

# ASPECTOS MORFOHISTOQUIMICOS DE LA INDUCCION EPITELIO-MESENQUIMA EN LA ORGANOGENESIS DENTAL.

FERRARIS, MARÍA ELSA G. DE °, FONSECA, MIGUEL MARIO °°,  
GENDELMAN, HÉCTOR °°°

## R E S U M E N

Se describen las secuencias cronológicas de las características morfo-histoquímicas de la organogénesis dentaria, previo a la etapa aposicional, que fueron las siguientes:

- 1) positividad Aldehído Fucsina de la membrana basal (futura conexión amelo-dentinaria);
- 2) aumento del número de capas celulares en el estrato intermedio, con metacromasia y alcianofilia en el retículo estrellado;
- 3) metacromasia y alcianofilia en la papila, con diferenciación de odontoblastos basófilos en su periferia;
- 4) depósito dentinario alcianofilo y PAS +, con cambio de polaridad de los ameloblastos basófilos y posterior secreción de matriz adamantina ligeramente PAS +.

La variante técnica de oxidación con ácido peryodico durante 10', reactivo de Schniff 15' y la posterior e inmediata aplicación de metenamina plata 1 hora a 60°C, permite identificar con nitidez sustancias peryodatos reactivas como el glucógeno y los componentes reactivos de la membrana basal.

## S U M M A R Y

*Morphohistochemical aspects of epithelium-mesenchyma induction in dental organogenesis*

Chronologic sequences of dental organogenesis morphohistochemical characteristics are described prior to appositional stage. They were the following:  
1) Basal membrane Fuchsin Aldehyde positive (future amelo-dentinal junc-

° Profesora Adjunta Interina. Cátedra de Histología y Embriología.

°° Profesor Adjunto. Cátedra de Anatomía Patológica.

°°° Profesor Titular. Cátedra de Anatomía Patológica.

tion). 2) Increase of cellular layers-in intermediate stratum with metachromasia and alcianophilia in stellate reticulum. 3) Metachromasia and alcianophilia in papilla with differentiation of basophile odontoblasts on its periphery. 4) Alcianophile dentine deposit and PAS + with basophile ameloblasts polarity change and posterior secretion of adamantine matrix slightly PAS +. Technical oxidation variation with periodic acid during 10', Schiff reactive substance 15' and the posterior and immediate application of methenamine silver 1 hour at 60°C allows to identify clearly reactive substances to periodic acid like glucogene and basal membrane reactive components.

En la etapa embrionaria de los mamíferos la diferenciación desarrollo y crecimiento de varios órganos incluido los dentarios, depende de las influencias inductoras ejercidas por los tejidos entre si (8-9-15).

Los conocimientos sobre la inducción epitelio-mesénquima (EM) o interdependencia tisular en la organogénesis dentaria, sugieren que el principal efecto inductor lo ejerce el epitelio interno del órgano del esmalte sobre el mesénquima adyacente determinando la organización de la papila y la posterior diferenciación de los odontoblastos en su superficie (18-23-26).

El depósito de la primera capa dentinaria por los odontoblastos, da lugar al cambio de polaridad de los ameloblastos jóvenes en ameloblastos adultos (maduros o secretores). Se inicia así la secreción de la matriz orgánica del esmalte sobre el depósito de dentina. Es decir, que el desarrollo y crecimiento del germen dentario está sujeto a la interacción de los tejidos embrionarios: Organó de esmalte (ectodermo) - papila dental (mesodermo) entre sí, efecto inductor observado tanto "in vivo" como "in vitro" (11-13-15-30-33).

Siendo el proceso inductivo muy complejo por las modificaciones y cambios que se dan a nivel morfológico y químico, su mecanismo exacto se desconoce aún y ofrece aspectos a investigar en especial, aquellos que ocurren antes o durante la diferenciación de las células principales (ameloblastos, odontoblastos) y en la etapa de secreción de sus respectivas matrices orgánicas.

Así mismo la membrana basal (MB) situada entre el epitelio y conjuntivo es una estructura cuya constitución y origen no está

bien aclarada. Se acepta en general formada por dos capas básicas: 1) la que está en contacto con la membrana plasmática de las células del epitelio, constituida por finísimas fibrillas de colágeno tipo IV embebidas en una matriz intercelular de origen epitelial llamada lámina basal y 2) la otra capa situada más profundamente formada por fibras de reticulina de origen conjuntivo embebidas también en sustancia amorfa (10-19-23-32).

Esta membrana evidenciable histoquímicamente con el PAS (glicoproteínas) y con los métodos argénticos (componente reticular) se encuentra presente en todos los lugares donde existe tejido epitelial en relación con el conjuntivo, ya sea en circunstancias normales o patológicas (5-6-10-20-22).

La MB está sujeta continuamente a cambios (fenómenos de polimerización y despolimerización) (22) y se sugiere en los trabajos de cultivos sobre inducción E.M., que constituye un factor importante para la diferenciación celular y organogénesis dental (12-13-14-30-33).

Por otro lado, histoquímicamente en relación a este proceso inductivo, se ha descrito la detección de MPSA \* o GAGS \*\* visibles por metacromasia (ATO), glucógeno y fosfatasa alcalina en las áreas próximas a los tejidos dentarios en formación (3-4-16-18-34).

El contenido de ARN se incrementa en las células ameloblásticas y odontoblásticas concomitantes con su especialización y organización celular (3-4-7).

Nuestro objetivo es ordenar cronológicamente la secuencia de datos morfohistoquímicos que acontecen en la histodiferenciación del órgano dental previos a la etapa aposicional, el papel que desempeña la MB a nivel de microscopía óptica y los probables cambios en su caracterización histoquímica, en relación a los momentos del mecanismo inductivo. Estos datos podrían ser utilizados en el estudio de los fenómenos de inducción, principalmente en la patología neoplásica.

\* MPSA: mucopolisacaridos ácidos.

\*\* GAGS: glicosamiñoglicanes.

## MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 12 cabezas de embriones humanos (de 6 a 12 semanas, obtenidos de abortos espontáneos) y 15 cabezas de embriones de ratas Wistar de 14 a 20 días de vida intrauterina según tabla de Farris y Griffith (2) sobre histogénesis dentaria en rata. El material en este caso se obtuvo sacrificando el animal madre en los tiempos arriba establecidos.

La fijación del material se realizó en Formol-Alcohol pH 7. Cinco de las cabezas humanas se descalcificaron en Rossman. Se incluyeron en parafina y la orientación de los cortes se realizó en planos frontales y sagitales. Se colorearon con Hematoxilina eosina y también impregnación argentina reticulina colágena (20-21).

Reacciones histoquímicas: Acido Peryodico de Schiff (PAS), Diastasa PAS (1-19-28), Acido Peryodico 20' metenamina - plata 60' en oscuridad (31), PAS metenamina plata (Acido peryodico 10' Schiff 15' metenamina plata a 60°C 1 hora en oscuridad); Alcian blue pH 1 y 2,5; Alcian blue previa digestión con hialuronidasa testicular ovina (19-28), Azul de toluidina pH 7 y 3,5 con y sin deshidratación alcohólica, Azul de toluidina pH 1 (1-19-28), Aldehído Fucsina (Halmis) - Hialuronidasa Aldehído Fucsina (28).

Para control de las reacciones histoquímicas se usó cartílago y mucosa bucal.

## RESULTADOS

No encontramos diferencias histoquímicas notables entre el material humano y de ratas. En los primeros estadios de brote y casquete la mucosa bucal en el epitelio presenta abundante glucógeno en el estrato mucoso, siendo escaso o nulo a nivel de las células basales, destacándose la MB PAS + que la separa del mesénquima embrionario. Esta membrana basal es rica en fibras de reticulina y presenta indentaciones que penetran entre las células epiteliales.

La lámina dental muestra un contenido de glucógeno (PAS + Diastasa labil) menor que el epitelio bucal y su MB es PAS y reticu-

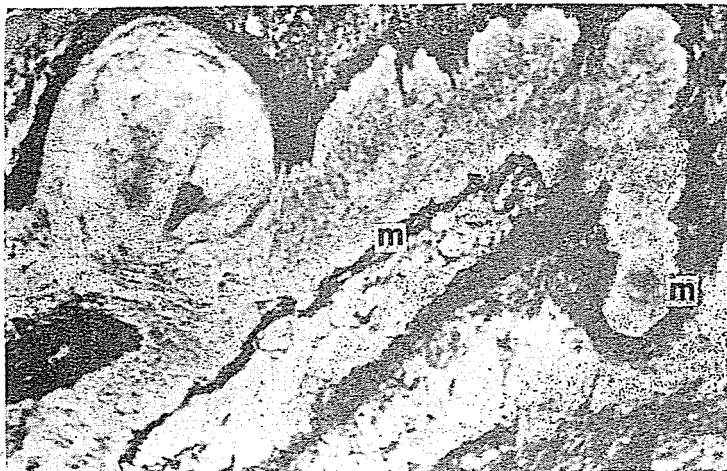


FIGURA 1. — Fotomicrografía de la lámina dental y el esbozo del germen dentario humano (brote). Reticulina-colágeno - 40 x m: membrana basal.

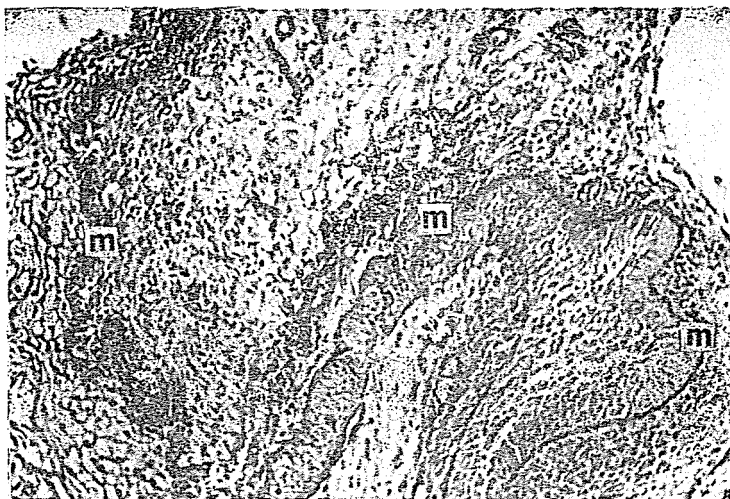


FIGURA 2. — Fotomicrografía de un películo dental humano (casquete). Metenamina-plata. 40 x m: membrana basal.



FIGURA 3. — Fotomicrografía de un folículo dentario humano. PAS - metenamina plata. 40 X m: membrana basal. g: glucógeno.

lina positiva. Con la técnica de PAS - metenamina plata, se logra una mejor visualización de las sustancias peryodatos reactivas (Figuras 1, 2 y 3).

El casquete, futuro órgano del esmalte presenta material PAS + en su zona central al comenzar la etapa de campana (que se identifica estructuralmente por la presencia del estrato intermedio). El glucógeno tiende a desaparecer y solo es detectado en la zona de fusión del epitelio externo con el saco dentario.

Se identifican M.P.S. ácidos en el retículo estrellado y en el epitelio interno o Preameloblástico. Este último se caracteriza por su basofilia en aumento con la diferenciación y especialización celular.

La MB futura conexión amelo dentinaria, presenta cambios histoquímicos previos al comienzo de la dentinogénesis por los odontoblastos. Esta MB llamada también preformativa, es Aldehído Fucsina + metacromática al ATO a pH 7 y 3,5; y alcianófila a pH 2,5. (Fig. 4-5-6-7).

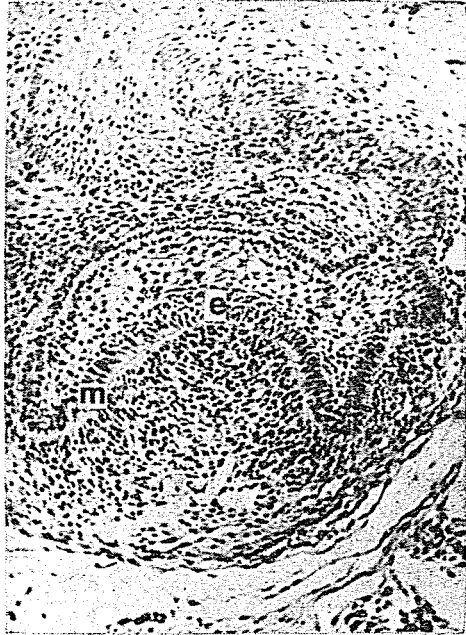


FIGURA 4. — Fotomicrografía de un folículo dentario humano. Aldehído-fucsina y verde brillante 60 X. m: membrana basal. e: epitelio interno.

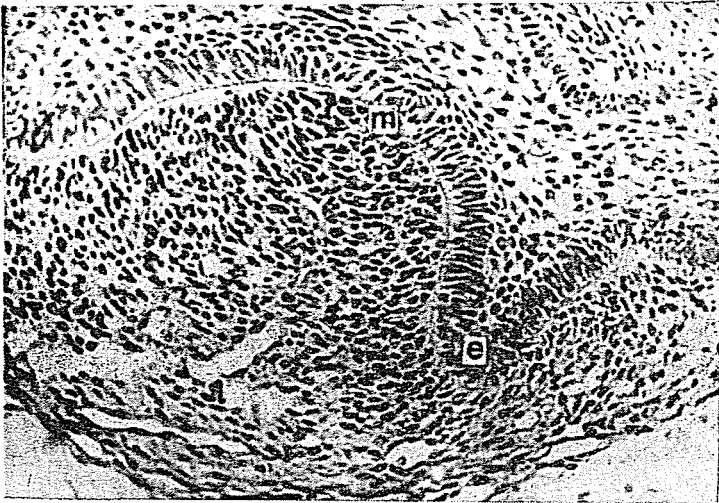


FIGURA 5. — Fotomicrografía en detalle de la figura anterior. 100 X. m: membrana basal. e: epitelio interno.



FIGURA 6. — Aldehido fucsina. 100 X. m: membrana basal positiva. e: epitelio interno.

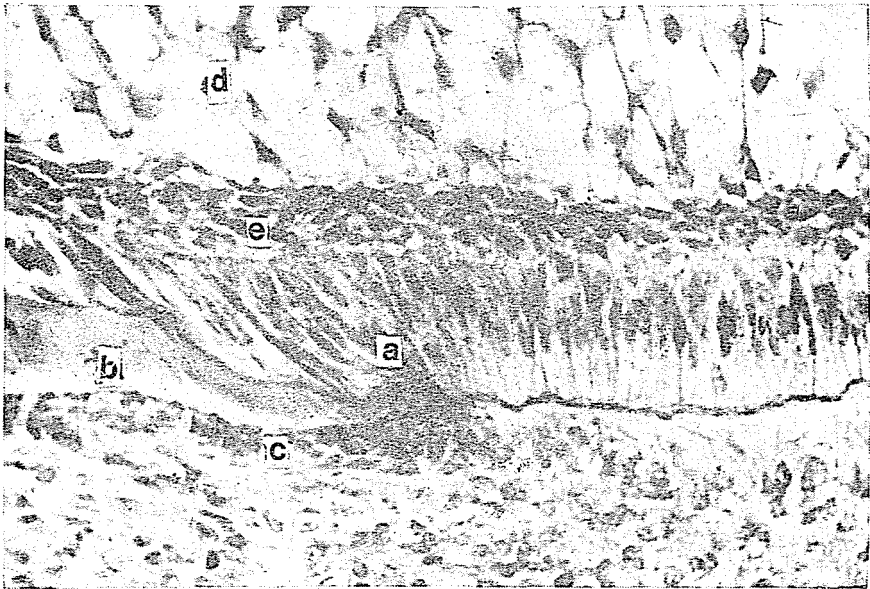


FIGURA 7. — PAS - Hematoxilina - 200 X. a: ameloblastos. b: predentina. c: odontoblastos. d: reticulo estrellado. e: estrato intermedio.



Su metacromasia es parcialmente lábil al alcohol etílico.

Con la hialuronidasa (testicular ovina) desaparece la alcianofilia y la reacción positiva al Aldehido Fucsina de la MB. Se interpretaría como que en esta etapa aparecen ácido hialurónico y condroitinsulfatos de tipo 4-6. Es PAS + diastasa resistente (glicoproteica). Al método reticulina colágeno presenta escasa cantidad de fibras. En relación con la MB y en la periferia de la papila observamos una estrecha zona alcianófila y metacromática, previa al depósito de la dentina, los odontoblastos son fuertemente basófilos.

Se resumen los hallazgos en la tabla I.

#### D I S C U S I O N

En el desarrollo dentario se han postulado las siguientes posibilidades de interacción: a) por contacto directo de célula a célula; b) a distancia por difusión de sustancias; c) interacción mediante material intercelular rico en colágeno, GAGS y glicoproteínas. Pero la histodiferenciación tanto "in vivo" como "in vitro" depende de la proximidad de los tejidos epitelial y mesenquima (13-15-29-30-33).

En nuestras observaciones con la reacción de PAS e impregnaciones argentícas, la MB está presente desde el estadio de brote y su nitidez se hizo más evidente en la etapa de campana, coincidiendo con el aumento de células del Estrato Intermedio y la diferenciación odontoblástica en la periferia de la papila. Con el empleo del Aldehido Fucsina (Halmis) se identifica fácilmente en esta etapa su positividad por el contenido en ácido hialurónico y condroitinsulfato 4-6; difíciles de visualizar y valorar con el Alcian blue y por metacromasia, (pudiendo influir en este aspecto la descalcificación).

En un trabajo anterior (4) no observamos cambios a nivel de la MB ya que la metodología empleada no incluía el Aldehido Fucsina. Estos componentes químicos de la membrana jugarían un papel importante en la iniciación de la dentinogénesis.

TABLA I

ETAPAS BROTE Y CASQUETE	RETICULINA COLAGENO	PAS	DIASTASA PAS	PAS MET. AG.	ALCIAN BLUE		AZUL TOLUIDINA			ALDEH. FUCSINA				
					PH 1	PH 2,5	PH 1	PH 3,5	PH 7					
MUCOSA BUCAL		+	-	+	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-
MEMBRANA BASAL (MB)	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-
LAMINA DENTAL		+	-	+	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-
M. BASAL	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-
ETAPA DE CAMPANA														
EP. EXTERNO		+	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-
RETICULO ESTRELLADO		+	+	+	-	+	+	-	M	M	M	M	-	-
ESTRATO INTERMEDIO		-	-	-	-	-	-	-	0 M	0 M	0 M	0 M	-	-
EPITELIO INTERNO O AMEL.		+	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-
M. BASAL	+	+	+	+	-	+	-	-	M	M	M	M	+	-
MATRIZ ADAMANTINA		+	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-
PAPILA		+	+	+	-	+	-	-	M		M		-	-
MATRIZ DENTINARIA	+	+	+	+	-	+	-	-					+	-
							HL			DA		DA		HL

O: ORTOCROMASIA

M: METACROMASIA

DA: DESHIDRATACION ALC.

HL: HIALURONIDASA

Con las técnicas de plata (el componente reticular) se destaca especialmente en la primera zona de diferenciación del epitelio interno (nivel de futura cúspide o borde incisal), característica que se mantiene hasta el comienzo de la dentinogénesis, aunque en este momento mostró un menor contenido fibrilar.

No pudimos corroborar que la membrana preformativa o amelo dentinaria presenta mayor PAS + antes de la formación de pre dentina (16).

Policard (22) menciona que MB podría presentar cuadroitinsulfatos asociados al material glicoproteico, y otros depósitos de sustancias, tales como carbonatos de calcio, hidroxiapatita y compuestos ferruginosos. Nuestros hallazgos, corroboran estas descripciones y guardan relación con la dentinogénesis en su etapa inicial.

Utilizando la técnica del ácido peryodico-metenamina plata, el ácido peryodico libera grupos aldehidos los cuales reducen la metenamina plata a plata metálica que finalmente precipita. Esta técnica fue introducida por Gomori en microscopía óptica utilizando el ácido crómico. Posteriormente el ácido crómico fue reemplazado por el ácido peryodico (18). Es considerada inespecífica ya que la plata puede reducir grupos que no han sido oxidados como por ejemplo melanina, células cebadas y células argentafines. También reacciona con los grupos sulfidrilos (-SH) además de los 1-2 glicoles, por lo que la tinción de estos últimos se haría inespecífica. Su especificidad puede controlarse con testigos en donde se omite la oxidación (25).

El tiempo de aplicación de la metenamina plata es de 1 hora a 60°C en la oscuridad, cuidando que no pase de un color castaño para evitar groseras precipitaciones de la plata (25).

Actualmente se emplea esta técnica, para los estudios de carbohidratos complejos a nivel de microscopía electrónica. (24-25).

Nuestra variante técnica del Acido peryodico 10' Schiff 15' y metenamina plata 1 hora a 60°C, permite una visualización más nítida de los compuestos peryodatos reactivos. La metenamina plata potencia la reacción a cargo del Schiff, sobre los grupos aldehidos liberados. Esta interpretación fue corroborada "ex situ" al mez-

clar la merenamina al reactivo de Schiff lo que produce un rápido e inmediato cambio de la fucsina decolorada en coloreada.

La estrecha zona alcianofila y metacromática próxima a la MB, situada en la periferia de la papila podría corresponder a la denominada matriz extracelular o interfase rica en colageno y GAGS- (12-13-27-29) por su respuesta histoquímica, característica que se mantiene una vez diferenciado los odontoblastos y desaparece al comenzar la secreción de la matriz dentinaria. La intensa basofilia citoplasmática de ameloblastos y odontoblastos al comenzar la síntesis de sus respectivas matrices orgánicas, son características identificadas en trabajos anteriores (3-4-7) donde el ARN citoplasmático alcanza el mayor grado de apetencia tintorial detectado por citotquímica y fluorotinción (acridina-orange).

La metacromasia observada en la papila y sustancia intercelular del RE, coincide con los hallazgos de Wislocki (34) en dientes humanos en desarrollo. Esta capacidad se pone en evidencia durante la organogénesis, para luego disminuir o desaparecer en la pulpa del diente adulto (16-18-26).

Acorde a estos hallazgos podemos concluir que las etapas cronológicas desde el punto de vista morfo histoquímico en la diferenciación del órgano dental, en nuestro trabajo son las siguientes:

- 1) La MB futura conexión AD se observa nítidamente desde las primeras etapas en su componente reticulínico y PAS +. La positividad al Aldehido Fucsina se manifiesta previo a la denticogénesis.
- 2) Aumento del número de capas del E. Intermedio en el sitio que corresponderá a nivel de futuras cúspides o borde incisal.
- 3) Especialización del Ep. Interno preameloblastos, Metacromasia y Alcianofilia en reticulo estrellado y Est. Intermedio.
- 4) Metacromasia y alcianofilia en la papila sobre todo en el estrecho espacio ópticamente amorfo que la contornea, con diferenciación de los odontoblastos en la periferia.

- 5) Depósito dentinario con simultáneo cambio de polaridad de los ameloblastos.
- 6) Odontoblastos basófilos y matriz dentinaria con ligera metacromasia, PAS + y alcianofilia.
- 7) Ameloblastos con basofilia intensa y depósito de matriz de esmalte que presenta ligera PAS +.

B I B L I O G R A F I A

1. Barka T. y Anderson P.: Histoquímica. Edit. Atika SA. Madrid, 1967.
2. Farris E. and Griffith J. The rat in laboratory investigation 2ª Edit. Lippincott Company Philadelphia, 1942.
3. Ferraris M. E. G. de: Detección y correlación histoquímica, fluorescente de los ácidos nucleicos, glucógeno y fosfatasa alcalina en gérmenes dentarios de rata albina. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. 1974.
4. Ferraris, M. E. G. de; Fonseca M.; Gendelman, H.: "Tissular interdependence in the mophological differentiation of the tooth germ". J. Dent. Res. 56: D213, 1977.
5. Fonseca M. M.; Gani, O.; Gendelman, H.: "Sobre los capilares subodontoblasticos de la pulpa dentaria humana". Rev. Fac. Odont. 9 (1): 23, 1977.
6. Gendelman, H., Fonseca, M.: "Observations histologiques et histochimiques sur la membrane basale des kystes paradentaires" Bull. Group. Int. Res. Sc. Stomat. 9: 421, 1966.
7. Gendelman H.; Fonseca M.; Ferraris, M. E. G. de: "Morphologische Isolierung und charakteristik menschlicher odontoblasten sowie die fluoreszanz, mikroskopische und zytoschemische identifizierung". Leitz Mitt. Wss u Techn. 6: 236, 1976.
8. Gustafson T., Wolpert, L.: "The cellular basis of morphogenesis and searchin development". Int. Rev. Cytol. 15: 139, 1963.
9. Grobstein, C.; Cohen, J.: "Collagenase: Effect on the morphogenesis of embryonic salivary epithelium in vitro" Science 150: 626, 1965.
10. Ham, A.: "Tratado de histología". Edit. Interamericana 7ª Edic. México, 1975.
11. Heritier, M.: "Etude in vitro des relations epithélio - mesenchymateuses au cours de la differenciation des bourgeons dentaires chez la souris". Rev. Fr. Odontostomatol 18: 77, 1971.

12. Hetem, S., Edward, J.: "Effect of  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , dipirydil on the basament mebrane of tooth germ in vitro" J. Dent. Res. 54: 783, 1975.
13. Hurmerinta, K.; Thesleff, I.: "In vitro inhibition of mouse odontoblast differentiation by vit A" Arch Oral Biol. 25: 385, 1980.
14. Kallman, F., Grobstein, C.: "Source of collagen at epithelio - mesenchymal interfaces during inductive interaction". Dev. Biol. 11: 169, 1965.
15. Karcher, A.; Djuricic, V.: "Role of the adamantine epithelium in the differentiation of odontoblasts" C. R. Soc. Biol. 165: 1992, 1971.
16. Lazzari, E.: "Bioquímica dental" Edit. Interamericana S.A. Mexico, 1970.
17. Mowry, R. W.: "Effect of periodic acid used prior to chromic acid on tre staining of polysaccharides by Gomori's methenamine silver". J. Histochem, Cytochem 7: 288, 1959.
18. Mjör, I.; Pindborg, J.: "Histología del diente humano" Edit. Labor. Barcelona, 1974.
19. Pearse, A.: "Histochemistry vol. I. Little Brown. Great Britain, 1968.
20. Polak, M., Sánchez, J.; Golonbek, M.; Herrero, L.: "Consideraciones acerca de la llamada membrana basal" Arch. Fund. Roux Ocefa 5: 67, 1971.
21. Polak, M.: "Blastomas del sistema nervioso central y periférico" López Libreros. Buenos Aires, 1966.
22. Policard, A., Collet, A.: "Physiologie du tissu conjonctif". Masson et Cie. Paris, 1967.
23. Provenza, V.: "Histología y Embriología Odontológica". Ed. Interamericana. Mexico, 1974.
24. Raumburg, A.: "A improved silver methenamine technique for the detection of periodic acid reactive complex carbohydrates with the electron microscope" J. Histochem, Cytochem. 15: 409, 1967.
25. Rovasio, R. A.: "Citoquímica y ultraestructura de superficies celulares". Tesis. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, 1976.
26. Seltzer, S.; Bender, I.: "La pulpa dental" Ed. Mundi S.A. Buenos Aires, 1970.
27. Silva, D. and Kailis, D.: "Ultrastructural studies on the cervical loop and the development of the amelo dentinal junction in the cat" Arch. Oral Biol. 17: 279, 1972.
28. Spicer, S.; Horn, R.; Leppi, T.: "Histochemistry connective tissue mucopolysaccharides Int. Acad. of Pathol. Monograph. nº 7. Chap 17 William & Wilkins Baltimore, 1967.
29. Slavkin, H.; Bringas, P.; LeBaron, R.; Cameron, J. and Bavetta, L.: "The fine structure of the extracellular matrix during epithelio - mesenchymal interactions in the rabbit embryonic incisor. Anat. Rec. 155: 237, 1969.
30. Slavkin, H. and Bringas, P. "Epithelial - mesenchyme interactions during odontogenesis" Dev. Biol. 50: 428, 1976.
31. Thiéry, J. P.: Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique, J. Microscopie 6: 987, 1967.

32. Wheater, P.; Burkitt, H.; Daniels, V.: "Histología funcional (ATLAS) Edit. Jims. Barcelona, 1980.
33. Wolters, J. and, Van Mullerm, J. P.: "Electron microscopy of epithelio-mesenchyme intercellular communication in trans - filter cultures of rat tooth germs" Arch. Oral Biol. 22: 705, 1977.
34. Wislocki, G. and Sogwnaes, R.: "Histochemical reactions of normal tecth" Am J. Anat. 87: 239, 1950.