

---

# EL PAPEL DE LA ENAMELISINA (MMP-20) EN EL DESARROLLO DENTARIO. REVISIÓN SISTEMÁTICA

## THE ROLE OF ENAMELYSIN (MMP-20) IN TOOTH DEVELOPMENT. SYSTEMATIC REVIEW

Estefanía Cuéllar Rivas<sup>1</sup>, María Carolina Pustovrh Ramos<sup>2</sup>

**RESUMEN. Introducción:** el ameloblasto es la célula encargada de la producción y mineralización de la matriz orgánica del esmalte. Atraviesa varias etapas: la fase pre-secretora, secretora, de transición y maduración. En la fase secretora se producen los componentes de la matriz orgánica. En la fase de maduración se elimina el componente orgánico y se inicia el proceso de mineralización. Este proceso requiere de la participación de la metaloproteínasa de matriz 20 (MMP-20) o también llamada enamelinasa. Diversos estudios demuestran la presencia de MMP-20 en el desarrollo dentario y su relación con alteraciones en la formación del esmalte. El objeto fue clasificar los diferentes estudios y técnicas de laboratorio empleadas que demuestren la participación de enamelinasa en el desarrollo dentario y su relación con patologías en la formación del esmalte. **Métodos:** se realizó una revisión sistemática de la literatura con las siguientes bases bibliográficas: PubMed, Science-Direct, Hinari y SciELO, con el fin de clasificar los diferentes estudios relacionados con la participación de MMP-20 en el desarrollo dental y los métodos utilizados para detectar su expresión, entre los años de 2009 a 2014. **Resultados y conclusiones:** los modelos in vitro evidencian que MMP-20 tiene sitios específicos de escisión para las proteínas de matriz de esmalte. Este proceso se ve alterado por la composición química, iones, y la presencia de hidroxiapatita. En los modelos knockout la morfología del esmalte está alterada. En los estudios en humanos, se ha relacionado la MMP-20 con una mayor susceptibilidad de caries dental, el grosor completo de esmalte y agenesias dentales.

**Palabras clave:** desarrollo del esmalte, desarrollo dental, enamelinasa, MMP-20, amelogenesis, amelogenesis imperfecta.

Cuellar E, Pustovrh MC. El papel de la enamelinasa (MMP-20) en el desarrollo dentario: revisión sistemática. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2016; 27(1): 154-176. DOI: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v27n1a8>

---

**Abstract. Introduction:** ameloblasts are cells responsible for the production and mineralization of the organic matrix of enamel through several stages: pre-secretory, secretory, transition, and maturation. The organic matrix components are produced in the secretory phase. In the maturation phase, the organic component is removed and the mineralization process starts. This process requires the involvement of matrix metalloproteinase 20 (MMP-20), also called enamelysin. Several studies have shown the presence of MMP-20 in tooth development and its relationship to alterations in enamel formation. **The objective was:** to classify the different studies and laboratory techniques used to demonstrate the involvement of enamelysin in tooth development and its relation to pathologies during enamel formation. **Methods:** a systematic review was conducted with the following bibliographic databases: PubMed, Science-Direct, Hinari, and SciELO, in order to classify the different studies related to the involvement of MMP-20 in tooth development and the methods to detect its expression, between the years of 2009 and 2014. **Results and conclusions:** in vitro models show that MMP-20 has specific cleavage sites for enamel matrix proteins. This process is altered by chemical composition, ions, and the presence of hydroxyapatite. Enamel morphology is altered in the knockout models. In human studies, MMP-20 has been associated with increased susceptibility to dental caries, enamel thickness, and dental agenesis.

**Key words:** enamel development, tooth development, enamelysin, MMP-20, amelogenesis, amelogenesis imperfecta.

Cuellar E, Pustovrh MC. The role of enamelysin (MMP-20) in tooth development: systematic review. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2016; 27(1): 154-176. DOI: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v27n1a8>

---

1 Maestría en Ciencias Biomédicas 2013-2015, Universidad del Valle, Especialización Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Ortodoncia y Ortopedia Maxilar 2015-2017.  
2 Profesora Departamento de Morfología Universidad del Valle. Postdoctorado 2006-2007; Postdoctorado Universidad De Chile 2007-2009, Doctorado Universidad de Buenos Aires, Doctor en Ciencias 2002-2006.

---

1 Master's Degree in Biomedical Sciences 2013-2015, Universidad del Valle, Specialization at Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Orthodontics and Maxillary Orthopedics 2015-2017.  
2 Professor, Morphological Department, Universidad del Valle, Postdoctoral Fellow 2006-2007; Postdoctoral Fellow, Universidad de Chile 2007-2009, PhD Universidad de Buenos Aires, Doctor in Sciences 2002-2006.

## INTRODUCCIÓN

### Amelogénesis

La morfogénesis de los órganos dentarios inicia a la sexta semana de vida intrauterina en seres humanos (aproximadamente a los cuarenta y cinco días), y en el ratón inicia en el estadio E12.5<sup>1</sup>. El primer indicio consiste en la diferenciación de la lámina dental o listón dentario, originado del ectodermo que reviste la cavidad oral. El ectomesénquima induce a las células basales del epitelio oral a proliferar y formar dos nuevas estructuras: la lámina vestibular y la lámina dentaria. La lámina vestibular formará el surco vestibular y la lámina dentaria dará origen a los crecimientos epiteliales correspondientes a los futuros dientes: 20 deciduos y 32 gérmenes de dentición permanente. De acuerdo a su morfología, los gérmenes dentales seguirán una evolución en: estadio de brote macizo (o yema), estadio de casquete, estadio de campana y estadio de fólculo dentario, terminal o maduro.

Es en el estadio de campana el órgano del esmalte presenta una nueva capa, el estrato intermedio, ubicado entre el retículo estrellado y el epitelio interno. Al finalizar esta etapa de campana, inicia la histogénesis o aposición de los tejidos duros dentarios (dentina y esmalte). Las células que conforman el epitelio interno, también llamadas preameloblastos, se diferencian en ameloblastos jóvenes y serán las encargadas de la producción del esmalte.

El esmalte, también conocido con el nombre de sustancia o tejido adamantino, está ubicado en la porción coronal cubriendo la dentina subyacente. Se origina del órgano del esmalte, y es el tejido más duro del organismo. Está constituido por los prismas de esmalte, los cuales están altamente mineralizados, ubicados desde la conexión amelodentinal (CAD) a la superficie externa o libre en contacto con la cavidad oral. La matriz inorgánica del esmalte la conforman los cristales de hidroxiapatita y representa un 95%. Estos están constituidos por fosfato de calcio y se encuentran densamente compactados. La matriz orgánica del esmalte es de naturaleza proteica;

## INTRODUCTION

### Amelogenesis

The morphogenesis of dental organs begins during the sixth week of intrauterine life in humans (approximately at forty-five days), and in mice it begins during the E12.5 stage.<sup>1</sup> The first indication is the differentiation of dental lamina or slat tooth, originated from the ectoderm that covers the oral cavity. The ectomesenchyme induces oral epithelial basal cells to proliferate and form two new structures: the vestibular lamina and the dental lamina. The vestibular lamina forms the vestibular groove while the dental lamina generates the corresponding epithelial growth of future teeth: 20 deciduous teeth and 32 germs of permanent teeth. According to their morphology, dental germs will continue their evolution in these stages: stage of massive outbreak (or yolk), cap stage, bell stage, and stage of tooth follicle, either terminal or mature.

It is at the bell stage the enamel organ presents a new layer—the intermediate layer—located between the inner epithelium and the stellate reticulum. Histogenesis or apposition of the dental hard tissues (enamel and dentin) begins at the end of the bell stage. Cells forming the inner epithelium, also called pre-ameloblasts, differentiate from young ameloblasts and will be responsible for enamel production.

Enamel, also known as adamantine substance or tissue, is located in the coronal portion covering the underlying dentin. It originates from the enamel organ, and is the hardest tissue of the body. It consists of enamel prisms, which are highly mineralized, located from the dentin-enamel junction (DEJ) to the external surface in contact with the oral cavity. Hydroxyapatite crystals form the inorganic enamel matrix and represents 95% of it. These are composed of calcium phosphate and are densely compacted. The organic matrix of enamel is protein in nature;

sin embargo, en su composición química no participa el colágeno. Está en menor proporción y representa el 0,36-2%.

El estadio de campana será de gran importancia para la formación de la morfología coronal por acción de señales específicas del ectomesénquima adyacente sobre este epitelio interno. Este patrón coronal se determinará previo a la aposición y mineralización de los tejidos dentales.

El ameloblasto es la célula encargada de la secreción de la matriz orgánica, y durante la formación del germe dentario atraviesa una serie de etapas o estadios, las cuales se caracterizan por presentar cambios funcionales y ultraestructurales que dependen de la actividad celular, de acuerdo a los procesos de formación o maduración del esmalte. Por tal motivo encontramos cuatro etapas importantes para el desarrollo del esmalte: la fase pre-secretora, secretora, de transición y maduración.<sup>2</sup>

El desarrollo del esmalte o amelogénesis comprende dos etapas: la primera es la formación de una matriz orgánica extracelular y la segunda es el proceso de mineralización de esta matriz, la cual comprende a su vez la formación y elongación de los cristales y la eliminación de la matriz orgánica y la maduración de los cristales.

Los ameloblastos se diferencian a partir del epitelio interno del órgano del esmalte. Antes de que se lleve a cabo este proceso, se requiere de la presencia de la dentina. A este estadio se le denomina presecretorio, donde antes de la formación mineral se requiere la deposición de predentina por los odontoblastos en la futura unión amelodentinal.

En el estadio secretorio, se caracteriza porque los preameloblastos se transforman en células secretoras, diferenciadas, muy especializada y ha perdido la capacidad de hacer mitosis. Son células cilíndricas de 60  $\mu\text{m}$  de altura aproximadamente. A nivel ultraestructural presenta abundantes mitocondrias, complejo de Golgi, RER distribuido por toda la célula y más desarrollado en el polo proximal. Presenta microfilamentos de tubulina,  $\alpha$ -actinina, vinculina y prequeratinas. Además, presenta vesículas llamadas

however, collagen is not involved in its chemical composition, having a reduced proportion representing 0.36-2%.

The bell stage will be of great importance for the formation of the coronal morphology by the action of specific signs of adjacent ectomesenchyme on this inner epithelium. This coronal pattern will be determined prior apposition and mineralization of dental tissues.

Ameloblasts are cells responsible for the secretion of organic matrix, and during the formation of the tooth germ they go through a series of steps or stages, which are characterized by functional and ultrastructural changes dependent on cell activity, according to the formation processes or enamel maturation. This is why there are four important stages in the development of enamel: pre-secretory, secretory, transition, and maturation.<sup>2</sup>

Enamel development or amelogenesis includes two stages: a) the formation of extracellular organic matrix and b) the process of matrix mineralization, which at the same time includes the formation and elongation of crystals and the elimination of organic matrix and crystals maturation.

Ameloblasts differentiate from the inner epithelium of the enamel organ. For this process to take place, it requires the presence of dentin. This stage is called pre-secretory, which prior to the formation of mineral requires pre-dentine deposition by odontoblasts in the future dentin-enamel junction.

During the secretory stage, pre-ameloblasts are transformed into secretory differentiated cells, which are highly specialized and have lost the ability to undergo mitosis. They are columnar cells of nearly 60  $\mu\text{m}$  in height. At the ultrastructural level, there are abundant mitochondria, Golgi complex, and RER distributed throughout the entire cell and more developed in the proximal pole. It presents microfilaments of tubulin,  $\alpha$ -actinin, vinculin, and pre-keratins. In addition, it has vesicles called

cuerpos ameloblásticos o cuerpos adamantinos, las cuales son formaciones de tipo granular, y son precursores de la matriz orgánica del esmalte. Su contenido no se conoce con exactitud, se cree que son de naturaleza proteica y algunos autores consideran que pueden tener sales minerales cálcicas en forma soluble.

Una vez estos cuerpos ameloblásticos son formados en el complejo de Golgi, migran al polo proximal del ameloblasto, donde se liberan contra la dentina formada. Es así que se forma la primera capa de esmalte aprismático. Los ameloblastos se alejan de la superficie de la dentina y se forman los procesos de Tomes, estructura que se encarga de la formación de los cristales. Mientras esto ocurre, el ameloblasto produce cuatro proteínas diferentes y las secreta en la matriz de esmalte. Tres de estas son proteínas estructurales y una es una proteinasa. La amelogenina (AMELX) representa un 80-90% de la matriz orgánica, y la ameloblastina (AMBN) y enamelin (ENAM) representan el 5% y 3-5% respectivamente, y la proteinasa, que es una metaloproteinasa de matriz-20 (MMP-20, enamelysina), que está en cantidades variables. Finalizando la etapa secretoria, se alcanza el espesor total de la capa de esmalte.

El inicio del estado de transición del diente en desarrollo varía según el diente, al igual que entre las especies. En esta etapa el ameloblasto reduce su tamaño, aumentan su diámetro transversal y complejo de Golgi y su RER disminuye de volumen. El proceso de Tomes desaparece y en el polo proximal aparecen microvellosidades e invaginaciones tubulares. Estas estructuras les permiten tener capacidad absorptiva y eliminar agua y matriz orgánica del esmalte. Esto facilita el posterior aumento de componente orgánico y la transformación a un esmalte maduro. En este estadio los ameloblastos sintetizan ATPasa dependiente del calcio y enzimas lisosómicas y fosfatasa alcalina. En la fase de transición muere el 25% de los ameloblastos y en la etapa de maduración muere el otro 25%.

Cuando se ha conformado el esmalte maduro, el ameloblasto entra en estado de regresión,

ameloblastic bodies or enamel bodies, which are granular formations and are precursors of the organic matrix of the enamel. Their content is not known with accuracy, but they are believed to be protein in nature and some authors consider that they can have mineral calcium salts in soluble form.

Once these ameloblastic bodies are formed in the Golgi complex, they migrate to the proximal pole of ameloblast, where they are released towards the formed dentin. This is how the first layer of aprismatic enamel forms. Ameloblasts move away from the surface of the dentin forming the Tomes processes—a structure responsible for the formation of crystals—. While this happens, the ameloblast produces four different proteins and secretes them into the enamel matrix. Three of these are structural proteins and one is a proteinase. Amelogenin (AMELX) represents 80-90% of the organic matrix, while ameloblastin (AMBN) and enamelin (ENAM) represent 5 and 3-5% respectively. Proteinase, which is a matrix metalloproteinase 20 (MMP-20, enamelysin) is in variable amounts. The total thickness of the enamel layer is achieved at the end of the secretory stage.

The beginning of the transitional stage varies among species and according to the developing tooth. At this stage, the ameloblast reduces in size, while its transverse diameter and Golgi complex increase and its RER decreases in volume. The Tomes' process disappears and in the proximal pole there are microvilli and tubular invaginations. These structures allow them to have absorptive capacities and to eliminate water and organic matrix from the enamel. This facilitates the subsequent increase of organic component and the transformation to mature enamel. At this stage, ameloblasts synthesize calcium-dependent ATPase as well as lysosomal enzymes and alkaline phosphatase. 25% of ameloblasts die in the transition phase, and another 25% dies in the maturation stage.

When the mature enamel has formed, the ameloblast enters in a state of regression,

las células se fusionan con el resto de las capas del órgano del esmalte. Estos estratos conformarán una capa estratificada llamada epitelio reducido del esmalte, cuya función será la protección del esmalte maduro. Si este epitelio se degenera prematuramente, no puede haber erupción dentaria.<sup>3</sup>

## **Metaloproteinasa de Matriz 20 (MMP-20)/ Enamelisina**

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de proteinasas secretadas como proenzimas o zimógeno inactivo responsables de la degradación de componentes de la matriz extracelular (MEC), y su actividad está regulada por sus inhibidores endógenos o TIMPs. Las MMPs participan en procesos normales del desarrollo embrionario, en la reproducción (ciclo endometrial) y el mantenimiento (remodelado del hueso), y en procesos patológicos como la destrucción del tejido (enfermedad periodontal, caries, inflamación pulpar) y enfermedades fibróticas (esclerosis múltiple). Los miembros de esta familia se han clasificado en seis grupos diferentes, de acuerdo a su organización estructural y funcional.<sup>4</sup>

Al grupo de las colagenasas pertenecen la MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18. Estas enzimas se encargan de degradar colágeno intersticial I, II, y III y otros componentes de la matriz extracelular. El siguiente grupo son las gelatinasas, la gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9). Estas se encargan de la degradación de colágenos desnaturalizados y laminina. El tercer grupo son las estromelisin; estromelisina 1 (MMP-3) y estromelisina 2 (MMP-10) y degradan diferentes componentes de la MEC. Entre estos encontramos fibronectina, laminina, proteoglicanos y colágenos no fibrilares IV, V, IX, y X. Las matrilisin se caracterizan por la ausencia de un dominio de hemopexina, y pertenecen la matrilisina 1 (MMP-7) y matrilisina 2 (MMP-26). Las metaloproteinasas tipo membrana (MT-MMPs) son: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25. Por último, encontramos siete MMPs que no han sido

and the cells merge with the rest of the layers of the enamel organ. These strata form a stratified layer known as reduced enamel epithelium, functioning as protection of mature enamel. If this epithelium degenerates prematurely, there can be no tooth eruption.<sup>3</sup>

## **Matrix metalloproteinase 20 (MMP-20) / Enamelysin**

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of proteinases secreted as proenzymes or inactive zymogen responsible for the degradation of extracellular matrix (ECM) components, and their activity is regulated by its endogenous inhibitors or TIMPs. MMPs are involved in normal processes of embryonic development, in reproduction (endometrial cycle) and maintenance (bone remodeling), as well as in pathological processes such as the destruction of tissue (periodontal disease, tooth decay, pulp inflammation) and fibrotic diseases (multiple sclerosis). Members of this family have been classified into six groups, according to their structural and functional organization.<sup>4</sup>

The group of collagenases belong to the MMP-1, MMP-8, MMP-13, and MMP-18. These enzymes are responsible for degrading interstitial collagen I, II, and III and other components of the extracellular matrix. The next group is the gelatinases: gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9). These are responsible for the degradation of denatured collagen and laminin. The third group are the stromelysins: stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10), which degrade various components of the MEC. These include fibronectin, laminin, and proteoglycans and non-fibrillar collagens IV, V, IX, and X. Matrilysins are characterized by the absence of hemopexin domain, and include the matrilysin 1 (MMP-7) and matrilysin 2 (MMP-26). Membrane-type Metalloproteinases (MT-MMPs) are: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, and MMP-25. Finally, there are seven MMPs that have

clasificadas en ninguno de los grupos mencionados, entre estas encontramos la enamelinina (MMP-20) que se encarga de la degradación de la amelogenina.<sup>5</sup>

En los últimos años se demostró que el componente proteico del esmalte maduro disminuía significativamente en comparación con el esmalte inmaduro. En el proceso de amelogénesis, encontramos los siguientes componentes de la matriz orgánica del esmalte: la tufelina, o también llamada proteína de flecos, y la sialofosfoproteína dentinaria (DSP) en la unión amelodentinaria. Posteriormente, se producen las amelogeninas, que conforman el 90% de la materia orgánica y van disminuyendo a medida que el esmalte avanza hasta su estado de maduración. La enamelinina y la ameloblastina se forman en último lugar, y en este momento participan las MMPs presentes en la fase secretora de los ameloblastos y proteasas de serina, las cuales se asocian en la parte superficial de los cristales de esmalte y en la fase de maduración.

Múltiples investigaciones sugieren que, en el esmalte en desarrollo, las MMPs intervienen en un cambio de los componentes de la matriz orgánica cuando los ameloblastos pasan de la fase secretora a la fase de maduración. Se ha demostrado que la MMP-20 tiene habilidad para escindir la amelogenina y enamelinina y es la única MMP durante la fase secretora. También es capaz de escindir la pro-KLK4 (peptidasa relacionada con la calicreína 4) para producir la serinproteasa KLK4 activa. También se demostró que la MMP-20 degrada E-cadherina, caseína y/o gelatina, agregano, colágeno tipo IV, V, tenascina-C, laminina-1, laminina-5.<sup>6</sup>

La enamelinina o MMP-20 fue inicialmente clonada del órgano del esmalte de porcino, además por técnicas de hibridación *in situ* se ha demostrado que tanto los ameloblastos como odontoblastos presentan transcritos de MMP-20.<sup>7</sup> Asimismo, muy pocas líneas celulares expresan MMP-20, como el diente en desarrollo y el intestino grueso, pero no se halló expresión en tejidos como el intestino delgado, riñón, hígado, páncreas, cerebro, pulmón, bazo o estómago.<sup>8</sup> Esta MMP fue localizada en algunas condiciones patológicas

not been classified in any of the abovementioned groups, including enamelin (MMP-20) which is responsible for amelogenin degradation.<sup>5</sup>

In recent years, it has been shown that the protein component of mature enamel significantly decreases in comparison with immature enamel. During amelogenesis, there exist the following components of the organic matrix of enamel: tuftelin, also known as fringe protein, and dental sialophosphoprotein (DSP) in the amelodentinal junction. Amelogenins appear later, making up 90% of the organic matter and decreasing as the enamel progresses to its maturation stage. Enamelin and ameloblastin form in the last place, with participation of the MMPs that are present in the secretory phase of ameloblasts and serine proteases, which are associated in the superficial part of enamel crystals and the maturation stage.

Several studies suggest that, in developing enamel, MMPs participate in a change of the components of the organic matrix when ameloblasts move from the secretory phase to the maturation phase. It has been shown that MMP-20 has the ability to split amelogenin and enamelin and is the only MMP during the secretory phase. It is also capable of splitting the pro-KLK4 (4 kallikrein-related peptidase) to produce active KLK4 serinprotease. It has also been shown that the MMP-20 degrades E-cadherin, casein and/or gelatin, agregano, type IV and type V collagen, tenascin-C, laminin-1, and laminin-5.<sup>6</sup>

Enamelin or MMP-20 was originally cloned from porcine enamel organ, and by *in situ* hybridization techniques it has been shown that both ameloblasts and odontoblasts present transcripts of MMP-20.<sup>7</sup> Also, very few cell lines express MMP-20, such as tooth development and the large intestine, but its expression has not been found in tissues such as small intestine, kidney, liver, pancreas, brain, lung, spleen, or stomach.<sup>8</sup> This MMP was found in some pathological

como en quistes odontogénicos calcificantes, tumores odontogénicos, células del carcinoma de lengua humana.<sup>9-11</sup> Por estas razones, es considerada una MMP específica del diente.

En las últimas décadas se ha destacado la importancia de la enamelysina en el desarrollo dentario, específicamente en la formación del esmalte, y cómo alteraciones en su expresión pueden llevar a la formación de patologías como la amelogenénesis imperfecta.<sup>12-13</sup> Por tal motivo, el objetivo de esta revisión es clasificar los diferentes estudios y técnicas de laboratorio empleadas, que demuestren la participación de enamelysina en el desarrollo dentario y su relación con patologías en la formación del esmalte.

## MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática de la literatura con las siguientes bases bibliográficas: PubMed, Science-Direct, Hinari y SciELO, con las palabras clave *enamel development*, *tooth development*, *enamelysin*, *MMP-20*, *amelogenesis imperfecta*, con el fin de clasificar los diferentes estudios relacionados con la participación de MMP-20 en el desarrollo dental y los métodos utilizados para detectar su expresión, entre los años de 2009 a 2014.

## RESULTADOS

En esta revisión sistemática se presentan los diferentes estudios, tanto en modelos *in vitro*, cultivos celulares, estudios en animales como en humanos, relacionados con enamelysina y desarrollo dentario. Se tuvieron en cuenta 19 referencias. Los resultados se presentan en la tabla 1.

conditions such as calcifying odontogenic cysts, odontogenic tumors, and cells of human tongue carcinoma.<sup>9-11</sup> For these reasons, it is considered an MMP specific to tooth.

The importance of enamelysin in tooth development has been highlighted in recent decades, specifically in the formation of enamel, and in how alterations in their expression can lead to the formation of pathologies such as amelogenesis imperfecta.<sup>12-13</sup> For this reason, the objective of this review is to classify the different studies and laboratory techniques, showing the participation of enamelysin in tooth development and its relation to pathologies in the formation of enamel.

## METHODS

A systematic review was conducted with the following bibliographic databases: PubMed, Science-Direct, Hinari, and SciELO, using these keywords: *enamel*, *tooth development*, *enamelysin*, *MMP-20*, *amelogenesis imperfecta*, in order to classify the different studies related to the participation of MMP-20 in tooth development and the methods used to detect its expression, between the years of 2009 and 2014.

## RESULTS

This systematic review presents the different studies in *in vitro* models, cell cultures, and animal studies as well as in humans, related to enamelysin and tooth development. 19 references were taken into account. The results are listed in table 1.

Tabla 1. Estudios publicados en la literatura sobre los diferentes métodos empleados para detectar la expresión de MMP-20 en el desarrollo dentario

Autores	Año	Objetivo del estudio	Muestra	Métodos	Resultados
<b>Shimada y colaboradores (28)</b>	2009	Investigar la localización de MMPs en la dentina cariosa	5 terceros molares humanos con lesiones de caries de dentina de pacientes entre 32-59 años	Inmunomarcación enzimática, microscopía electrónica de barrido	MMP-2 se distribuye en la dentina normal y la dentina cariosa, los índices de marcación de MMP-8 y MMP-9 decrecieron en la dentina cariosa interna, comparada con los niveles normales de dentina, pero se intensificó de nuevo en la región externa de caries. La marcación de MMP-20 fue más alta en la dentina normal
<b>Nagano y colaboradores (14)</b>	2009	Examinar la habilidad de MMP-20 y Kik4 para catalizar las uniones que generan P173 y los productos de unión de LRAP que se acumulan en el estadio secretor de esmalte	Gérmenes dentales de molares permanentes de mandíbulas y maxilares de cerdos de 6 meses de edad	Purificación y caracterización de LRAP (proteína amelogenina rica en leucina), TRAP (polipéptido de amelogenina rico en tirosina), Kik4 y MMP-20, electroforesis (SDS-PAGE), Western blot, zimografía, y espectrometría de masa	MMP-20 se une a secuencias de amelogenina después Pro, Ser, His, Ala y Trp. Estas uniones generarán mayores productos de unión que se acumulan en el estadio secretor del esmalte en porcino: amelogeninas 23kDa, 20-kDa, 13-kDa, 11-kDa y 6-kDa. MMP-20 se une a productos de LRAP. Entre estos sitios de unión clave, Kik4 se pudo unir solo después de His.
<b>Chun y colaboradores (15)</b>	2010	Probar la hipótesis que MMP-20, pero no Kik4, pueden catalizar las uniones que generan los productos de ameloblastina que acumulan durante el estadio secretorio de la amelogénesis, y presentar una hipótesis sobre la progresión de la unión de ameloblastina puede ocurrir in vivo	Segundos molares no erupcionados de cerdos de 6 meses de edad	Expresión, purificación y caracterización de ameloblastina recombinante (rAmbn), aislamiento de MMP-20 recombinante (rMMP-20) y Kik4, digestión de rAmbn con rMMP-20 y Kik4, secuenciación de N-terminal, electroforesis (SDS-PAGE), Western blot, espectrometría de masa, cromatografía líquida de alta eficacia	MMP-20 se une a cada péptido exacto en sitios correspondientes de uniones de ameloblastina catalizadas in vivo. La MMP-20 es la enzima que procesa la ameloblastina durante el estadio secretorio de la amelogénesis
<b>Lee y colaboradores (22)</b>	2010	Descubrir los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la MMP-20	Mandíbulas y maxilares de ratones de 16 días de edad	Inmunohistoquímica, RT-PCR, cultivo celular ALC, microscopía de fluorescencia, expresión y purificación de proteínas ODAM recombinante de rata (rodam), Western blot, ensayo de luciferasa, ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP), zimografía de caseína, tinción por alizarina	En la fase secretora de la amelogénesis ODAM se localizó en el núcleo y citoplasma de ameloblastos y en la etapa de maduración se observó en el citoplasma y en la interfaz entre ameloblastos y la capa de esmalte, pero no en el núcleo. ODAM se detectó en la línea celular del linaje ameloblástico (ALC), que coincidió con la etapa de maduración de la amelogénesis. La expresión de Runx2 y ODAM nuclear, correlacionan con la expresión de MMP-20 en ALC. La expresión de MMP-20 acelera el procesamiento de amelogenina durante la mineralización del esmalte. Se sugiere que Runx2 regula la expresión de ODAM y que ODAM nuclear tiene una función reguladora importante en la mineralización del esmalte a través de la regulación de la MMP-20
<b>Sun y colaboradores (16)</b>	2010	Examinar la hipótesis de que la hidroxipatita (HAP) puede afectar la proteólisis de amelogenina por MMP-20 y Kik4	Amelogenina de cerdo recombinante (rP172), MMP-20 recombinante de cerdo (rpMMP-20)	Cromatografía líquida de alta eficacia, proteólisis en presencia de HAP	Se encontró una relación distinta de dosis dependiente entre la cantidad de HAP presente en la mezcla de proteólisis y el rango de degradación por rpMMP-20, mientras que el efecto de HAP en proteólisis de rP172 o rP148 por rhKik4, fue menos prominente



Autores	Año	Objetivo del estudio	Muestra	Métodos	Resultados
<b>Yamakoshi y colaboradores</b> (17)	2011	Analizar proteínas de esmalte y proteasas en ratones silvestres, MMP-20 nulo, KLK4 nulo y doble nulo de Mmp-20/KLK4 en los primeros molares maxilares de ratón en el estadio secretor, estadio de maduración y antes de la erupción de los dientes	Ratones silvestres, knockout KLK4, MMP20 cepa C57BL/6J, ratones doble nulos Mmp20/Klk4	Genotipificación por PCR, histología, inmunohistoquímica, cromatografía líquida de alta eficacia, zimografía, Western blot, electroforesis con gel de poliacrilamida	Solo amelogeninas intactas y ameloblastina fueron observadas en el estadio secretor de esmalte para el ratón nulo de MMP-20, mientras que la matriz del estadio secretor del ratón nulo de KLK4 fue idéntico al ratón silvestre. Mayor contenido de matriz residual fue observado en el ratón doble nulo comparado con cualquiera de los nulos individuales.
<b>Bartlett y colaboradores</b> (26)	2011	Demostrar los cambios en estado secretor de ameloblastos usando un modelo knockout de MMP-20	Incisivos de ratón adulto cepa C57BL/6	Microscopía electrónica de barrido, microscopía óptica con azul de toluidina	En el ratón knockout de MMP-20 se encuentran: forma de nodulos calcificados durante el estadio de maduración en el esmalte en desarrollo, los ameloblastos en este estadio cubren completamente estos nodulos, el esmalte se conecta solo vagamente a la dentina subyacente y el patrón de los prismas de esmalte es una malformación severa
<b>Uskokovic y colaboradores</b> (20)	2011	Obtener información sobre el mecanismo de amelogenesis a escala molecular involucrado en el diseño de un sistema de valoración biomimético	Amelogenina de longitud completa (rH174) y MMP-20 fueron sintetizadas previamente vía expresión en BL21(DE3) plysS Escherichia coli	SDS-PAGE MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz)	La proteólisis ejerce una nucleación adicional y el efecto promotor del crecimiento. La hidrólisis de amelogenina de longitud completa por la MMP-20 disminuye el tiempo crítico necesario para la proteína, y péptidos para adherirse y para cubrir el sustrato
<b>Kuchler y colaboradores</b> (32)	2011	Investigar la asociación posible entre MMP1, MMP3 y MMP-20 en la agenesia dental	Ciento sesenta y siete familias nucleares de dos diferentes poblaciones fueron analizadas, 116 de Brasil y 51 de Turquía. Los participantes tenían al menos un diente ausente	Muestras de DNA fueron obtenidas y genotipificadas usando química de Taqman. Además, MMP20 fue seleccionada para reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real con SYBR Green en el desarrollo dental del ratón	Asociaciones entre las agenesias dentales y MMP1 (p= 0.007) y MMP20 (p= 0.03) fueron encontradas en las familias brasileñas  Conclusión: MMP-1 y MMP-20 juegan un rol importante en la agenesia dental en humanos
<b>Bromley y colaboradores</b> (19)	2012	Usar la calcita como un sistema mineral para examinar los efectos de la digestión de proteínas durante el crecimiento del cristal y, por lo tanto, proporcionar información sobre el papel preciso de la MMP-20 en el desarrollo de esmalte	Amelogenina humana recombinante (rhMMP-20), amelogenina recombinante porcina (rP172)	Expresión y purificación de proteínas, electroforesis en gel, espectrometría ultravioleta, visible, cristalización calcita, digestión amelogenina por rhMMP20 durante cristalización, microscopía electrónica de barrido y micro-espectroscopía Raman, microscopía de fuerza atómica	La amelogenina de longitud completa se une fuertemente, la amelogenina truncada se une débilmente y el solo extremo C-terminal tiene la interacción más débil. En cuanto a crecimiento de cristales de esmalte, la prevención de la oclusión en cristales de esmalte en maduración podría ser un gran beneficio resultante de la escisión selectiva de amelogenina en el extremo C-terminal por la MMP-20
<b>Lee y colaboradores</b> (23)	2012	Investigar la expresión celular y localización subcelular de ODAM en ameloblastos, odontoblastos, osteoblastos y varios tipos de células cancerígenas para determinar las correlaciones entre ODAM y MMP-20, y definir nuevos roles funcionales de ODAM	Molares de ratón postnatales P0, P3, P10, P14, células en cultivo ALC, LS8, MDPC-23, MG-63, células H1299, AGS, HeLa, MCF-7, células cancerígenas SK-BR y células de cáncer epitelial de mama MCF-10A	Inmunohistoquímica, inmunofluorescencia indirecta por cultivo, Western blot	ODAM fue localizada en ameloblastos, odontoblastos y osteoblastos in vivo e in vitro. Además, ODAM fue localizada en el citoplasma y el núcleo de ameloblastos y odontoblastos expresando MMP-20, pero solo en el citoplasma de osteoblastos que no expresaban MMP-20. Estos resultados sugieren que el patrón de expresión y localización subcelular de ODAM es altamente variable y dependiente de los tipos celulares y sus estadios de diferenciación, y la correlación funcional existente entre ODAM y MMP-20. Se provee la primera evidencia de ODAM en múltiples compartimientos celulares de diferenciación odontogénica y líneas celulares cancerígenas con importantes implicaciones funcionales

Autores	Año	Objetivo del estudio	Muestra	Métodos	Resultados
<b>Takahashi y colaboradores (18)</b>	2012	Examinar la distribución y la expresión de amelogenina, ameloblastina, MMP-20 y KLK-4 después de cultivar en una mezcla de células epiteliales de Malassez y fibroblastos del ligamento periodontal para obtener contacto celular directo	Terceros molares fueron coleccionados de 28 individuos (21-28 años). Cultivos celulares de explantes de tejidos del ligamento periodontal conteniendo células epiteliales de Malassez y fibroblastos del ligamento periodontal	Inmunohistoquímica, hibridación in situ, RT-PCR	Los resultados de inmunohistoquímica revelan pobre expresión de amelogenina, ameloblastina, MMP-20 y KLK4 en células epiteliales de Malassez co-cultivadas con fibroblastos del ligamento periodontal. La hibridación in situ y RT-PCR confirman expresión de mRNA de estos factores en células co-cultivadas comparadas con las células control. mRNA de MMP-20 no se expresó en las células control. Estos resultados sugieren que las interacciones epitelio mesenquimales promueven la diferenciación de células epiteliales de Malassez humanas y la introducción de proteasas de matriz de esmalte facilitan la degradación de proteínas de matriz de esmalte
<b>Tannure y colaboradores (29)</b>	2012	Evaluar la asociación entre MMP-20 y la experiencia de caries en los niños brasileños	Niños no relacionados de 5-14 años con o sin caries n=388	Examen clínico odontológico, RT-PCR,	De 388 sujetos, 161 fueron niños libres de caries. No hay diferencias entre los niveles de caries y la distribución genotípica en la cohorte total. Diferencias en la distribución genotípica fueron observadas en los niños libres de caries vs. niños con caries en caucásicos (p=0,03). El análisis de regresión, ajustado para el genotipo y etnicidad, confirma que la ingestión de dulces entre las comidas aumenta el riesgo de presentar lesiones de caries (p= 0,00001; OR = 2,33; 95% CI 1,53-3,54). Se concluye que la variación en MMP-20 puede estar asociada con la experiencia de caries, principalmente en sujetos caucásicos con pobres hábitos de higiene oral.
<b>Khan y colaboradores (21)</b>	2013	Estudiar la proteólisis de la cinética de enzimas de MMP-20 de la longitud completa amelogenina recombinante humana bajo diferentes composiciones minerales	Amelogeninas recombinantes humanas (rH174, rH163 y rH146)	Electroforesis en gel (SDS-PAGE) y MAL-DI-TOF MS	Se observó que los iones minerales afectan el patrón de escisión y la cinética de las enzimas de la hidrólisis de rH174. Fuera de las cinco composiciones de iones minerales seleccionadas, MMP-20 fue más eficiente en altas concentraciones de calcio, mientras que fue el más bajo en altas concentraciones de fosfato, y altas concentraciones de calcio y fosfato. Estos estudios in vitro muestran que la química de las soluciones proteicas pueden alterar significativamente el tratamiento de amelogenina por MMP-20, que puede tener efectos significativos en el ensamblaje de la matriz in vivo y posteriormente en la mineralización de fosfato de calcio
<b>Yamakoshi y colaboradores (25)</b>	2013	Investigar la activación de KLK4 por MMP-20 y la inactivación de MMP-20 por KLK4	MMP-20 nativa de cerdo y KLK4 fueron extraídas de gérmenes dentales de molares permanentes de mandíbulas de cerdo de 5 meses. MMP-20 recombinante humana (rhMMP-20) y KLK4 (rh-proKLK4)	Zimografía en gel de caseína, densitometría, cromatografía líquida de alta resolución, degradación de Edman, electroforesis en gel (SDS-PAGE), Western blot	Ambas la pMMP20 y rhMMP20 activan la rh-proKLK4 por escisión en la unión pro- péptido-enzima usada in vivo. La pMMP-20 fue inactivada por pKLK4 bajo condiciones fisiológicas pero no bajo condiciones levemente ácidas. Ambas pKLK4, rhKLK4, escinden MMP-20 principalmente en dos sitios en el dominio catalítico de MMP-20. Conclusiones: la MMP-20 activa proKLK4 y KLK4 inactiva MMP-20 in vitro, y estas acciones es probable que ocurran durante la formación de esmalte in vivo.

Autores	Año	Objetivo del estudio	Muestra	Métodos	Resultados
<b>McGuire y colaboradores (30)</b>	2014	Demostrar que los dientes irradiados pueden contener metaloproteinasas de matriz activas	Dientes extraídos de pacientes con cáncer oral tratados con radioterapia y de sujetos sanos	Extracción de proteínas, cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-tandem MS), Western blot, zimografía en caseína o en gel de gelatina, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia	MMP-20 es un componente resistente a la radiación de las coronas dentales maduras, enriquecidas en la dentina-esmalte. Se especula que la MMP-20 cataliza la degradación de matriz orgánica en este sitio y puede llevar a la delaminación de esmalte asociada con la radioterapia del cáncer oral
<b>Horvath y colaboradores (31)</b>	2014	Examinar las pruebas de selección positiva en regiones cis-regulatorias de AMELX, AMBN, ENAM y MMP-20. Y contrastar los cambios en la secuencia humana con otros homínidos (chimpancés, gorilas, orangutanes, gibones y macacos Rhesus) asociados entre la formación de esmalte y las mutaciones de estos cuatro genes en humanos	Secuencias genómicas de humanos (Homo sapiens, GRCh/hg19), chimpancés (Pan troglodytes, CHIMP 2.1.4), gorilas (Gorilla, gorilla, gorGOR3.1), orangutanes (Pongo abelii, PPG2), gibones (Nomascus leucogenys Nieu1.0) y macaco Rhesus (Macaca Mulatta, MMUL_1)	Análisis de secuencias genómicas, PCR, análisis de selección positiva	No se encontró evidencia para la selección positiva en las regiones codificantes para proteínas en alguno de estos genes. En contraste, se encontró una fuerte evidencia para selección positiva en las regiones 5' y 3' de las regiones de MMP-20 y ENAM a lo largo del linaje de los humanos, y en ambos el extremo 5' y 3' de las regiones de MMP-20 a lo largo del linaje que lidera a los chimpancés. Cambios no codificantes y su potencial para la regulación diferencial por factores de transcripción conocidos regulan el desarrollo del diente, pueden ofrecer una visión a los mecanismos que permiten cambios evolutivos rápidos en el grosor del esmalte entre especies relacionadas cercanamente
<b>Shin y colaboradores (27)</b>	2014	Determinar si la introducción de transgenes que expresan bajos, medios o altos niveles de MMP20 en el ratón knockout puede revertir el fenotipo de esmalte murino a la normalidad	RNA extraído de órgano del esmalte de incisivos o primeros molares de ratones postnatales de 5 días, cepa C57BL/6, ratones transgénicos MMP-20	PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR), inmunoblot, zimografía, electroforesis, tomografía microcomputarizada, microscopía electrónica de barrido, prueba de microdureza vickers	La expresión de los niveles de MMP-20 debe estar dentro de un rango específico para el desarrollo normal del esmalte. La creación de una capa de esmalte de grosor normal puede ocurrir en una amplia gama de niveles de expresión de MMP-20, pero la adquisición de una dureza normal de esmalte tiene un rango más estrecho. La sobre expresión de MMP-20 resulta en una disminución de la dureza de esmalte, esto sugiere que existe un balance entre la escisión y la longitud completa de proteínas de esmalte esenciales para la formación de una capa de esmalte apropiadamente dura
<b>Gao y colaboradores (24)</b>	2014	Explorar el rol del factor-2C potenciador de miocito (MEF2C), un factor de transcripción clave en el desarrollo craneofacial en la expresión genética de MMP-20 inducida por el TGFβ1	ALCs (línea celular de ameloblastos)	Ensayo de expresión de genes reporteros transitoria en cultivo de ALCs, herramientas bioinformáticas, ensayo de movilidad electroforética e inmunoprecipitación de cromatina	TGFβ1 induce la expresión de MMP-20 en ALCs, fue regulado por el sitio de unión MEF2 en el promotor de MMP20 y, por lo tanto, mediado por la vía de señalización de MEF2C

Abreviaturas: SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida), ALCs (Línea celular de ameloblastos), MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz), ODAM (proteína asociada a ameloblastos odontogénicos), RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

Table 1. Studies published in the literature on the different methods used to detect the expression of MMP-20 in tooth development

Autors	Year	Objetive	Sample	Methods	Results
<b>Shimada and collaborators (28)</b>	2009	Study the location of MMPs in carious dentine	5 third human molars with lesions of caries of dentine in patients aged 32-59 years	Enzymatic immunolabeling, scanning electron microscopy	MMP-2 is distributed in normal dentin and carious dentine, indices of MMP-8 and MMP-9 levels decreased in internal carious dentin, compared with normal levels of dentin, but intensified again in the region outside of tooth decay. MMP-20 marking was higher in normal dentin
<b>Nagano and collaborators (14)</b>	2009	Examine the ability of MMP-20 and Kik4 to catalyze connections generated by P173 and the products from the union of LRAP that accumulate during the secretory stage of enamel	Molar permanent germs in mandibles and jaws of pigs from 6 months of age	Purification and characterization of LRAP (protein Leucine-rich amelogenin), TRAP (amelogenin tyrosine-rich polypeptide), electrophoresis, Kik4 and MMP-20 (SDS-PAGE), Western blot, zymography, and mass spectrometry	MMP-20 joins amelogenin sequences after Pro, Ser, His, Ala, and Trp. These unions generate more products of union that accumulate in the secretory stage of porcine enamel: amelogenins 23kDa, 20-kDa, 13-kDa, 11-kDa and 6-kDa. MMP-20 joins LRAP products. Among these key binding sites, Kik4 could join only after His.
<b>Chun and collaborators (15)</b>	2010	To test the hypothesis that MMP-20, but not Kik4, can catalyze joints that generate products of ameloblastin that accumulate during the secretory stage of amelogenesis and present a hypothesis about the progression of the union of ameloblastin may occur <i>in vivo</i>	Second non-erupted molars of pigs from 6 months of age	Expression, purification and characterization of recombinant ameloblastin (rAmbn), insulation of recombinant MMP-20 (rMMP-20), digestion of rAmbn recombinant rMMP-20 and Kik4, sequencing of the N-terminal, electrophoresis (SDS-PAGE), Western blot, high performance liquid chromatography, mass spectrometry	MMP-20 joins each exact peptide in corresponding places of joints of ameloblastin catalyzed <i>in vivo</i> . MMP-20 is the enzyme that processes ameloblastin during the secretory stage of the amelogenesis.
<b>Lee and collaborators (22)</b>	2010	Discover the molecular mechanisms responsible for the regulation of MMP-20	Jaws and mandibles of mice of 16 days of age	Immunohistochemistry, RT-PCR, cell culture ALC, microscopy, fluorescence, expression and purification of proteins ODAM rat recombinant (rodam), Western blot, test of luciferase, trial of the chromatin immunoprecipitation (CHIP), casein zymography, staining by Alizarin)	In the secretory phase of amelogenesis, ODAM is located in the nucleus and cytoplasm of ameloblasts and the stage of maturation was observed in the cytoplasm and in the interface between ameloblasts and enamel layer, but not in the nucleus. ODAM was detected in the ameloblast-lineage cell line (ALC), which coincided with the stage of maturation of amelogenesis. The expression of Runx2 and nuclear ODAM correlated with the expression of MMP-20 in ALC. The expression of MMP-20 speeds up the processing of amelogenin during the mineralization of enamel. It is suggested that Runx2 regulates the expression of ODAM and that nuclear ODAM has an important regulatory role in the mineralization of enamel through regulation of MMP-20
<b>Sun and collaborators (16)</b>	2010	Examining the hypothesis that hydroxyapatite (HAP) can affect the proteolysis by MMP-20 and Kik4 amelogenin	Amelogenin of recombinant (rP172), recombinant MMP-20 pork of pig (rpMMP-20)	Liquid chromatography high efficiency, proteolysis in the presence of HAP	A different dose-dependent relationship was found between the amount of PAHs present in the mixture of proteolysis and the range of degradation by rpMMP-20, while the effect of HAP in proteolysis of any rP172 or rP148 by rhKLK4 was less prominent
<b>Yamakoshi and collaborators (17)</b>	2011	Analyze proteins in enamel and proteases in wild mice, null MMP-20, null KLK4 and double null of MMP-20/KLK4 in first maxillary molars of mice in the secretory stage, the maturation stage and before teeth eruption	Wild mice, KLK4 knockout, MMP20 strain C57BL/6J, double null mice Mmp20/Klk4	Genotyping by PCR, histology, immunohistochemistry, liquid chromatography of high efficiency, zymography, Western blot, polyacrylamide gel electrophoresis	Only intact amelogenins and ameloblastin were observed in the secretory stage of enamel for the null mouse MMP-20, while the matrix of the null mouse's KLK4 secreting stage was identical to that of the wild mouse. Higher content of residual matrix was observed in the double null mouse compared with any of the null individuals.

Autors	Year	Objective	Sample	Methods	Results
<b>Bartlett and collaborators (26)</b>	2011	Demonstrate changes in the secretory stage of ameloblasts using a knockout model of MMP-20	Incisors of adult mouse of C57BL/6 strain	Scanning electron microscopy, optical microscopy with toluidine blue	The knockout mouse of MMP-20 showed the following: formation of calcified nodules during the maturation stage in developing enamel, the ameloblasts in this stage completely cover these nodules, enamel is only vaguely connected to the underlying dentin, and the pattern of the enamel prisms is a null or severe malformation.
<b>Uskovovic and collaborators (20)</b>	2011	Obtain information about the mechanism of amelogenesis at the molecular level involved in the design of a system of biomimetic valuation	Full length (rH174) amelogenin and MMP-20 were previously synthesized via expression in BL21 (DE3) <i>plys</i> S <i>Escherichia coli</i>	SDS-PAGE, MALDI-TOF (desorption/ionization laser matrix-assisted)	Proteolysis exerts additional nucleation and promotes a growth effect. Hydrolysis of full-length amelogenin by MMP-20 decreases the critical time needed for protein and peptides to adhere and to cover the substrate.
<b>Kuchler and collaborators (32)</b>	2011	Study the possible association between MMP1, MMP3 and MMP-20 in tooth agenesis	One hundred and sixty-seven nuclear families of two different populations were analyzed, 116 from Brazil and 51 from Turkey. The participants had at least one missing tooth	DNA samples were obtained and geno-typed using Taqman chemistry. In addition, MMP20 was selected for the polymerase chain reaction in real time with SYBR Green	Relationships between dental agenesis and MMP1 (p = 0.007) and MMP20 (p = 0.03) were found in Brazilian families  In Conclusion: MMP-1 and MMP-20 play an important role in human tooth agenesis.
<b>Bromley and collaborators (19)</b>	2012	Use calcite as a mineral system to examine the effects of digestion of proteins during crystal growth, and therefore provide information about the precise role of the MMP-20 in enamel development	human recombinant amelogenin (rhMMP-20), porcine recombinant amelogenin (p172)	Expression and purification of proteins, gel electrophoresis, visible UV spectrometry, calcite crystallization, amelogenin digestion by rhMMP20 during crystallization, scanning electron microscopy, and micro-Raman Spectroscopy, atomic force microscopy	Full-length amelogenin binds strongly, truncated amelogenin binds weakly and the C-terminal end has weaker interaction. In terms of growth of crystals of enamel, the prevention of occlusion in crystals of enamel maturing could be a great benefit resulting from the selective scission of amelogenin in the c-terminal end by MMP-20
<b>Lee and collaborators (23)</b>	2012	Study the cellular expression and subcellular localization of ODAM in ameloblasts, odontoblasts, osteoblasts and several types of cancer cells to determine the correlations between ODAM and MMP-20, and define new functional roles of ODAM	Molars of postnatal mouse P0, P3, P10, P14, cells in ALC culture, LS8, MDPc-23, MG-63, H1299, AGS, HeLa, MCF-7 cells, cancer cells SK-BR and cells of epithelial breast cancer MCF-10A	Immunohistochemistry, indirect immunofluorescence for culture, Western blot	ODAM was found in ameloblasts, odontoblasts, and osteoblasts <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> . In addition, ODAM was found in the cytoplasm and the nucleus of ameloblasts and odontoblasts expressing MMP-20, but only in the cytoplasm of osteoblasts not expressing MMP-20. These results suggest that the pattern of expression and subcellular localization of ODAM is highly variable and dependent on cell types and stages of differentiation, as well as the functional correlation between ODAM and MMP-20. This provides the first evidence of ODAM in multiple cell blocks of odontogenic differentiation and cancer cell lines with important functional implications.

Autors	Year	Objetive	Sample	Methods	Results
Takahashi and collaborators (18)	2012	Examine the distribution and expression of amelogenin, ameloblastin, MMP-20 and KLK-4 after being cultivated in a mixture of Malassez epithelial cells and fibroblasts of the periodontal ligament to obtain direct cell contact	Third molars were collected from 28 individuals (21-28 years). Cell culture of tissue explants of the periodontal ligament containing Malassez epithelial cells and periodontal ligament fibroblasts	Immunohistochemistry, <i>in situ</i> hybridization, RT-PCR	Immunohistochemistry results reveal poor expression of amelogenin, ameloblastin, MMP-20, and KLK4 in Malassez epithelial cells co-cultured with fibroblasts of the periodontal ligament. Hybridization <i>in situ</i> and RT-PCR confirmed the expression of mRNA of these factors MMP-20 was not expressed in control cells. The mRNA of that epithelial-mesenchymal interactions promote the differentiation of human Malassez epithelial cells, and introduction of enamel matrix proteases facilitate degradation of enamel matrix proteins
Tannure and collaborators (29)	2012	To assess the association between MMP-20 and the history of decay in Brazilian children	Non-related children aged 5 to 14 years with or without caries n = 388	Dental clinical examination, RT-PCR,	161 out of 388 subjects were caries-free kids. There are no differences between the levels of tooth decay and genotypic distribution in the total sample. Differences in genotypic distribution were observed in caries-free children vs. children with caries, in Caucasians (p = 0.03). Regression analysis, adjusted for genotype and ethnicity, confirms that consumption of sweets in between meals increases the risk of caries lesions (p = 0.00001; OR = 2.33; 95% CI 1.53-3.54). The conclusion is that variation in MMP-20 may be associated with caries history, mainly in Caucasian subjects with poor oral hygiene habits.
Khan and collaborators (21)	2013	Study the proteolysis of the kinetics of MMP-20 enzymes of full-length human recombinant amelogenin under different mineral compositions	Human recombinant amelogenins (rH174, rH163, and rH146)	Electrophoresis in gel (SDS-PAGE) and MALDI-TOF Ms	The researchers noted that mineral ions affect the pattern of division and the kinetics of enzymes for the hydrolysis of rH174. Out of the five compositions of mineral ions selected, MMP-20 was the most efficient in high concentrations of calcium, but the lowest in high concentrations of phosphate and high concentrations of calcium and phosphate. These <i>in vitro</i> studies show that the chemistry of protein solutions can significantly alter the treatment of amelogenin by MMP-20 that can have significant effects in matrix assembly <i>in vivo</i> and later in the mineralization of calcium phosphate.
Yamakoshi and collaborators (25)	2013	Study KLK4 activation by MMP-20 and MMP-20 inactivation by KLK4	Native pork MMP-20 and KLK4 were extracted from permanent molar germs of 5 month-old pork. Human recombinant MMP-20 (rhMMP-20 and KLK4 (rh-proKLK4)	Zymography in casein gel, densitometry, liquid chromatography of high resolution, degradation of Edman, electrophoresis in gel (SDS-PAGE), Western blot	Both pMMP20 and rhMMP20 activate the rh-proKLK4 by excision in the pro-peptide-enzyme bonding used <i>in vivo</i> . pMMP-20 was inactivated by pKLK4 under physiological conditions, but not under slightly acidic conditions. pKLK4 and rhKLK4 detach MMP-20 mainly at two sites in the catalytic domain of MMP-20. <b>Conclusions:</b> MMP-20 activates proKLK4 and KLK4 inactivates MMP-20 <i>in vitro</i> , and these actions are likely to occur during enamel formation <i>in vivo</i> .
McGuire and collaborators (30)	2014	Demonstrate that irradiated teeth may contain active metalloproteinases matrix	Teeth extracted from oral cancer patients treated with radiation therapy and healthy subjects	Protein extraction, liquid chromatography, mass spectrometry (LC-tandem MS), Western blot, zymography in casein or gelatin, immunoprecipitation, immunofluorescence	MMP-20 is resistant to the radiation of mature dental crowns, enriched in dentin-enamel. It is speculated that MMP-20 catalyzes the degradation of organic matrix on this site and can lead to enamel delamination associated with oral cancer radiation therapy.

Autors	Year	Objective	Sample	Methods	Results
<b>Horvath and collaborators (31)</b>	2014	Examine the tests of positive selection in cis-regulatory regions of AMELX, AMBN, ENAM, and MMP-20, and contrast human changes in sequence with other hominids (chimpanzees, gorillas, orangutans, Gibbons and Rhesus Macaques) associated between the formation of enamel and the mutations of these four genes in humans	Genome sequences of humans (Homo sapiens, GRCh / hg19), chimpanzees (Pan troglodytes, CHIMP 2.1.4), gorillas (Gorilla gorilla, gorGOR3.1), orangutans (Pongo abelii, PPYG2), Gibbons (Nomascus leucogenys Nleu1.0) and macaca Rhesus (Macaca Mulatta, MMUL_1)	Analysis of genomic sequences. PCR analysis of positive selection	No evidence of positive selection was found in coding regions for proteins in any of these genes. In contrast, there was a strong evidence of positive selection in the 5' and 3' regions of MMP-20 and ENAM along the lineage of humans, and both 5' and 3' regions of MMP-20 along the lineage leading chimpanzees. Non-coding changes and their potential differential regulation by transcription factors known to regulate the development of tooth can provide insight to the mechanisms that allow for quick evolutionary changes in enamel thickness among closely related species.
<b>Shin and collaborators (27)</b>	2014	Determine if the introduction of transgenes that express low, medium or high levels of MMP20 in knockout mouse can reverse the phenotype of murine enamel to normal conditions	RNA extracted from the enamel organ of incisors or first molars of postnatal 5-days old mice, C57BL/6 strain, transgenic Mmp20 mice	Quantitative PCR in real time (qPCR), electrophoresis, Western blot, zymography, micro-computerized tomography, scanning electron microscopy, Vickers' microhardness test	The expression of MMP-20 levels must be within a specific range for the normal development of enamel. The formation of a layer of enamel of normal thickness can occur in a wide range of levels of expression of MMP-20, but the acquisition of a normal hardness of enamel has a narrower range. Since the above expression of MMP-20 results in a decrease in enamel hardness, this suggests that there is a balance between the excision and the full length of enamel proteins that are essential for the formation of a layer of enamel appropriately hard.
<b>Gao and collaborators (24)</b>	2014	Explore the role of the myocyte enhancer 2C-factor (MEF2C), a transcription factor which is key in craniofacial development in the gene expression of MMP-20 induced by TGFβ1	ALCs (ameloblast-lineage cell line)	Test of transient expression of reporter genes in cultivation of ALCs, bioinformatics tools, test of electrophoretic mobility and chromatin immunoprecipitation	TGFβ1 induces the expression of MMP-20 in ALCs; it was regulated by the MEF2 binding site in the MMP20 promoter and, therefore, mediated by MEF2C signaling pathway

Abbreviations: SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), ALCs (ameloblast-lineage cell line), MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization), ODAM (odontogenic-associated ameloblasts protein), RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

## DISCUSIÓN

### Modelos *in vitro*

En el 2009, Nagano y colaboradores,<sup>14</sup> en un modelo *in vitro*, demostraron, por medio de la digestión de péptidos fluorescentes, que la MMP-20 es capaz de digerir secuencias de amelogenina en sitios específicos. Por otro lado, Klk4 (calicreína relacionada con peptidasa 4) tiene afinidad por sitios diferentes de escisión. Por lo tanto, en el diente en desarrollo del cerdo, la MMP-20 es la única que presenta actividad proteolítica en el espacio extracelular durante la fase secretora. Esto es confirmado por Chun y colaboradores,<sup>15</sup> donde concluyen que MMP-20 pero no Klk4 cataliza las proteínas de esmalte procesadas durante la fase secretora de amelogénesis. También otros autores, como Sun y colaboradores,<sup>16</sup> estudiaron MMP-20 y Klk4. Estos diseñaron una serie de experimentos *in vitro* que evaluaban sistemáticamente el efecto de la HAP (hidroxiapatita) en la rP172 (amelogenina porcina recombinante) por rPMMP-20 (Metaloproteínasa 20 recombinante de cerdo) y rP148 (amelogenina porcina recombinante que carece de los aminoácidos 24 C-terminales hidrófilos) por rhKLK4 (calicreína relacionada con peptidasa 4 recombinante humana). Encontraron que la actividad de rPMMP-20 contra la amelogenina porcina recombinante, fue más sensible a la presencia de cristales de hidroxiapatita comparados con la rhKLK4 contra la rP148, o rhKLK4 contra la rP172.

Esto sugiere que hay una íntima relación entre la degradación paso a paso de la amelogenina en presencia de HAP en el estadio temprano de mineralización del esmalte. De igual forma, en el 2013, Yamakoshi y colaboradores<sup>17</sup> concluyeron que la MMP-20 activa la proKLK4, y KLK4 inactiva la MMP-20 *in vitro*, y estas acciones pueden suceder durante la amelogénesis *in vivo*.

Estos resultados son contrarios a los hallados por Takahashi y colaboradores<sup>18</sup> en el 2012. Estos autores realizaron un modelo *in vitro* con cultivos celulares de explantes de tejidos del ligamento periodontal, conteniendo células epiteliales de Malassez

## DISCUSSION

### *In vitro* models

In 2009, Nagano et al.,<sup>14</sup> in an *in vitro* model showed, through the digestion of fluorescent peptides, that MMP-20 is able to digest amelogenin sequences in specific sites. On the other hand, Klk4 (kallikrein-related peptidase 4) has affinity for different excision sites. Therefore, in the development of pig tooth, MMP-20 is the only that presents proteolytic activity in the extracellular space during the secretory phase. This is confirmed by Chun et al.,<sup>15</sup> who concluded that MMP-20 —and not Klk4— catalyzes enamel proteins that are processed during the amelogenesis secretory phase. Other authors, such as Sun et al.,<sup>16</sup> studied MMP-20 and Klk4. They designed a series of *in vitro* experiments systematically assessing the effect of HAP (hydroxyapatite) in rP172 (recombinant porcine amelogenin), rPMMP-20 (recombinant pork metalloproteinase 20), and rP148 (recombinant porcine amelogenin lacking 24 hydrophilic C-terminus amino acids) by rhKLK4 (recombinant human kallikrein-related peptidase 4). They found out that the activity of rPMMP-20 against the recombinant porcine amelogenin was more sensitive to the presence of hydroxyapatite crystals compared with the rhKLK4 against rP148, or rhKLK4 against rP172.

This suggests that there is an intimate relationship between the step-by-step degradation of amelogenin in the presence of HAPs in the early stage of enamel mineralization. Similarly, in 2013, Yamakoshi et al.<sup>17</sup> concluded that MMP-20 activates proKLK4, and KLK4 inactivates MMP-20 *in vitro*, and these actions can happen *in vivo* during amelogenesis.

These findings disagree with those by Takahashi et al.<sup>18</sup> in 2012. These authors designed an *in vitro* model with cell cultures of tissue explants from periodontal ligament, containing Malassez



y fibroblastos del ligamento periodontal de terceros molares de 28 individuos entre 21-28 años de edad, con el fin de determinar la expresión de amelogenina, MMP-20, (KLK4) y sus efectos en la interacción entre las células epiteliales de Malassez y fibroblastos del ligamento periodontal. Los resultados por inmunohistoquímica revelaron una expresión débil de amelogenina, ameloblastina, MMP-20 y KLK4 en las células epiteliales de Malassez. Esto puede deberse a que las funciones de estas proteínas de esmalte y sus proteasas, en la formación de las raíces dentales, se desconoce.

Por otro lado, Bromley y colaboradores<sup>19</sup> estudiaron el crecimiento de los cristales de calcita en presencia de amelogenina de longitud completa y su proteólisis por una metaloproteinasa de matriz recombinante (rhMMP-20). La amelogenina recombinante porcina (rP172) altera la forma de los cristales de calcita por inhibición del crecimiento de los pasos en las caras que se ocultan dentro de los cristales. Estos autores encontraron que, en muestras con rP172-rhMMP-20, la oclusión de la amelogenina en los cristales de calcita disminuyó drásticamente. La reducción del extremo C-terminal disminuyó la afinidad de la amelogenina a los cristales y, por lo tanto, previó la oclusión, tal como fue hallado en los estudios de Uskokovic y colaboradores,<sup>20</sup> donde, en un modelo *in vitro*, determinaron la capacidad de la amelogenina de promover la nucleación y el crecimiento de los cristales.

Para el proceso de mineralización y formación del esmalte maduro, Khan y colaboradores<sup>21</sup> estudiaron la proteólisis de la cinética de enzimas de MMP-20 de longitud completa amelogenina recombinante humana bajo diferentes composiciones minerales. Hallaron que la MMP-20 fue más eficiente en altas concentraciones de calcio, mientras que fue más bajo en altas concentraciones de fosfato y altas concentraciones de calcio y fosfato. Estos estudios *in vitro* demuestran que la química de las soluciones proteínicas pueden alterar significativamente el tratamiento de amelogenina por MMP-20, que puede tener efectos significativos en el ensamblaje de la matriz *in vivo* y, posteriormente, en la mineralización de fosfato de calcio.

epithelial cells and fibroblasts of the periodontal ligament of lower third molars of 28 individuals aged 21 to 28 years, in order to determine the expression of amelogenin, MMP-20, (KLK4) and their effects on the interaction between Malassez epithelial cells and fibroblasts of the periodontal ligament. The immunohistochemistry results showed a weak expression of amelogenin, ameloblastin, MMP-20, and KLK4 in Malassez epithelial cells. This may happen because the functions of these proteins in enamel and their proteases in the formation of dental roots are still unknown.

On the other hand, Bromley et al<sup>19</sup> studied the growth of calcite crystals in the presence of full-length amelogenin and its proteolysis by a recombinant matrix metalloproteinase (rhMMP-20). Recombinant porcine amelogenin (rP172) alters the shape of calcite crystals by inhibiting the growth of the steps in the sides that are occluded in the crystals. These authors found out that, in samples with rP172-rhMMP-20, occlusion of the amelogenin in calcite crystals decreased drastically. The c-terminal end reduction decreased the affinity of the amelogenin crystals and therefore foresaw the occlusion, as found in studies by Uskokovic et al.,<sup>20</sup> who by means of an *in vitro* model determined the ability of amelogenin to promote the nucleation and growth of crystals.

Concerning the process of mineralization and formation of mature enamel, Khan et al<sup>21</sup> studied proteolysis of the kinetics of MMP-20 enzymes of full-length human recombinant amelogenin under different mineral compositions. They found out that MMP-20 was more efficient in high concentrations of calcium, but lower in high concentrations of phosphate and high concentrations of calcium and phosphate. These *in vitro* studies show that the chemistry of protein solutions can significantly alter the treatment of amelogenin by MMP-20, which can have significant effects in the matrix assembly *in vivo* and later in the mineralization of calcium phosphate.

## Cultivos celulares

En el 2010, Lee y colaboradores<sup>22</sup> estudiaron los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la MMP-20, encontrando que la fase secretora de la amelogenesis ODAM (proteína asociada a ameloblastos odontogénicos) se localizó en el núcleo y citoplasma de los ameloblastos, y la etapa de maduración se observó en el citoplasma y en la interfaz entre los ameloblastos y la capa de esmalte, pero no en el núcleo. Se sugiere que Runx2 regula la expresión de ODAM nuclear que tiene una función reguladora importante en la mineralización del esmalte a través de la regulación de la MMP-20. Estos resultados son confirmados nuevamente en el 2012 por Lee y colaboradores.<sup>23</sup> Estos autores investigaron la expresión de ODAM en ameloblastos, odontoblastos y varios tipos de células cancerígenas, y encontraron que ODAM se localizó en estas células tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos resultados sugieren que el patrón de expresión y la localización subcelular de ODAM es altamente variable y dependiente de los tipos celulares, sus estados de diferenciación y las correlaciones funcionales existentes entre ODAM y MMP-20.

Por otro lado, Gao y colaboradores<sup>24</sup> exploraron el rol del factor-2C potenciador de miocito (MEF2C) y el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ1) en la expresión genética de MMP-20. Estos autores concluyeron que el TGFβ1 induce la expresión de MMP-20 en ALCs (Línea celular de ameloblastos).

## Estudios en animales

Con relación a los estudios realizados en modelos murinos, Yamakoshi y colaboradores<sup>25</sup> caracterizaron ratones *knockout* para MMP-20 y KLK4, y doble nulo de MMP-20/KLK4. Estudiaron las fases secretoras y de maduración por medio de histología, zimografía y Western blot. Solo se encontraron amelogeninas y ameloblastinas intactas en la fase secretora en el ratón *knockout* para MMP-20, mientras que en la matriz perteneciente a

## Cell cultures

In 2010, Lee et al,<sup>22</sup> studied the molecular mechanisms responsible for the regulation of MMP-20, finding out that the secretory phase of amelogenesis ODAM (odontogenic- ameloblast-associated protein) was located in the nucleus and cytoplasm of ameloblasts, and maturation stage was observed in the cytoplasm and at the interface between the ameloblasts and enamel coating, but not in the nucleus. It is suggested that Runx2 regulates the expression of nuclear ODAM playing an important regulatory role in the mineralization of enamel through regulation of MMP-20. These results were verified in 2012 by Lee et al.<sup>23</sup> These authors evaluated the expression of ODAM in ameloblasts, odontoblasts, and several types of cancer cells, finding out that ODAM was located in these cells both *in vivo* and *in vitro*. These results suggest that the pattern of expression and subcellular location of ODAM is highly variable and dependent on cell types, their stages of differentiation, and the functional correlations between ODAM and MMP-20.

On the other hand, Gao et al<sup>24</sup> explored the role of the myocyte-specific enhancer factor 2C (MEF2C) and transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) in the gene expression of MMP-20. These authors concluded that the TGFβ1 induces the expression of MMP-20 in ALCs (ameloblast-lineage cell line).

## Studies in animals

Concerning studies in mouse models, Yamakoshi et al<sup>25</sup> characterized knockout mice for MMP-20, KLK4, and double null MMP-20/KLKL-4. They studied the secretory and maturation phases by histology, zymography, and Western blot. They only found intact amelogenins and ameloblastins in the secretory phase in knockout mouse for MMP-20, while the matrix belonging to the secretory

la fase secretoria para el ratón nulo de KLK-4 fue idéntico a lo encontrado en el ratón silvestre.

Más residuos en la matriz se observaron en el ratón doble nulo comparado con los ratones *knockout* de MMP-20 o KLK-4. Esto lo corroboraron Bartlett y colaboradores<sup>26</sup> y Shin y colaboradores<sup>27</sup> donde, con un modelo de ratón *knockout* para MMP-20, demostraron la importancia de MMP-20 como mediador necesario para el mantenimiento de la superficie de esmalte, una unión amelo-dentinal fuerte y para el establecimiento del patrón de varillas de esmalte. Estos resultados validan lo encontrado en modelos *in vitro* por Nagano y colaboradores<sup>14</sup> y Chun y colaboradores<sup>15</sup>.

### Estudios en humanos

Con relación a los estudios en humanos, estos mencionan la importancia que tiene la MMP-20 en la caries dental, el grosor del esmalte y la susceptibilidad a caries por radiación y agenesias dentales.

En primer lugar, Shimada y colaboradores<sup>28</sup> estudiaron, por inmunomarcación enzimática, la participación de MMP-2,-8,-9 y 20 en lesiones de caries dentinal en terceros molares humanos de pacientes entre 32-59 años, y hallaron que la MMP-2 estaba distribuida en la dentina normal y la dentina cariada, los niveles de MMP-8 y MMP-9 estaban significativamente disminuidos en la caries dentinal interna comparada con la dentina normal y la MMP-20 era la más alta en la dentina normal, y decreció significativamente hacia la región externa de caries.

Por otro lado, Tannure y colaboradores<sup>29</sup> evaluaron la asociación entre MMP-20 y la experiencia de caries en los niños brasileños. De 388 sujetos, 161 fueron niños libres de caries. Estos autores no encontraron diferencias entre los niveles de caries y la distribución genotípica en la cohorte total. Sin embargo, hubo diferencias en la distribución genotípica, observadas en los niños libres de caries vs. niños con caries en caucásicos ( $p=0,03$ ). Estos resultados sugieren que el desarrollo de la caries es multifactorial y puede estar asociado a genotipos de MMP-20 en mayor proporción

phase for the null mouse KLK-4 was identical to that found in wild mouse.

More matrix remnants were observed in double null mice compared with knockout mice of MMP-20 or KLK-4. This was supported by Bartlett et al<sup>26</sup> and Shin et al,<sup>27</sup> who by means of a knockout mouse model for MMP-20 showed the importance of MMP-20 as a necessary mediator for the maintenance of enamel surface, a strong dentin-enamel junction, and the establishment of enamel rods pattern. These results validate the findings in *in vitro* models by Nagano et al<sup>14</sup> and Chun et al.<sup>15</sup>

### Studies in humans

With regard to studies in humans, they mention the importance of MMP-20 in dental caries, enamel thickness, and susceptibility to caries by radiation and dental agenesis.

By means of immunolabeling enzyme, Shimada et al<sup>28</sup> studied the participation of MMP-2, -8, -9, and -20 in dentinal caries lesions in third molars of human patients aged 32 to 59 years, finding out that the MMP-2 was distributed in normal dentin and carious dentin, MMP-8 and MMP-9 levels were significantly decreased in inner dentinal caries compared to normal dentin, and MMP-20 was the highest in normal dentin, significantly decreasing towards the outer region of caries.

On the other hand, Tannure et al<sup>29</sup> evaluated the association of MMP-20 and caries history in Brazilian children. 161 out of 388 subjects were caries-free kids. The authors found no differences between the levels of tooth decay and genotypic distribution in the total sample. However, there were differences in genotypic distribution. Differences in genotypic distribution were observed in caries-free children vs. children with caries, in Caucasians ( $p = 0.03$ ). These results suggest that caries development is multifactorial and may be associated to MMP-20 genotypes, in higher

en individuos caucásicos con pobres hábitos de higiene oral.

En el 2014, McGuire y colaboradores,<sup>30</sup> por técnicas de espectrometría de masa, inmunomarcaje y zimografía en gel, estudiaron dientes de pacientes con cáncer oral tratados con radioterapia, y se compararon con dientes de individuos sanos. Concluyeron que la MMP-20 es la metaloproteína de matriz más abundante en extractos *in vitro* irradiados e incubados de las coronas dentales maduras, como con las coronas control. En los estudios *in vitro* encontraron que el fragmento de 23 kDa de MMP-20 es resistente a la radiación de las coronas dentales maduras, lo que indica que este componente puede degradar los componentes proteicos de la interfase esmalte-dentina y contribuir así a la delaminación patológica del esmalte observado en la radioterapia oral, lo cual también se asocia a las dosis altas de radioterapia.

En el mismo año, Horvath y colaboradores<sup>31</sup> encontraron una fuerte evidencia para selección positiva en las regiones 5' y 3' de las regiones de MMP-20 y ENAM, a lo largo del linaje de los humanos, y en ambos el extremo 5' y 3' de las regiones de MMP-20 a lo largo del linaje que lidera a los chimpancés. Cambios no codificantes y su potencial para la regulación diferencial por factores de transcripción conocidos regulan el desarrollo del diente y pueden ofrecer una visión a los mecanismos que permiten cambios evolutivos rápidos en el grosor del esmalte entre especies relacionadas cercanamente.

Por otro lado, Kuchler y colaboradores<sup>32</sup> estudiaron la asociación de MMP-1, MMP-3 y MMP-20, y su relación con agenesias dentales en 167 familias nucleares de dos poblaciones diferentes, 116 de Brasil y 51 de Turquía. Los participantes tenían al menos un diente ausente. Estos autores encontraron asociaciones entre la agenesias dentales, MMP-1 ( $p = 0,007$ ) y MMP-20 ( $p = 0,03$ ) en las familias brasileñas. Estos resultados son contrarios a los reportado por Antunes y colaboradores,<sup>33</sup> en donde estudiaron la asociación de polimorfismos en genes para MMP-2, MMP-9 y MMP-13 en humanos con agenesias dentales, en 285 individuos no relacionados

proportions among Caucasian individuals with poor oral hygiene habits.

In 2014, McGuire et al,<sup>30</sup> by means of mass spectrometry techniques, immunolabeling, and gel zymography, studied the teeth of patients with oral cancer treated with radiotherapy, comparing them against the teeth of healthy individuals. They concluded that MMP-20 is the most abundant matrix metalloproteinase in irradiated and incubated *in vitro* extracts of mature dental crowns, as in control crowns. In their *in vitro* studies, they found out that the 23 kDa fragment of MMP-20 is resistant to radiation of mature dental crowns, which indicates that this component can degrade the protein components of the enamel-dentin interface and thus contribute to the pathological delamination observed in oral radiotherapy, which is also associated with high doses of radiotherapy.

In the same year, Horvath et al<sup>31</sup> found strong evidence for a positive selection in the 5' and 3' regions of MMP-20 and ENAM regions along the lineage of humans, and both 5' and 3' regions of MMP-20 along the lineage leading chimpanzees. Non-coding changes and their potential differential regulation by known transcription factors regulate tooth development and can provide insight into the mechanisms that allow quick evolutionary changes in enamel thickness among closely related species.

On the other hand, Kuchler et al<sup>32</sup> studied the associations of MMP-1, MMP-3 and MMP-20, and their relations to dental agenesis in 167 nuclear families of two different populations, 116 from Brazil and 51 from Turkey. The participants had at least one missing tooth. These authors found associations among dental agenesis, MMP-1 ( $p = 0.007$ ) and MMP-20 ( $p = 0.03$ ) in Brazilian families. These results disagree with those reported by Antunes et al,<sup>33</sup> who studied the association of polymorphisms in human genes for MMP-2, MMP-9 and MMP-13 with dental agenesis, in 285 non-related individuals

(202 controles sin agenesia dental y 83 casos con agenesia dental), donde no encontraron asociación significativa para el genotipo MMP-2, y encontraron una relación significativa de agenesias dentales asociadas a los genotipos de MMP-9 y MMP-13.

## CONCLUSIÓN

Los resultados de esta revisión proveen un soporte sobre la importancia que tiene la MMP-20 para la degradación de diversas proteínas de la matriz orgánica, como amelogeninas y ameloblastinas en la fase secretora de la formación de esmalte. Además de la participación de otras proteasas como la KLK4 que, a diferencia de la MMP-20, participa en la fase de maduración de la amelogénesis. Los modelos *in vitro* permiten concluir que la MMP-20 tiene sitios específicos de escisión para las proteínas de matriz y que estos difieren para la KLK4. Así mismo, este proceso puede ser alterado por la composición química, iones y la presencia de hidroxiapatita.

Con los modelos *knockout* se concluye que alteraciones en MMP-20 modifican completamente la morfología del esmalte, a diferencia de lo hallado en el ratón nulo para KLK4. Estos modelos permiten entender las diversas variaciones que se presentan en el desarrollo del esmalte, como por ejemplo la amelogénesis imperfecta.

En los estudios realizados en humanos, se ha relacionado la MMP-20 en primer lugar; con una mayor susceptibilidad de caries dental, en segundo lugar; una relación evolutiva entre humanos y chimpancés y su asociación con el grosor del esmalte, en tercer lugar; una mayor presencia de MMP-20 en la unión amelo-dentinal en dientes sometidos a radioterapia, lo cual se vincula con la delaminación del esmalte. Y, por último, una asociación entre MMP-20 y agenesias dentales.

(202 control individuals without dental agenesis and 83 cases with dental agenesis), finding out no significant association for the MMP-2 genotype, but a significant relationship of dental agenesis associated to MMP-9 and MMP-13 genotypes.

## CONCLUSION

The results of this review highlight the importance of MMP-20 in the degradation of various proteins of organic matrix, such as amelogenins and ameloblastins in the secretory phase of enamel formation, in addition to the involvement of other proteases such as KLK4 which, unlike MMP-20, takes part in the maturation stage of amelogenesis. The *in vitro* models allow concluding that MMP-20 has specific sites for excision of matrix proteins and that these differ to KLK4. Similarly, this process may be altered by chemical composition, ions, and the presence of hydroxyapatite.

The knockout models allow concluding that alterations in MMP-20 completely alter enamel morphology, unlike the findings in null mice for KLK4. These models allow us to understand the different variations occurring during enamel development, such as amelogenesis imperfecta.

In human studies, MMP-20 has been related to a) increased susceptibility to tooth decay, b) an evolutionary relationship between humans and chimpanzees, as well as an association with enamel thickness, and c) a greater presence of MMP-20 in the amelodontal junction in teeth subjected to radiation therapy, which is linked to enamel delamination. Finally, there is an association between MMP-20 and dental agenesis.

**CONFLICTOS DE INTERÉS**

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

**CORRESPONDENCIA**

Estefanía Cuéllar Rivas.

estefania.cuella@correounivalle.edu.co

María Carolina Pustovrh Ramos.

maria.pustovrh@correounivalle.edu.co

**CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare not having any conflict of interest.

**CORRESPONDING AUTHORS**

Estefanía Cuéllar Rivas.

estefania.cuella@correounivalle.edu.co

María Carolina Pustovrh Ramos.

maria.pustovrh@correounivalle.edu.co

**REFERENCIAS / REFERENCES**

1. Kaufman MH. Atlas of mouse development. Amsterdam: Elsevier, 1992.
2. Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. ISRN Dent 2013; 2013:684607. doi: 10.1155/2013/684607.
3. Gómez de Ferraris M, Campos -Muñoz A. Histología y embriología bucodental 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2002.
4. Evrosimovska B, Velickovski B, Dimova C, Veleska-Stefkowska D. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). J Cell and Anim Biol 2011; 5(7): 113-120.
5. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res 2003; 92(8): 827-839.
6. Begue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. Eur J Oral Sci 1998; 106(5): 963-970.
7. Fukae M, Shimizu M. Studies on the proteins of developing bovine enamel. Arch Oral Biol 1974; 19 (5): 381-386.
8. Grant GM, Giamberti TA, Grant AM, Klebe RJ. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells. Matrix Biol 1999; 18(2): 145-148.
9. Takata T, Zhao M, Nikai H, Uchida T, Wang T. Ghost cells in calcifying odontogenic cyst express enamel-related proteins. Histochem J 2000; 32(4): 223-229.
10. Takata T, Zhao M, Uchida T, Wang T, Aoki T, Bartlett JD et al. Immunohistochemical detection and distribution of enamelysin (MMP-20) in human odontogenic tumors. J Dent Res 2000; 79(8): 1608-1613.
11. Vaananen A, Srinivas R, Parikka M, Palosaari H, Bartlett JD, Iwata K et al. Expression and regulation of MMP-20 in human tongue carcinoma cells. J Dent Res 2001; 80(10):1884-1889.
12. Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD et al. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. J Med Genet 2005; 42(3): 271-275
13. Santos MC, Line SR. The genetics of amelogenesis imperfecta: a review of the literature. J Appl Oral Sci 2005; 13(3): 212-217.
14. Nagano T, Kakegawa A, Yamakoshi Y, Tsuchiya S, Hu JC, Gomi K et al. Mmp-20 and Klk4 cleavage site preferences for amelogenin sequences. J Dent Res 2009; 88(9): 823-828.
15. Chun YH, Yamakoshi Y, Yamakoshi F, Fukae M, Hu JC, Bartlett JD et al. Cleavage site specificity of MMP-20 for secretory-stage ameloblastin. J Dent Res 2010; 89(8): 785-790.
16. Sun Z, Carpiaux W, Fan D, Fan Y, Lakshminarayanan R, Moradian-Oldak J. Apatite reduces amelogenin proteolysis by MMP-20 and KLK4 in vitro. J Dent Res 2010; 89(4): 344-348.
17. Yamakoshi Y, Simmer JP, Bartlett JD, Karakida T, Oida S. MMP20 and KLK4 activation and inactivation interactions in vitro. Arch Oral Biol 2013; 58(11): 1569-1577.

18. Takahashi K, Shimonishi M, Wang R, Watanabe H, Kikuchi M. Epithelial-mesenchymal interactions induce enamel matrix proteins and proteases in the epithelial cells of the rests of Malassez in vitro. *Eur J Oral Sci* 2012; 120(6): 475-483.
19. Bromley KM, Lakshminarayanan R, Thompson M, Lokappa SB, Gallon VA, Cho KR et al. Amelogenin processing by MMP-20 prevents protein occlusion inside calcite crystals. *Cryst Growth Des* 2012; 12(10): 4897-4905.
20. Uskokovic V, Khan F, Liu H, Witkowska HE, Zhu L, Li W et al. Hydrolysis of amelogenin by matrix metalloproteinase-20 accelerates mineralization in vitro. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(12): 1548-1559.
21. Khan F, Liu H, Reyes A, Witkowska HE, Martinez-Avila O, Zhu L et al. The proteolytic processing of amelogenin by enamel matrix metalloproteinase (MMP-20) is controlled by mineral ions. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(3): 2600-2607.
22. Lee HK, Lee DS, Ryoo HM, Park JT, Park SJ, Bae HS et al. The odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) cooperates with RUNX2 and modulates enamel mineralization via regulation of MMP-20. *J Cell Biochem* 2010; 111(3): 755-767.
23. Lee HK, Park SJ, Oh HJ, Kim JW, Bae HS, Park JC. Expression pattern, subcellular localization, and functional implications of ODA M in ameloblasts, odontoblasts, osteoblasts, and various cancer cells. *Gene Expr Patterns* 2012; 12(3-4): 102-108.
24. Gao Y, Zhang L, Xiang L, Li B, Liu X, Wang Y, et al. Transforming growth factor-beta1 regulates expression of the matrix metalloproteinase 20 (Mmp20) gene through a mechanism involving the transcription factor, myocyte enhancer factor-2C, in ameloblast lineage cells. *Eur J Oral Sci* 2014; 122(2): 114-120.
25. Yamakoshi Y, Richardson AS, Nunez SM, Yamakoshi F, Milkovich RN, Hu JC et al. Enamel proteins and proteases in Mmp20 and Klk4 null and double-null mice. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119 Suppl 1: 206-216.
26. Bartlett JD, Skobe Z, Nanci A, Smith CE. Matrix metalloproteinase 20 promotes a smooth enamel surface, a strong dentino-enamel junction, and a decussating enamel rod pattern. *Eur J Oral Sci* 2011; 119 Suppl 1: 199-205.
27. Shin M, Hu Y, Tye CE, Guan X, Deagle CC, Antone JV et al. Matrix metalloproteinase-20 over-expression is detrimental to enamel development: a *Mus musculus* model. *PLoS One* 2014; 9(1): e86774.
28. Shimada Y, Ichinose S, Sadr A, Burrow MF, Tagami J. Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine. *Aust Dent J* 2009; 54(4): 347-354.
29. Tannure PN, Kuchler EC, Lips A, Costa Mde C, Luiz RR, Granjeiro JM et al. Genetic variation in MMP20 contributes to higher caries experience. *J Dent* 2012; 40(5): 381-386.
30. McGuire JD, Mousa AA, Zhang BJ, Todoki LS, Huffman NT, Chandrababu KB et al. Extracts of irradiated mature human tooth crowns contain MMP-20 protein and activity. *J Dent.* 2014; 42(5): 626-635.
31. Horvath JE, Ramachandran GL, Fedrigo O, Nielsen WJ, Babbitt CC, St Clair EM et al. Genetic comparisons yield insight into the evolution of enamel thickness during human evolution. *J Hum Evol* 2014; 73: 75-87
32. Kuchler EC, Menezes R, Callahan N, Costa MC, Modesto A, Meira R et al. MMP1 and MMP20 contribute to tooth agenesis in humans. *Arch Oral Biol* 2011; 56(5): 506-511.
33. Antunes LS, Kuchler EC, Tannure PN, Dias JB, Ribeiro VN, Lips A et al. Genetic variations in MMP9 and MMP13 contribute to tooth agenesis in a Brazilian population. *J Oral Sci* 2013; 55(4): 281-286.