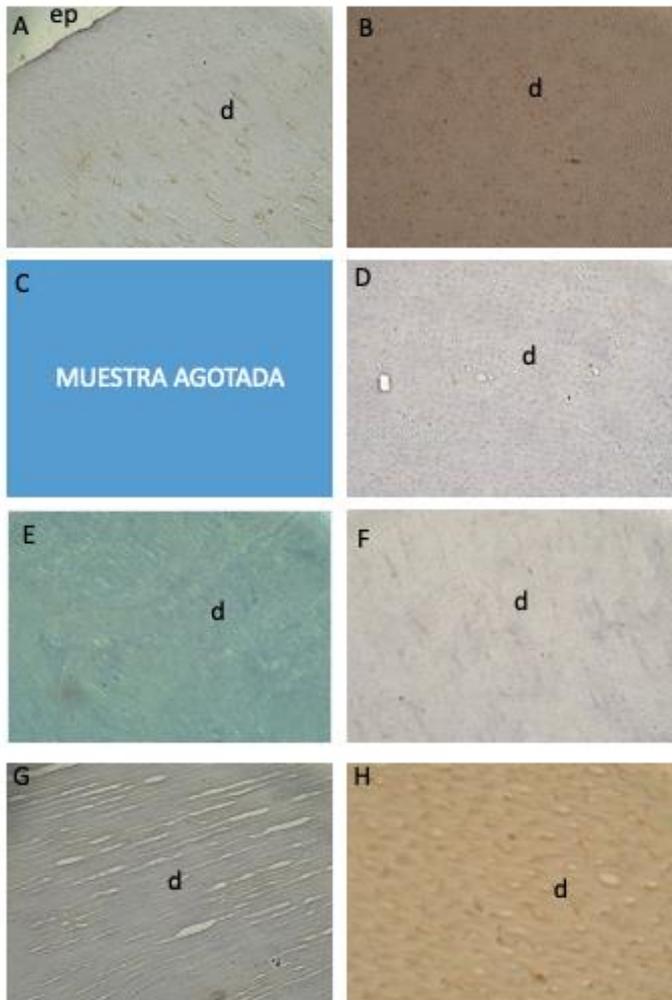
**Fig. 11. Dientes descalcificados analizados por técnica inmunohistoquímica para detectar AMELX C-19 con aumento 40x con:** **A.** Al Hipoplásica, nótese el esmalte perdido y la dentina normal. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa un escaso remanente de matriz de esmalte y túbulos dentinarios con dirección normal. **C.** Al Hipocalcificada (dt), Muestra agotada. **D.** ODR (dt), se observa escasa matriz de esmalte muy irregular. **E.** DI (dp), se observa matriz de esmalte perdido y escasa presencia de túbulos dentinarios. **F.** DI + OI (dt), se observa matriz de esmalte perdido por descalcificación y nula presenta túbulos dentinarios. **G.** Control (dt), se observa esmalte perdido y dentina con túbulos de grosor y dirección normal. **H.** Control (dp) se observa esmalte perdido y dentina con túbulos de estructura normal. e=esmalte, d=dentina.



**Fig. 12. Dientes descalcificados analizados por técnica inmunohistoquímica para detectar AMELX F-11 con aumento 40x con:** **A.** Al Hipoplásica, nótese el esmalte perdido y la dentina normal. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa un escaso

remante de matriz de esmalte y túbulos dentinarios con dirección normal. **C.** Al Hipocalcificada (dt), se observa matriz de esmalte positiva para AMELX-F11. **D.** ODR (dt), se observa escasa matriz de esmalte muy irregular. **E.** DI (dp), se observa matriz de esmalte perdido y escasa presencia de túbulos dentinarios. **F.** DI + OI (dt), se observa matriz de esmalte perdido por descalcificación y nula presenta túbulos dentinarios. **G.** Control (dt), se observa esmalte perdido y dentina con túbulos de grosor y dirección normal. **H.** Control (dp) se observa esmalte perdido y dentina con túbulos de estructura normal. e=esmalte, d=dentina.

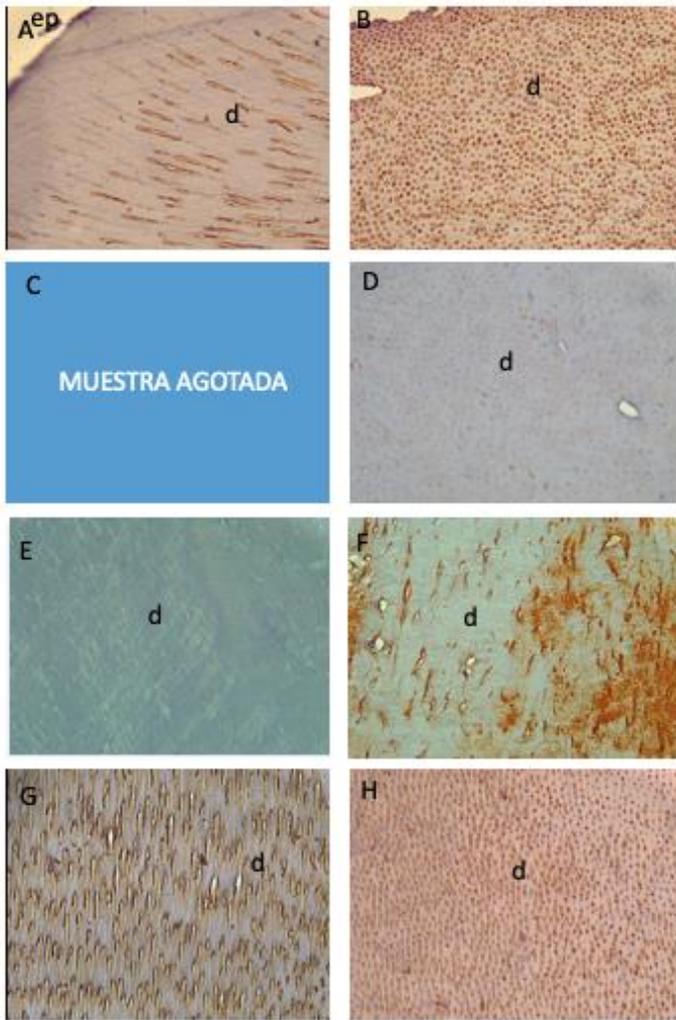
**FIGURA 13. DIENTES DESCALCIFICADOS CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGENESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTESCONTROLES DESCALCIFICADOS ANALIZADOS POR TÉCNICA INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETERCTAR EXPRESION DE DSPP LFMb 21.**



**Fig. 13. Dientes descalcificados analizados por técnica inmunohistoquímica para detectar DSPP LFMB 21 con aumento 40x con: A.**Al Hipoplásica, nótese el esmalte perdido y la dentina normal. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa túbulos

dentenarios con dirección normal. **C.** Al Hipocalcificada (dt), Muestra agotada. **D.** ODR (dt), se observa escasos tubulos dentenarios con grosores alterados. **E.** DI (dp), se observa escasa presencia de túbulos dentenarios con grosores irregulares. **F.** DI + OI (dt), se observa nula presencia de túbulos dentenarios. **G.** Control (dt), se observa túbulos de grosor y dirección normal. **H.** Control (dp) se observa dentina con túbulos de estructura normal. e=esmalte, d=dentina.

**FIGURA 14. DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTESCONTROLES DESCALCIFICADOS ANALIZADOS POR TÉCNICA INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETERCTAR EXPRESION DE DSPP ab122321**



**Fig. 14. Dientes descalcificados analizados por técnica inmunohistoquímica para detectar DSPP ab122321 con aumento 40x con:****A.** Al Hipoplásica, nótese el esmalte perdido y la dentina normal. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa túbulos dentinarios con dirección normal.**C.** Al Hipocalcificada (dt), Muestra agotada. **D.** ODR (dt), se observa escasos túbulos dentinarios con grosores alterados.**E.** DI (dp), se observa escasa presencia de túbulos dentinarios con grosores irregulares.**F.** DI + OI (dt), se observa pocos túbulos de diámetros diferentes.**G.** Control (dt), se observa túbulos de grosor y dirección normal. **H.** Control (dp) se observa dentina con túbulos de estructura normal. e=esmalte, d=dentina.

#### **5.4 CONFORMACIÓN ULTRA ESTRUCTURAL DE ESMALTE Y DENTINA DE DIENTES DE PACIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA Y ODONTODISPLASIA REGIONAL CON DIENTES CONTROLES SANOS**

Del total de muestras donadas, se analizaron 27 dientes con la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), 20 dientes primarios y siete dientes permanentes, con el propósito de observar la conformación ultraestructural de los dientes.

**Dientes con Amelogenesis Imperfecta:** Se estudiaron 12 dientes de pacientes con Amelogenesis Imperfecta, de los cuales tres dientes primarios fueron del tipo AI Hipoplásica, seis dientes primarios del Tipo AI Hipomadura y dos terceros molares y un molar primario con AI Hipocalcificada.

*AI Hipoplásica:* Cuando estudiamos esmalte, el máximo grosor observado en la zona proximal de los dientes primarios fue de 0,72 mm. De los tres casos observados, en dos se observó prismas irregulares y en uno de ellos se observó una estructura amorfa sin prismas (Figura 15A y 16A). En La dentina se observó una disposición de los túbulos similar a la de dentina normal (Tabla XI).

*AI Hipomadura:* Al observar esmalte en MEB, el grosor en zona proximal mostró una mediana es de 0,7 mm. En los seis dientes se observó presencia de prismas de estructura regular. En dentina, la disposición de los túbulos fue normal en las seis muestras (Figura 15B, Tabla XI).

*AI Hipocalcificada:* Tanto en los dientes permanentes como en el diente primario el esmalte observado en los dos terceros molares con MEB, presentó estructura prismática. Uno de los molares permanentes mostró adelgazamientos que daban imagen de “cuentas de collar” a los prismas (Figura 15C y 16C). La dentina presentó morfología dentro de rangos normales (Tabla XI).

**Dientes con Dentinogenesis Imperfecta:** Se analizaron tres dientes, de los cuales correspondieron a un premolar con DI aislada y dos dientes primarios, un molar y un incisivo asociados a Osteogenesis Imperfecta.

*Dentinogénesis imperfecta aislada:* El premolar con DI aislada, presentó dentina con escasos túbulos con direcciones irregulares, sin paralelismo entre sí y con un diámetro menor a los controles, con una mediana de 2,2  $\mu\text{m}$  (Tabla XI).

*Dentinogénesis imperfecta asociada a OI:* En los dos dientes con DI asociada a OI se observó escasos túbulos dentinarios con amplias variaciones de sus diámetros, incluso algunos de formas que semejaban lagunas óseas. En uno de los casos, en el tercio externo de la dentina, se identificó presencia de túbulos con curvaturas en forma de “U” con el área convexa hacia el límite amelodentinario (Figura 15F y 16F, Tabla XI).

***Dientes con Odontodisplasia regional:*** De los tres dientes donados con ODR, un diente primario se procesó para estudiar en MEB. En esmalte se observó que el grosor fue de 0,27 mm y una estructura irregular, con escasas zonas que presentaban una estructura tipo prismas con ondulaciones múltiples y de escaso radio. En dentina, los túbulos presentaron amplia variación de diámetros con una máxima de 10  $\mu\text{m}$  y el diámetro mínimo de 1,5  $\mu\text{m}$ , los túbulos se observaron rectos solamente en tercio externo coronario y se observaron de disposición irregular en otras áreas (Figuras 15D y 16D, Tabla XI).

***Dientes controles sanos:*** Se estudiaron 11 dientes controles sanos, tres molares permanentes correspondientes a terceros molares y un premolar, siete dientes primarios correspondientes a un incisivo, un canino y cuatro molares. Con MEB se observó la ultraestructura normal descrita en esmalte, los prismas presentaron una disposición normal al igual que los túbulos dentinarios. (Figura 15G-H, Tabla XI).

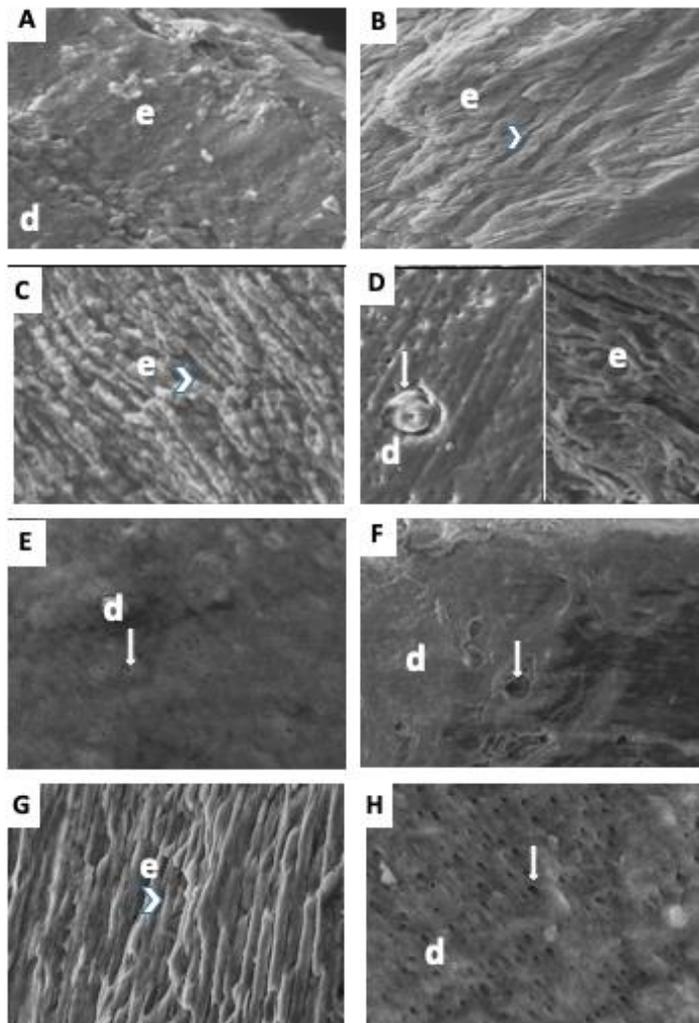
**Tabla XI.**Dientes observados con Microscopia Electrónica de Barrido. MEB

CONDICIÓN DEL DIENTE	SUBTIPO DE PATOLOGÍA	TIPO DE DENTICIÓN		Esmalte					Dentina		
		DT	DP	Grosor Máx esmalte mm Mediana (rango)	Grosor Máx esmalte mm Mediana (rango)	Presencia de prismas	Diámetro. prismas um Mediana (rango)	Diámetro prismas um Mediana (rango)	Diámetro de túbulos um Mediana (rango)	Diámetro de túbulos um Mediana (rango)	Disposición normal de túbulos
AI n = 12	AI Hipoplásica n= 3	3	0	0,15* (0,1-0,72)	-	2	2,4* (0-4,7)	-	2,5* (2-5)	-	3
	AI Hipomadura n= 6	6	0	0,7* (0,53-1,27)	-	6	3,5* (1,8-5,3)	-	2* (1,1-5,5)	-	6
	AI Hipocalificada n= 3	1	2	1,5* (1-2)	1,6** (1,6-2)	3	4,5* (2,8-6,3)	4,4** (1,7-6,3)	3,5* (1-4)	3,5** (1-5)	3
DI n=3	DI aislada n= 1	0	1	-	0,52** (0,2-0,7)	1	-	2,6** (1,3-4,6)	-	2,2** (1,6-2,8)	0
	DI con CI n= 2	2	0	0,44* (0,3-0,58)	-	2	5,52* (2,5- 6)	-	6,25* (0,7- 12)	-	0
ODR n=1	ODR n=1	1	0	0,27* (0,15-1)	-	1	2,7* (1,3-4)	-	5,7* (1,5-10)	-	0
DIENTES SANOS n = 11	Molares n=8	5*	3**	0,62* (0,48-0,9)	1,3** (1,17-1,8)	5* 3**	3,7* (3,3-5,5)	3,9** (3,3-5,5)	3* (1,3-5)	3,5** (3-5)	5* 3**
	Premolar n=1		1**	-	1,05** (0,7-1,2)	1**	-	4,3** (3,3-5,3)	-	2,7** (2,1-3,1)	1**
	Incisivo n=1	1*		0,37* (0,3-0,5)	-	1*	4,5* (3,6-5,3)	-	4,6* (5,5-3,6)	-	1*
	Canino n=1	1*		0,34* (0,3-0,6)	-	1*	4,6* (3,3-6)	-	3,3* (1,3-4,6)	-	1*
TOTAL n = 27	--	20	7			26					23

AI = Amelogénesis Imperfecta; DI= Dentinogénesis Imperfecta ODR= Odontodisplasia Regional. DT=Dientes temporales, DP=Dientes permanentes.

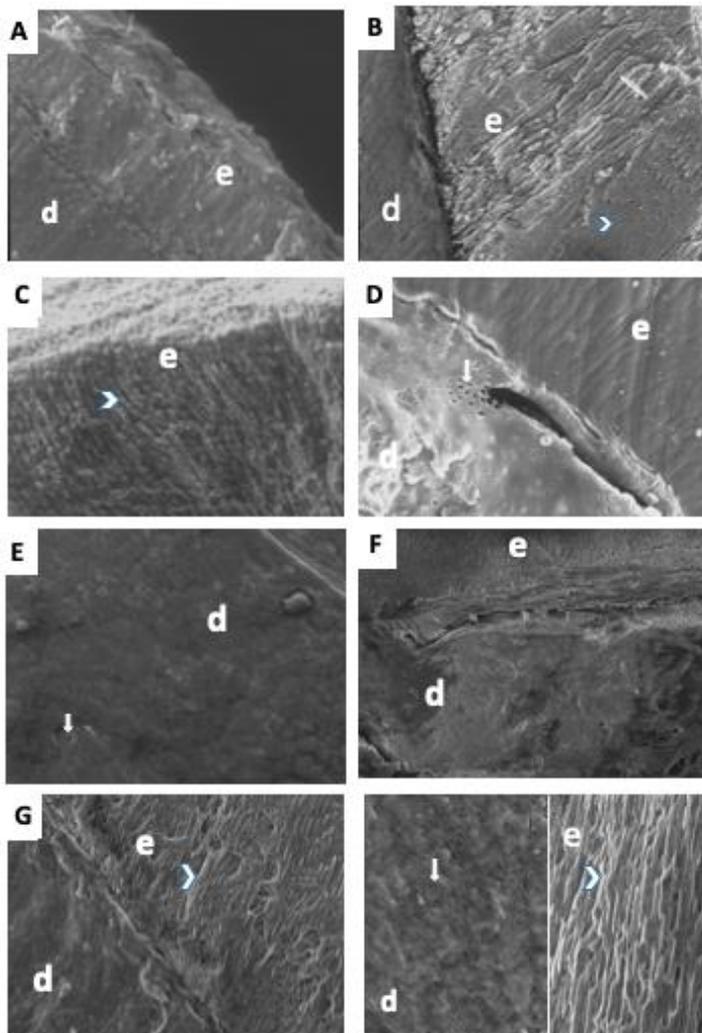
\*= Resultado con dientes temporales; \*\*=resultados con dientes permanentes

**FIGURA 15. DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CONTROLES OBSERVADOS EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO 1000x**



**Fig. 15. Microscopia electrónica de Barrido con aumento 1000x de dientes con:** **A.** Al Hipoplásica (dt) (molar), nótese el esmalte de estructura amorfa y sin prismas. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa prismas de esmalte (punta de flecha). **C.** Al Hipocalcificada (dp) (tercer molar extraído) esmalte dentario de grosor normal con presencia de prismas (punta de flecha). **D.** ODR (dt), esmalte rugoso e irregular con forma de arremolinado y dentina con túbulos de diámetro variable. **E.** DI (dp) Dentina con escasos túbulos dentinarios y algunos de diámetros variables. **F.** DI + OI (dt), la dentina presenta túbulos con diámetro variable. **G.** Control temporal (dt), esmalte de estructura prismática normal. **H.** Control permanente (dp) esmalte de estructura prismática normal. Flecha blanca =Túbulo dentario. Punta de flecha blanca = prismas del esmalte.

**FIGURA 16. DIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA, ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CONTROLES OBSERVADOS EN MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO 500x**



**Fig. 16. Microscopia electrónica de Barrido con aumento 500x de dientes con:** **A.** Al Hipoplásica (dt) (molar), nótese el esmalte de estructura amorfa y sin prismas. **B.** Al Hipomadura (dt), se observa zonas sin prismas de esmalte (punta de flecha). **C.** Al Hipocalcificada (dp) (tercer molar extraído) esmalte dentario de grosor normal con presencia de prismas (punta de flecha). **D.** ODR (dt), límite amelodentinario con dentina de túbulos de diámetro variable. **E.** DI (dp) Dentina con escasos túbulos dentinarios y algunos de diámetro menor. **F.** DI + OI (dt), presenta túbulos escasos. **G.** Control temporal (dt), esmalte de estructura prismática normal. **H.** Control permanente (dp) esmalte de estructura prismática normal. Flecha blanca =Túbulo dentario. Punta de flecha blanca = prismas del esmalte.

## 6. DISCUSION

En el presente trabajo se estudió un conjunto de condiciones patológicas que incluye las Amelogénesis Imperfectas, Dentinogénesis Imperfecta y Odontodisplasia regional. Estas patologías han sido estudiadas, describiendo sus fenotipos clínicos, características radiográficas y análisis genéticos (Witkop, 1989, Crawford 2007, La Dure-Molla 2015, Rashidian y cols. 2013). Sin embargo, existen escasos reportes respecto a las modificaciones morfológicas a nivel histopatológico, ultra estructural e inmunoquistoquímico de cada una de estas condiciones patológicas.

### *Diagnóstico de los pacientes*

Cada uno de estos pacientes participantes en el estudio fue diagnosticado previamente a través de análisis clínico, radiográfico y genealógico, examinando al máximo de familiares que fue posible. En el análisis clínico se consultó por infecciones frecuentes, laxitud de piel y articulaciones u otras alteraciones que sugieran una condición sindrómica, que se excluyeron, salvo osteogénesis imperfecta, y se descartó consumo excesivo de flúor o consumo de antibióticos como penicilina u otras alteraciones ambientales que explicaran los cambios de coloración de los dientes (Klein y cols. 2013, Chetty y cols. 2016, MacDougall y cols. 2006).

### *Diagnóstico de AI*

Para el diagnóstico de amelogénesis imperfecta se empleó los criterios y clasificación de Witkop (1989), esta decisión se basó en que hasta el día de hoy es la clasificación más usada y porque se basa en el fenotipo clínico-radiográfico y lo relaciona con su patrón de herencia, aspectos que pudimos determinar en todos los casos estudiados. Aun cuando se han propuesto varias clasificaciones nuevas, muchas de estas consideran además del modo de herencia y fenotipo la identificación de las mutaciones y/o resultado bioquímico para especificar el

diagnóstico (Crawford y cols. 2007, Nusier 2004), información disponible sólo para algunos de nuestros casos.

#### *Diagnóstico de DI*

Para el diagnóstico de los pacientes con Dentinogenesis Imperfecta se empleó los criterios de Hart (2007) que clasifica los desórdenes dentinarios en dos grandes grupos: DI y Displasias dentinarias. Hart describió que en las DI las alteraciones clínicas e histológicas de los dientes son similares en las DI tipo I que son las asociadas a osteogénesis imperfecta y las DI tipo II que son aquellas no sindrómicas. Se decidió emplear esta clasificación ya que con las diferentes técnicas empleadas esperábamos encontrar diferencias en la estructura o la presencia de proteínas como DSPP que nos permitieran diferenciar los dientes en cada tipo de alteración. Otras clasificaciones de desórdenes del desarrollo dentinario consideran principalmente aspectos clínicos y moleculares para diferenciarlas, describiendo una graduación de la expresión clínica compleja y subjetiva (La Dure-Molla 2015 y Chetty y cols. 2016).

#### *Diagnóstico de ODR*

En el caso de la ODR, la paciente no presenta una alteración sindrómica asociada, lo que ha sido descrito previamente por varios autores (Neville 4° Ed. 2009). Los dientes afectados presentaron las alteraciones descritas por Rashidian para su diagnóstico, como ser dientes clínicamente pequeños, estriados, hipoplásico e hipocalcificado, con una coloración marrón o amarillento, afectando a un solo cuadrante que tiene presentación unilateral, condición que rara vez atraviesa la línea media (Rashidian y cols. 2013).

#### *Dientes donados*

En esta tesis se utilizaron dientes donados directamente por los pacientes que correspondieron principalmente a dientes primarios exfoliados y terceros molares que requirieron exodoncia por motivos ortodóncicos, Todos estos pacientes o sus padres autorizaron el estudio morfológico de los dientes firmando un consentimiento informado o un asentimiento en el caso de menores de edad

entre 12 y 17 años, los que fueron revisados por el Comité de ética de la Facultad de Odontología, cumpliendo los criterios de la convención de Helsinki (Declaración de Helsinki, 2000).

Estos dientes fueron cortados en sentido longitudinal desde la cúspide al ápice o zona cervical con orientación vestibular-lingual/palatal, obteniendo en la mayoría de los casos tres fragmentos de cada diente con superficies de corte que mostraban esmalte y dentina y en los casos de dientes permanentes adicionalmente cemento radicular. Cada uno de estos fragmentos fueron analizados y comparados mediante tres grupos de técnicas: a) dientes sin descalcificar con cortes por desgaste que se observaron con microscopía de luz corriente y con filtros de luz polarizada, b) dientes descalcificados estudiados con tinción corriente de hematoxilina-eosina y con técnicas inmunohistoquímicas para evaluar amelogenina y DSPP y c) se realizó análisis ultraestructural con microscopía electrónica de barrido.

La técnica de cortes por desgaste con luz corriente y polarizada de dientes sin descalcificar actualmente se emplea para estudios con múltiples objetivos, tales como la histopatología del esmalte en caries dental (Ekstrand 1997) alteraciones ambientales del desarrollo del esmalte (Sabel 2010), con fines arqueológicos (Antoine 2008), forenses (Hurnanen 2017) etc. Esta técnica permite evaluar principalmente la estructura primaria de esmalte y dentina y una de sus ventajas es que permite identificar zonas de menor calcificación tanto en esmalte como en dentina (Nanci 2004). Adicionalmente, los cortes por desgaste permiten estudiar la bandas de Hunter Schreger, las cuales se consideran un fenómeno óptico visualizado en la superficie de esmalte de un diente cortado o fracturado observado bajo luz reflectada (Lynch 2011). Actualmente se sugiere que la apariencia de las bandas de Hunter Schreger está relacionada con decusaciones sincrónicas de los prismas del esmalte en el plano horizontal

(Osborn 1990). Lynch concluyó que las bandas de H-S han evolucionado para optimizar la resistencia a la atrición, abfracción y fractura dentaria, por lo que la ausencia de estas bandas podría explicar una mayor fragilidad del esmalte.

La técnica histopatológica para estudio de dientes descalcificados se emplea frecuentemente en histopatología con fines de diagnóstico de biopsias de tejidos calcificados tales como hueso, dentina y cemento radicular. Debido a que el esmalte dentario presenta el mayor porcentaje de cristales de hidroxiapatita de todos los tejidos o matrices extracelulares calcificadas de los seres humanos, generalmente no se emplea para estudio de esmalte de dientes sanos ya que al descalcificar estas muestras se pierde esta matriz extracelular (Nancy 2004). Sin embargo, para el estudio de patologías de esmalte con disminución significativa de la mineralización y en tumores odontogénicos ha demostrado ser útil e incluso se ha descrito estudios inmunohistoquímicos en esta matriz que permiten identificar proteínas del esmalte como amelogenina (Urzúa 2015, Yagishita 2001).

La técnica de MEB permite estudiar ultra estructura de tejidos dentarios con alta magnificación lo que permite analizar con gran detalle la forma, arquitectura y dirección de los prismas del esmalte y, además podemos observar con esta técnica los túbulos dentinarios, viendo la densidad, diámetros y dirección de los túbulos. Se ha demostrado que MEB es muy útil ya que permite observar túbulos gigantes y determinar con mayor exactitud los diámetros además de formas irregulares (Lindau y cols. 1999, Majorana y cols, 2010, Gjorup y cols, 2009).

## 6.1 AMELOGÉNESIS IMPERFECTA

Las AI presentan una gran diversidad fenotípica y su estructura ha sido estudiada principalmente a través de técnicas por desgaste con luz corriente y luz polarizada y MEB (Urzua 2015, El-Sayed 2010, Nusier 2004, Wright 2009). Los cortes por desgaste permiten estudiar la bandas de Hunter Schreger, las cuales se consideran un fenómeno óptico visualizado en la superficie de esmalte de un diente cortado o fracturado observado bajo luz reflectada (Lynch 2011). Actualmente se sugiere que la apariencia de las bandas de Hunter Schreger están relacionadas con decusaciones sincrónicas de los prismas del esmalte en el plano horizontal (Osborn 1990). Lynch concluyó que las bandas de H-S han evolucionado para optimizar la resistencia a la atrición, abfracción y fractura dentaria.

En el presente estudio en las AI Hipoplásicas (AIHP) además de la disminución de grosor que fue observada con cortes por desgaste y microscopía electrónica de barrido observamos presencia de estructura prismática en dos casos y ausencia de estructura prismática en un caso. En el estudio de Nusier y cols. estudiaron nueve familias con AI, de las cuales cinco presentaban AI Hipoplásica. En estos cinco casos clínicamente encontraron una familia con esmalte delgado rugoso, otra con esmalte delgado liso, otra familia con esmalte con hoyuelos y dos familias con esmalte muy delgado o perdido en los tercios incisal o medio. Solo en una de las familias con pérdida de esmalte estudiaron la estructura del esmalte, donde observaron estructura prismática con MEB. (Nusier y cols). Por otro lado, Wright y col (2009) observaron en dos pacientes con AI hipoplásica en los que identificaron mutaciones de los genes AMEL y ENAM que el esmalte presentaba menor grosor y disrupción de la estructura prismática. Por lo tanto, es muy probable que existan otros genes mutados asociados a las AIHP en que se observa disminución de grosor del esmalte con presencia de estructura prismática, tal como los caso reportados por Nusier y el presente estudio.

Los casos de AI hipomadura, en el presente estudio al ser analizados con cortes por desgaste se observó grosor normal con pérdida translucidez, y con luz polarizada se observó disminución de birrefringencia en dos de seis casos y ausencia en los cuatro restantes y presencia de Bandas de Hunter Schreger difusas. Resultados similares observó Poulter 2014, quien al estudiar la estructura de dientes con AI hipomineralizada y mutación del gen ITGB6, observaron clínicamente esmalte hipomineralizado con numerosos hoyuelos o fositas, en los que al ser analizados con microtomografía computarizada (microCT) observaron desgaste de las cúspides y desprendimiento del esmalte dejando dentina expuesta. Adicionalmente observaron áreas con menor densidad mineral en el esmalte cuspídeo cercano al límite amelodentinario. Con MEB, este autor observó numerosos hoyuelos y zonas prismáticas irregulares con bandas de H-Sch difusas, además la capa interna del esmalte estaba estructuralmente anormal con pérdida de la organización prismática. Por otro lado, El-Sayed el año 2011 estudió una familia con AI hipomadura con una mutación en el gen WDR72 encontrando con MEB estructura prismática normal general, pero la zona interprismática estaba más marcada que los controles.

Las AI Hipocalcificadas en nuestro trabajo, presentaron grosor normal con presencia de estructura prismática. Según el análisis en microscopía óptica de cortes por desgaste observados en pacientes afectados con AI hipocalcificada mostraron mantención de la estructura prismática (Urzua y cols. 2015). Con MEB pudimos observar que en uno de los casos analizados en nuestro estudio con AI hipocalcificada mostró en un tercer molar de un paciente varón estructura prismática con adelgazamientos que daban imagen de “cuentas de collar”, reportado previamente con mutación de FAM83H (Urzúa 2015). En estudios en familias con AI hipomadura donde también demuestran la mutación en FAM83H, observaron con MEB en dientes cortados longitudinalmente, estructura prismática en menor número, áreas inter prismáticas amplias y zonas con

fracturas, rupturas y colapso de prismas. Este mismo autor observó en un tercer molar impactado, que la dentina presentaba dentina peritubular ensanchada y túbulos dentinarios estrechos u obliterados. (Zhang 2015). En otros estudios en AI hipocalcificada con MEB, al analizar superficie de esmalte sin cortar ni fracturar se observó extensa desorganización con estructura irregular y superficie rugosa, desprendimiento de esmalte post erupción dentaria y en el fondo de las depresiones observaron áreas tipo coral de aprox. 3-4 micrones de longitud. (Gjorup y cols. 2009). En el análisis ultraestructural de dientes deciduos afectados con AI hipocalcificada en una familia con una mutación en FAM83H, se reportó pérdida de esmalte post erupción, prismas irregulares y de mala calidad cubiertos por material amorfo. (El-Sayed 2010 y cols).

Con el análisis histológico de dientes descalcificados y procesados para técnica de rutina (H-E) se observó que en la mayoría de los casos el esmalte se perdió después del proceso de descalcificación, pero en algunos casos de AI hipocalcificada se encontró matriz de esmalte con áreas prismáticas y áreas amorfas sin estructura prismática. Los túbulos dentinarios en los tres tipos de AI presentaron una dirección y densidad similar a controles sanos. En un estudio del presente equipo de trabajo, en el que se realizó análisis histopatológico de rutina con tinción H-E reveló la persistencia de materia orgánica en el esmalte afectado, después del proceso de descalcificación en dientes con AI hipocalcificado (Urzua y cols 2015).

En el análisis inmunohistoquímico de nuestro estudio, dientes con AI hipocalcificada se encontró marcada expresión de AMELX F-11. Según un estudio del presente equipo de trabajo donde se analizó la expresión de amelogenina, en un paciente con una mutación en el gen FAM83H revelan un intenso marcaje tanto en interior como en la periferia de los prismas de esmalte,

mientras que en otro paciente sin esta mutación se observó un marcaje solo en la periferia de los prismas (Urzua y cols. 2015).

## **6.2 DENTINOGENESIS IMPERFECTA**

Con relación a dientes de pacientes con DI aislada y DI asociada a OI, nuestros resultados revelaron que en ambas condiciones la dentina presentaba escasos túbulos dentinarios, sin paralelismo entre ellos, con mayor número de ramificaciones y abundante dentina interglobular; mientras que el esmalte presentaba múltiples fisuras o se había desprendido lo que dificultó su análisis.

En casos de OI, Anderson encontró diversidad en la expresividad de dentinogénesis imperfecta, él describió casos de pacientes con OI tipo I más DI y de pacientes con OI tipo III más DI cuyos dientes primarios en cortes por desgaste presentaban una dentina con túbulos dentinarios con amplia variación en el diámetro y múltiples ramificaciones, adicionalmente en pacientes con OI tipo III observó lagunas celulares, mientras que en otros pacientes con OI encontró dentina con estructura histológica normal (Andersson y cols. 2017).

En el presente estudio en un caso de OI con DI observamos en el tercio externo de la dentina, estructuras tubulares con curvaturas en forma de “U” con el área convexa hacia el límite amelodentinario. Varios autores han observado estructuras curvas tipo canal o tipo inclusión vascular similares a las observadas por nosotros. Lindau y col. describieron en dientes permanentes y primarios de pacientes con OI tipo I, III y IV túbulos dentinarios gigantes e inclusiones “tipo vaso sanguíneo” similares a las observadas por nosotros (Lindau 1999). De Coster encontró en pacientes con OI y DI con mutaciones en COL1A1 áreas de dentina con apariencia normal alternada con áreas de dentina atubular con “estructuras tipo canal” (De Coster 2007), los que también fueron descritos por Majorana

2010. Por otro lado, Davis también describe en tres familias danesas con DI aislada túbulos dentinarios con diámetro parecido al de los capilares y que los túbulos más anchos estaban donde se formaba la dentina primaria (Davis y cols. 2015). Se ha descrito una amplia variación en la estructura de la dentina de pacientes con OI afectados con DI, si bien la mayoría de los autores describe escasos túbulos dentinarios con presencia de túbulos dentinarios gigantes, en otro análisis con MEB de terceros molares afectados con DI en pacientes con OI, se observó que los túbulos dentinarios tenían diámetro reducido y se encontraban en zonas de dentina con aspecto globular (Silveira y cols. 2008). Otros autores describen áreas tubulares irregulares con ondulaciones, variaciones de diámetro y múltiples ramificaciones (Vital 2012) similares a las observadas en el presente trabajo.

Similar a la abundante dentina interglobular observada por nosotros en dientes de pacientes con OI, son los hallazgos de Taleb quien además observó que el límite amelodentinario se caracterizaba por una falta de festoneado (Taleb y cols. 2018). Lindau 1999, observó en dientes de pacientes con la misma condición que el límite amelo-dentinario presentaba en un alto porcentaje una unión lisa y en pocos casos este límite era festoneado.

En el presente trabajo de investigación observamos en los dientes afectados por DI aislada escasos túbulos dentinarios con direcciones irregulares y áreas con alto porcentaje de dentina interglobular. Similares hallazgos reporta Devaraju y col 2014, quienes en cortes por desgaste observaron túbulos irregulares y aumento de dentina interglobular.

En nuestro estudio en los dientes afectados por DI aislada, encontramos además del menor número de túbulos dentinarios un menor diámetro de los

túbulos dentinarios en un premolar de un individuo adulto, por lo que este menor diámetro de los túbulos dentinarios podría atribuirse al envejecimiento dentario más que a la condición en estudio (Gómez de Ferrais).

En otros estudios que analizaron con MEB en un caso de DI aislada, observaron ausencia de paralelismo entre prismas de esmalte además de alteraciones de los túbulos dentinarios tales como reducción en la cantidad, obliteración de estos o túbulos de hasta 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (Gama y cols. 2017).

Con relación a los hallazgos de inmunohistoquímica con anticuerpos anti DSPP nosotros observamos una gran diferencia entre los casos con DI aislada, DI asociada a OI y los controles. En los casos de DI aislada no se observó inmunomarcación con ninguno de los dos tipos de anticuerpo anti DSPP, mientras que en los casos de OI con DI ambos anticuerpos marcaron los escasos túbulos dentinarios presentes y de manera muy llamativa los túbulos dentinarios gigantes que se marcaron no solo en la zona peritubular sino también en forma difusa la periferia de estos túbulos. A nuestro entender este es el primer estudio que compara la inmuno marcación de DSPP en dientes humanos con DI en pacientes con y sin OI. En pacientes con OI y dentina estructuralmente anormal, se ha realizado inmunomarcación para colágeno I encontrándose una tinción heterogénea en las áreas de dentina patológica circumpulpar (De Coster 2007) con una distribución similar a la observada por nosotros al marcar DSPP. En dientes de pacientes con OI, Majorana 2010 empleando inmunofluorescencia encontró colágeno III, el que normalmente sólo se encuentra en dentina reactiva. Este mismo autor en el año 2014, realizó un análisis inmunohistoquímico marcando colágeno I y VI en dientes de pacientes con OI y observó una estructura fibrilar desorganizada, con una marcación de colágeno I menos uniforme y con mayor reactividad de colágeno VI que los dientes normales. Los hallazgos de estos autores más los nuestros sugieren que los pacientes con OI

con dentina estructuralmente anormal tendrían fibras de colágeno I y DSPP distribuido en forma heterogénea en torno a túbulos gigantes además de mayor presencia de colágeno III y VI que los controles.

### **6.3. ODONTODISPLASIA REGIONAL**

En el presente trabajo los tres dientes afectados por ODR, presentaron el esmalte y la dentina con grosor disminuido y aspecto irregular. El esmalte con forma arremolinada, presentaba curvaturas muy marcadas y muy irregulares, lo que fue evidente en las muestras estudiadas con cortes por desgaste, con técnica histológica de rutina en muestras descalcificadas y con MEB. La dentina presentó alteraciones como abundante dentina interglobular y túbulos de diámetros muy variables. Hallazgos importantes se observaron inmunohistoquímica, donde al analizar el abundante material orgánico remanente en el esmalte después de descalcificar los dientes presentaron intensa marcación con anticuerpo anti amelogenina.

En el estudio de un paciente que presentaba un caso raro de ODR, debido a que los dientes afectados correspondían a zona anterior maxilar cruzando la línea media, en corte por desgaste observaron que el esmalte presentaba grosor variable con áreas hipoplásicas e hipocalcificadas provocando una superficie irregular, la dentina era delgada y los túbulos eran reducidos en número y con forma tortuosa. La misma muestra, al ser analizada con microscopia óptica con técnica histológica corriente y tinción H-E, estos autores observaron un esmalte anormal y delgado y dentina con zonas atubulares con un espacio pulpar amplio (Kappadi y cols). En nuestro estudio vimos similares características a nivel dentinario, pero adicionalmente presencia de abundante dentina interglobular y túbulos dentinarios de diámetros variables de hasta 10  $\mu\text{m}$  en dientes primarios,

siendo algunos incluso gigantes con relación a otros.. Adicionalmente, observamos un esmalte con prismas de aspecto arremolinado

En otro análisis observaron en microscopio óptico, que los dientes descalcificados teñidos con H-E, presentaban dentina interglobular y presencia de material amorfo en predentina (Gurunathan y cols.).

Carlos y cols. analizaron dos casos con ODR, encontrando en ambos casos que tanto esmalte como dentina tenían grandes alteraciones incluyendo hipomineralización y descoloración en la estructura coronaria. En el análisis ultraestructural de estos casos, observaron alteraciones de la superficie prismática y surcos dentinarios con presencia de dentina interglobular, también los autores demostraron que la dentina presentaba alteración en densidad, tamaño y orientación de los túbulos dentinarios (Roman Carlos y cols.).

Las Amelogénesis imperfectas, Dentinogénesis imperfectas y Odontodisplasia regional presentan alteraciones estructurales y ultraestructurales particulares a cada una de ellas, por lo que el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural puede ser de alta relevancia en el diagnóstico diferencial de estas patologías. El conocimiento de las alteraciones estructurales de los dientes tiene gran relevancia en Odontología, ya que contribuye al diagnóstico preciso de cada una de estas patologías y sus variaciones, lo que por un lado permite correlacionar estos cambios con las mutaciones descritas para comprender la etiopatogenia de estas condiciones y contribuir a tomar medidas preventivas, así como buscar terapias odontológicas específicas para proteger y/o restaurar las estructuras dentarias alteradas.

## 7. CONCLUSIONES

1. Las AI hipoplásicas presentan un esmalte de grosor delgado con estructura prismática anormal o ausente. En dentina la estructura y la presencia de DSPP se observó similar a los controles sanos.
2. En AI hipomadura se observó un grosor normal pero con pérdida de translucidez observados con la técnica corte por desgaste analizados en microscopio óptico con luz corriente y filtros de luz polarizada. La dentina presentó una estructura e inmunomarcación de DSPP similar a los controles sanos.
3. AI hipocalcificada presentó un grosor normal con estructura prismática, las muestras descalcificadas presentaron inmunomarcación de AMELX en matriz de esmalte. El análisis ultra estructural presentó, en un caso, zonas de prismas parecidos a "cuencas de collar". En dentina la estructura y la presencia de DSPP se observó similar a los controles sanos.
4. Los casos de DI aislada presentaron disminución en densidad de los túbulos dentinarios, pérdida de paralelismo entre ellos y variaciones en los diámetros.
5. La DI asociada a OI, presentó zonas de dentina con escasos túbulos de diámetros variables, algunos de gran tamaño o con curvaturas en forma de "U". Con anticuerpo anti DSPP se observó intensa marcación en dentina peritubular y en el interior de túbulos dentinarios irregulares.

6. Los dientes del paciente con ODR presentaron un esmalte delgado con aspecto arremolinado y dentina delgada con zonas atubulares y zonas con alteración en tamaño y forma de túbulos dentinarios y abundante dentina interglobular.

## 8. RESUMEN

TEJIDO	TÉCNICA DE ANÁLISIS	AMELOGÉNESIS IMPERFECTA			DENTINO GÉNESIS IMPERFECTA	ODONTODISPLASIA REGIONAL
		Al Hip	Hipom	Hp calci		
ESMALTE	MICROSCOPIA ÓPTICA CORTES POR DESGASTE	100 % disminución de grosor. Prismas irregulares o ausentes.	Grosor mantenido. Mantención estructura prismática.	Grosor mantenido. Mantención estructura prismática.	Fractura y pérdida de esmalte coronario.	Áreas de esmalte Hipoplásica e Hipocalcificada y prismas con una dirección y grosor irregular.
	MICROSCOPIA LUZ POLARIZADA CORTES POR DESGASTE	67 % de casos con birrefringencia	32 % de casos con birrefringencia	Ningún caso con birrefringencia	32% de casos con birrefringencia	Presencia de birrefringencia en el único caso.
	MICROSCOPIA ÓPTICA INMUNOHISTOQUÍMICA	Pérdida de matriz de esmalte.	Remanente de matriz de esmalte	Presencia de <u>amelogenina</u> . DSPP ausente en esmalte	Pérdida de matriz de esmalte.	Áreas de esmalte muy irregular y de forma tortuosa.
	MICROSCOPIA ÓPTICA TINCION H-E	Pérdida de matriz de esmalte.	Escaso remanente de matriz de esmalte	Persiste matriz de esmalte con estructura prismática <u>separada de la</u>	Pérdida de matriz de esmalte.	Escasa matriz de esmalte muy irregular y sin prismas.
	MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARIIDO	Grosor disminuido, con esmalte amorfo y sin prismas en un caso.	Grosor normal con prismas	dentina Grosor normal con prismas adelgazados y dan imagen de cuentas de collar.	Esmalte de grosor normal con fisura	Grosor de esmalte disminuido, esmalte irregular, rugoso y sin prismas.

<b>DENTINA</b>	<b>MICROSCOPIA ÓPTICA CORTES POR DESGASTE</b>	100% de Túbulos dentinarios de grosor, diámetro y paralelismo normal 32 % de casos con dentina interglobular.	100% de túbulos normales en grosor, paralelismo y diámetro, 64 % con dentina interglobular	100% de túbulos normales en grosor, paralelismo y diámetro, 33 % con dentina interglobular	Túbulos dentinarios muy escasos, con distribución desorganizada.	Dentina delgada, número reducido de túbulos dentinarios y de forma tortuosa. Dentina amorfa o con dentina interglobular
	<b>MICROSCOPIA LUZ POLARIZADA CORTES POR DESGASTE</b>	No hay presencia de birrefringencia	No hay presencia de birrefringencia	No hay presencia de birrefringencia	No hay presencia de birrefringencia	Presencia de birrefringencia en el único caso
	<b>MICROSCOPIA ÓPTICA INMUNOHISTOQUÍMICA</b>	Se encontró poca expresión de DSPP no expresión de amelogenina	64 % de expresión con amelogenina y 100 % de expresión de DSPP	Negativo para amelogenina y no hay registro de DSPP ya que están en proceso de descalcificación	Túbulos dentinarios ausentes y negativo para amelogenina y escaso para DSPP	Muy Escaso para amelogenina y 67 % de marcación para DSPP
	<b>MICROSCOPIA ÓPTICA TINCION H-E</b>	100% Túbulos dentinarios de diámetro y paralelismo normal.	100% Túbulos dentinarios de diámetro y paralelismo normal y 50 % de dentina interglobular.	100% Túbulos dentinarios de diámetro y paralelismo normal.	Muy escasa presencia de túbulos y presencia de dentina interglobular .	100% de presencia de dentina interglobular.
	<b>MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO</b>	Túbulos con disposición similar a dentina normal	Túbulos normales en disposición y diámetro.	Túbulos con diámetro normal y disposición recta.	Túbulos con curvaturas en forma de U y en escaso número	Túbulos con amplia variación de diámetros.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Al-Tuwirqi Amani, Lambie Duncan (2014). Regional Odontodysplasia: Literature Review and Report of an Unusual Case Located in the Mandible. *Pediatric Dentistry*; 36:1.
2. Alachioti X. S., Dimopoulou E., Vlasakidou A., Athanasiou E. (2014). Amelogenesis imperfecta and anterior open bite. *Journal of Orthodontic Science*; 3:1.
3. A fifth amendment for the Declaration of Helsinki. *The Lancet* 2000; 356: 1123.
4. Aldred MJ (2003). Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century. *Oral Diseases*; 9, 19–23.
5. Antoine Daniel, Hillson Simon, Dean Christopher (2009). The development of a clock of dental enamel: a test for the periodicity of prism cross-striations in modern humans and an evaluation of the most likely by sources of error in histological studies of this kind. *J. Anat.* 214, 45–55.
6. Andersson K, Dahlöf G, Lindahl K, Kindmark A, Grigelioniene G, Åström E, et al. (2017) Mutations in COL1A1 and COL1A2 and dental aberrations in children and adolescents with osteogenesis imperfecta – A retrospective cohort study. *PLoS ONE* 12(5): e0176466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176466>
7. Barron Martin J, McDonnell Sinead T (2008). Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*; 3:31.
8. Bertassoni L., Habelitz S., Pugach M., Soares P., Marshall S., Marshall Jr G. (2010). Evaluation of Surface Structural and Mechanical Changes Following Remineralization of Dentin. *Scanning*; 32(5): 312–319.
9. Beynon, AD. (1992). Circaseptan rhythms in enamel development in modern humans and Pliocene hominids. In: Smith P, Tchernev E,

- editors. Structure, function and evolution of teeth. London: Freund. p 295–309.
10. Boyde A. (1989). Enamel. In: Oksche A, Vollrath L, editors. Teeth. Berlin: Springer-Verlag. p 309–473.
  11. Crawford Peter JM (2007). Amelogenesis imperfecta. Orphanet Journal of Rare Diseases 2:17.
  12. De La Dure-Molla Muriel, Philippe Fournier, Benjamin, Berdal Ariane (2014). Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: revision of the classification. European Journal of Human Genetics, 1–7.
  13. Deshpande AS, Fang PA, Zhang X, Jayaraman T, Sfeir C, Beniash E. (2011). Primary structure and phosphorylation of dentin matrix protein 1 (DMP1) and dentin phosphophoryn (DPP) uniquely determine their role in biomineralization. Biomacromolecules, 12:2933-45.
  14. Devaraju D, Yashoda Devi BK, Vasudevan Vijeev, Manjunath V (2014). Dentinogenesis imperfecta type I: A case report with literature review on nomenclature system. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology 18 (1); 131-134.
  15. Duverger Oliver, Beniash Elia y Morasso Marial. (2016). Keratins as components of the enamel organic matrix. Matrix Biol.; 52-54: 260–265.
  16. El-Sayed W, Shore RC, Parry DA, Inglehearn CF, Mighell AJ. Ultrastructural analyses of deciduous teeth affected by hypocalcified amelogenesis imperfecta from a family with a novel Y458X FAM83H nonsense mutation. Cells Tissues Organs.; 191(3):235-9.
  17. Elhechmilmen, Braga Jose, Dasgupta Gautam, Gharbi Tijani (2013). Accelerated measurement of perikymata by an optical instrument. Biomedical Optics Express 10 (4): 2124-2137.

Código de campo cambiado

18. Ergun Gulferm y Seda Ataul Ayse (2018). An Interdisciplinary Approach for Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta: A Case Report. *The Open Dentistry Journal*, 2018, 12, 466-475
19. Fang Ping-An, VerdelisKostas (2014). Ultrastructural organization of dentin in mice lacking dentin sialo-phosphoprotein. *ConnectTissue Res*; 55(S1): 92–96.
20. Feng J, McDaniel J, Chuang HH, Huang O, Rakian A, Xu X, Steffensen B, Donly KJ, MacDougall M, Chen S. (2012) Binding of amelogenin to MMP-9 and their co-expression in developing mouse teeth. *J Mol Hist*. 43: 473–485.
21. Goldberg M., Askok B., Kulkarni, Marian Y. (2012). Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci.*; 3: 711–735.
22. Gómez de Ferrais ME, Campos A (2002). *Histología y embriología bucodental* (2da. Edición). México. Editorial Médica Panamericana.
23. Hu J.C., Chan H. C., Simmer S.G., Seymen F., Richardson A. (2012). Amelogenesis imperfecta in two families with defined AMELX deletions in ARHGAP6. *PLoS One*, vol. 7.
24. Jahanimoghadam F., Pishbin L., Rad M. (2016). Clinical, Radiographic, and Histologic Evaluation of Regional Odontodysplasia: a Case Report with 5-year Follow-up. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.*, 2016 June; 17(2): 159-163.
25. Kavitha B., Privadharshini V., Sivapathasundharm B., Sarawathi T R (2010). Role of genes in oro-dental diseases. *Indian J Dent Res*, 21:270-4.
26. Lee S.K., Seymen F. (2010). Novel WDR72 Mutation and Cytoplasmic Localization. *J Dent Res* 89(12):1378-1382.

27. Linda Ubritt, Dietz wolfram, Lundgrented, Storhaugkari (1999). Discrimination of morphological findings in dentine from osteogénesis imperfecta patients using combinations of polarized light microscopy, microradiography and scanning electron microscopy. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 9: 253-261.
28. Malik S., Gupta S., Wadhwan V., Suhasini G P. (2015). Dentin dysplasia type I – A rare entity. *J Oral MaxillofacPathol*, 19:110.
29. Martín-González J, Sánchez-Domínguez B. (2012). Inherited dental abnormalities and displasias. *Odontoestomatol*; 28 (6): 287-301.
30. Mathew A, Dauravu LM, Reddy SN, Kumar KR, Venkataramana V (2015). Ghost teeth: Regional odontodysplasia of maxillary first molar associated with eruption disorders in a 10-year-old girl. *J Pharm Bioallied Sci.*, 7:800-3.
31. Mazumder P, Prajapati S, Lokappa SB, Gallon V, Moradian-Oldak J. (2014). Analysis of co-assembly and co-localization of ameloblastin and amelogenin. *Front Physiol.*, 25(5):274.
32. Mazumder P, Prajapati S, Bapat R y Moradian-Oldak J (2016). Amelogenin-Ameloblastin Spatial Interaction around Maturing Enamel Rods. *Journal of Dental Research*, 95(9):1042–1048
33. Montenegro MA, Mery C, Aguirre A (1997) *Histología y Embriología del Sistema Estomatognatico* (1ra. Edición). Santiago, Chile. Ediciones Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
34. Moradian-Oldak (2013). Janet Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci*; 17: 1996–2023.
35. Mostafa I.M, Taha S.N, IMehrez IMA. (2013). Generalised versus Regional Odontodysplasia: Diagnosis, Transitional Management, and

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

- Long-Term Followup-A Report of 2 Cases. *Case Rep Dent.*, 2013;519704.
36. Al-Mullahi A. M. and Toumba K.J. (2016). Regional Odontodysplasia with Generalised Enamel Defect. Volume 2016, Article ID 4574673: 1-5.
  37. Napierala D, Sun Y, Maciejewska I, Bertin TK, Dawson B, D'Souza R, Qin C, Lee B. (2012). Transcriptional repression of the *Dspp* gene leads to dentinogenesis imperfecta phenotype in *Col1a1-Trps1* transgenic mice. *J Bone Miner Res.*, 27(8):1735-45.
  38. Neville B, Damm D, Allen C, Bouquot J (2008) Oral and maxillofacial pathology. Philadelphia, USA: W B Saunders Co, pp 374–376.
  39. Niño-Barrera Javier L., Gutiérrez Maria L., Garzón-Alvarado Diego A.(2013). A theoretical model of dentinogenesis: Dentin and dentinal tubule formation. *Computer Methods and programs in biomedicine* 112:219–227
  40. Poulsen S., Gjørup H. (2008). Amelogenesis imperfecta a systematic literature review of associated dental and oro-facial abnormalities and their impact on patients. *Acta Odontologica Scandinavica*; 66: 193-199.
  41. Prasad MK, Geoffroy V, Vicaire S (2016). A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement. *J Med Genet*; 0:1–13.
  42. Rashidian A., Afsharian Zadeh M., Azarshab M., Zarrabian T. (2013). Regional Odontodysplasia: Report of a case. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.*, Dec; 14(4): 197-200.
  43. Ravindran Sriram y George Anne (2015). Dentin Matrix Proteins in Bone Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol.*; 881: 129–142
  44. Reid DJ, Dean MC. 2000. Brief communication: the timing of linear hypoplasia on human anterior teeth. *Am J Phys Anthropol* 113:135–139.

45. Ritchie Helena (2018). The functional significance of dentin sialoprotein phosphophoryn and dentin sialoprotein. *International Journal of Oral Science*;10:31.
46. Salido EC, Yen PH, Koprivnikar K, Yu LC, Shapiro LJ. (1992). The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 50:303– 316.
47. Sabel Nina, Klingberg Gunilla, Dietz Wolfram, Nietzsche Sandor, Nore ´n Jorgen G. (2010). Polarized light and scanning electron microscopic investigation of enamel hypoplasia in primary teeth. *International Journal of Paediatric Dentistry*; 20: 31–36
48. Seow WK (2014). Developmental defects of enamel and dentine: challenges for basic science research and clinical management. *Australian Dental Journal.* 59:143–154.
49. Sook-Kyung Lee, Kyung-Eun Lee, Su Jeong song, Hong-Keun Hyun, Sang-Hoon Lee y Jung-Wook Kim (2013). A DSPP Mutation Causing Dentinogenesis Imperfecta Characterization of the Mutation. ID 948181: 1-7.
50. Shaker JL, Albert C, Fritz J and Harris G. (2015) Recent developments in osteogénes isimperfecta;4:681. *BioMed Research International*
51. Shellis RP. (1998). Utilization of periodic markings in enamel to obtain information on tooth growth. *J HumEvol* 35:387–400.
52. Shields ED, Bixler D, el-Kafrawy AM. (1973). A proposed classification for heritable human dentin defects with a description of a new entry. *Arch Oral Boil.*, 18:543–53.
53. Smith TM, Toussaint M, Reid DJ, Olejniczak AJ, Hublin JJ. (2007). Rapid dental development in a Middle Paleolithic Belgian Neanderthal. *ProcNatlAcadSci* 104:20220–20225.

54. Smith CEL, Poulter JA, Antanaviciute A, Kirkham J, Brookes SJ, Inglehearn CF and Mighell AJ (2017) Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways. *Front. Physiol.* 8:435.
55. Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB. (2003). Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened pre-dentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem.*, 27:24874–80.
56. Stephanopoulos G., Garefalaki M.E., Lyrroudia K. (2005). Genes and Related Proteins Involved in Amelogenesis Imperfecta. *Dent Res* 84(12): 1117-1126.
57. Taleb Kawther, Lauridsen Eva, Daugaard-Jensen Jette, Nieminen Pekka, Kreiborg Sven. (2018). Dentinogenesis imperfecta type II-genotype and phenotype analyses in three Danish families. *Mol Genet Genomic Med.*;6:339–349.
58. Ten Cate AR (2003). *Oral histology: development structure, and function.* Mosby, St. Louis.
59. Urzúa B, Martínez C, Ortega-Pinto A, Adorno D, Morales-Bozo I, Riadi G, Jara L, Plaza A, Lefimil C, Lozano C, Reyes M. Novel missense mutation of the FAM83H gene causes retention of amelogenin and a mild clinical phenotype of hypocalcified enamel. *Arch Oral Biol.* 2015 23;60(9):1356-1367.
60. Urzúa Blanca, Ortega-Pinto Ana, Morales-Bozo Irene, Rojas-Alcayaga Gonzalo, Cifuentes Víctor (2011). Defining a New Candidate Gene for Amelogenesis Imperfecta: From Molecular Genetics to Biochemistry. *Biochem Genet* 49:104–121.
61. Wang S-K, Chan H-C, Rajderkar S, Milkovich RN, Uston KA, Kim J-W, Simmer JP, Hu JC-C. (2011). Enamel malformations associated with a

Código de campo cambiado

- defined dentin sialophosphoprotein mutation in two families. *Eur J Oral Sci*, 119: 158–167.
62. Wolman, M (1975). Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 23(1): 21-50.
63. Witkop CJ Jr. (1989). Amelogenesis Imperfecta, Dentinogenesis Imperfecta and dentin dysplasia revised: problems in classification. *J Oral Pathol* 17:547-553
64. Wright J. T., Hart T. C., Hart S. S., Suggs C. D., Simmer J. H., Bartlett J.D., Li Y., Yuan Z., Seow W.K., Gibson C.W. (2009). Human and Mouse Enamel Phenotypes Resulting from Mutation or Altered Expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4. *Cells Tissues Organs*; 189:224–229.
65. Wright J. T., Li Y., Suggs C., Kuehl M.A., Kulkarni A. B., and Gibson C.W.(2011). The role of amelogenin during enamel-crystallite growth and organization in vivo. *European Journal of Oral Sciences*, 119(1): 65–69.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1 FICHA CLÍNICA

N° \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### FICHA CLÍNICA

##### A. ANAMNESIS ESTADÍSTICA

Nombre completo: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_ Sexo: M F RUT: \_\_\_\_\_

Dirección actual: \_\_\_\_\_

Fono Fijo: \_\_\_\_\_ Fono celular: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_ Nivel educacional \_\_\_\_\_

Lugar (es) de Residencia(s) durante la vida: \_\_\_\_\_

##### B. ANAMNESIS REMOTA FAMILIAR

###### 1. Enfermedades sistémicas: SI NO

Mamá		Papá	
Alteraciones embarazo		Labio fisurado	
Rubéola		Rubéola	
Raquitismo		Raquitismo	
Radiación		Radiación	
Displasia ectodérmica		Displasia ectodérmica	
Paladar fisurado		Paladar fisurado	

Antecedentes de:

Consumo medicamentos: \_\_\_\_\_

Alteraciones visuales: \_\_\_\_\_

Nefrocalcinosis: \_\_\_\_\_

Fuma: \_\_\_\_\_

Otro : \_\_\_\_\_

##### C. ANAMNESIS REMOTA PERSONAL

ENFERMEDADES	SI	NO
Enfermedades cardiovasculares		
Hipertensión arterial		
Diabetes		
E.T.S		
Tuberculosis		
Enfermedades autoinmunes		
Enfermedades respiratorias (Bronquitis frecuente)		
Enfermedades tracto digestivo		
Enfermedades congénitas		
Enfermedades psiquiátricas		

Enfermedades renales		
Nefrocalcinosis		
Litiasis renal		
Otras:		

Antecedentes de ingesta de flúor y/o medicamentos (SI/NO)

Fecha: \_\_\_\_\_

Consumo actual de medicamentos (SI/NO)

Cual(es): \_\_\_\_\_

Hábitos: \_\_\_\_\_

**D. ENFERMEDAD ACTUAL**

	SI	NO
Sensibilidad a cambios térmicos		
Sensibilidad a cambios químicos		
Dolor		
Otra sintomatología:		

**E. EXÁMEN CLÍNICO**

**1. Extraoral:** indicar SI o NO

Hipotricosis

Uñas disp. mano

Uñas disp. pies

Sequedad piel

Frente displásica


Cejas esc/aumen

Pestañas esc/aum.

Hiperpig. Parp. inf.

Nariz displásica


Cabello canoso

Hipohidrosis

Orejas displásic.

Párpados displa


**2. Intraoral:**

Mucosa: \_\_\_\_\_

Frenillo labial (Superior/Inferior): \_\_\_\_\_

Paladar: \_\_\_\_\_

Lengua: \_\_\_\_\_

Úvula: \_\_\_\_\_

Secreción de glándulas salivales mayores: \_\_\_\_\_

Mordida Abierta Anterior: \_\_\_\_\_

Estado Periodontal:

- Presencia de placa (SI/NO; Localizada/Generalizada): \_\_\_\_\_
- Presencia de Cálculo (SI/NO; Localizada/Generalizada): \_\_\_\_\_
- Hiperplasia gingival (SI/NO; Localizada/Generalizada; ¿ por fármacos?) \_\_\_\_\_
- Gingivitis (SI/NO; Localizada/Generalizada): \_\_\_\_\_
- Periodontitis (SI/NO; Localizada/Generalizada): \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Examen del Esmalte:**

Coloración del esmalte: \_\_\_\_\_

Delgadez del esmalte: \_\_\_\_\_

Características de textura y rugosidad del esmalte: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Dentición permanente**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16


17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

**Dentición temporal**


X = ausente

△ en arroz

M = en Mora

D = Displasia otra

Ab= abrasión cervical

Mc= mancha café

C = caries

O = Coronada

P = Pilar Puente

Di= diente invaginado

Mb= mancha blanca

I= incluido

T= transposición dentaria

G= giroversion

Sp= supernumerario

S= sano

Ma= mancha amarillo

**Dentición(es) afectada(s):** ( ) Temporal ( ) Permanente

**Nº de Dientes Afectados:** \_\_\_\_\_

*Diagnóstico del paciente\*:* \_\_\_\_\_

¿Hay islas de esmalte normal en puntas de cúspides o en zona cervical? \_\_\_\_\_

**F. EXAMEN RADIOGRÁFICO:**

Taurodontismo (SI/NO; Dientes afectados): \_\_\_\_\_

Contraste Dentina/Esmalte: \_\_\_\_\_

**4. Otros:**

Estatura: \_\_\_\_\_cm

Test de saliva global \_\_\_\_\_ml x 5min. TuboNº: \_\_\_\_\_

Test de Schirmer oral= \_\_\_\_\_mm x 5 min.

Medición de densidad de GSM Labiales= \_\_\_\_\_

Foto clínica: \_\_\_\_\_

Impresión de arcadas dentarias: \_\_\_\_\_

Entrega de orden de Radiografía panorámica: \_\_\_\_\_

**Muestra de Diente permanente o temporal (SI/NO; Cuál (es):** \_\_\_\_\_

## ANEXO 2 CERTIFICADO COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

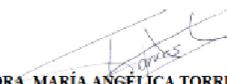


### CERTIFICADO

El Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, con fecha 12 de julio del 2013, aprobó el Proyecto de Investigación " MUTATIONAL ANALYSIS OF CAUSAL GENES OF AMELOGENESIS IMPERFECTA AND A SEARCH FOR NEW GENES INVOLVED IN ITS ETIOLOGY THROUGH TECHNIQUES OF EXOME CAPTURE AND MASSIVE PARALLEL SEQUENCING ", Proyecto Fondecyt Regular, cuyo Investigador Responsable es la Académica Dra. Blanca Urzúa Orellana, del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Dicho proyecto de Investigación, que se ejecutará durante el 15 de marzo del 2014 al 15 de marzo del 2018, a juicio de este Comité, cumple con las exigencias éticas correspondientes.

SANTIAGO, 02 de marzo de 2015

  
DRA. MARÍA ANGÉLICA TORRES V.  
PRESIDENTA COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO



MATV/vrd.

**ANEXO 3**  
**CERTIFICADO COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOSEGURIDAD**



Comité Institucional de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte  
FDO N°2

Santiago, 24 de Junio de 2013.

**C E R T I F I C A D O**

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso Fondecyt Regular 2014, titulado "MUTATIONAL ANALYSIS OF CAUSAL GENES OF AMELOGENESIS IMPERFECTA AND A SEARCH FOR NEW GENES INVOLVED IN ITS ETIOLOGY THROUGH TECHNIQUES OF EXOME CAPTURE AND MASSIVE PARALLEL SEQUENCING". La Investigadora Responsable de este proyecto es la Dra. Blanca Urzúa Orellana.

Los procedimientos experimentales, que involucran tanto el manejo de material biológico así como el uso de agentes químicos de riesgo, se realizarán en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral perteneciente al Departamento de Ciencias Básicas y Comunitarias, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

El CIB certifica que el laboratorio y la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material químico y biológico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Urzúa para ser presentado al Concurso FONDECYT Regular 2014.

Dr. Mario Chiong  
Secretario

Dra. Carla Lozano M.  
Presidenta

## ÍNDICE

PORTADA.....	1
1. RESUMEN.....	2
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 ODONTOGÉNESIS.....	4
2.2 ESTRUCTURA DE ESMALTE.....	5
2.3 ESTRUCTURA DE LA DENTINA.....	9
2.4 AMELOGÉNESIS IMPERFECTA.....	12
2.5 DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA.....	18
2.6 ODONTODISPLASIA REGIONAL.....	23
2.7 FORMULACIÓN DE PROBLEMA.....	25
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL Y MÉTODO .....	29
4.1 TIPO DE ESTUDIO.....	29
4.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA .....	29
4.3 JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	29
4.4 ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD DE LA INVESTIGACIÓN .....	29
4.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	30
4.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	30
4.7 PROCEDIMIENTO.....	30
4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA UTILIZADA EN EL ESTUDIO.....	36
5.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE ESMALTE Y DENTINA DE DIENTES DE PACIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA,	

ODONTODISPLASIA REGIONAL Y DIENTES CONTROLES SANOS.....	39
5.3 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AMELOGENINA Y DENTINA SIALOFOSFOPROTEÍNA EN ESMALTE Y DENTINA DE PACIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA (AI), DENTINOGENESIS IMPERFECTA (DI) Y ODONTODISPLASIA REGIONAL (ODR) CON DIENTES CONTROLES SANOS.....	61
5.4 CONFORMACIÓN ULTRA ESTRUCTURAL DE ESMALTE Y DENTINA DE DIENTES DE PACIENTES CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA, DENTINOGENESIS IMPERFECTA Y ODONTODISPLASIA REGIONAL CON DIENTES CONTROLES SANOS.....	77
6. DISCUSION .....	84
7. CONCLUSIONES .....	96
8. RESUMEN .....	98
9. BIBLIOGRAFÍA.....	100
10. ANEXOS.....	108