

## Cartografía de la Expresión del Gen *msx2* en el Ratón. Análisis de las Alteraciones Relacionadas con la Invalidación del Gen *msx2*

Alba Bolaños<sup>1</sup>, Ariane Berdal<sup>2</sup>, Frédéric Lezot<sup>2</sup>, Dominique Hotton<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento Ciencias Morfopatológicas. Facultad de Odontología - Universidad de Carabobo.

<sup>2</sup>Centre de Recherche des Cordeliers. Biología Oro facial y Patología UMRS 872. Equipo5 Universidad Paris VII. Francia  
abolanosve@yahoo.com

Recibido: 11/12/2007  
Aceptado: 15/10/2008

### Resumen

Esta investigación realizó la cartografía de los transcritos del homogen *msx2* y analizó las perturbaciones ligadas a la invalidación de este gen. Se estableció el patrón de expresión de los transcritos de *msx2* en los estados mas avanzados de la mineralización: el molar, el hueso del ratón de siete días y del incisivo en crecimiento continuo del ratón de 56 días de nacido. En este trabajo también se evidenció un ARN antisentido de *msx2*. Este transcrito se traduce en las mismas células donde se encuentra el transcrito antisentido infiriendo su participación en la regulación de la proteína. Se evidenciaron claramente las zonas en las que se expresa la proteína: el diente y el folículo piloso, en el ratón heterocigoto, obtenido por introducción del gene revelador *nlacZ* en el interior del gen *msx2*. El estudio de la función de la proteína Msx2 se llevó a cabo mediante el análisis de las alteraciones relacionadas con la invalidación progresiva del gen. Se estudió la localización de la calbindina-D 28k, proteína que se une al calcio con una alta afinidad, en los ratones Msx2<sup>+/+</sup>; <sup>+/+</sup> y <sup>-/-</sup>. y finalmente se realizó un estudio por RT-PCR con *primers* específicos del gen de la calbindina-D 28k en los mismos animales de experimentación. Los resultados obtenidos permitieron establecer hipótesis relativas a las alteraciones morfológicas y fisiológicas relacionadas con la anulación del homeogen *msx2*.

**Palabras clave:** Homogenes divergentes, diente, ARN antisentido, biomineralización.

### Summary. Cartographic Expression of *msx2* Gene in wild tipe mice disturbances Analysis linked to *msx2* Gene invalidation

This work show the transcripts of the *msx2* homeobox gene wild type mice and analysed disturbances linked to the invalidation of this gene in transgenics mice. Expression's pattern of the transcripts *msx2* homeobox gene was established in wild type mouse in all mineralized development stages in molar, bone at seven days and in continuously growth incisor at 56 days. This memory contribute to evidence endogenous RNA antisens of *msx2* existence in mouse. This antisens RNA is expressed in the same cells as sense RNA and would participate protein's regulation. Expressions of the protein (tooth and hair follicle) were defined in heterozygote's mice (mutant by insertion of the *nlacZ* reporter gene inside the homeobox gene *msx2*). The function of the protein Msx2 was approached by analyze of disturbances linked to the progress invalidation of gene. The localization of calbindine-D 28k, protein which links calcium with a high affinity was studied with mice Msx2 <sup>+/+</sup>; <sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup>. RT-QPCR was accomplished with mice Msx2 <sup>+/+</sup>; <sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> with specifics primers of calbindin-D 28k gene. Our results allow establishing hypotheses of the morphological and physiological disturbances linked to the invalidation of Msx2.

**Key words:** Divergent homeogene Tooth, antisens RNA, biomineralization.

## Introducción

El desarrollo y fisiología del esqueleto craneofacial está coordinado por un grupo definido de tipos celulares (osteoblastos, condroblastos, ameloblastos, odontoblastos y cementoblastos) que, a pesar de presentar características comunes, cada uno guarda ciertas especificidades según su localización anatómica.

El origen embriológico de estos tipos celulares y sus regulaciones genéticas son importantes en la adquisición de una identidad posicional. El esqueleto diverge en su origen embriológico en mesodermo para la región axial y apendicular; crestas neurales cefálicas y epitelio oral para región craneofacial. Durante el desarrollo pueden observarse dos fases superpuestas: la morfogénesis precoz donde se ponen en evidencia los patrones de desarrollo, y la morfogénesis tardía, que corresponde a la histogénesis y a la mineralización.

El objetivo de esta investigación fue identificar los mecanismos de crecimiento y regeneración, propios del esqueleto de origen neural para dilucidar los mecanismos genéticos, que regulan la morfogénesis tardía. La hipótesis de investigación es que las células del esqueleto craneofacial mantienen ciertos patrones iniciales hasta la morfogénesis tardía, propios de cada región, basados en la expresión de los genes *msx* y *dlx*. Las investigaciones apuntan a la definición y jerarquización de estas cascadas de control de eventos genéticos que llevan a la expresión selectiva de proteínas de la matriz mineral. Con este mismo objetivo, se han emprendido dos ejes de investigación: El primero consiste en la caracterización de los perfiles de expresión de los homólogos de las familias *msx* y *dlx* durante el desarrollo dental, en el modelo del incisivo en crecimiento continuo. El segundo eje de investigación trata sobre el aspecto funcional de los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo dental.

La presente investigación; centrada en el homólogo *msx2*, consistió en cartografiar los transcritos del homólogo *msx2* por hibridación *in situ* en el incisivo en crecimiento continuo del ratón control en las fases de morfogénesis tardía (1, 3 y 6 meses de edad).

En la segunda parte, se realizó el análisis de la expresión de un calciproteína de tejidos mineralizados, la calbindina-D28k, en el modelo *in vivo* de ratón invalidado para este mismo homólogo *msx2*.

**Formación de tejidos dentarios.** Las fases iniciales del desarrollo de los gérmenes dentales corresponden a una cascada de eventos morfogenéticos asociados a la expresión génica sucesiva y específica (1,2,3); esta cascada es controlada por una serie de interacciones epitelio-mesenquimatosas donde intervienen principalmente factores de transcripción como las homoproteínas de las familias *Msx* y *Dlx*, factores de crecimiento como BMP (3), proteínas de la matriz dentaria (4) y moléculas implicadas en el metabolismo del calcio (calbindina-D28k).

Cuando el germen dental se forma, la diferenciación terminal de las células odontogénicas conduce a la formación de los diferentes tejidos mineralizados, es decir el esmalte, la dentina y el cemento.

**Morfogénesis Dentaria: Amelogénesis:** La amelogénesis consiste en una serie de eventos que conducen a la formación de la matriz del esmalte, morfológicamente comprende las fases consecutivas de proliferación, pre-secreción, secreción, transición, madurez, pigmentación y fusión con el epitelio oral, estas fases se evidencian en el modelo del incisivo en crecimiento continuo (5).

Además, de los diferentes rasgos morfológicos que caracterizan cada fase, la cual cumple funciones celulares específicas (6), en la fase de pre-secreción, las células del epitelio proliferan y se diferencian para producir cuatro capas celulares, el epitelio Adamantino Externo (EAE), el Retículo Estrellado (REF), el Estrato Intermedio (SI) y el epitelio Adamantino Interno (EAI). A nivel del EAI, las células se alargan y se polarizan progresivamente, pasando de la fase de pre-ameloblastos a la fase de ameloblastos pre-secretores. En la fase de secreción, la síntesis de las proteínas de la matriz por los ameloblastos es máxima (enamelinas, (7); amelogeninas, amelina:(6,8); en la fase de madurez los ameloblastos sufren una transformación cíclica, pasando de una forma aplanada en el

borde a una forma plegada en el polo distal. Las células en la forma plegada son las más activas. Es a este nivel que tiene lugar el transporte activo del calcio y fosfatos que van a producir la formación de un esmalte mineralizado en un 96%; los ameloblastos de madurez en la forma plegada se caracterizan por una expresión importante de las proteínas implicadas en la biomineralización. La calbindina-D28k y la fosfatasa alcalina se expresan fuertemente en los ameloblastos plegados (9,10).

Durante la fase de pigmentación en reposo, los ameloblastos tienen un aspecto de células cúbicas. Y luego en la erupción dentaria estas células se fusionan con el epitelio oral.

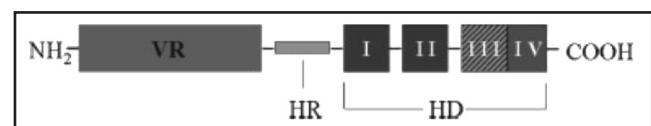
**La Dentinogénesis:** La dentinogénesis comprende las fases de proliferación, pre-secreción y secreción, seguida por una fase de reposo de los odontoblastos (11). En la fase de pre-secreción, después de la inducción de los pre-ameloblastos, los pre-odontoblastos proliferan. Las células de la unión epitelio-mesénquima se diferencian en odontoblastos post-mitóticos. En esta fase, los odontoblastos dirigen y controlan la diferenciación terminal de los ameloblastos. En la fase de secreción, los odontoblastos se polarizan progresivamente, se alargan, permitiendo una extensión celular de la matriz dentaria. Estas células producen proteínas que intervienen en la biomineralización, tales como la fosfatasa alcalina, la calbindina-D28k (10,12,13).

Durante la dentinogénesis, a diferencia de la amelogénesis, la secreción de la matriz y su mineralización están parcialmente desacopladas en el espacio (14,15). La aposición dentaria forma un tejido no mineralizado llamado pre-dentina que secundariamente después de la madurez sufrirá un fenómeno de mineralización con la formación de una capa mineralizada.

Se pueden distinguir dos tipos de dentina: la dentina periférica, conocida como la capa de Hopewell-Smith a nivel coronario y la capa granular de Tomes a nivel radicular; la dentina circunpulpal llamada dentina primaria, durante su formación desde la etapa inicial, hasta la completa formación del diente como tal, cuando se denominara dentina secundaria.

**Los genes del desarrollo cráneo-facial:** En el humano, 15 a 20 días después de la fecundación, la forma de la cabeza y la cara ya están definidas. Las grandes familias de genes del desarrollo codifican en su mayoría por factores de transcripción. Los homógenos se detectaron por la primera vez en la mosca *Drosophila melanogaster* y posteriormente en el resto de los reinos vegetal y animal, los mamíferos y el hombre. En la *Drosophila*, ellos son responsables de transformaciones homéoticas de un segmento del cuerpo en otro. Estos genes forman también el complejo *hom-c*, localizado en dos regiones de un mismo cromosoma, permiten definir una identidad de posición a cada segmento. Estos homógenos se han detectado en los vertebrados donde forman el complejo *hox* (16); se organizan en el ratón y el humano en cuatro complejos: *hoxA*, *hoxB*, *hoxC* y *hoxD* localizados en cuatro cromosomas diferentes (2, 7, 12, 17) formando los ortólogos de los genes de la *Drosophila*. Los genes del complejo *hox* siguen las reglas de la linealidad espacial, temporal y funcional, definiendo así para cada segmento una combinación específica de genes llamados código *hox* o homeocódigo (17). Los genes homobox codifican para factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos. Tienen una función importante a lo largo de la embriogénesis así como en la morfogénesis y en la diferenciación celular, tienen una secuencia de 180 pares de bases, que codifican para una secuencia polipeptídica específica de alrededor de 60 aminoácidos, llamada homodominio, esta secuencia se mantiene entre las diferentes homoproteínas en la evolución de las diferentes especies (18) ( Fig. 1).

Fig. 1. Esquema de la Proteína Homobox



-NH<sub>2</sub> amino, -COOH carboxilo, VR: región variable que determina la especificidad, HR: región que conecta el homodominio y la región variable; HD: Homodominio

Fuente: Cohen MM (18)

La homoproteína se fija directamente a los elementos de respuesta presentes a nivel de los promotores de los genes específicos ricos en bases A y T bajo la forma monomérica por la inclinación

de la tercera hélice que se inserta en el gran surco de ADN, pero la activación o la inhibición de la transcripción está definida por el resto de la proteína que interactúa con otros factores de transcripción (19,20).

**Homógenos divergentes:** Son los genes descritos particularmente en las regiones anterior a nivel del primer arco branquial y representan una familia de genes homobox denominados genes no- *hox* o homógenos divergentes. Estos genes comprenden numerosas familias como *otx*, *paix*, *emx*, *gsc*, *msx*, y *dlx*. Entre los vertebrados, los genes *msx* (homobox segment muscle) son los equivalentes del gen *msh* de la *Drosophila* expresados en las células de la cresta neural durante las interacciones epitelio-mesenquimatosas que determinan el desarrollo craneo-facial y de los miembros. Han sido muy estudiados por su rol en el desarrollo de los tejidos dentales y óseos a nivel del ectomesénquima del primer arco branquial (21,22).

**La familia de genes *msx*:** Ha sido aislada en todos los representantes de todas las clases de los vertebrados. Existen dos genes homólogos en el humano, *msx1* y *msx2s*. Un tercer gen *msx3* se ha aislado en el ratón. Esta familia de genes *msx* se ha aislado por homología con la *Drosophila msh*. *msx1* y *msx2s* se localizan en humanos en el cromosoma 4(p16, 1) y el cromosoma 5(q34-q35). En el ratón *msx1*, *msx2*, *msx3* se encuentran en el cromosoma 5, 13, y 7 (23). El gen *msx2* es idéntico a *msx1*: compuesto por dos exones separados por un intrón con la secuencia codante para el homodominio, situada en la primera parte del segundo exón. La proteína Msx2 consiste en 268 aminoácidos (24).

**Homógenos *msx* y desarrollo dentario:** El homógeno de *msx* se ha relacionado con las interacciones epitelio-mesenquimatosas, se expresa en las células de las crestas neurales durante su migración cuando se transforman en células dentales (25). Desde la etapa de morfogénesis temprana, que va a determinar qué tipo de diente va a desarrollarse, hasta las fases de morfogénesis tardía donde cuenta la presencia de varios factores difusibles tales como BMP, FGF, Shh, Wn. (26) y la expresión de los homógenos divergentes (*msx*, *barx*, *dlx*) es específica en cada fase del desarrollo

dental y en las diferentes poblaciones celulares (27-29).

**El gen de *msx2* y el desarrollo craneofacial:** Muchos trabajos han mostrado el papel esencial de los homógenos divergentes de la familia *msx* en el desarrollo craneo facial. La implicación del gen de *msx2* parece importante y se ha demostrado por la descripción de su perfil de expresión, el análisis de fenotipos asociados a las mutaciones del gen, en el hombre y animales, y por el uso de modelos animales de sobre-expresión o anulación de *msx2*. En la región craneofacial del embrión, este gen se expresa principalmente durante el desarrollo dental y a nivel de las suturas del craneo (30). Esta expresión, observada precozmente en el mesénquima derivado de las crestas neurales en los sitios de los gérmenes dentales, continúa en el epitelio y el mesénquima durante todo el desarrollo dental (30, 31). Las mutaciones humanas de este gen se relacionan con defectos en el cierre de las suturas craneales, o PFM, por la pérdida de función del gen (32), y la craneo-sinostosis de Boston por la mutación ganancia de una función, (33). Los modelos animales de estos defectos genéticos presentan el mismo fenotipo asociado a las anomalías dentales, hipoplasias mandibulares y hendiduras palatinas secundarias (34,35). A nivel funcional, *msx2* actúa como un represor transcripcional relacionado, entre otros, con la regulación de los genes de la osteocalcina y la amelogenina (36,37). Actor importante en la vía Ras, el Msx2 también está envuelto en el proceso de apoptosis durante el desarrollo, donde parece establecer un equilibrio entre la supervivencia y la apoptosis de las células derivadas de las crestas neurales. Este equilibrio es indispensable para una morfogénesis normal (34). Sin embargo, gran parte de los mecanismos de regulación de este gen permanece sin clarificar.

**Morfogénesis dental y la diferenciación celular:** Durante las diferentes fases de la morfogénesis dental, las proteínas difusibles como BMP4 pertenecientes a la superfamilia del TGF $\beta$  juegan un papel muy importante en la señalización epitelio-mesenquimatoso dental (3, 4, 38). Ellos serían responsables para el paso desde el epitelio en la fase de iniciación, hacia el ectomesénquima a la fase del brote. Estas mismas proteínas difusibles

están implícitas en la inducción de la expresión de *msx1* y *msx2* en el mesénquima.

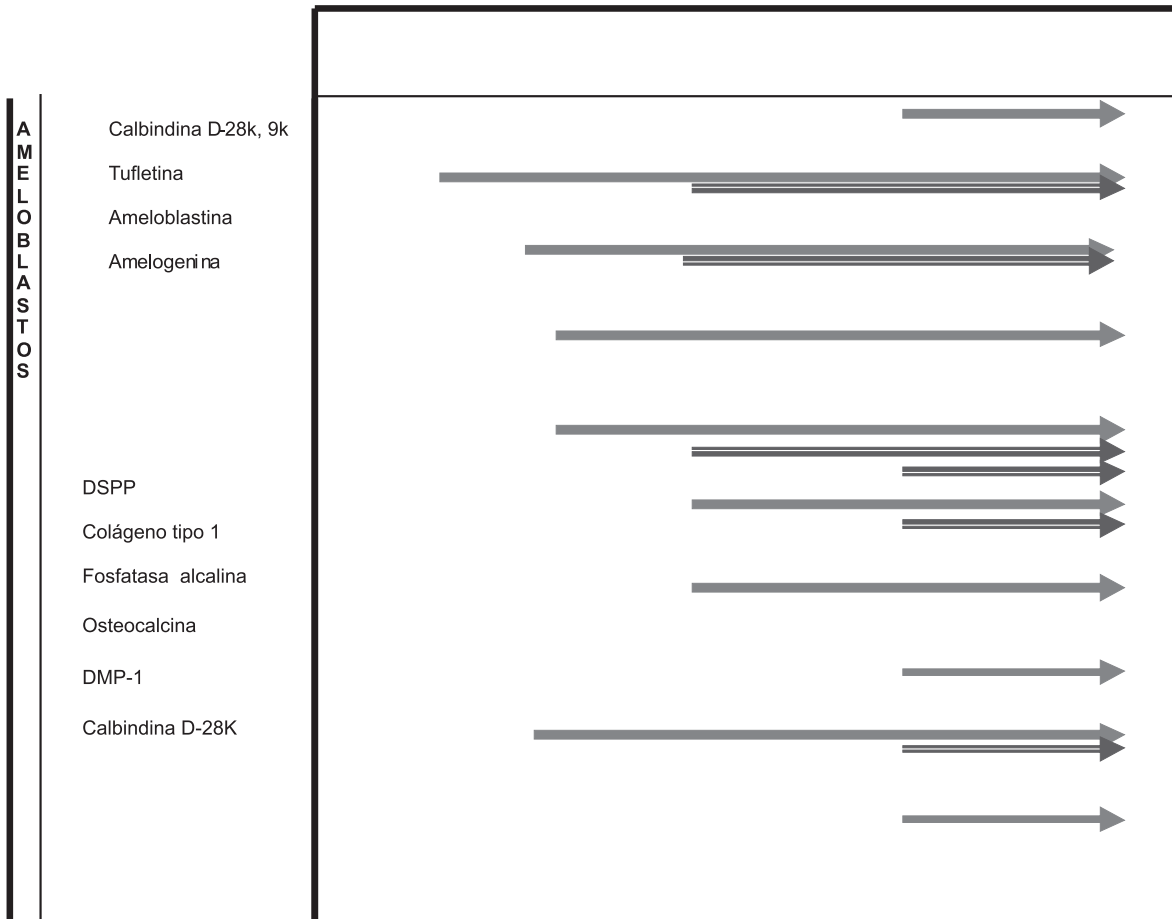
Los transcritos de *msx2* se han descrito primero a nivel del mesénquima en el arco mandibular, ellos aparecen a nivel epitelial en el estado de brote; en la fase de campanilla, *Msx2* está presente al nivel del epitelio interno y externo del esmalte, del estrato intermedio, del nudo del esmalte y de las células odontoblásticas y supra-odontoblásticas (29, 30, 39). El nudo del esmalte es considerado como un centro organizador de la diferenciación celular donde se observa una reducción de la proliferación celular y un aumento de la apoptosis. En este nudo, se expresan *msx2*, *p21*, *fgf-4*, *fgf-9* y *shh*. Los ratones mutantes en los que el gen *msx2* se ha suprimido (-/-), presentan un defecto en la morfogénesis coronaria (35) con la consecuencia de la dificultad para masticar, los incisivos son frágiles y no alineados. En esta mutación el germen molar se desarrolla normalmente desde el

estado de germen hasta el estado de campanilla. El primer defecto se detecta a E16.5 y consiste en una disminución del volumen del órgano del esmalte. (29) (Fig. 2).

Durante su diferenciación terminal los ameloblastos se polarizan, observándose la expresión de amelogenina, así como de otras proteínas no amelogénicas y calciproteínas intracelulares (6,13). Los odontoblastos diferenciados expresan también proteínas colagénicas de tipo I, tipo-I trímero, tipo V y las no colagénicas (proteoglicanos).

El estudio de los promotores de los genes que codifican por las proteínas de la matriz dentaria ha mostrado numerosos sitios de fijación para estas proteínas, lo que sugiere que su expresión es controlada durante la diferenciación, a lo largo del desarrollo dentario. *msx1* y *msx2* se expresan en las células óseas del cráneo intrauterino *in vivo*

Fig. 2. Expresión de los marcadores fenotípicos de los diferentes tejidos dentarios a lo largo de la morfogénesis dentaria

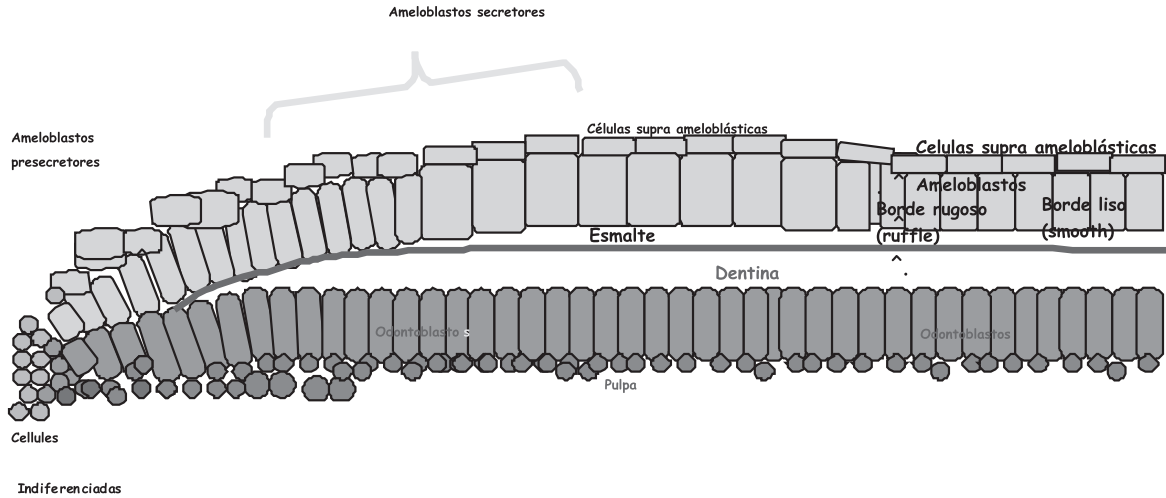


*Msx2* se encuentran en los osteoblastos adultos bajo la dependencia de la hormona  $1-\alpha 25$  (OH)<sub>2</sub> Vitamina D<sub>3</sub> (40).

**Modelo del Incisivo:** Este estudio utilizó el modelo del incisivo de ratón en crecimiento continuo, el cual permite seguir las diferentes fases del desarrollo dental.(Fig. 3).

**Genotipo de los ratones de *msx2*.** Los ratones invalidados para el gen *msx2* muestra el siguiente fenotipo: pérdida de pelos en forma cíclica del lomo hacia el vientre, seguida por una fase de recrecimiento, el número de los folículos pilosos en los ratones mutantes es de 1/3 de la totalidad del que cuentan los ratones salvajes. Asimismo, presentan una involución en la formación de las

Fig. 3. Representación esquemática del incisivo en crecimiento continuo



**Ratón con una invalidación del homogen *msx2*.** Los ratones de *msx2/nlacZ* provienen del laboratorio de Genética Molecular y Morfogénesis del Instituto de Pasteur de París. Esta recombinación se logra por la formación de un locus *msx2/nlacZ* que sintetiza la  $\beta$  galactosidasa en lugar de *Msx2* sin que ningún fragmento de la proteína de *Msx2* se conserve.

Los heterocigotos de los ratones permiten seguir la expresión de *msx2* gracias al gen expresado *nlacZ*; asimismo, los animales homocigotos son invalidados por una mutación en *msx2* (Fig. 4).

glándulas mamarias y además otros apéndices ectodérmicos están alterados: las uñas y las orejas son de gran tamaño. A los 30 días, el ratón adulto muestra deficiencia en la osificación del hueso frontal. La dentición está alterada: los dientes presentan hipoplasia del esmalte, no se encuentran alineados, con la consecuencia de dificultad para masticar, por lo tanto, estos animales requieren una dieta blanda (Fig. 5A y 5B).

Fig. 4. Construcción del modelo de ratón de *Msx2/nLacZ*: Mutación controlada del gen *msx2* por la inserción del gen *nlacZ* bacteriano

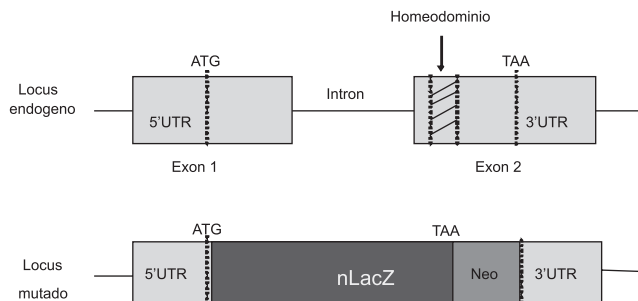
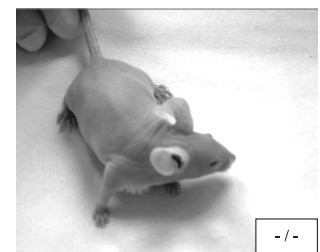


Fig. 5. Fenotipos del animal *Msx2* +/+, -/-

Fig. 5A

Fig. 5B



## Materiales y Métodos

**Genotipaje de los animales:** El genotipaje se realizó por PCR después de la extracción de ADN. El extracto genómico de ADN se logra a partir de 0.6 centímetros de la cola del ratón, a la cual se le colocó una solución tampón de Genomic lysis de ADN (Aqua-Pure Genomic ADN, Bio-RAD) con proteinasa K durante toda la noche a 55°C. La solución obtenida se trató con ARNasa a 37°C durante 60 minutos y se añadió una solución precipitante de proteínas. La precipitación del ADN se hizo con isopropanol 100% por centrifugación. Seguidamente el ADN obtenido se lavó con etanol 70%, se secó sobre papel absorbente, luego se agregó una solución de hidratación de ADN durante 5 minutos a 65°C. Se midió la densidad óptica a 260 nm de la solución ADN y se determinó la concentración en ADN antes de realizar la PCR.

Para distinguir los diferentes animales heterocigotos, homocigotos y salvaje, se realizó la PCR con 100 ng de ADN genómico. Tres *primers*, se usaron para poner en la evidencia el *locus* endógeno (5'*msx2* y 3'*msx2*) y por otro lado el *locus* mutante (5'*msx2* y 3'*lacZ*).

Las secuencias empleadas de los *primers* fueron:

5'*msx2*: GTCTTCGCTTGAGAGTTGCCA

3'*msx2*: GTCGGACATGAGCGCCTC

3'*lacZ*: GGCAAAGCGCCATTCGCCATTCAGGC

Las condiciones de amplificación fueron: 95°C (10 segundos), 65°C (30 segundos) y 72°C (1 minuto) durante 35 ciclos. Después de la amplificación por PCR, se realizó la migración del contenido de los tubos sobre un gel de agarosa a 2%.

**Recolección y preparación de tejidos:** La preparación de tejidos para ser utilizados en la hibridación y el inmunomarcaje se realizó según la técnica descrita por (10): Los ratones se anestesiaron, los tejidos fueron fijados por perfusión intracardiaca con PFA 4%, 15% de sacarosa en tampón PBS (Solución Tampón Fosfato) 1X a pH 7,4. Se realizó la disección de los tejidos de la mandíbula, fijándose en la misma

solución durante 16 horas a 4°C. Las mandíbulas se separaron con el fin de contar con mandíbulas decalcificadas y mandíbulas sin decalcificar. Los tejidos que se decalcificaron se lavaron durante 4 horas en PBS a 4°C y luego se decalcificó en una solución de EDTA (Sigma) 4,13% y de PFA 2% pH 7, posteriormente, se efectuó la deshidratación e inclusión en parafina y se conservaron a 4°C hasta su uso.

**Cortes de tejidos en criostato:** Se cortaron los tejidos en el criostato (Leica-París, Francia) a -20°C en un plano frontal o sagital y con un espesor comprendido entre 8-10µ espesor. Los cortes se recuperaron en láminas pre-tratadas con poly-L-lysine a 50mg/ml (Sigma), una vez secas, éstas se guardaron a -80°C hasta la hibridación *en situ* o el inmunomarcaje.

**Cortes de tejidos en microtomo:** Los bloques de los incisivos incluidos en parafina se cortaron con un microtomo (Leica, París, Francia) en un plano frontal y se recuperaron en láminas tratadas al hidroxil-amino silano. Las láminas se secaron a 42°C durante una noche y se guardaron a -80°C, hasta ser utilizadas.

**Immunohistoquímica de la Calbindina-D28K y la Beta-Galactosidasa:** Es un método que permite descubrir los antígenos celulares o titulares, por una reacción del antígeno-anticuerpo, visualizada con la ayuda de marcadores enzimáticos. Los cortes son desparafinados en dos baños de tolueno (5 minutos), re-hidratados en baños de etanol decrecientes (100%, 95%, 70%, 5 minutos cada uno), se enjuaga en agua y en PBS (Solución Buffer Fosfato) 1X pH 7,4. Las peroxidasas endógenas se desactivaron por un tratamiento de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos. Después de enjuagar con PBS 1X, las inmunoglobulinas tisulares se saturaron con el suero de la oveja normal diluido 10% con albúmina 1% en tampón PBS 1X durante 16 horas a 4°C. El anticuerpo policlonal primario anti-conejo Calbindina-D28k o el anticuerpo antibetagalactosidasa, se diluyó en una proporción de 1/1000-1/4000 y se incubó durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de enjuagar en el PBS 1X, el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la peroxidasa diluido a 1/200 se incubó durante 30 minutos a temperatura

ambiente. Después de enjuagar, la revelación de la reacción enzima-substrato se hizo con el Kit-Vector Novared (Abscyss, París). Los cortes se deshidrataron y se montaron con laminilla cubreobjeto (con DePeX, laboratorio BDH, Poole, Inglaterra).

**Hibridación *in situ*.** Esta técnica de biología molecular estudia la expresión de los genes, poniendo en evidencia las secuencias de ácidos nucleicos en las células de los cortes de tejidos. La técnica de hibridación se realizó según Hotton (10)

**Hibridación *in situ* con sondas frías en cortes de parafina:** Las soluciones pre-hibridación se prepararon con agua DEPC (el diethyl-piro carbonate; Sigma St.Louis, EE.UU.) y se esterilizaron. Las sondas *msx2*-antisentido se prepararon con un plasmido de transcripción de Bluescript, en el cual se insertó un ADNc del gen de *msx2* de una longitud de 2kb. Se utilizaron las enzimas de restricción *XhoI* y *PstI*s (Promega, Francia) para linearizar el plasmido y la ARN polimerasa de T7 y *Sp6* para transcribir las sondas. La UTP unida a la digoxigenina (Rock, Francia) se usó como marcador de las sondas.

**Hibridación de los cortes:** Antes de la hibridación, los cortes se re-hidrataron en PBS 1X. 40µl de tampón de hibridación (3-6 ng de sonda/µl de tampón de hibridación) se depositó en cada corte, la hibridación se realizó por una noche a 58°C en una atmósfera húmeda. Después de enjuagar en las soluciones de SSC2X, SSC1X, MABT, NTE-ARNsa, los tejidos se incubaron en solución bloqueadora durante 3 horas a temperatura ambiente, luego se incubaron con el anticuerpo anti-Digoxigenina 1/200 durante una noche a la temperatura ambiente, luego se lavaron en MABT, NTMT y se revelaron en NBT/BCIP en una atmósfera húmeda y al abrigo de la luz. Después de una deshidratación a concentraciones creciente de alcohol (75, 80, 100%) se sumergió en tolueno, los cortes fijados con Depex®, se cubren con un cubreobjeto se observaron y fotografiaron al microscopio fónico de DMRB (Leica, Francia).

**Extracción de ARN Total:** Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó la disección de los tejidos epiteliales (órgano

del esmalte y ameloblastos), mesenquimatosos (odontoblastos y pulpa) y óseo basal de las mandíbulas, las muestras se conservaron en el nitrógeno líquido. Cada tejido fue triturado y homogeneizado en la solución de extracción del TRI-REAGENT®, el ARN se separó por centrifugación con cloroformo, seguido de una precipitación en isopropanol, después de un lavado con etanol 75%, el ADN se resuspendió en agua estéril. La dosificación de ARN se realizó por el espectrofotómetro (Pharmacia Biotech) y la concentración se expresa en µg de ARN por µl de solución. Para validar las disecciones realizadas, se verificó la calidad del ARN extraído de los tejidos epiteliales y mesenquimatosos realizando su migración en un gel de agarosa (28S, 18S y 5S).

**RT-PCR.** Después de la extracción del ARN se realizó una transcripción reversa con una enzima termoestable. La retrotranscripción y la amplificación se realizó incubando en el tampón, la transcriptasa inversa en presencia de iones Mn<sup>++</sup>.

A partir de 1µg de ARN, con 1 µl de dT-oligo, se realizó la linearización a 2min y 65°C, luego se incubó durante 1 hora a 42°C con la mezcla dNTP (GTP, ATP, CTP, TTP), la reacción se detuvo calentando a 70°C por 15min. Se conservó el ADN obtenido a -20°C. Esta reacción tuvo lugar en un termociclador (Roche), dispositivo que controla y cambia la temperatura según el ciclo de programación. Un ciclo del PCR comprende: desnaturalización a 93°C que separa la cadena doble hélice de ADN; luego la hibridación a 60°C hecho de los *primers*, cada uno complementario de las dos cadenas separadas, extensión por aumento de la temperatura a 72°C durante este periodo la *taq*-polimerasa replica la cadena complementaria. Se obtienen dos cadenas idénticas al original llamadas amplicon. Este ciclo de tres fases se repite 50 veces hasta obtener una cantidad suficiente de material genético que permite la caracterización del gen de interés (calbindina-D 28K). Se realizaron dos ensayos de RT-PCR por duplicado a partir de un triplicado de tejido.

Las secuencias de los *primers* específicos para cada uno de los transcritos fueron los siguientes. (Tabla 1).



Tabla 1. Secuencias de los partidores específicos utilizados en la RT-PCR

Gen	Talla del fragmento amplificado	Primers 1	Primes 2
Calbindina-D <sub>28k</sub>	414 pb	5'ACggAAgTggTTACCTggAA3'	5'CACACATTTTgATTCCCTgg3'
S15	343 pb	5'CTTCCgCAAgTTCACCTACC3'	5'ggCTTgTAggTgATggAgAA3'

## Resultados

### Expresión de transcritos del homogen *msx2* en el incisivo en crecimiento continuo de ratón

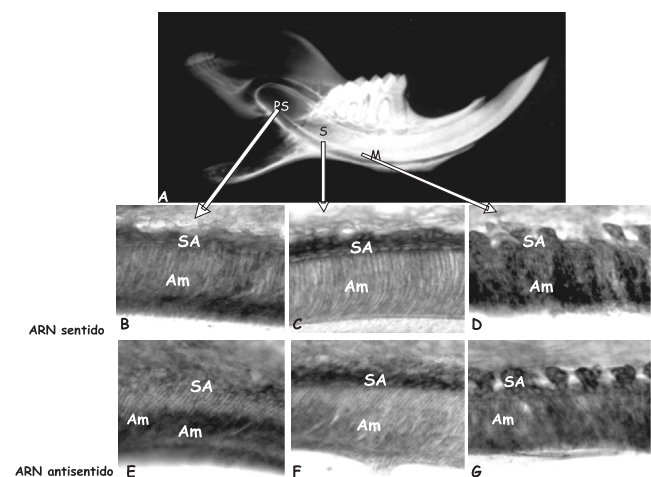
El esquema de expresión del homogen *msx2* fue analizado por hibridación *in situ* utilizando el incisivo en crecimiento continuo de ratón de 56 días de nacido. A esta edad los transcritos de *msx2*-S se localizaron a nivel de los pre-odontoblastos y pre-ameloblastos. Posteriormente se localizaron a nivel de los ameloblastos en pre-secreción, y luego aparecieron en las células supra-ameloblásticas (SA), reforzándose en la zona de secreción. Los ameloblastos de la zona de maduración muestran una expresión que disminuye en intensidad con una diferencia notable entre los ameloblastos y las células supra-ameloblásticas. Se observó un transcrito anti-sentido en todos los estados del desarrollo de la amelogenesis de los "controles" tratados con la sonda sentido. La intensidad de la señal es menor que para el ARN-sentido pero la repartición a lo largo de la diferenciación de los ameloblastos y de las células supra-ameloblásticas es parecida (Fig. 6).

### Esquema de expresión de los transcritos sentido y contrasentido del homogen *msx2*, y de la homeoproteína *Msx2* en el primer molar de la mandíbula de ratón de 7 días de nacido.

Los resultados mostraron la señal del ARN-sentido de *msx2* en la vaina epitelial de Hertwig y en los pre-ameloblastos y pre-odontoblastos del molar, en los estados de pre-secreción/secreción

del esmalte, los ameloblastos y las células supra-ameloblásticas mostraron una señal. Los ameloblastos y las células supra-ameloblásticas tienen una marca de intensidad constante. Mientras que los pre-odontoblastos y los odontoblastos en proliferación tienen la misma intensidad de la señal, los odontoblastos en reposo muestran una disminución de señal. De la misma manera que en el incisivo, se observó una señal con la sonda sentido, que nos indica la existencia de un ARN antisentido endógeno. El ARN-antisentido se encuentra en las mismas células que el ARN-sentido a excepción de la vaina epitelial de Hertwig, con una intensidad de señal menor que la del ARN –sentido.

Fig. 6. Expresión de los transcritos del homogen *msx2* en el incisivo mandibular en crecimiento continuo del ratón de 56 días

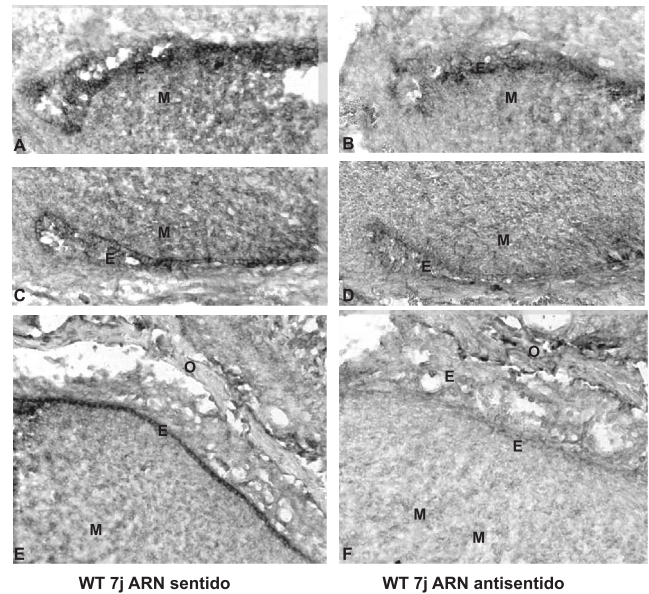


A: modelo de incisivo en crecimiento continuo. B, E: zona de presecrecion (PS); C, F: zona de secreción (S); D, G: zona de madurez; SA: células supra-ameloblásticas, Am: ameloblastos

La inmunolocalización con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la  $\beta$ -galactosidasa del gene *nlacZ* muestra que la homoproteína *Msx2* que se encuentra en las mismas células que el ARN-sentido en cortes realizados sobre la mandíbula de ratón transgénico heterocigotos *msx2 nlacZ*. (Fig.7).

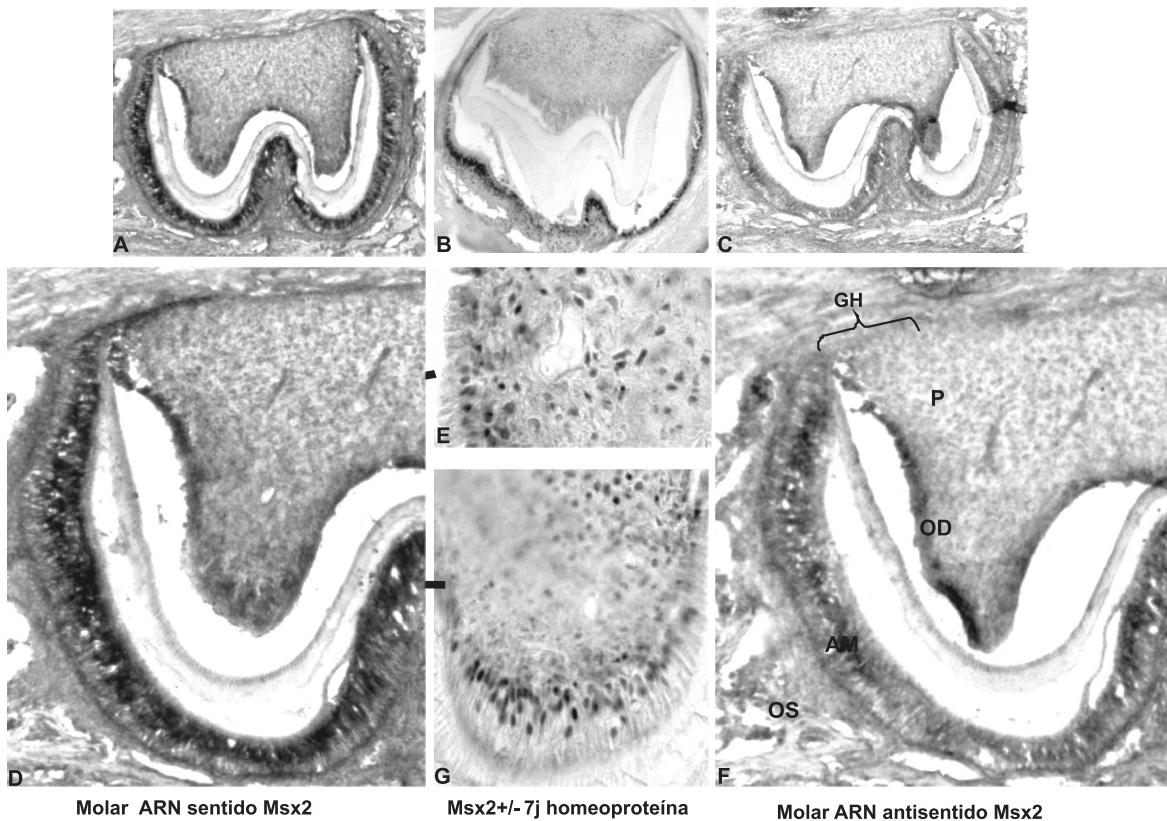
**Expresión de transcritos del homogen *msx2* en el estado precoz del desarrollo dentario de la mandíbula de ratón:** El esquema de expresión del homogen *msx2* se analizó por hibridación *in situ* utilizando sondas frías marcadas con digoxigenina. Las células del agujero apical (epitelial: pre-ameloblastos, mesenquimatoso: pre-odontoblastos) mostraron la presencia de *msx2* -sentido del lado coronario y del lado radicular, del incisivo de mandíbula del ratón homocigoto de 7 días de nacido. La sonda sentido no mostró coloración en estos estados (Fig. 8).

Fig. 8. Expresión de los transcritos de *msx2* en la región apical de la mandíbula del ratón de 7 días



A, C, E: región coronaria; B, D, F: región radicular; células epiteliales (E); células del mesénquima (M); tejido óseo (O)

Fig. 7. Expresión de los transcritos de *msx2* en el molar mandibular del ratón de 7 días



Hibridación *in situ* (A, C, D, F). Expresión de la homeoproteína *Msx2* en el ratón heterocigoto *Msx2 +/-*. Inmunohistoquímica (B, E, G)

**Expresión de los transcritos de *msx2* en las células óseas de la mandíbula de ratón de 7 días:** El esquema de expresión de transcritos del homogen *msx2* se analizó por hibridación *in situ* utilizando sondas frías marcadas con digoxigenina. El ARN sentido del homogen *msx2* se encontro en el citoplasma de las células osteoprogenitoras, de los osteoblastos y los osteocitos. La presencia de un ARN antisentido reveló en las mismas células pero con una intensidad menor (Fig. 9).

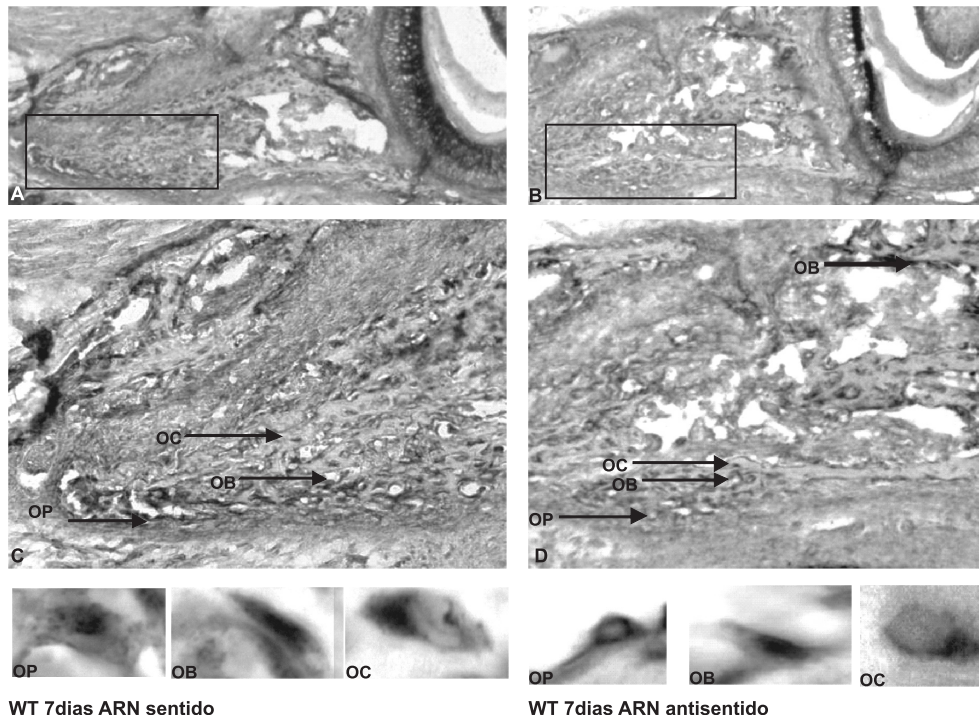
**Expresión de los transcritos de *msx2* y de la homeoproteína *Msx2* en el folículo piloso de ratón de 7 días de nacido:** El esquema de expresión del homogen *msx2* se analizó por hibridación *in situ* utilizando sondas frías marcadas con UTP unido a Digoxigenina.

La inmunolocalización de la homoproteína *Msx2* se realizo con un anticuerpo dirigido contra la  $\beta$ -galactosidasa. Los cortes sagitales mostraron una coloración intensa a nivel de la raíz y del cortex (1,2, A) lo que indica la presencia del ARN sentido de *msx2*. Con una expresión que disminuye de la raíz hacia el tallo del folículo piloso(A). En el corte transversal la raíz, y el cortex del folículo

se mostro la misma señal (1,2, B). En los cortes sagitales tratados con la sonda sentido (ARN antisentido), se observo igualmente una señal en la raíz y el corteza del folículo piloso pero siguiendo un gradiente inverso, en comparación con el ARN sentido (D). Los cortes transversales muestran así mismo una señalización en la raíz y la corteza. (1, 2, E). La hemoproteína *Msx2* se encuentra en la raíz y la corteza del folículo piloso (C) (Fig. 10).

**Análisis morfológico comparativo del ratón *Msx2* (+/+) y mutantes *Msx2* (-/-):** Un análisis comparativo de la morfología y la histología del incisivo mandibular de los ratones *Msx2*+/+ y *Msx2* -/- de 3 meses mostraron que la morfología, organización así como la cantidad de ameloblastos se encontro afectada, como una fuerte alteración en la amelogenesis del grupo mutante, lo que conduce a una amelogenesis imperfecta. En el ratón heterocigoto *Msx2*-/-, se observo una desorganización de las células epiteliales con ausencia en la polarización de los ameloblastos (AM, B, C, D).La dentina al parecer se mostro menos afectada (Fig.11).

Fig. 9. Expresión de los transcritos de *msx2* en el tejido óseo de la mandíbula de ratón de 7 días



Corte sagital (A, B, C, D); células osteoprogenitoras (OP, C) expresan el ARN sentido de *Msx2*. Osteoblastos (OB, C) y los osteocitos (OC, C) expresan el ARN sentido en el citoplasma. (OP, D) osteocitos (OC, D), los osteoblastos (OB, D) expresan el ARN antisentido de *Msx2*

Fig. 10. Expresión de los transcritos de *msx2* en el folículo piloso del ratón de 7 días

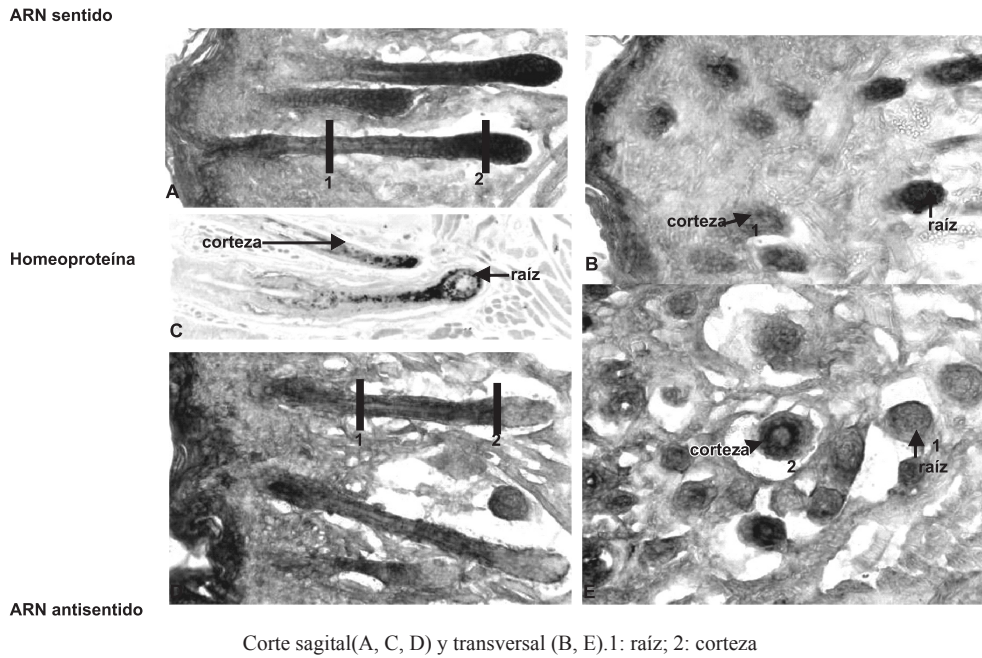
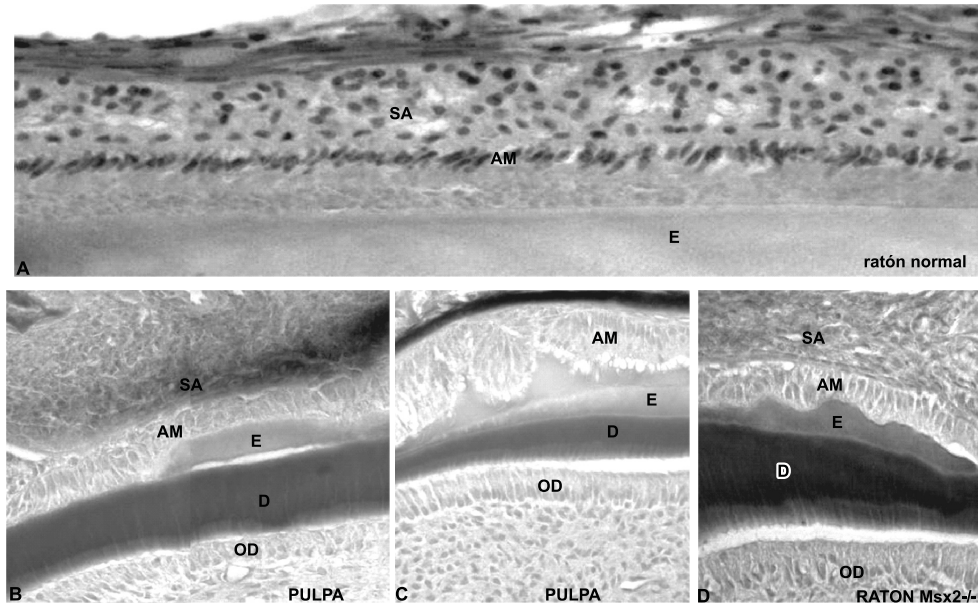


Fig. 11. Histología de los diferentes fenotipos *Msx2*: A: *Msx2*<sup>+/+</sup>; B, C, D: *Msx2*<sup>-/-</sup>



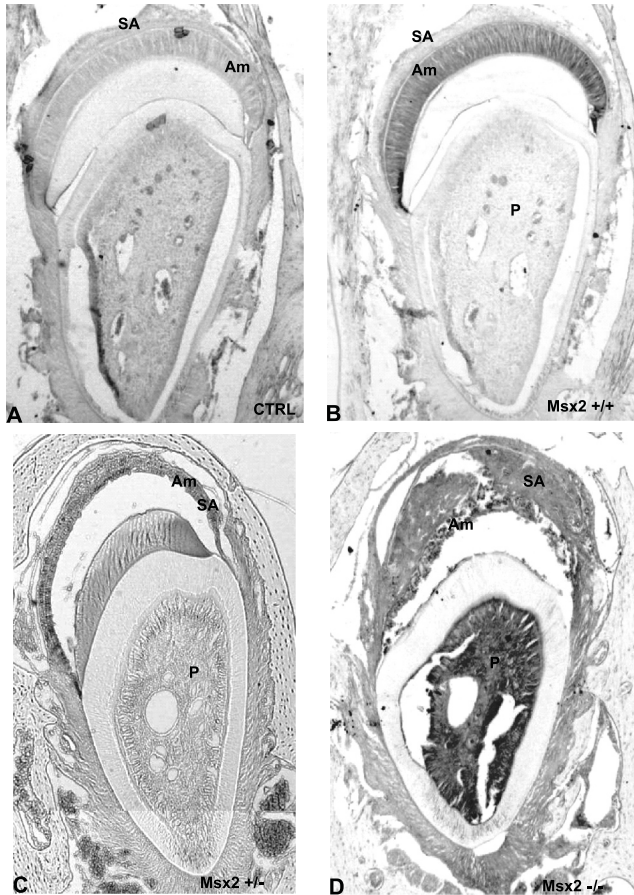
AM= ameloblastos; E=esmalte; SA=células supra-ameloblásticas; OD=odontoblastos; D=dentina

**Análisis de las alteraciones en la expresión de la calbindina-D28k relacionada a la invalidación del gen *msx2*:** Se realizó la localización de la proteína calbindina-D28k por inmunocitoquímica, utilizando cortes frontales del incisivo de ratón de 3 meses, homocigotos<sup>+/+</sup>, heterocigotos <sup>+/-</sup> y homocigotos <sup>-/-</sup>. Se observó una expresión diferente según el fenotipo de ratón

estudiado: El corte de tejido control, donde se omitió el anticuerpo primario no mostró expresión (A). El corte de *Msx2* <sup>+/+</sup> presentó expresión solamente en los ameloblastos (AM, B). El corte *Msx2* <sup>+/-</sup> presentó una señal en los ameloblastos y también en las células supra ameloblásticas (Am, SA, C). El tejido de *Msx2* <sup>-/-</sup> presenta una señal en las células epiteliales y mesenquimatosas

(odontoblastos y células pulpares) del incisivo (D) (Fig.12).

Fig. 12. Expresión de la proteína calbindina-D28k relacionadas a la invalidación del gen *msx2*



A: corte de tejido control; B: corte de incisivo de ratón *Msx2* +/+; C: corte incisivo de ratón *Msx2* +/-; D: corte de incisivo de ratón *Msx2* -/- ; Am: ameloblastos; SA: células supra-ameloblásticas, P: pulpa

**Análisis comparativo de la tasa de expresión del gen de la calbindina-D28k entre los ratones *Msx2* +/+, +/- y -/- por RT-PCR:** La calbindina-D28k se expresó intensamente en el epitelio (E), en relación el mesénquima (M) y el hueso (O). La cantidad de calbindina-D28k en el epitelio de ratón *Msx2* +/+ fue significativamente superior ( $p=0.05$ ) en relación a la cantidad encontrada en el ratón +/- y -/-.

La cantidad de transcritos de la calbindina-D28k en el epitelio micro diseccionado de la hemimandíbula de ratón homocigotos +/+ de 56 días de nacido es el doble de que se halló en los animales heterocigotos +/- y alrededor de 8 veces

menor en el caso de los animales homocigotos mutados *Msx2* -/-.

La cantidad de transcritos de la calbindina-D28k en el mesénquima fue igual en los animales homocigotos +/+, heterocigotos +/- y la mitad en el caso de los mutantes -/- Mientras que la diferencia en la expresión a nivel del hueso en los diferentes fenotipos de ratón no fueron significativas.

## Discusión

**Estudio de la expresión de los transcritos del homogen *msx2* en el ratón de normal (a los siete días y 56 días de nacido) por hibridación *in situ*:** La totalidad de los factores de transcripción codantes por los homogenes *msx* y *dlx* se identificaron en el desarrollo dentario precoz (27, 30, 41). Su implicación en la odontogénesis se ha estudiado utilizando modelos animales mutantes en esos estados iniciales (42), en el curso de la morfogénesis (43) y de la histogénesis (35, 44). Los resultados sobre el gen *dlx2* mostraron que la expresión de los homogenes continúa durante la mineralización (45, 46).

Este trabajo estableció el esquema de los transcritos de *Msx2* en estados avanzados de la biomineralización (7 días y 56 días de nacido). Se demostró que el ARN sentido de *msx2* se encontró a la vez en el compartimiento epitelial y mesenquimatoso de los tejidos dentarios. Su expresión se asoció a la diferenciación funcional de los ameloblastos y de los odontoblastos en los estados post-natales. En estos estados las células dentarias sintetizaron activamente proteínas que participan en la histogénesis, proteínas de la matriz y moléculas implicadas en los movimientos iónicos como la calbindina-D28k.

En este trabajo además se comprobó que los transcritos de *msx2* se expresaron a lo largo de la adquisición del fenotipo de las células osteoblásticas (47). Esto llevó a la interrogante sobre la función de esta homeoproteína en la regulación de la expresión de otros genes en estos estados de diferenciación.

Con referencia a los resultados obtenidos en este estudio podemos deducir que *msx2*, así como

otros factores de transcripción como *dlx2* y *dlx3* (45,46) parecen ser importantes en el control de la expresión fenotípica de las células del esqueleto. En este sentido participaron no solamente los ameloblastos sino también los odontoblastos, como se pudo observar en los resultados mostrados. Los primeros resultados sobre la función de *Msx2* como inhibidor de la transcripción fueron reportados sobre el gen de la osteocalcina. El *Msx2* intervino, junto con otras proteínas como *Dlx3*, *Dlx5*, y *Runx2* en la diferenciación de los ameloblastos

En las células dentarias el papel de *Msx2* como inhibidor de la expresión de la osteocalcina se demostró en los fibroblastos del ligamento alveolo-dentario (48) y en los odontoblastos (45). El gen de la amelogenina también fue reprimido por *Msx2* (37).

Otros genes que también podrían ser inhibidos por el factor de transcripción *Msx2*: las proteínas no colágenas y las calciproteínas expresadas por las células dentarias y óseas en los mismos estados de diferenciación celular.

En este trabajo se estudió la regulación potencial de la calciproteína, vitamina-D dependiente, la calbindina-D28k en el modelo de ratón transgénico *msx2*.

**El ARN antisentido de *msx2*:** Los resultados mostraron la presencia de un ARN reconocido por la sonda sentido de *msx2*, y evocan resultados precedentes de este laboratorio (49): el descubrimiento de un ARN antisentido *msx1*. Lo que sugiere la presencia de un ARN antisentido para *msx2*.

El ARN antisentido del homogen *msx1* evidenciado comprende el exon 2, además de una parte del intron. Posee 1000 bases comunes con el ARN sentido. Y tuvo la capacidad de inhibir la expresión de la homoproteína *Msx1*. Experiencia validada *in vitro* por transfección de los vectores de expresión del ARN sentido y del ARN antisentido.

Surge como hipótesis que el ARN antisentido de *msx2* tendrá también un papel como represor sobre la expresión de la homoproteína *Msx2*.

Los transcriptos antisentido naturales (TAN) se han ligado con la regulación en la expresión de

una cantidad de genes. Estos fenómenos podrían ir hasta las fases de transcripción y traducción de la expresión de la proteína codante para el ARN sentido.

La transcripción bi-direccional no es desconocida; existen trabajos que demostraron la existencia de TAN que controlan la expresión de ciertos genes en los organismos eucariota. Además, los estudios recientes (49) permitieron pensar que este tipo de transcripción bi-direccional se conserva en el genoma en el curso de la evolución (50-53). El 22% del genoma humano esta regulado por transcritos sentido y antisentido (53) y 15%, en el caso del ratón (48).

El conjunto de datos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* validan el concepto de la regulación por los transcritos antisentido con mayor frecuencia de lo que se pensaba anteriormente (53-55).

Los TAN son los ARN que poseen una secuencia complementaria de los ARN endógenos (56). Ellos pueden ser codantes o no y pueden ser complementarios, ya sea de un intron o de las extremidades 5' o 3' UTR (48); también pueden replicarse. Los TAN se clasifican según su sitio de transcripción en *cis*-TAN y *trans*-TAN. El *cis*-TAN es transcrito a partir de una cadena opuesta del mismo *locus génico* que el transcrito sentido y guarda con este ultimo una perfecta complementariedad en la secuencia. El *trans*-TAN se transcribe a partir de un *locus* diferente del transcrito sentido y guarda con este una complementariedad pequeña e imperfecta. En este trabajo, la hipótesis que el ARN antisentido de *msx2* cuya estructura podría ser homóloga al de *msx1*. se comprobó por RT-PCR, encontrándose que la placenta humana expresa fuertemente el antisentido del ARN de *msx2*, además se localizaron en la porción intrónica de *msx2* supuestos ARN antisentido, así como el ARN antisentido de *msx1*. Estos resultados también sugieren por primera vez que *msx2* posee un ARN-antisentido natural. Sin embargo, es necesario seguir el estudio con trabajos en RACE-PCR para definir la estructura completa de este ARN.

Los ARN-antisentido de *msx1* y *msx2* son parte de los *cis*-TAN. Estos homogenes divergentes no son los únicos que tienen un TAN. Otros homogenes

divergentes de la familia *dlx* como *dlx1* y *dlx6* también los poseen. El gen *dlx1* presenta muchos transcriptos sentido y por lo menos un *cis*-TAN, mientras *dlx6* presenta un transcrito sentido y un *cis*-TAN.

Antes de la publicación de la secuencia completa del genoma humano, sólo algunos TAN fueron descritos por equipos que trabajaban sobre un *locus* preciso (49). Ya se habían propuesto hipótesis sobre el papel que podrían tener los TAN en la regulación de la expresión de los genes humanos (57,58). Los resultados en este trabajo muestran dos tipos de 2 localizaciones tisulares diferentes del ARN- sentido con respecto a la del ARN-antisentido *in vivo*: Una primera localización espacio-temporal cuando el sentido y el antisentido no se expresan en las mismas zonas, tal es el caso del folículo piloso, del hueso en crecimiento y una región dental de morfogénesis (la vaina epitelial de Hertwig). El ejemplo del folículo del piloso es especialmente remarcable; el ciclo piloso es un proceso definido por tres fases sucesivas: una fase de crecimiento de pelo o anágeno, una fase de regresión o catágeno y una fase de reposo llamada telógeno (59). Durante la embriogénesis, *Msx1* y *Msx2* se expresaron en la placa del ectodermo del folículo piloso y después en las células de la matriz epitelial.

En el ratón la expresión de *Msx1* y *Msx2* fue desde el tercer día de nacimiento hasta el día 17, pero en la fase tardía, sólo la expresión de *Msx2* persiste. Esto sugiere que *Msx2* no es indispensable para la salida del pelo, pero si es un factor necesario para su mantenimiento (35). De hecho en el ratón de *Msx2* - /- , a esta edad, el folículo piloso entra prematuramente en catágeno, fase de cambios morfológicos del folículo piloso, que incluye la detención de la proliferación celular en la matriz y la apoptosis en el bulbo piloso. Se estudió la expresión de *Msx2* en el folículo piloso del ratón de siete días de nacido, que corresponde a la fase de anágeno, fase de proliferación y de diferenciación celular donde el folículo se alarga y penetra en la dermis, en esta fase, las células de la corteza se diferencian en el pelo que empieza a salir del folículo.

En el ratón de siete días, los transcriptos de *Msx2* se expresaron en la raíz y la corteza del

bulbo piloso con un gradiente que disminuye y una señal inversa para el ARN-antisentido. La expresión de la proteína coincide con la expresión del transcrito sentido de *msx2* y es opuesta al gradiente de expresión del ARN-antisentido. Así, el **desplazamiento espacio-temporal** se relaciona con eventos de morfogénesis al curso de los cuales un hueso, un germen dental, y un folículo piloso adquieren forma gracias al control espacial de eventos celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis por la proteína *Msx2*. En este caso, parece que en las fases menos diferenciadas, el ARN-sentido se expresa exclusivamente y la proteína se sintetiza. El ARN-antisentido aparece después, en el momento preciso de la disminución de la homoproteína.

La segunda categoría de localización es la que se pudiera denominar una **coincidencia espacio-temporal**, el ARN-sentido y el ARN-antisentido se expresaron en las mismas células, ameloblastos y células supra-ameloblásticas en las diferentes fases de la amelogenesis.

La expresión irregular en los compartimientos pulpares, dentarios y óseos no permitieron concluir en lo que concierne a la co-expresión del trío: sentido-antisentido-proteína; la solución sería realizar su localización en la misma célula.

La co-expresión aparentemente neta en el órgano del esmalte, implica células en las que la diferenciación ha tenido lugar y desarrollan un programa fisiológico especializado como es la elaboración del esmalte.

La variación en la proporción sentido-antisentido podría ser importante para determinar una regulación de la expresión de la proteína no solo en las fases precedentes de la morfogénesis caracterizada por el desplazamiento espacio-temporal.

Es necesario notar que la expresión del trío sigue el programa de la amelogenesis con una fuerte intensidad a la fase de madurez de los ameloblastos en comparación con la fase de secreción. Durante esta fase, se observa una disminución progresiva de la intensidad de la señal, este patrón de expresión de *msx2* recuerda la expresión de las calbindinas (9).

De hecho, se observó una coincidencia en la expresión de *msx2*, de la calbindina- D9k y la calbindina- D28k. Esta convergencia nos sugiere que *msx2* tuvo un efecto estimulante en la expresión de las calbindinas en los ameloblastos.

Las calbindinas (calbindina- D9k y calbindina- D28k) son las proteínas que se unen al calcio con alta afinidad. Se ha demostrado que son marcadores del fenotipo terminal de las células de tejidos mineralizados: osteoblastos, odontoblastos y ameloblastos.

El papel de las calbindinas en el diente no es claro, estudios sobre la cantidad de mineral en el esmalte en ratón normal y mutante para el gen de la calbindina- D28k excluye un papel de la calbindina- D28k en la bio-mineralización (60).

Un papel en la protección contra la apoptosis, establecido en otros tejidos (61), se corresponde bien con los esquemas de expresión de las calbindinas y de *Msx2* en los ameloblastos; trabajos anteriores de este laboratorio han mostrado la presencia de calbindina- D28k en las células epiteliales del incisivo de rata en las fases de secreción y madurez, pero no en la fase de transición, donde 80% de las células entran en apoptosis. Habría por consiguiente una coincidencia entre *Msx2*, calbindina- D28k y la protección contra la apoptosis. Por otra parte los ameloblastos y odontoblastos son, con las células del duodeno, del riñón y las células de Purkinje del cerebelo, los tejidos con más fuerte expresión de calbindinas (62)

Otros trabajos demuestran que, la caries estimula la producción de dentina, la acumulación y el transporte del calcio, así como la síntesis de Calbindina- D28k por los odontoblastos.

En trabajos logrados en el laboratorio (9,13,62) sobre la expresión de las calbindinas en el incisivo de rata, se demostró la presencia de los dos genes de la calbindina en el órgano del esmalte, mientras que en la pulpa dental sólo se expresa el ARN de la Calbindina- D28k.

**Análisis comparativo de la expresión de la calbindina-D28k en los ratones salvajes, heterocigotos y homocigotos mutantes de 3 meses de nacidos:** Se ha demostrado que *Msx2*

tiene un papel importante en la diferenciación terminal de los ameloblastos. De hecho, los ameloblastos se encuentran despegados en ciertas regiones en el incisivo del ratón mutante *Msx2*. Este fenómeno sería inducido por una disminución de la expresión de moléculas de adhesión, como la laminina-5 $\alpha$ 3 (29).

Además, histológicamente se ha observado alteraciones del esmalte en los ratones *Msx2* -/-; en las regiones donde los ameloblastos se encuentran más afectados, indicando un aumento del número de ameloblastos y de células supra-ameloblásticas que generan formaciones pseudo-quísticas.

Se utilizó una línea de ratones mutantes para analizar la función fisiológica de *Msx2* en el diente y en el hueso. El fenotipo dental precoz del ratón *Msx2* -/- se ha descrito anteriormente. En el laboratorio se ha logrado un análisis detallado del fenotipo en el estado tardío dental y parodontal ligado a las mutaciones de *Msx2* (44). A fin de determinar las posibles relaciones entre la expresión de la calbindina- D28k y *Msx2*, se analizó la cantidad de ARN en los ratones de *Msx2* +/+, +/- y -/- y la localización de la proteína. Los resultados mostraron una reducción de la proporción de los transcritos de la calbindina- D28k en los mutantes de *Msx2*, de manera neta para *Msx2* -/- en comparación a *Msx2* +/-.

Los resultados mostraron una expresión fuerte del ARN de la calbindina- D28k en el epitelio del incisivo del ratón homocigoto (+/+) con respecto a la expresión de los transcritos del mismo gen en el epitelio del incisivo del ratón homocigoto - / - y un resultado intermedio para el heterocigoto. Al parecer *Msx2* podría ser un estimulador de la expresión de la calbindina- D28k en las células dentales.

Tenemos entonces una relación funcional inversa entre las proporciones de expresión de *Msx2* y la calbindina- D28k por un lado y la matriz dental en apoptosis por otro lado. Se propuso por consiguiente que la regulación de la expresión por *Msx2* fue positiva, lo que se opone a la acción conocida como promotor de otros genes. Este resultado conllevó a proponer dos hipótesis: 1) la regulación de la expresión de la calbindina- D28k en la transcripción, pero de una manera indirecta,



ya que *Msx2* es un represor. *Msx2* reprimida la expresión de un segundo factor de transcripción que reprime a su vez la expresión de la calbindina-D28k. 2) Otras formas de regulación indirecta.

Para estudiar esta hipótesis se analizó la expresión de la calbindina-D28k en el epitelio de ratón +/- *in situ*. No se encontraron anomalías en la diferenciación celular. Los ameloblastos, las células supra-ameloblásticas y los odontoblastos conservaron su morfología normal. Esto significa que el ratón heterocigoto *Msx2* +/- es un modelo adecuado para estudiar el impacto fisiológico de la reducción de *Msx2* en las células dentarias diferenciadas.

Los datos obtenidos en inmunohistoquímica de los controles muestran una expresión de la calbindina-D28k en los ameloblastos, mientras que no se observan en los odontoblastos. Este último punto ya se había mencionado como un artefacto negativo debido a los agentes decalcificantes (62).

Por otra parte, la localización de la calbindina-D28k fue diferente en el ratón *Msx2* -/- pues las células supra-ameloblásticas expresan también esta proteína. Esta expresión ectópica de la calbindina-D28k corresponde a anomalías epiteliales de la población de células supra-ameloblásticas. Estos resultados se correspondieron con las modificaciones morfológicas observadas en los animales *Msx2* -/- que muestran un mayor número de células supra-ameloblásticas que de ameloblastos. Este fenómeno podrá corresponder a un fenómeno de transdiferenciación que llevaría a las células supra-ameloblásticas a adquirir el fenotipo de los ameloblastos. Una anomalía de este tipo se mostró en el contexto de tumores odontogénicos mixtos humanos (63). En las células supra-ameloblásticas humanas, se observó la expresión ectópica de una serie de marcadores de la diferenciación de ameloblastos (amelogenina, ameloblastina).

Para validar la hipótesis de la transdiferenciación de las células supra-ameloblásticas en ameloblastos, se pueden utilizar otros marcadores además de la calbindina-D28k estos serían las amelogeninas, la ameloblastina así como la calbindina-D9k.

## Conclusiones

-El esquema de expresión de los transcritos de *Msx2* en los estados tardíos de la mineralización mostraron la presencia del ARN-sentido y antisentido de *msx2* en todas las fases del desarrollo dentario. El ARN-antisentido se encontró en los mismos sitios de expresión que el ARN-sentido con una intensidad menos fuerte, en el folículo piloso y en el hueso mandibular.

-Se encontró una reducción de la proporción de transcritos de la calbindina-D28k en los ratones mutantes de *Msx2*. Estos resultados y la coincidencia en la expresión de *msx2* y esta proteína en los ameloblastos hacen pensar en un efecto estimulador de *Msx2* sobre el gen de la calbindina-D28k.

-Los factores de crecimiento inducen la expresión de la calbindina-D28k en los osteoblastos. Será interesante investigar uno de estos factores, las IGF, en las células ameloblásticas, pues hay estudios que han demostrado la inducción de la calbindina-D28k por éstos factores en otros tipos celulares, pero, que no se han realizado en las células que nos interesan.

## Referencias

1. Slavkin HC. Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation a review. *J.Craniofac Genet Dev Biol.* 1991; 11: 338-49.
2. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39: 51-68.
3. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997; 67: 111-23.
4. Thesleff I, Partanen AM, Vainio S. Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the role of extracellular matrix, growth factors, and cell surface receptors. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1991; 11: 229-37.
5. Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells

- associated with major events in amelogenesis. *Int.J.Dev Biol.* 1995; 39:153-64.
6. Zeichner- David M., Diekwish T, Fincham A., Lau E., Macdougall M, Moradian-Oldak J et al. Control of Ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39: 69-92.
  7. Deutsch D, Haze-Filderman A, Blumenfeld A, Dafni L, Leiser Y, Shay B et al. Amelogenin, a major structural protein in mineralizing enamel, is also expressed in soft tissues: brain and cells of the hematopoietic system. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114 (Supl 1):183-9.
  8. Cerny R, Slaby I, Hammarstrom L, Wurtz T A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res.* 1996; 11: 883-91.
  9. Hotton D, Davideau JL, Bernaudin JF, Berdal A . In situ Hybridization of Calbindin-D 28k Transcripts in undecalcified sections of the Rat Continuously Erupting Incisor Connective Tissue Research. 1995; 32,137-43
  10. Hotton D, Mauro N, Lézot F, Forest N, Berdal A. Differential Expression and Activity of Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Rat Odontogenic Cells in Vivo. *J Histochem Cytochem.* 1999; 47: 1541-552.
  11. Linde, A. Lundgren T. From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39: 213-22.
  12. Magloire H., Joffre A., Azerad J, Lawson D. Localization of 28kDa calbindin in human odontoblasts. *Cell Tissue Res.* 1988; 254:341-46
  13. Berdal A, Hotton D, Cuisinier-Gliffar S, Thomasset M, Nancy A. Calbindin-D9k- and Calbindin-D28k expression in rat mineralized tissues in vivo. *J Bone Mineral Res.* 1996; 11:768-79.
  14. Weiss K.M, Stock DW. Dynamic interactions and the evolutionary genetics of dental patterning. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(4)369-98
  15. Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res.* 1996; 35: 131-36
  16. Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis, Review *Pediatric Research.* 1997; 42:421-29
  17. Vieille-Grosjean I, Hunt P, Gulisano M, Boncinelli E, Thorogood P. Branchial HOX gene expression and human craniofacial development. *Developmental Biology.* 1997; 183: 49-60
  18. Cohen MM Jr. The New Bone Biology: pathologic, molecular and clinical correlates. *Am J Med Genet A.* 1996; 140 (23): 2646-706.
  19. Bally-Cuif M. Les gènes du développement. Paris, France: Ed.Nathan; 1995
  20. Ghering WJ, Muller M, Affolter M, Percival-Smith A, Billeter M, Qian YQ et al. The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet.* 1990; 6(10): 323-29.
  21. Sharpe PT. Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res.* 1995; 32(1-4):17-25.
  22. Cobourne MT. The genetic control of early odontogenesis. *Br J Orthod.* 1999; 26: 21-28
  23. Robert B, Sassoon D, Jacq B, Gehring W, Buckingham M. Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *EMBO J.* 1989; 8(1):91-100.
  24. Towler DA, Rutledge SJ, Rodan GA. Msx-2/Hox8.1: A transcriptional regulator of the rat osteocalcin promoter. *Mol Endocrinol.* 1994; 8:1484-493.
  25. Hill RE, Jones PF, Rees AR, Sime CM, Justice MJ, Copeland NG et al. A new family of mouse homeobox-containing genes; molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox7. *Genes Dev.* 1989; 3 (1):26-37.
  26. Thesleff I. Does epidermal growth factor control tooth eruption ASDC *J Dent Child.* 1987; 54(5):321-29.

27. Thomas BL, Tucker AS, Qiu M., Ferguson CA, Hardcastle Z, Rubenstein JLR et al. Role of Dlx-1 and Dlx-2 in patterning of the murine dentition. *Development*. 1997;124:4811-818.
28. Bei M, Maas R. FGFs and BMP4 induce both *msx1*-independent and *msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development*. 1998; 125(21):4325-333
29. Bei M, Stowell S, Maas R. *Msx2* controls ameloblast terminal differentiation *Dev Dyn*. 2004; 231.(4):758-65.
30. Mackenzie A, Ferguson MWJ, Sharpe P. T.-expression pattern of the homeobox gene, *hox8*, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development*. 1998; 115(2):403-20
31. Davideau JL, Sahlberg C, Thesleff I, Berdal A. EGF receptor expression in mineralized tissues: an in situ hybridization and immunocytochemical investigation in rat and human mandibles. *Connect Tissue Res*. 1995; 32(1-4): 47-53.
32. Wilkie AO, Tang Z, Elanko N, Walsh S, Twigg SR, Hurst JA et al. Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene *MSX2* causes defects in skull ossification. *Nat Genet*. 2000; 24(4):387-90.
33. Jabs E, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth I et al. A mutation in the homeodomain of the human *msx-2* gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell*. 1993; 75: 443-450.
34. Winograd J, Reilly M, Roe R, Lutz J, Laughner E, Xu X et al. Perinatal lethality and multiple craniofacial malformations in *msx2* transgenic mice. *Human Molecular Genetics*. 1997; 6(3): 369-79.
35. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*. 2000; 24: 391-95.
36. Bidder M, Latifi T, Towler DA. Reciprocal temporospatial patterns of *Msx2* and Osteocalcin gene expression during murine odontogenesis. *J Bone Miner Res*. 1998;13: 609-19
37. Zhou YL, Lei Y, Snead ML. Functional antagonism between *Msx2* and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in regulating the mouse amelogenin gene expression is mediated by protein-protein interaction. *J Biol Chem*. 2000;275(37): 29066-75
38. Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*. 2000; 127(22):4775-85
39. Liu Y, Kundu R, Wu L, Luo W, Ignelzi MA, Snead ML et al. Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing *msx2* transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1995; 92 (13): 6137-141
40. Hodgkinson J, Davidson C, Beresford J, Sharpe P. Expression of a human homeobox-containing gene is regulated by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in bone cells. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1174:11-16.
41. Tucker A.S., Matthew K.L., Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signalling. *Science*. 1998; 282:1136-138.
42. Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT et al. Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol*. 1997; 185(2):165-84.
43. Satokata I, Maas R.. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*. 1994; 6:348-56.
44. Aïoub M, Lézot F, Molla M, Castaneda B, Robert B, Goubin G et al. *Msx2* *-/-* transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Bone*. 2007; 41(5):851-9.

45. Lezot F, Davideau JL, Thomas B, Sharpe P, Forest N, Berdal A. Epithelial Dlx-2 homeogene expression and cementogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48(2): 277-84.
46. Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Lézot F, Blin-Wakkach C, Asselin A, Sautier JM et al. Expression pattern of Dlx3 during cell differentiation in mineralized tissues. *Bone.* 2005; 37: 799-809
47. Ryoo HM., Hoffman HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS et al. Stage- Specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involment in regulation of osteocalcine gene expression. *Mol Endocrin.* 1997; 11: 1681-1690.
48. Kiyosawa H, Yamanaka I, Osato N, Kondo S., Hayashizaki Y. Antisense transcripts with FANTOM2 clone set and their implications for gene regulation. *Genome Res.* 2003; 13:1324-334.
49. Werner A, Berdal A. Natural antisense transcripts: sound or silence? *Physiol Genomics.* 2005; 23 (2): 125-31.
50. Stolt P, Zillig W. Antisense RNA mediates transcriptional processing in an archaeobacterium, indicating a novel kind of RNse activity. *Mol Microbiol* 1993; 7:875-82.
51. Merino E, Balbas P, Puentes JL, Bolivar F. Antisense overlapping open reading frames in genes from bacteria to humans. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:1903-908.
52. Knee R, Murphy PR. Regulation of gene expression by natural antisense RNA transcripts. *Neurochem Int.* 1997;31(3):379-92.
53. Chen J, Sun WJ., Kent X, Huang H, Xie H, Wang W et al. Over 20% of human transcripts might form sense-antisense pairs. *Nucleic Acid Res.* 2004; 32: 4812-820
54. Lipman DJ. Making (anti)sens of non-coding sequence conservation. *Nucleic Acid Res.* 1994; 25: 3580-583.
55. Carmicael G. Antisense starts making more sens. *Nat Biotechnol.* 2003; 21:371-72.
56. Lavorgna G, Dahary D, Lehner B, SorekR, Sanderson CM, Casari G. In search of antisense. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29:88-94.
57. Kumar M, Carmichael G. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62:1415-434.
58. Vanhée-Brossollet C, Vaquero C. Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes? *Gene.* 1998; 211:1-9.
59. Ma L, Liu J, Wu T, Plikus M, Jiang TX, Bi Q et al. Cyclic alopecia in *msx2* mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation. *Development.* 2003; 130: 379-89
60. Turnbull CI, Looi K, Mangum J, Meyer M, Sayer R, Hubbard MJ. Calbindin Independence of Calcium Transport in Developing Teeth Contradicts the Calcium ferry dogma. *J Biol Chem.* 2004; 279 (53): 55850-854.
61. Christakos S, Liu Y. Biological actions and mechanisms of action of calbindin in he process of apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 89-90(1-5): 401-4.
62. Berdal A, Hotton D, Kamyab S, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Subcellular colocalization and co-variations of two Vitamin D-Dependent Proteins in rat Ameloblasts. *Arch Oral Biol.* 1991; 36(10):715-22.
63. Papagerakis P, Peuchmar M, Hotton D, Ferkdady I, Delma P, Sasaki S et al. Aberrant gene expression in epithelial cells of mixed odontogenous tumor. *J Dent Res.* 1999; 78(1)20-30.

