



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS



DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS BIOMÉDICAS

**TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR**

***“CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, HISTOLÓGICA Y GENÉTICA DE UNA FAMILIA
AFECTADA CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA”***

NOMBRE DEL ALUMNO(A): Anita Carolina Plaza Flores

TUTOR PRINCIPAL: Prof. Dra. Blanca Regina Urzúa Orellana

TUTORES ASOCIADOS: Prof. Dra. Ana Verónica Ortega Pinto

Prof. Dra. Irene Cecilia Morales Bozo

Prof. Dra. Carla Paola Lozano Moraga

FINANCIADO POR: Proyecto FIOUCh 09-1

AÑO 2011

A las mujeres que llenan de luz los espacios que tocan y, de paso, han iluminado mi mundo también. A mis profesoras, a mis amigas y a mi madre...

Agradecimientos

Durante el espacio-tiempo en el cual fui alumna de este programa, muchos procesos y, más importante aún, muchas (muchas!) personas han sido parte de mi formación e indispensables para finalizar este ciclo. Por esto y mucho más, quisiera expresarles mi gratitud.

A la Dra Blanca, por acogerme, por ayudarme a crecer. Gracias por exigirme y, a la vez, confiar en mí. Por compartir sus conocimientos y por enseñarme con ejemplos lo que es la perseverancia y entrega a la vida científica. Me siento enormemente afortunada de trabajar con una profesora de vocación y, por sobre todo, con una excelente persona.

A la Dra. Ana por tener la capacidad de maravillarse con su trabajo, gracias por compartir esa pasión conmigo y dedicarme su valioso tiempo.

A la Dra. Irene, por su entusiasmo y pasión que deposita en todas sus tareas, por su profesionalismo, alegría y rectitud. Es una fortuna compartir a diario con Ud.

A la Dra. Carla, por tu incansable generosidad, por compartir todas tus experiencias y conocimientos, por tu incondicional disposición para ayudar, por tu espíritu docente, por tu amistad.

A María Eugenia, MEFi, no sólo por su tremenda colaboración en esta tesis, por su cariño y alegría, si no también porque es la responsable de que esté aquí, infinitas gracias.

A la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y al Proyecto FIOUCH por su financiamiento para desarrollar este trabajo. A todas mis compañeras del Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, en especial a Andrea.

A las la personas que forman parte de este programa de Magíster; funcionarios, docentes y a mis compañeros.

Al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Al Dr. Víctor Cifuentes, por darme la oportunidad de trabajar con Ud. y por permitir y facilitar las condiciones para continuar con mi formación.

A Dony, por tu valiosa e indispensable ayuda en esta tesis y por comunicarme tus invaluable conocimientos.

A Fernandita por su importante colaboración en este trabajo.

A Mauricio, por tus consejos, por ayudarme a ver las cosas con claridad, por tu preocupación y apoyo.

A Joaquín y Ricardo, por su cariño fraternal, por hacer tuyas mis alegrías, por ser mis compañeros siempre.

A José Miguel, porque durante todo este período de estudio fuiste esencial, con tu compañía y alegría me dabas el ánimo y fuerza que necesitaba para continuar.

A mis amigas Daniela, Desireé, Evelyn, Paola, Paz y Tania, gracias por su atención, comprensión y contención. Por entregarme su inmenso amor y amistad.

A mi Familia, por su apoyo ilimitado. A Dan, hermano, porque eres simplemente indispensable en todo lo que hago. A Juan Carlos, papá, porque siempre has estado cerca, por tu apoyo incondicional a pesar de mis errores, gracias por quedarte, tu vida es un regalo. Martita, mamá, gracias por ser mi amiga y compañera y porque nunca termino de sorprenderme de tu nobleza y bondad.

Finalmente, gracias a los pacientes por su colaboración y buena disposición pero por sobre todo, porque le dan sentido a nuestro trabajo. Porque la ciencia, cuando está en buenas manos, puede ayudarnos a construir una sociedad más sana y, también, más igualitaria.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN: ASPECTOS TEÓRICOS	8
2.1 Esmalte Dental	8
2.1.1 Desarrollo normal del esmalte o Amelogénesis	9
2.2 Amelogénesis Imperfecta (AI)	11
2.2.1 Definición	11
2.2.2 Clasificación	12
2.2.3 Prevalencia	13
2.2.4 Etiología genética de las Amelogénesis Imperfecta	13
2.2.4.1 Organización estructural y funcional del gen amelogenina	16
2.2.4.2 Correlaciones fenotipo-genotipo en AI ligadas al cromosoma x	19
2.2.5 Histopatología de las Amelogénesis Imperfecta	22
2.3 Contexto del estudio	22
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
3.1 Hipótesis	24
3.2 Objetivo General	24
3.3. Objetivos Específicos	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 Análisis clínico-radiográfico y construcción de la genealogía	25
4.1.1 Individuos participantes	25
4.1.2 Diagnóstico clínico de Amelogénesis Imperfecta	26
4.2 Análisis genético-molecular	28
4.2.1 Obtención y cuantificación del material genético	28
4.2.2 Análisis mutacional del gen amelogenina (<i>AMELX</i>)	30
4.3 Análisis histopatológico y ultraestructural	35
4.3.1 Piezas dentarias analizadas	35
4.3.2 Análisis a través de microscopía de luz	35
4.3.3 Análisis a través de microscopía electrónica de barrido	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Análisis clínico-radiográfico y de la genealogía familiar	37
5.2 Análisis genético-molecular	43
5.2.1 Purificación y cuantificación de ADN genómico	43

5.2.2	Amplificación de la región promotora y exones de <i>AMELX</i> mediante PCR	45
5.2.1	Análisis de secuenciación completa del gen <i>AMELX</i>	47
5.3	Análisis histopatológico y ultraestructural	54
5.3.1	Análisis a través de microscopía de luz	54
5.3.2	Análisis a través de microscopía electrónica de barrido	54
6.	DISCUSIÓN	59
6.1	Análisis clínico-radiográfico y genealógico	60
6.2	Análisis genético-molecular	62
6.3	Análisis histopatológico y ultraestructural	69
7.	CONCLUSIONES	71
8.	REFERENCIAS	72
9.	ANEXOS	78

1. RESUMEN

Las Amelogenesis Imperfecta (AI) son un grupo de condiciones heredadas, de muy baja prevalencia (1 en 8.000 a 1 en 14.000), que afectan el desarrollo del esmalte, causando formas heterogéneas del punto de vista clínico, como hipoplasia, hipocalcificación e hipomaduración. Son también genéticamente heterogéneas, existiendo subtipos clínicos, que se heredan en forma autosómica y ligadas al cromosoma X, con variantes recesivas y dominantes, en cada caso.

El esmalte dental es un tejido difícil de estudiar porque su formación está regulada en forma espacial y temporal, quedando restringida sólo al período de odontogénesis. En este contexto, el estudio de familias con defectos heredados en la síntesis de esmalte, tales como Amelogenesis Imperfecta (AI), constituyen una aproximación válida para dilucidar el rol de los genes y las funciones específicas que desempeñan sus productos en la síntesis de este tejido.

Hasta la fecha se han descrito 7 genes que tienen roles causales en la etiología genética de las AI: *AMELX*, *ENAM*, *MMP-20*, *KLK4*, *FAM83H*, *DLX3* y *WDR72*. El propósito de este estudio fue analizar clínica, histológica y genéticamente sujetos afectados con Amelogenesis Imperfecta de tipo hipoplásica, para determinar el subtipo específico de AI y su etiología genética. Dado el patrón de herencia observado en la familia y el fenotipo clínico del esmalte examinado, planteamos que el gen causal en este grupo podría corresponder a amelogenina (*AMELX*) y que mutaciones en este gen podrían determinar menor grosor y perturbación de la organización prismática del tejido a nivel ultraestructural.

Para llevar a cabo esta investigación, los sujetos afectados y no afectados de la familia fueron clínicamente examinados y con los datos recopilados se construyó la genealogía del grupo. Se analizó la región promotora y codificante completa del gen

amelogenina, mediante PCR y secuenciación directa. Además, se analizó dientes temporales de un sujeto afectado mediante microscopía de luz y electrónica de barrido.

Los resultados indicaron que esta familia posee Amelogénesis Imperfecta hipoplásica lisa, dominante ligada al cromosoma X, tipo IE de Witkop. El análisis mutacional no detectó ninguna de las mutaciones previamente reportadas, ni nuevas variantes de secuencia en la región codificante y promotora del gen *AMELX*. Se detectó un polimorfismo de nucleótido simple en el intrón 2 de este gen, en estado homocigoto, que se encuentra registrado en la base de datos (rs946252). Estos resultados indican que mutaciones en otras regiones regulatorias del gen o mutaciones en otros genes del cromosoma X podrían estar involucradas en la etiología genética de esta familia. Adicionalmente, el análisis histológico y ultraestructural de piezas dentarias afectadas, evidenció la severa disminución del grosor del esmalte con pérdida parcial de la organización prismática del tejido.

La heterogeneidad genética, de locus y alélica, sumado a la variabilidad de formas clínicas, con que se presenta esta anomalía, ha dificultado enormemente su diagnóstico. A pesar de ser una patología poco prevalente, la severidad de las lesiones pueden resultar en la pérdida total de las piezas dentarias. Por ello, la aproximación genética, implícita en este estudio, es un aporte importante al conocimiento de la estructura y función de las proteínas que participan en la síntesis de esmalte, a la identificación de genes desconocidos implicados en la etiología y al proceso de clasificación molecular de este grupo de desórdenes.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

2.1 ESMALTE DENTAL

El esmalte dental es la capa más externa del diente y cubre la corona clínica en su totalidad. Es un tejido acelular, extremadamente duro y corresponde a la matriz extracelular más mineralizada que se conoce. Su composición es 96 % mineral, mientras que sólo el 4 % corresponde a material orgánico y agua. La matriz inorgánica está constituida fundamentalmente por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita (Ten Cate, 1998). Además, existen pequeñas cantidades de carbonato, magnesio, potasio, sodio y flúor. La apariencia del esmalte, por su estructura cristalina, es translúcida y birrefringente. Al examinarlo radiográficamente presenta mayor densidad que la dentina, lo que permite visualizarlo como una estructura radiopaca sobre la dentina radiolúcida. Su grosor varía de acuerdo a la localización en el diente, alcanzando un grosor máximo de 2,3 mm en la cúspide del diente (Berkovitz, 1995).

La unidad estructural fundamental del esmalte de los mamíferos es el denominado prisma o varilla del esmalte, el que se encuentra rodeado por la sustancia interprismática o intervarilla. Cada prisma está formado por cristales de hidroxiapatita que se ensamblan estrechamente y se alargan en forma de cinta o cilindro desde la unión amelodentinaria hasta la superficie del diente, en dirección radial con una trayectoria sinuosa, mientras que la sustancia interprismática posee cristales que se encuentran orientados en una dirección diferente a los cristales que forman el prisma (Nanci, 2008).

Por sus propiedades físicas, es capaz de resistir la fuerza mecánica aplicada durante la masticación, además de soportar un ambiente húmedo, ácido y poblado por aproximadamente 700 especies bacterianas (Berkovitz, 1995). A su vez, la dureza del esmalte lo vuelve quebradizo, sin embargo la dentina, capa con la que limita por su

cara interna y que posee mayor elasticidad, le permite mantener su integridad (Nanci, 2008).

2.1.1 Desarrollo del esmalte normal o Amelogénesis

En el ser humano el esmalte se forma en el período de odontogénesis, específicamente en un proceso denominado amelogénesis, alrededor de la octava semana del desarrollo embrionario y continúa durante la vida postnatal antes que erupción la pieza dentaria (Ten Cate, 1998). La amelogénesis es un proceso altamente complejo y regulado, y desde el punto de vista metodológico ha sido difícil de estudiar, ya que el esmalte de todos los dientes temporales se forma durante la vida intrauterina y el de los dientes permanentes se desarrolla desde el nacimiento hasta los 12-13 años de edad, ambos en forma intraósea (Ten Cate, 1998; Gómez de Ferraris, 2002)

El desarrollo del diente se caracteriza por una serie de eventos que determinan la morfogénesis de la corona y la histodiferenciación de las células epiteliales en ameloblastos secretores de esmalte y de células mesenquimales en odontoblastos secretores de dentina, ambos tipos celulares originados de la migración celular desde la cresta neural hacia el mesénquima alveolar (Simmer & Fincham, 1995).

Los ameloblastos son células columnares y polarizadas que sintetizan y secretan proteínas específicas del esmalte y además, son responsables de generar y mantener un ambiente favorable para la deposición del mineral. Después de depositar la matriz del esmalte en su totalidad, los ameloblastos disminuyen de tamaño y regulan la maduración del esmalte, para posteriormente desaparecer por muerte celular programada. Por esta razón, es que el esmalte dental es un tejido sin capacidad de regeneración (Bei, 2009).

El esmalte es sintetizado en un proceso que ocurre en dos etapas (**Figura 1**). En la primera fase o etapa secretora, el ameloblasto produce una matriz proteica, parcialmente mineralizada, que corresponderá a todo el grosor del esmalte adulto. La

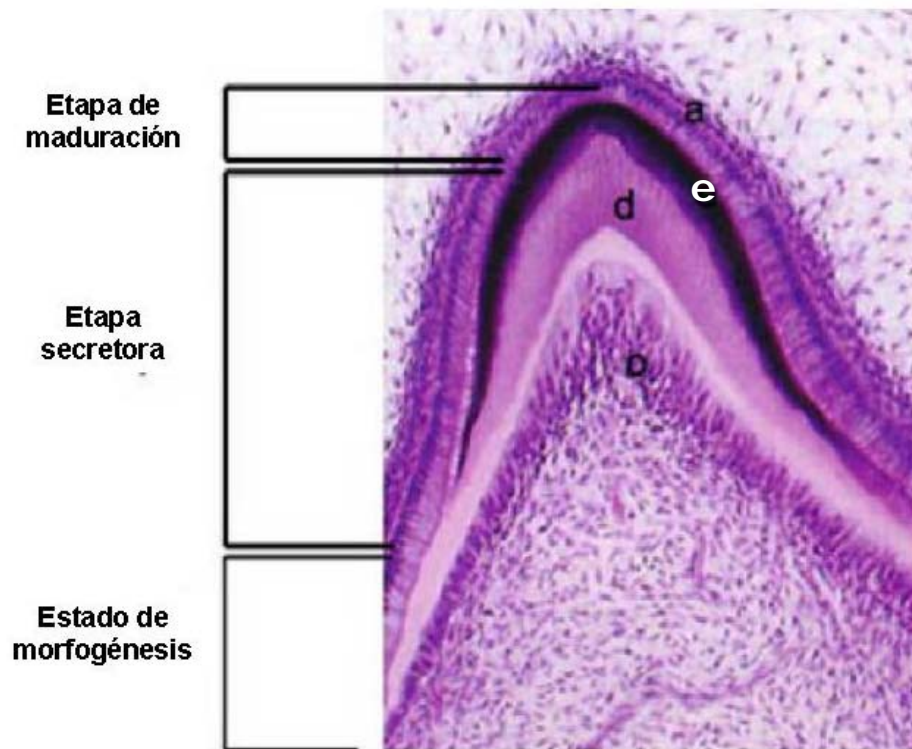


Figura 1. Tinción Hematoxilina-Eosina de diente en formación, mostrando las fases de desarrollo del esmalte. Abreviaciones: a: ameloblastos, d: dentina, e: matriz del esmalte, o: odontoblastos. (Adaptado de Bei *et al*, 2009).

matriz de la etapa secretora está formada por 90% de proteínas del tipo amelogeninas y 10% de proteínas no-amelogeninas o enamelinas. Dentro de las enamelinas se distinguen: tuftelina, amelina propiamente tal y ameloblastina, también llamada amelina o *sheathline*. En la segunda etapa de maduración se degrada la matriz proteica y se completa la mineralización. La proteasa predominante en esta última etapa es calicreína 4 (KLK4 ó EMSP1), cuya función sería remover la materia orgánica remanente para dar paso a la mineralización completa del tejido (Neville B., 1995; Simmer & Fincham, 1995; Sapp, 1998; Margolis *et al.*, 2006). Enamelisina o MMP-20 es una proteasa del esmalte que predominantemente se expresa durante la fase secretora de la amelogénesis y también en la etapa de maduración temprana donde cumpliría la función de degradar amelogenina (Hu *et al.*, 2007).

2.2 AMELOGÉNESIS IMPERFECTA (AI)

2.2.1 Definición

La Amelogénesis Imperfecta corresponden a un grupo de condiciones, de origen genético, que afectan la estructura y apariencia clínica del esmalte, las cuales pueden estar asociadas con cambios morfológicos o bioquímicos en otras partes del cuerpo (Aldred *et al.*, 2003). Estos defectos se limitan principalmente al esmalte, permaneciendo normales el resto de los componentes del diente. Pueden afectar tanto la dentición primaria, permanente o ambas (Sapp, 1998). En su forma más leve, AI causa decoloración y morfología anormal de las coronas dentarias, mientras que en su presentación más severa el esmalte es escaso, casi imperceptible, o presenta defectos en su estructura y composición, lo que permite que se pierda fácilmente del diente luego de la erupción. Estas condiciones pueden afectar tanto la estructura como la apariencia clínica del esmalte, de todos o casi todos los dientes, en mayor, menor o igual grado de severidad (Crawford *et al.*, 2007). Así mismo, las alteraciones genéticas

que subyacen a esta condición pueden ser heredadas con un patrón autosómico o ligado al sexo y, en ambos casos, pueden presentarse en forma recesiva o dominante.

2.2.2 Clasificación

De acuerdo al fenotipo resultante, es posible definir tres tipos fundamentales de Amelogénesis Imperfecta: hipoplásica, hipocalcificada e hipomadura. En las AI de tipo hipoplásicas (local o generalizada), existe un defecto en la secreción de la matriz del esmalte, causado por una interferencia en la función de los ameloblastos. El esmalte no tiene el espesor normal, es delgado o presenta cavidades, debido a defectos de aposición en áreas locales o generalizadas. La radio-opacidad del esmalte es mayor que la de la dentina (Witkop, 1988; Wright *et al*, 2003; Crawford *et al*, 2007). En las AI de tipo hipocalcificadas, el esmalte es de grosor normal, pero ocurre una mineralización defectuosa de la matriz, con nucleación y mineralización anormal de los cristallitos, que ocasiona que el esmalte sea blando y fácil de eliminar con un instrumento. En estos casos el esmalte es menos radio-opaco que la dentina (Witkop, 1988; Crawford *et al*, 2007). En las AI de tipo hipomaduras, el esmalte es de espesor normal, no así su dureza y transparencia. Ocurre un defecto en el crecimiento de los cristallitos durante la fase de maduración. El esmalte puede ser perforado por presión y separado de la dentina por exploración del tejido con un instrumento. La radio-opacidad del esmalte es aproximadamente la misma que presenta la dentina (Witkop, 1988; Sapp, 1998; Crawford *et al*, 2007). Basados en el proceso de Amelogénesis normal, en las manifestaciones clínicas y en el modo de herencia, esta anomalía ha sido clasificada en los tres tipos antes mencionados, con al menos 14 subtipos distintos (Witkop, 1988).

2.2.3 Prevalencia

AI es la patología hereditaria más frecuente dentro de los desórdenes del esmalte. La frecuencia estimada de AI en la población general varía entre 1 en 8.000 a 1 en 14.000, dependiendo del criterio diagnóstico y el carácter demográfico de la población investigada (Backman & Holm, 1986). Algunos estudios han reportado que las AI de tipo hipoplásicas son las más frecuentes en población extranjera (Witkop, 1988; NevilleB., 1995; Sapp, 1998).

2.2.4 Etiología genética de las Amelogénesis Imperfecta

Se han descrito formas de AI de tipo autosómica dominante y recesiva, además de formas ligadas al cromosoma X, también dominantes y recesivas. Por tal razón se considera que los desórdenes de AI presentan heterogeneidad genética e involucran mutaciones diferentes en un mismo gen o mutaciones en genes diferentes (Lagerstrom-Fermer & Landegren, 1995; Stephanopoulos *et al.*, 2005; Wright, 2006; Crawford *et al.*, 2007; Kida *et al.*, 2007). En este contexto, la **Tabla 1** resume la etiología genética de las AI. En ella se puede observar que, hasta la fecha, se han descrito siete genes causales de AI, para los cuales existe evidencia contundente de que, mutaciones en sus regiones codificantes o vecindades exón-intrón, son responsables de variados tipos clínicos de AI.

A continuación se realizará una breve descripción de cada uno de estos genes y del posible rol de sus productos proteicos en amelogénesis, conocimiento que ha sido obtenido principalmente a través del análisis genético-molecular de familias con esta condición heredada del esmalte:

Amelogenina (AMELX): La proteína amelogenina está codificada por genes ubicados en los cromosomas sexuales X e Y, y estaría involucrada tanto en el control del crecimiento como en la distribución espacial de los cristales. Es el gen causal en los casos de AI ligadas al cromosoma X. Hasta la fecha no se han reportado casos de

Tabla 1: Etiología genética de las Amelogénesis Imperfecta (Adaptada de Urzúa *et al*, 2010).

GENES INVOLUCRADOS (ubicación cromosómica) Producto proteico	FENOTIPO CLÍNICO	PATRÓN DE HERENCIA
1) <i>AMELX</i> (Xp22.3) Amelogenina	AI Hipoplásica/Hipomineralizada AI Hipoplásica/Hipomadura	Ligados al cromosoma X (Recesivos y/o Dominantes)
2) <i>DLX3</i> (17q21) Distal-less 3	AI Hipoplásica/Hipomineralizada asociada a Taurodontismo	Autosómicos Dominantes
3) <i>ENAM</i> (4q21) Enamelina	AI Hipoplásica severa generalizada AI Hipoplásica leve, localizada	Autosómicos Dominantes
	AI Hipoplásica generalizada severa asociada a mordida abierta anterior	Autosómicos Recesivos
4) <i>MMP-20</i> (11q22.3-q23) Enamelisina	AI Hipomadura	Autosómicos Recesivos
5) <i>KLK4</i> (19q13.4) Calicreína 4	AI Hipomadura	Autosómicos Recesivos
6) <i>WDR72</i> (15q21.3) Proteína 72, con repetidos WD	AI Hipomadura	Autosómicos Recesivos
7) <i>FAM83H</i> (8q24.3) Proteína Fam83h	AI Hipocalcificada	Autosómicos Dominantes

herencia ligada al cromosoma Y (Stephanopoulos *et al.*, 2005). Se han descritos 15 mutaciones en *AMELX*, de las cuales la mayor parte se relacionan con fenotipos hipoplásicos, que pueden presentarse en forma combinada, con defectos de hipocalcificación. (Urzúa *et al.*, 2010.).

Distal less 3 (*DLX3*): *DLX3* es un gen homeobox ubicado en el cromosoma 17. Mutaciones en este gen se han asociado con una variante de AI hipoplásica, con patrón de herencia autosómica dominante, vinculada al síndrome trico-odonto-óseo, el cual se caracteriza por hipoplasia del esmalte con taurodontismo y aumento del grosor y la densidad de los huesos craneales (Price *et al.*, 1999; Pavlic *et al.*, 2007).

Enamelina (*ENAM*): Hasta la fecha se han descrito 10 mutaciones en el gen que codifica la proteína enamelina ubicado en el cromosoma 4, las cuales se han asociado con AI del tipo hipoplásico y con un patrón de herencia autosómico dominante o recesivo (Stephanopoulos *et al.*, 2005). Enamelina es una proteína glicosilada y fosforilada que es clivada rápidamente luego de su secreción. La proteína intacta ha sido sólo observada en el frente de mineralización, lo que sugiere un rol importante en la elongación de los cristales (Hu *et al.*, 2007).

Enamelisina (*MMP20*): Enamelisina es una metaloproteinasas de la matriz extracelular, codificada por un gen ubicado en el cromosoma 11. Esta enzima tiene como función degradar las proteínas del esmalte para permitir la elongación de los cristales de hidroxiapatita y la mineralización (Lu *et al.*, 2008). Hasta la fecha, se han descrito 4 mutaciones en el gen *MMP20* asociadas con AI del tipo hipomadura, con patrón de herencia autosómico recesivo (Stephanopoulos *et al.*, 2005).

Calicreína 4 (*KLK4*): El gen *KLK4* se ubica en el cromosoma 19 y codifica una proteína que tiene actividad serín-proteasa, con capacidad de degradar proteínas del esmalte y que es secretada en la última fase de la amelogénesis. Se ha reportado sólo 1 mutación en pacientes con AI de tipo hipomadura autosómica recesiva. En estos casos el esmalte es pigmentado y posee alto contenido de proteínas, debido a la

incapacidad del mineral para desplazar la matriz orgánica anormalmente retenida (Lu *et al.*, 2008).

Proteína 72 con repetidos WD (*WDR72*): Este gen, localizado en el cromosoma 15, codifica una proteína que es exclusivamente citoplásmica y que se expresa en varios tejidos además del esmalte. Actualmente, se desconoce su función, pero se especula que tendría un rol en la exocitosis de vesículas dependiente de Ca^{2+} , durante la remoción de proteínas en la etapa de maduración tardía de la amelogenénesis (El-Sayed *et al.*, 2011). Se ha sugerido que la expresión de *WDR72* es crítica para la formación del esmalte dental y actualmente se han descrito 5 mutaciones vinculadas con AI autosómica recesiva de tipo hipomaduro (Lee *et al.*, 2010).

Familia con similitud de secuencia 83, miembro H (*FAM83H*): el gen *FAM83H*, ubicado en el cromosoma 8, codifica una proteína de función desconocida hasta ahora, pero se cree que *Fam83h* podría corresponder a una proteína periférica de membrana y que jugaría un rol en el tráfico intracelular o en la reorganización del citoesqueleto (Ding *et al.*, 2009). Se han descrito 16 mutaciones en este gen, las cuales se han asociado a defectos en la mineralización del esmalte y a variados fenotipos clínicos de AI autosómica dominante de tipo hipocalcificada (Urzúa *et al.*, 2010).

2.2.4.1 Organización estructural y funcional del gen Amelogenina (*AMELX*)

Amelogenina es la proteína más abundante de la matriz extracelular del esmalte en desarrollo. Esta proteína está codificada por el gen *AMELX* (locus AIH1, Xp22.3), el cual está constituido por 7 exones, abarcando una longitud total de 8 kb en el genoma, de los cuales parte del exón 2, los exones 3, 5, 6 y parte del 7 codifican para la proteína amelogenina en humanos (**Figura 2**). Existen 3 isoformas de amelogenina producto del procesamiento alternativo de su ARN mensajero (Sasaki & Shimokawa, 1995).

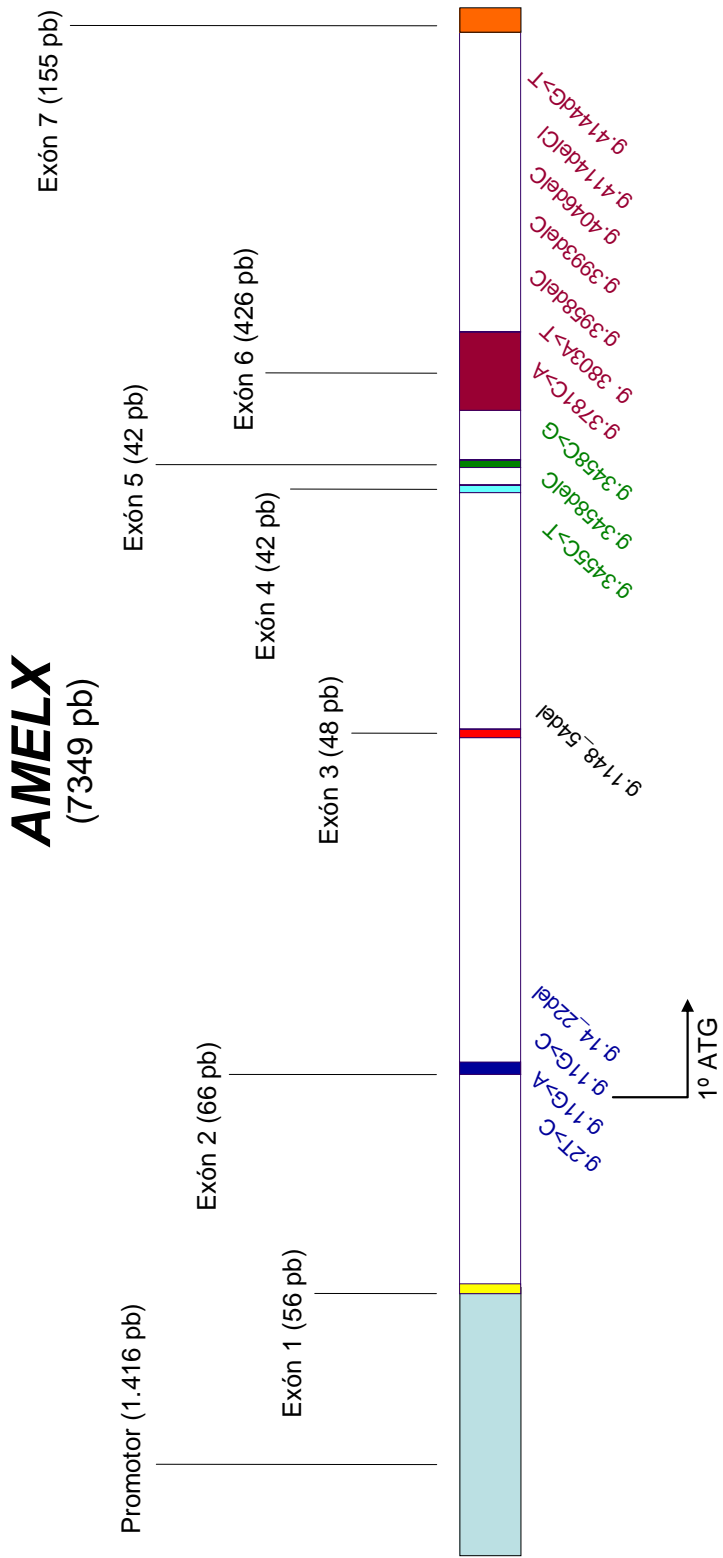


Figura 2: Organización de la estructura exón-intrón y región promotora del gen amelogenina (AMELX), mostrando la localización de las quince mutaciones reportadas hasta la fecha, las que son señaladas usando el color respectivo del exón en cual han sido ubicadas.

Amelogenina es una proteína cuya secuencia de aminoácidos es altamente conservada entre diferentes especies de mamíferos (Toyosawa *et al.*, 1998). Es una proteína hidrofóbica, rica en prolina, que posee un péptido señal ácido de 16 aminoácidos y es secretada primariamente como una cadena de 175 aminoácidos (Wright *et al.*, 2003). La secuencia aminoacídica de amelogenina puede ser dividida en 3 dominios en su estructura primaria, basados en las diferencias en su composición: a) un dominio N-terminal hidrofóbico de 45 aminoácidos que contiene 6 residuos de tirosina (región llamada TRAP, "tyrosine-rich amelogenin peptide"), b) una región central hidrofóbica formada por 100 a 130 residuos ricos en prolina, leucina, glutamina e histidina y c) un dominio C-terminal cargado e hidrofílico de 13 aminoácidos. Este último dominio presenta gran afinidad con mineral durante el crecimiento de los cristales (Ravindranath *et al.*, 1999; Margolis *et al.*, 2006).

Se piensa que amelogenina forma parte de un andamiaje orgánico que es esencial para controlar el ordenado crecimiento direccional de los cristales del esmalte. Sin embargo, su rol no ha sido absolutamente esclarecido. Su importancia se ha verificado a través de la asociación de defectos del esmalte con mutaciones presentes en el gen *AMELX* en humanos y la presencia de hipoplasia severa en ratones *Knock out* para este gen (Gibson *et al.*, 2001).

Amelogenina una vez que es secretada es procesada por proteasas del esmalte y se auto-ensambla para generar nanósferas, estructuras supramoleculares de alrededor de 20 nm, que facilitarían la organización y crecimiento de los cristales en el frente de mineralización del esmalte (Yang *et al.*). A esta proteína se le atribuyen diversas funciones: 1) controlar el tamaño del cristal, su morfología y orientación; 2) inhibir el crecimiento del cristal por formación de agregados proteína-mineral; 3) ser reservorio de iones minerales por poseer sitios de unión específicos; proporcionar sustento físico y distribución espacial a los cristales; 4) formación de agregados proteína-mineral tipo canal que facilitan la difusión de iones y fluido y 5) constituir una

concha de protección para el crecimiento de los cristales (Pugach *et al.*; Yang *et al.*; Paine *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2004; Margolis *et al.*, 2006).

El ensayo de doble híbrido en levaduras se ha utilizado para demostrar que amelogenina posee 2 dominios claramente definidos de autoensamblaje: el dominio A del extremo amino terminal que compromete los aminoácidos 1-42; y el dominio B que involucra los residuos de aminoácidos 157-173 (Paine & Snead, 1997). Durante la etapa de maduración, amelogenina es removida casi completamente por enzimas proteasas (enamelinasa o MMP-20), permitiendo finalizar el crecimiento de los cristales del esmalte para completar la mineralización final de este tejido (Wright *et al.*, 2003).

2.2.4.2 Correlaciones fenotipo-genotipo en AI ligadas al cromosoma X

Hasta la fecha se han descrito 15 mutaciones en *AMELX* que incluyen deleciones de varios tamaños y mutaciones *nonsense* y *missense* (**Tabla 2**). Estos errores determinan marcadas diferencias en los fenotipos resultantes, desde hipoplasia hasta hipomineralización-hipomaduración dependiendo del dominio donde se ubique la mutación (**Figura 2**). Los hombres afectados por AI suelen presentar fenotipos más severos debido a que expresan sólo un alelo para el gen *AMELX* (por poseer sólo un cromosoma X). Las mujeres, por otro lado, experimentan un fenómeno denominado *lyonización* (Lyon, 1961), que consiste en la inactivación aleatoria de una copia del cromosoma X como forma de compensación de dosis génica durante la embriogénesis. Es por esto que las mujeres afectadas por AI pueden mostrar un patrón mosaico presentando secciones de esmalte alterado y no alterado, producto de la metilación del gen *AMELX* en algunos ameloblastos, observándose como bandas verticales en los dientes. Esto último representa una característica importante en las mujeres afectadas por AI ligada al cromosoma X (Wright *et al.*, 2003).

En pacientes con hipoplasia del esmalte se han descrito cuatro mutaciones en el péptido señal (mutaciones N° 1 a 4, **Tabla 2 y Figura 2**). Estas mutaciones consisten

Tabla 2: Mutaciones descritas en el gen *AMELX* en casos de AI ligada al cromosoma X.

Nº	ADN genómico [^]	Exón	Proteína*	Región afectada	Referencia
1	g.2T>C	2	p.M1T	péptido señal	Kim <i>et al.</i> , 2004
2	g.11G>A	2	p.W4X	péptido señal	Sekiguchi <i>et al.</i> 2001
3	g.11G>C	2	p.W4S	péptido señal	Kim <i>et al.</i> 2004
4	g.14_22del	2	p.I5_A8delinsT	péptido señal	Lagerström-Fermer <i>et al.</i> 1995
5	g.1148_54del	3-7	p.18del	toda la proteína	Lagerstöm <i>et al.</i> 1991
6	g.3455C>T	5	p.T51Y	N-terminal	Lench and Winter, 1995
7	g.3458delC	5	p.P52fsX53	N-terminal	Aldred <i>et al.</i> 1992b; Lench <i>et al.</i> 1994
8	g.3458C>G	5	p.P52R	N-terminal	Kida <i>et al.</i> 2007
9	g.3781C>A	6	p.P70T	C-terminal	Collier <i>et al.</i> 1997; Hart <i>et al.</i> 2000
10	g.3803A>T	6	p.H77L	C-terminal	Hart <i>et al.</i> 2002
11	g.3958delC	6	p.H129fsX187	C-terminal	Sekiguchi <i>et al.</i> 2001
12	g.3993delC	6	p.Y141fsX187	C-terminal	Greene <i>et al.</i> 2002
13	g.4046delC	6	p.P158fsX187	C-terminal	Lench and Winter 1995
14	g.4114delC	6	p.L181fsX187	C-terminal	Kindelan <i>et al.</i> 2000; Hart <i>et al.</i> 2002
15	g.4144dG>T	6	p.E191X	C-terminal	Lench and Winter 1995

[^] = numeración basada en el nucleótido +1 del codón ATG de la secuencia genómica de referencia AY040206.

* = numeración basada en el aminoácido metionina como inicio en la posición +1; fs=marco de lectura; X=codón stop.

principalmente en cambios puntuales, dos transiciones y una transversión. Una de las transiciones se produce en el codón de inicio. Además se ha descrito la delección de 9 pares de bases, la cual produce la pérdida total de la secreción de amelogenina. Todas las mutaciones en el péptido señal afectan de alguna manera el proceso de secreción de la proteína, desde los ameloblastos hasta el espacio extracelular, y tienen como consecuencia un esmalte notoriamente disminuido en su espesor, pero bien mineralizado (Lagerstrom-Fermer *et al.*, 1995; Sekiguchi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004). Una delección de 5 kb compromete desde el exón 3 hasta parte del exón 7 (Nº 5 en **Tabla 2**). Esta mutación representa un *Knock out* humano de amelogenina, con sólo 2 aminoácidos codificados a partir del péptido señal. El fenotipo asociado es un defecto predominantemente hipomineralizado/hipomaduro. El esmalte se observa manchado, con una coloración opaca y las microradiografías demuestran que es hipomineralizado. Además, existe una hipoplasia variable generalizada (Lagerstrom *et al.*, 1991).

Todas las mutaciones que afectan parte del extremo N-terminal de la proteína amelogenina (mutaciones 6 a 8 en **Tabla 2**), están asociadas a un fenotipo clínico hipomineralizado/hipomaduro, en el cual el esmalte tiene una coloración café-amarilla. Estas alteraciones podrían explicarse porque la región N-terminal es rica en el aminoácido tirosina y es un sitio altamente conservado para la unión de carbohidratos y posiblemente proteínas del tipo queratina. A su vez, esta zona de la proteína contiene varios sitios relevantes de clivaje proteolítico (Lench *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 2003).

Las mutaciones reportadas en el extremo C-terminal (mutaciones Nº 9-15 en **Tabla 2**) se correlacionan con fenotipos hipoplásicos y en algún grado, con retención de material orgánico (fenotipo hipomaduro). La severidad del adelgazamiento del esmalte es variable llegando a ser extrema, formándose sólo una mínima cantidad de esmalte (Wright *et al.*, 2003).

En cinco mutaciones reportadas en *AMELX* una señal prematura de *stop* trunca la proteína y altera el extremo C-terminal de amelogenina (mutaciones Nº 11 a 15 en **Tabla 2**) (Pugach *et al.*, 2010).

Además, otras dos mutaciones que provocan el cambio de prolina por treonina en la posición 41 y de Histidina por Leucina en la posición 47 (mutaciones Nº 9 y 10 en **Tabla 2**) sugieren que estos cambios ocurren en sitios de clivaje altamente conservados, importantes en el procesamiento post secretorio de la matriz y en la maduración del esmalte (Collier *et al.*, 1997).

2.2.5 Histopatología de AI ligada al cromosoma X

Los estudios estructurales del esmalte de pacientes con AI ligada al cromosoma X, a través de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido (MEB), reflejan una disminución del grosor del esmalte, llegando a representar sólo un cuarto del esmalte normal (Kim *et al.*, 2004). Un elemento característico en el análisis ultraestructural observable a través del MEB, es la pérdida de la organización prismática del esmalte (Sauk *et al.*, 1972; Wright *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004). Este último fenómeno se produce en forma generalizada en el esmalte de hombres afectados, sin embargo, en mujeres se pueden observar áreas donde se conserva el patrón prismático, alternada con áreas de esmalte desorganizado (Sauk *et al.*, 1972). Por otra parte, la dentina no presenta alteraciones en relación a controles sanos conservando su estructura tubular (Ravassipour *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004).

2.3 CONTEXTO DEL ESTUDIO

Se han estudiado exhaustivamente las proteínas que participan en el desarrollo del esmalte, principalmente amelogeninas, pero las dificultades metodológicas encontradas no han permitido dilucidar con certeza el rol de cada una de ellas en el proceso de síntesis de esmalte, siendo sus funciones aún especulativas

(Stephanopoulos *et al.*, 2005). En este contexto, el estudio de familias con defectos heredados en la síntesis de esmalte, tales como AI, constituye una aproximación válida para abordar una serie de aspectos no resueltos. Por ejemplo, se desconoce el número total de genes involucrados en la ruta de síntesis, las funciones específicas que desempeñan cada uno de ellos en el proceso, las mutaciones que presenta la población Chilena portadora de este desorden, la prevalencia de AI en la población general en Chile y los tipos de AI más prevalentes en nuestro país, entre otros.

Actualmente, nuestro equipo de trabajo cuenta con varias familias con diagnóstico clínico de AI de diversos subtipos, las cuales han sido reclutadas en el servicio de diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. En el presente trabajo se describe exhaustivamente, a nivel clínico, histológico y molecular una de estas familias, cuyo patrón de herencia y fenotipo clínico sugieren que, de todos los genes causales descritos hasta la fecha para esta patología del esmalte, el gen amelogenina (*AMELX*) podría ser el más probable candidato para realizar un análisis mutacional de su secuencia promotora, regiones exónicas e intrónicas circundantes, mediante PCR y secuenciación directa, con el propósito de identificar mutaciones responsables del fenotipo clínico en este caso particular.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

“Los sujetos analizados en este estudio, pertenecientes a una familia chilena afectada por una alteración del esmalte, con posible patrón de herencia ligado al cromosoma X, presentan alguna de las mutaciones descritas, o una nueva variante causal, en el gen amelogenina (*AMELX*). Esta mutación alteraría la organización prismática y el grosor del esmalte dental de estos pacientes a nivel histológico y ultraestructural”.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar sujetos de una familia chilena afectada por un defecto del esmalte dental, mediante métodos clínicos, histológicos y genéticos, para describir las alteraciones clínico-radiográficas y cambios ultraestructurales del tejido afectado e identificar la mutación subyacente al fenotípico clínico.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Completar el análisis clínico-radiográfico de algunos miembros afectados de la familia en estudio.
- ❖ Realizar análisis histológico corriente y de microscopía electrónica de barrido a piezas dentarias provenientes de sujetos afectados con AI en la familia estudiada.
- ❖ Determinar en el ADN del probando de la familia en estudio, la presencia/ausencia de mutaciones previamente descritas en el gen amelogenina (*AMELX*), o la presencia de alguna nueva variante de secuencia.
- ❖ Correlacionar el fenotipo clínico de los sujetos afectados, con los hallazgos de los estudios histológicos, ultraestructurales y genético-moleculares realizados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ANÁLISIS CLÍNICO-RADIOGRÁFICO Y CONSTRUCCIÓN DE LA GENEALOGÍA

4.1.1 Individuos participantes

A) Tipo de estudio: Este trabajo de tesis corresponde a una investigación observacional, descriptivo clínico, histológico e imagenológico y genético de una familia afectada por una alteración del esmalte. Dada la naturaleza del estudio, el muestreo de los pacientes, sus familiares afectados y no afectados y sujetos control corresponde a un muestreo no probabilístico y específicamente a una muestra por criterio o fines especiales (un tipo de muestreo por conveniencia).

b) Pacientes con AI. En la presente tesis se estudió una familia afectada con AI de tipo hipoplásica. La paciente probando fue derivada a este grupo de estudio por una dentista odontopediatra, quien se encontraba realizando el tratamiento restaurador de los dientes afectados. Este grupo familiar está constituido por 13 sujetos, de los cuales 7 son mujeres (4 afectadas con AI) y 6 son hombres (1 afectado con AI). Se invitó a todos los integrantes de la familia a participar del estudio y quienes acudieron a esta cita se les explicó los objetivos del estudio y se les solicitó leer el consentimiento y/o asentimiento informado y firmarlo en caso de acceder a participar de este trabajo. Sólo de quienes firmaron este documento se obtuvo fotografías clínicas, radiografías y, si adicionalmente lo autorizaron, se les tomó muestras de sangre periférica y/o muestra de saliva. Se priorizó la toma de muestra de sangre y de saliva, pero en caso de niños y de adultos que se negaran a dar muestra sanguínea sólo se les tomó muestra de saliva.

c) Grupo control. Para el análisis de secuencia se estudiaron 2 sujetos sanos de ambos sexos (C1 y C2), sin Amelogénesis Imperfecta u otra patología del esmalte.

Estos sujetos presentaban edad, condición étnica y estatus socioeconómico similar a la del probando y fueron examinados con el mismo protocolo clínico aplicado a los pacientes. Adicionalmente, para el estudio histopatológico se incluyeron 2 sujetos sanos, de edad y sexo equivalente a la paciente en estudio, sin alteraciones clínicas ni radiográficas del esmalte dentario, quienes donaron dientes temporales exfoliados y sin caries, similares a los dientes analizados de la paciente afectada.

d) Procedimiento de consentimiento informado y autorización ética. Los individuos afectados y sujetos controles firmaron un consentimiento y/o asentimiento informado de su participación en este estudio (ANEXO 1 y 2), el cual fue aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (ANEXO 3).

4.1.2 Diagnóstico clínico de AI

El diagnóstico clínico y su fundamentación se realizó basándose en los datos clínicos, de anamnesis, radiográficos, histo-patológicos (cuando se dispuso de dientes) y genealógicos de la familia examinada, la cual fue evaluada según los criterios de la clasificación de Witkop C. (Witkop, 1988; Aldred et al., 1992), actualizados por Aldred M. J. (Aldred *et al.*, 1992b). Para ello, los pacientes y sujetos control fueron sometidos a:

a) Anamnesis. Se realizó anamnesis consultando por historia de enfermedades sistémicas, tratamiento farmacológico, consumo de flúor, lugar de residencia hasta los 15 primeros años de vida u otro antecedente que pudiera afectar la estructura dentaria durante el desarrollo. También se consultó por dolor dentario frente a estímulos térmicos y químicos.

b) Examen clínico. El examen clínico extra e intra-oral se realizó en el Servicio de Diagnóstico de la Facultad Odontología de la Universidad de Chile, para lo cual se contó con la correspondiente autorización del Director del Servicio. Este examen fue

ejecutado en forma independiente por dos Cirujanos Dentistas, especialistas en Patología Oral, calibrados, con fotos clínicas (Dra. Ana Ortega Pinto y Dra. Daniela Adorno Farías), completando la ficha clínica generada para ello (ANEXO 4). El procedimiento de examinación fue realizado usando un espejo Nº 5 y sonda de caries, secando con aire los dientes a examinar. Se consignaron datos relativos a mordida abierta anterior, alteraciones de forma y color de los dientes, tales como: pérdida de puntos de contacto y alteraciones de la superficie del esmalte.

Criterios de inclusión:

- Pacientes chilenos, con residencia en Chile en los primeros quince años de vida
- Pacientes que accedieron a firmar consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con alteraciones sistémicas como epilepsia, retardo mental severo, alteraciones del cabello, alteraciones óseas (Osteogénesis Imperfecta) u otras manifestaciones del desarrollo maxilo facial severas.
- Pacientes con historia de consumo de flúor terapéutico en los primeros quince años de vida
- Pacientes con residencia en la primera región de Chile (región con alta fluoración del agua potable) durante los primeros quince años de vida
- Pacientes con historia de consumo de tetraciclinas durante los primeros quince años de vida

c) Exámenes complementarios. Se tomaron radiografías retro-alveolares a los individuos afectados examinados, con un equipo de rayos X convencional de 70 Hz (Dental X, rayos ARM modelo dx-076, Belmont), las que una vez reveladas fueron analizadas en negatoscopio convencional. Además, se guardó registro fotográfico intra-oral de los pacientes afectados con AI, los que fueron fotografiados con una cámara digital Cyber-Shot DSC-HX1 (SONY).

d) Confección de la genealogía. La genealogía se construyó mediante entrevista al probando, sus progenitores y familiares que participaron en la investigación. Después de examinar el mayor número posible de individuos del grupo familiar, se confeccionó la genealogía. La asignación del modo de herencia se realizó por un análisis tradicional de la genealogía para el rasgo Amelogenesis Imperfecta, teniendo en cuenta los criterios descritos para cada tipo de herencia.

4.2 ANÁLISIS GÉNÉTICO-MOLECULAR

4.2.1 Obtención y cuantificación del material genético

a) Toma de muestra de sangre. Se procedió a extraer 5-10 ml de sangre venosa a los pacientes y sujetos controles, los cuales fueron depositados en tubos sellados al vacío que contenían EDTA como anticoagulante. Los tubos fueron agitados y almacenados a 4-6 °C, después de lo cual fueron procesados para purificar ADN genómico durante las 24 horas siguientes a la extracción. La toma de muestra fue realizada por un profesional Tecnólogo Médico o Enfermera.

b) Toma de muestra de saliva. Este procedimiento consistió en un raspado de la mucosa del piso de boca y caras internas de las mejillas utilizando una paleta de madera estéril, luego se le indicó al paciente que se enjuagara con 6 ml de una solución de glucosa al 3 % durante un minuto y que posteriormente depositara la solución dentro de un tubo estéril de 15 ml. Se repitió el paso del raspado de la mucosa oral y, finalmente, la paleta de madera se depositó dentro del tubo. Las muestras fueron almacenadas a 4-6 °C hasta su procesamiento para extraer ADN durante las 24 horas siguientes.

c) Purificación de ADN genómico a partir de sangre. El ADN genómico fue aislado a partir de sangre periférica, utilizando el protocolo *Probe*, modificado del método *Salting Out*, descrito por Miller *et al.*, 1988. Este procedimiento consistió en mezclar 5

ml de sangre, con una solución de lisis de glóbulos rojos (155 mM NH_4Cl , 9,98 mM KHCO_3 , 1 mM EDTA pH 8,0), la cual se dejó en agitación durante 15 minutos (min) a temperatura ambiente (TA), para posteriormente centrifugar durante 10 min a 5.000 rpm. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue resuspendido en vórtex agregando 1,5 ml de solución de lisis celular (25 mM EDTA y 69,35 mM SDS). Esta resuspensión fue incubada durante la noche a 37 °C. En el siguiente paso se agregó 1,5 ml de solución de precipitación de proteínas (10 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) y la mezcla fue centrifugada durante 20 min a 5000 rpm. El sobrenadante se traspasó a un tubo que contenía 2,5 ml de isopropanol frío, se dejó reposar y luego se rescató el ovillo de ADN y se depositó en un tubo Eppendorf limpio. El ovillo recuperado se lavó 3 veces con etanol frío al 70 %, se secó y finalmente se resuspendió en 100 μl de buffer TE (100mM Tris-Cl, 10mM EDTA).

d) Purificación de ADN genómico a partir de saliva. la extracción de ADN desde saliva se realizó utilizando el mismo protocolo que se usó para la extracción de ADN desde sangre, excepto que se partió con el sedimento de células epiteliales para el paso de lisis y finalmente la muestra de ADN fue resuspendida en 50 μl de buffer TE.

e) Cuantificación de ADN en las muestras. Para determinar la concentración e integridad de los ácidos nucleicos obtenidos con el método de purificación empleado, tanto para la purificación de ADN genómico como para la purificación de productos de PCR, se usó el método del mini gel de agarosa, con asistencia de un programa computacional. Este método consistió en la corrida electroforética de las muestras en un gel de agarosa cuya concentración varió entre 0,8 y 1,5%, de acuerdo a las necesidades. Como patrón se utilizó el ADN del fago λ digerido con la enzima *Hind* III, a una concentración de 40 ng/ μl . El gel se observó en transiluminador UV (National Labnet Company) y se registró mediante fotografía con una cámara digital (Cyber-Shot DSC-S650, Sony). Esta foto fue analizada haciendo uso del programa computacional 1D gel de Kodak, el cual permitió comparar la intensidad de fluorescencia de la banda

de interés con las bandas del estándar y determinar la concentración de ADN de la muestra.

4.2.2 Análisis mutacional del gen amelogenina (*AMELX*)

El análisis mutacional del gen amelogenina se realizó usando ADN genómico correspondiente al probando de la familia en estudio. El análisis de la secuencia promotora, codificante completa y de las vecindades exón-intrón del gen se llevó a cabo mediante PCR y secuenciación directa.

a) Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

i) **Diseño de partidores.** Los exones del gen amelogenina, y sus vecindades exón-intrón, fueron amplificados usando los partidores específicos mostrados en la **Tabla 3**, según el esquema mostrado en la parte superior de la tabla. Estos partidores fueron diseñados en base a la secuencia de referencia del gen *AMELX*, cuyo número de acceso es AY040206, usando la herramienta "Primer Blast" del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), disponible en el sitio web http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome. Los partidores utilizados para secuenciar el exón 3 se obtuvieron del trabajo publicado por Kindelan et al., 2000.

ii) **Reacción de PCR.** La reacción en cadena de la polimerasa fue llevada a cabo en los termocicladores Perkin Elmer®, Gene AMP PCR System, modelo 2400 y Labnet Multigene Gradient. Como blanco se usó 50-100 ng de ADN genómico de los pacientes y sujetos control. La reacción fue diseñada para un volumen final de 25 µl, que contenía tampón PCR 10X pH 8,4 (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3); 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de una mezcla equimolar de los cuatro desoxirribonucleótidos (Invitrogen®), 1µM de cada partidore (obtenidos de Alpha ADN® o IDT®) y 0,5 unidades de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) Boline®. Cuando fue

necesario re-amplificar fragmentos se usó la enzima ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) Stratagene®. El programa de ciclaje térmico consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min y posteriormente 35 ciclos de: desnaturalización a 95° C por 30 seg; alineamiento de los partidores a la temperatura adecuada, por 30 seg (temperatura adaptado a cada pareja, según **Tabla 3**) y extensión a 72° C por 3 min, con un paso de extensión final a 72° C por 10 min.

iii) Electroforesis de ADN. La técnica de electroforesis de ADN en geles de agarosa se realizó según Sambrook & Russel, 2001. Brevemente, la agarosa fue disuelta en tampón TAE pH 7,9 (40 mM Tris-HCl, 5 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA) con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5µg/ml y por calentamiento se llevó hasta ebullición para su disolución. Las muestras de ADN, previamente mezcladas con tampón de carga 6X (35% glicerol, 2% ficoll, 0,25% azul de bromofenol, tampón TBE 6X), se cargaron en un gel de agarosa y la electroforesis se corrió a un voltaje constante de 60 Volts, por 1-2 horas. Los geles de agarosa fueron observados en un transiluminador UV, a una longitud de onda de 302 nm. Cada gel fue registrado tomando una foto con una cámara digital. Para determinar el tamaño molecular de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, se usó como patrón el marcador de tamaño molecular 100 bp *plus* (Fermentas®), para lo cual se utilizó el programa computacional de análisis de imágenes 1D gel de Kodak®.

iv) Purificación de productos PCR. Los amplificados obtenidos de las diferentes parejas de partidores, fueron obtenidos en varias y simultáneas reacciones de PCR, con el objeto de acumular suficiente cantidad de cada fragmento para ser usado en las reacciones de secuenciación. Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el método del paquete comercial *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®), como lo indica el fabricante. Para ello, la reacción de PCR (o la disolución de un bloque de agarosa) conteniendo el fragmento a purificar, fue mezclada en igual proporción con solución de unión a la membrana y transferida a la minicolumna SV

Tabla 3: Ubicación, nombre, secuencia, tamaño y temperatura de alineamiento de los partidores utilizados para la amplificación y secuenciación de la región promotora y codificante completa del gen amelogenina (*AMELX*). El esquema mostrado en la parte superior de la tabla muestra la ubicación de cada pareja de partidores en relación al promotor y a la estructura exón-intrón del gen.

Ubicación	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	tº de annealing (°C)	
Promotor	AmelxP1F	CTCCCTGATTGGAAGGTCTTACC	I	595	59
	AmelxP1R	CCCCTTCCCTAAGCAATGACC			
	AmelxP2aF	GCTGACAGGGTTGGGAGAGTAA	II	736	61
	AmelxP2aR	GGCAAGGAGTGCACACCAGACA			
	AmelxP2bF	GGGCAAAGAAGGGCCGCCATA	III	558	61
	AmelxP2bR	AAGCTTCTCTGCCATCGCCTTTTCC			
	AmelxP3F	ATAGAGCAGTGGTGATCCCAA	IV	533	59
AmelxP3R	AAACTCAGGGATGCTTGATCCT				
Exón 1	AmelX 1 F	GCTAGAACTGAGGAAAAGGCGA	V	600	58
	AmelX 1 R	TGTGGCCAAGAAAGACCTTTGG			
Exón 2	AmelX 2 F	GGTAGACTGTGCACGAGACATTT	VI	719	58
	AmelX 2 R	CCCAGCTGTACCAAATCAGAA			
Exón 3	Amx3F	TGTGTGCTGTTTCTGCTTC	VII	575	60
	Amx3R	CGGCCATATTTAGGAGGACA			
Exones 4, 5 y 6	Amelx 4-5-6 F	GGACAGTGTTCACCTCTCTT	VIII	1612	58
	Amelx 4-5-6 R	GCTCCCTCTGTCTTAAGCCTTC			
4 5 6 internos*	456 int a F	CCCTGTGTAACCTCAGTCAAGTTAA	IX	985	-
	456 int a R	GCTGCATGGGGAACATCGG			
	456 int b F	GGCCACCGGTATGTAGACATT	X	261	-
	456 int b R	GGCAGGTTTACCATTGGCTCA			
Exón 7	Amelx7b F	AGCCTGACATGCAAGACGTACC	XI	523	58
	Amelx7b R	TGAGCAGTTCCTACCTGATTCAAGA			

* Se utilizaron partidores internos para realizar la PCR de secuenciación utilizando como molde el fragmento producido por los partidores Amelx 4-5-6 F-R.

ensamblada sobre el tubo de colección, donde se incubó por 1 min a TA. Posteriormente, el ensamblaje fue centrifugado a 14.000 rpm en microcentrífuga por 1 min y el líquido colectado fue descartado. La columna fue lavada con 700 μ l de solución de lavado de la membrana y el ensamblaje centrifugado durante 1 min a 14.000 rpm, descartando el líquido colectado nuevamente. El lavado se repitió con 500 μ l de solución de lavado y el paso de centrifugación se realizó por 5 min a la misma velocidad. La minicolumna se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se adicionó 50 μ l de agua, libre de nucleasas en el centro de la membrana y se incubó por 1 min a TA, para finalmente eluir el ADN centrifugando por 1 min a 14.000 rpm.

iv) Purificación de productos PCR. Los amplificados obtenidos de as diferentes parejas de partidores, fueron obtenidos en varias y simultáneas reacciones de PCR, con el objeto de acumular suficiente cantidad de cada fragmento para ser usado en las reacciones de secuenciación. Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el método del paquete comercial *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®), como lo indica el fabricante. Para ello, la reacción de PCR (o la disolución de un bloque de agarosa) conteniendo el fragmento a purificar, fue mezclada en igual proporción con solución de unión a la membrana y transferida a la minicolumna SV ensamblada sobre el tubo de colección, donde se incubó por 1 min a TA. Posteriormente, el ensamblaje fue centrifugado a 14.000 rpm en microcentrífuga por 1 min y el líquido colectado fue descartado. La columna fue lavada con 700 μ l de solución de lavado de la membrana y el ensamblaje centrifugado durante 1 min a 14.000 rpm, descartando el líquido colectado nuevamente. El lavado se repitió con 500 μ l de solución de lavado y el paso de centrifugación se realizó por 5 min a la misma velocidad. La minicolumna se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se adicionó 50 μ l de agua, libre de nucleasas en el centro de la membrana y se incubó por 1 min a TA, para finalmente eluir el ADN centrifugando por 1 min a 14.000 rpm.

Para purificar fragmentos provenientes de bloques de agarosa, se utilizó también el método *Gene Clean* (Boyle & Lew, 1995). En este protocolo los productos de PCR se sometieron a una corrida electroforética y se cortaron las bandas correspondiente a cada amplificado. Luego, estos bloques de agarosa se disolvieron en una solución de Yoduro de Potasio (IK) 6 M durante 15 min a 55 °C. Posteriormente, se incubaron con 14 µl de *Glass Milk* (Dioxido de sílice disuelto en IK 3 M) durante 10 min a TA. Se centrifugaron 30 segundos (seg) a 13.500 rpm, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó 3 veces con solución *New Wash* (TRIS HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM, EDTA 2.5 mM pH 7.5 y etanol 98%). Posteriormente, se centrifugó durante 30 seg a 13.500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las muestras se secaron para eliminar todo el etanol y se resuspendieron en 14 µl de agua estéril. La elución del ADN se realizó incubando esta mezcla a 55°C por 10 min, con agitación en vórtex ocasional, después de lo cual se centrifugó a 13.500 rpm durante 2 min y finalmente se rescató el sobrenadante en un tubo limpio. La concentración de ADN de los fragmentos purificados se realizó utilizando en sistema del mini gel de agarosa, tal como se mencionó anteriormente.

b) Secuenciación de productos PCR. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones, usando los partidores con los cuales fueron amplificados a una concentración de 10 µM, y utilizando como ADN molde 50 ng totales de cada producto purificado. La reacción de secuenciación fue realizada utilizando el paquete comercial DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing de Amersham Biosciences, en las condiciones descritas por el fabricante. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el secuenciador automático ABI PRISM® 3100-Avant de Applied Biosystems. Este servicio se realizó en el Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Además, en algunos casos se enviaron muestras de ADN a la empresa MacroGen de Korea.

c) Análisis de secuencias. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de referencia del gen amelogenina usando el programa computacional Vector NTI versión 10.0 (Invitrogen, Informax). La secuencia de referencia se obtuvo de la base de datos de secuencias de nucleótidos (Entrez Nucleotide) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), cuyo sitio web se ubica en la dirección: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&cmd=search&term=>]. El número de acceso utilizado para obtener la secuencia del gen *AMELX* fue AY040206.

4.3 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURAL

4.3.1 Piezas dentarias analizadas. Se obtuvieron piezas dentarias correspondientes a 2 incisivos temporales exfoliados de la hermana del probando del estudio, también diagnosticada con AI, los cuales fueron procesados para su observación. Se utilizó una pieza para microscopía de luz y una pieza para MEB. En cada procedimiento se utilizaron 2 dientes exfoliados de sujetos controles, de sexo y edad equivalente, que fueron procesados de igual manera que los dientes del individuo afectado con Amelogénesis Imperfecta.

4.3.2 Análisis de dientes a través de microscopía de luz. Los dientes de pacientes con AI y sujetos controles fueron sometidos a cortes en sentido vestibulo-lingual con una sierra diamantada en el equipo de corte Iso Met 1000, Presicion Saw, Buehler y posteriormente lijados y pulidos en una piedra de Arkansas, hasta un grosor aproximado de 100 μm . Posteriormente fueron sometidos a dos lavados de 30 min cada uno en etanol 96 %, 2 lavados de 30 min cada uno en etanol 100 % y finalmente 2 pasos en xilol, de 1 hora y durante la noche, respectivamente. Luego, fueron montados con medio de montaje en un porta-objetos para su observación y se tomaron fotografías en el microscopio de luz Olympus DX 41 con aumentos de 10X y

4X. El grosor del esmalte afectado se comparó con el esmalte control utilizando el programa computacional Micrometrics SE Premium, midiendo 4 puntos diferentes en la zona cuspea.

4.3.3 Análisis de dientes a través de Microscopía electrónica de barrido. Los dientes se limpiaron con hipoclorito de sodio al 5 % y fueron cortados transversalmente en sentido vestibulo-lingual con un disco de carborundum en casi la totalidad de su perímetro, dejando un borde sin cortar, el cual, posteriormente fue fracturado y seleccionado como punto de observación del esmalte. De esta manera fue posible percibir la morfología del esmalte de la muestra sin artefactos producidos por corte con el disco. Posteriormente, los dientes fueron deshidratados en acetona ascendentes de 70%, 90% y 100%. El secado final, metalizado, observación y captura de imágenes se realizaron en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, en un microscopio Zeiss modelo DMS 940 del Centro de Equipamiento y Servicio de Apoyo Tecnológico (CESAT) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, servicio que fue comprado a esta entidad.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS CLÍNICO-RADIOGRÁFICO Y GENEALOGÍA DE LA FAMILIA ANALIZADA

La genealogía de la familia se construyó a partir de las entrevistas realizadas a todos los sujetos voluntarios que participaron en este estudio y también considerando los datos proporcionados por los análisis clínicos y de anamnesis de los pacientes que se pudo examinar. No fue posible acceder a todos los integrantes de la familia para realizar el examen clínico intra y extraoral, por lo que resultó complejo definir con certeza la forma de herencia del rasgo AI en este grupo familiar. En la **Figura 3** se muestra la genealogía construida con la información recopilada, donde se puede apreciar que el sujeto I.2, reportado afectado, transmite el rasgo a todas sus hijas, lo que determina un mayor número de mujeres afectadas que de hombres. Como se observa en la figura, en el caso de los individuos II.1 y II.5, los hijos de estas mujeres, independientemente de su sexo, tienen 50% de probabilidades de ser afectados y en ambos casos estos descendientes varones, que fueron examinados clínicamente, presentaron esmalte normal y por lo tanto no se encontraban afectados. En contraste a esta situación, la mujer afectada II.3 transmite el rasgo a sus dos hijas (III.2 y III.3) quienes resultaron afectadas. El análisis de esta genealogía sugiere que el modo de transmisión más probable del rasgo AI en esta familia es compatible con herencia dominante ligada al cromosoma X, aunque con los datos disponibles no se puede descartar un patrón de herencia autosómico dominante.

Al realizar la anamnesis, se descartó que a temprana edad los integrantes de la familia: hubiesen vivido en zonas de Chile con alta concentración de flúor en el agua potable, consumieran flúor profiláctico por vía sistémica en forma de gotas o comprimidos y que hubiesen ingerido antibióticos que alteran el desarrollo dentario como las tetraciclinas. Al consultar por antecedentes de epilepsia, alteraciones visuales

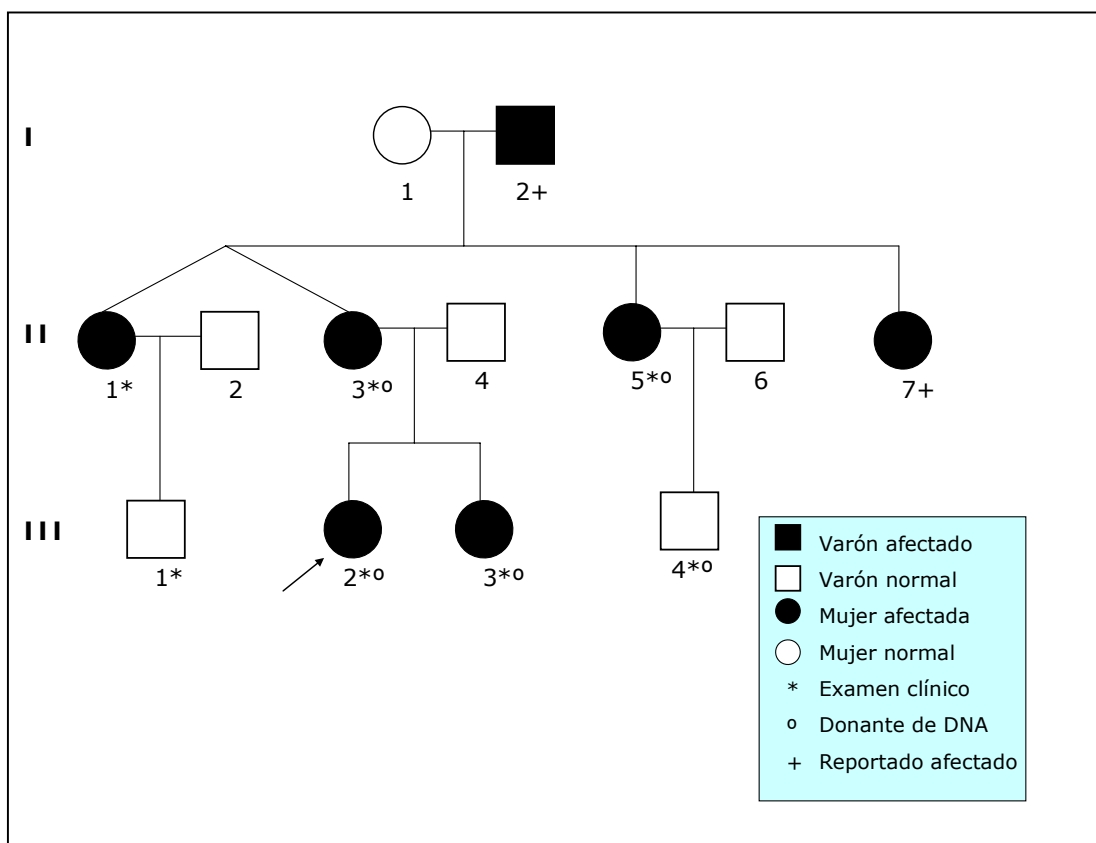


Figura 3: Genealogía de la familia afectada con Amelogénesis Imperfecta hipoplásica lisa, dominante ligada al cromosoma X, tipo IE según la clasificación de Witkop.

u otras patologías sistémicas, ninguno de los pacientes relató historia de estas condiciones.

En un total de 7 pacientes examinados pertenecientes a la familia en estudio, se diagnosticaron 5 individuos afectados. En todos los pacientes afectados se observó disminución del grosor del esmalte y alteración variable de la coloración en todos los dientes, siendo más evidente la variación en el grosor en la dentición permanente. En el caso de la probando del estudio (sujeto III.2, en la **Figura 3**, indicado con una flecha negra), el primer registro de ella se realizó cuando tenía 15 años de edad. Se observó en la dentición permanente un esmalte de menor grosor (**Figura 4A y 4B**), con desgastes importantes de las puntas de las cúspides (**Figura 4B**, flechas celestes), especialmente a nivel de caninos, premolares y molares inferiores, con diastemas entre todas las piezas dentarias (señalados mediante asteriscos en color verde en la **Figura 4A**). Estos dientes también presentaban una coloración blanco-opaca, con una superficie rugosa y tendencia a la formación de bandas verticales, formadas por alteración de la textura de la superficie. La alteración del grosor del esmalte fue evidente también en las radiografías retroalveolares (**Figura 4C**), en donde se aprecia que el esmalte presenta un grosor de aproximadamente un tercio del esmalte normal. En esta paciente también se observó alteración de la erupción y de la formación coronaria de un canino superior izquierdo y del canino inferior derecho (**Figura 4A y 4B**, flechas de color blanco), los cuales presentaban una erupción de menos de un tercio coronario, cuando la paciente ya presentaba totalmente erupcionados sus segundos molares, sus premolares y los otros dos caninos. Tal como se observa en la radiografía (**Figura 4C**), estos caninos también presentaban un escaso grosor del esmalte en la zona coronaria, dejando una pulpa dentaria con escasa aislación del medio externo.

En relación a la paciente III.3, hermana menor de la probando, que al momento del primer examen tenía 7 años, se observó que tanto los dientes temporales como los

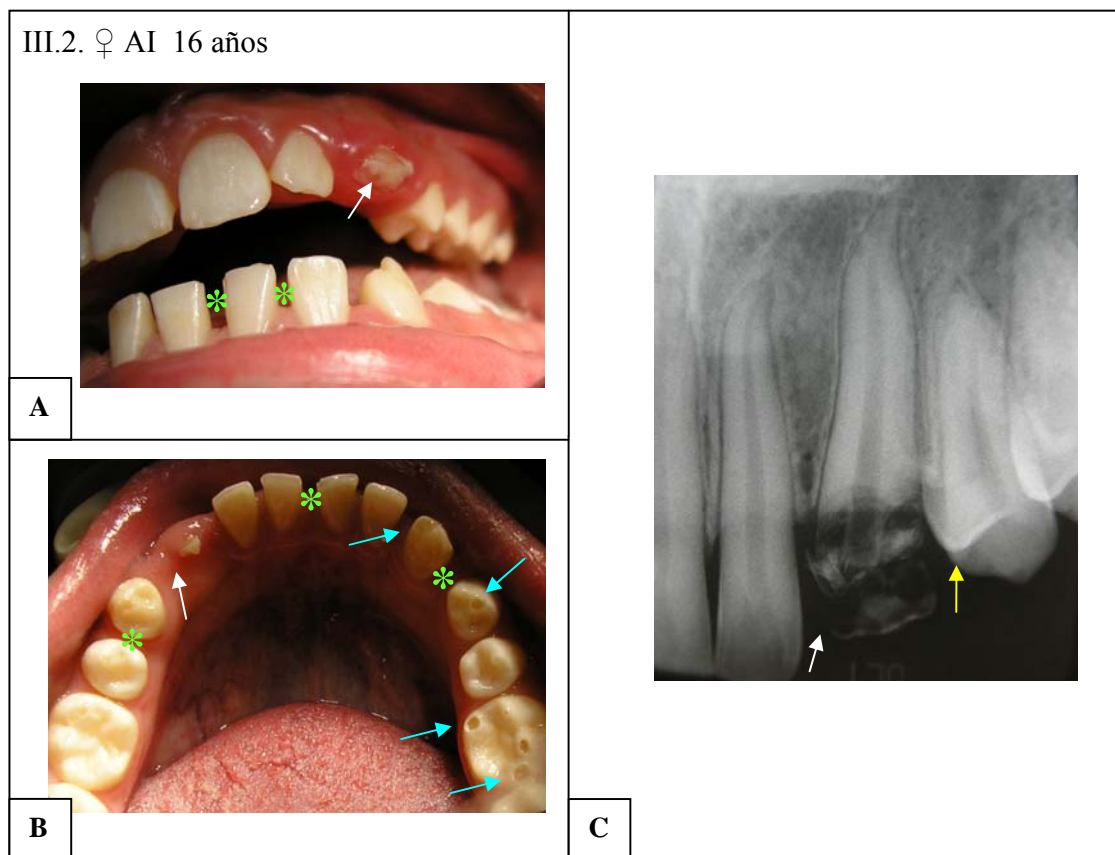


Figura 4: Fotos clínicas (**A**, **B**) y radiografía retroalveolar (**C**) de la probando del estudio, sujeto III.2 de la genealogía. Las flechas blancas señalan caninos con retardo de la erupción, los asteriscos en color verde indican la presencia de diastemas y las flechas celestes muestran cúspides con hipoplasia/atrición en las piezas N° 19, 21 y 22 (1° molar, 1° premolar y canino inferior derecho). En la radiografía retroalveolar se puede observar la disminución del grosor del esmalte.

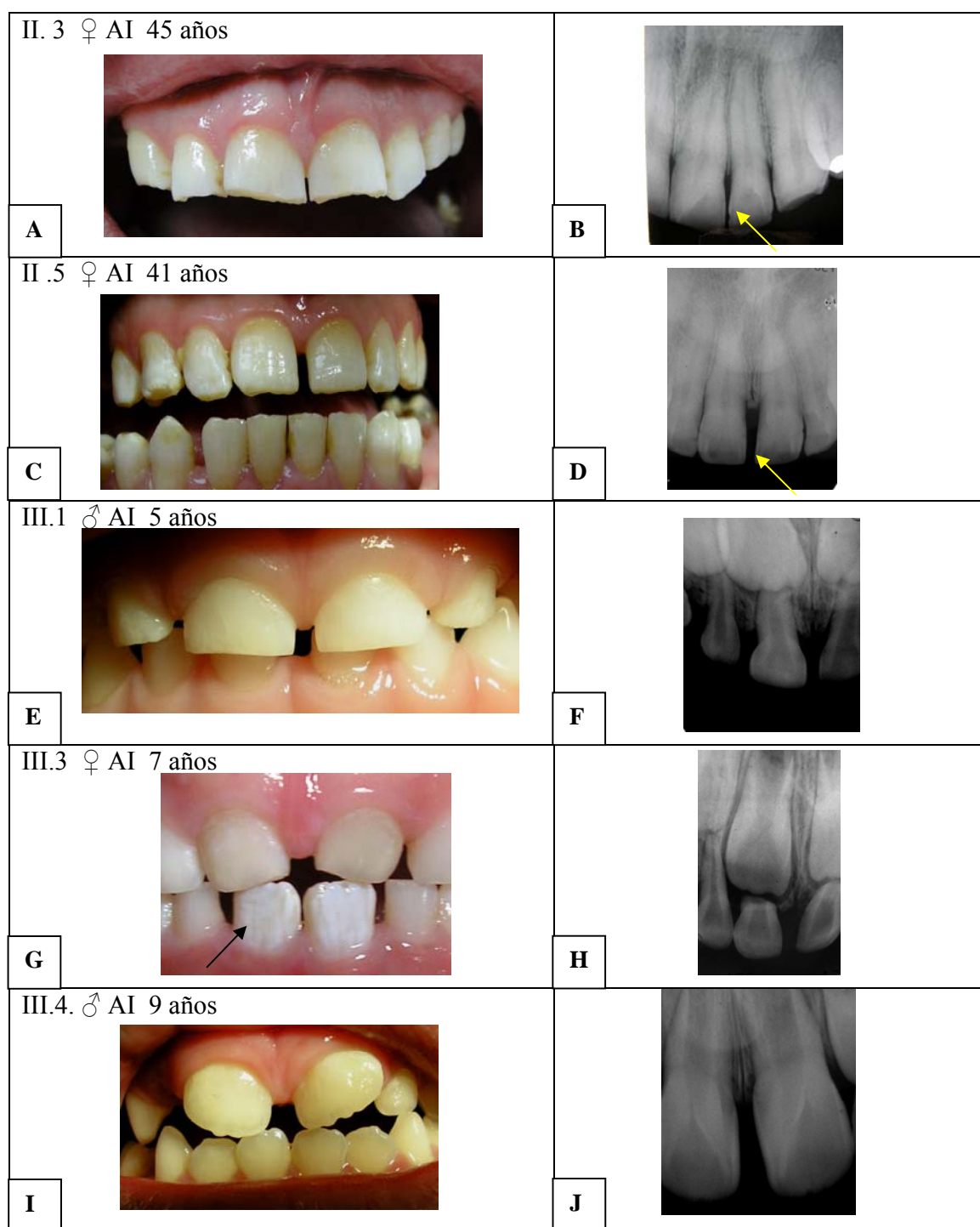


Figura 5: Fotos clínicas (**A, C, E, G, I**) y radiografías retroalveolares (**B, D, F, H, J**) de parientes afectados (II.3, II.5 y III.3) y no afectados (III.1, III.4) de la probando perteneciente a la familia diagnosticada con Amelogénesis Imperfecta hipoplásica lisa, dominante ligada al cromosoma X, tipo IE de Witkop. La flecha negra indica la presencia de bandas verticales alternadas, de esmalte normal y defectuoso, característico de este patrón de herencia. En las radiografías retroalveolares de los pacientes afectados se observa muy delgado y escaso contraste con la dentina (flecha amarilla).

permanentes, tenían un esmalte de menor grosor (**Figura 5G**), lo que fue más evidente en las radiografías retroalveolares (**Figura 5H**). En los dientes deciduos, la coloración del esmalte era de tonalidad amarillo-grisáceo, lo que contrastaba con la coloración blanco-opaco de los dientes permanentes recién erupcionados (**Figura 5G**). En los incisivos permanentes centrales inferiores, se distinguió la presencia de bandas verticales blanco-opacas y amarillo-grisáceo (**Figura 5G**, flecha negra), fenómeno que también se pudo observar en la hermana mayor (probando) pero con menor grado de expresión. Es importante señalar que este característico fenotipo clínico permite sustentar con mayor grado de certeza la hipótesis de herencia ligada al cromosoma X en esta familia. Tal como se aprecia en la **Figura 5G**, en esta niña, fue evidente también una inserción baja del frenillo superior.

Con respecto a la madre de la probando (sujeto II.3 de la genealogía), se observó una fuerte atrición que comprometía aproximadamente un cuarto de los bordes incisales del grupo dentario antero superior (**Figura 5A**) y una alteración del grosor del esmalte en tercio oclusal de caninos y premolares. Los molares remanentes en esta paciente, presentaban caries extensas, con gran destrucción del esmalte. En la radiografía retroalveolar, se puede apreciar que el esmalte también presenta un grosor disminuido con respecto a lo normal (**Figura 5B**).

En las pacientes II.1 (imágenes no mostradas) y II.5 (**Figura 5E**) las alteraciones del esmalte observadas fueron muy similares entre sí, la alteración del grosor del esmalte fue más evidente en tercio medio de los caninos y premolares. Nuevamente, a nivel de los molares, se observa importante atrición de las cúspides. Todas las piezas permanentes presentaban áreas blanco-opacas y alteración de la superficie con presencia de bandas verticales (**Figura 5C**).

Los hombres analizados (III.1 y III.4) que al momento del examen tenían 5 y 9 años respectivamente, no presentaron defectos evidentes en los dientes permanentes o temporales (**Figuras 5E, F, I, J**).

Por otra parte, es importante señalar que en el estudio radiográfico, tanto de los pacientes afectados como no afectados, no se detectó presencia de taurodontismo, ni de displaceraciones radiculares exageradas.

Dado que la madre de la probando relató antecedentes de “piedrecillas en los riñones”, además del retardo de la erupción dentaria de los caninos y la alteración más severa del grosor del esmalte en estos dientes de la probando, se solicitó como examen complementario ecografía renal para descartar nefrocalcinosis. Este examen, que fue realizado en la probando y en su madre, arrojó resultados negativos.

Finalmente, el análisis de todos los antecedentes clínicos recopilados durante el estudio de esta familia y relatados anteriormente, nos conducen a pensar que el diagnóstico clínico corresponde a Amelogénesis Imperfecta hipoplásica lisa, con herencia dominante ligada al cromosoma X, tipo IE, de acuerdo a la clasificación de Witkop (Witkop, 1988).

5.2 ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR

5.2.1) Purificación de ADN genómico de pacientes y sujetos control.

Se dispuso de muestras de ADN genómico extraído desde sangre periférica y/o de saliva de 4 individuos afectados y de 1 sujeto no afectado de la familia en estudio. Adicionalmente, se obtuvo ADN genómico de los dos sujetos sanos controles de sangre periférica. **La Figura 6** muestra un gel de agarosa con un ejemplo de los resultados del procedimiento de extracción de ADNg a partir de sangre y saliva, de la probando de la familia estudiada (sujeto III.2) y de un individuo no relacionado (mujer sana, sin Amelogénesis Imperfecta), empleada como control 1 (C1). En todos los carriles del gel se observa una banda intensa de alto peso molecular correspondiente a la migración del ADNg (ADN genómico). Tanto la extracción de ADN desde sangre como de saliva, dieron como resultado un ADN de buena calidad, sin degradación y sin presencia de ARN contaminante. De acuerdo a la intensidad de las bandas mostradas en los carriles

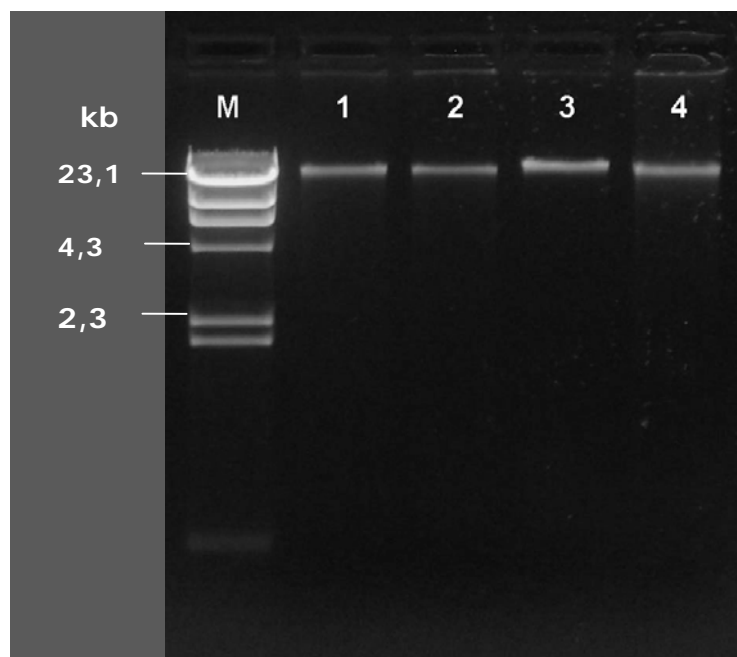


Figura 6: Gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, que muestra resultados representativos del procedimiento de purificación y cuantificación de ADN genómico de individuos de la familia estudiada y sujetos control. **Carril M:** 400 ng del marcador de tamaño molecular ADN del fago lambda digerido con la enzima *Hind* III, **carril 1:** 1 μ l de una dilución 1/10 de ADNg extraído de sangre del sujeto control 1 (C1), **carril 2:** 1 μ l de ADNg extraído de saliva del sujeto C1, **carril 3:** 1 μ l de una dilución 1/10 de ADNg extraído de sangre del paciente III.2, **carril 4:** 1 μ l de ADNg extraído de saliva del paciente III.2.

1 y 3, que contienen una dilución de ADN_g obtenido de sangre de un sujeto control y de la probando respectivamente, se pudo calcular que el procedimiento de extracción permitía obtener una concentración y un rendimiento promedio de aproximadamente 600 ng/ul y 30 ug totales por muestra. En los carriles 2 y 4 se muestran los resultados de la extracción de ADN de saliva, cuya concentración promedio fue de 70 ng/ul, con un rendimiento de aproximadamente 4 ug totales por muestra.

5.2.2) Amplificación y purificación de fragmentos que contienen la región promotora, secuencias exónicas e intrónicas circundantes del gen amelogenina (*AMELX*).

La obtención de segmentos génicos que contienen la región regulatoria (promotor del gen) y la secuencia codificante completa (exones), con las respectivas vecindades intrónicas del gen amelogenina (*AMELX*), se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior purificación de los amplicones obtenidos. Al respecto, la **Figura 7** muestra un gel de agarosa representativo del proceso de amplificación del gen amelogenina completo realizado con ADN_g del probando de la familia, utilizando los partidores descritos en la **Tabla 3**. Los fragmentos amplificados de 595, 736, 558 y 533 pb mostrados en los carriles 1 al 4 de esta figura representan la región correspondiente al promotor del gen. La región codificante del gen, formada por los exones 1 al 7, más las regiones intrónicas circundantes consideradas en este análisis, están representadas por amplicones que tienen tamaños de 600 (exon 1), 719 (exón 2), 575 (exón 3), 1612 (exones 4-5-6) y 523 (exón 7) pb respectivamente, tal como se muestra en los carriles 5 al 9 de la **figura 7**. A este nivel de resolución, los tamaños de los fragmentos producidos a partir del ADN_g del probando coinciden con los tamaños esperados para cada producto de PCR, lo que indica que no hay variaciones gruesas observables, tales como grandes deleciones o inserciones de bases.

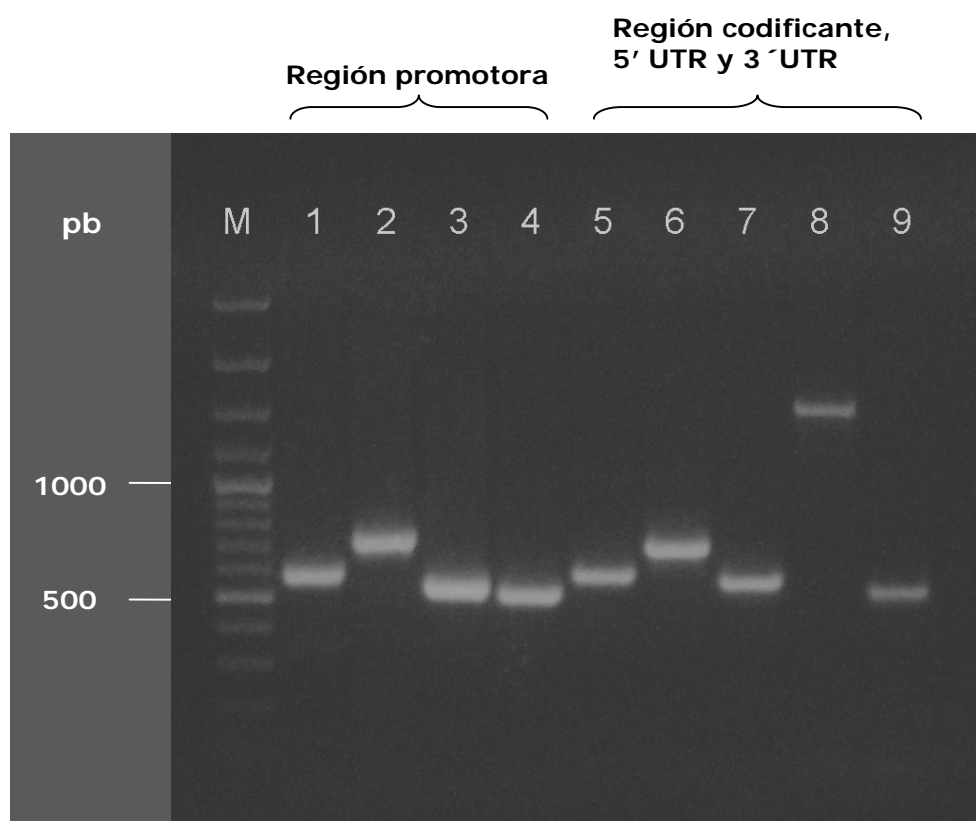


Figura 7: Gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra resultados representativos del procedimiento de amplificación de la región regulatoria y codificante completa del gen amelogenina (*AMELX*), realizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando partidores específicos y 75 ng de ADNg del probando del estudio (sujeto III.2). **Carril M:** 500 ng del marcador de tamaño molecular escalera de 100 pb. **Carriles 1 al 4:** 15 μ l de la reacción de amplificación de la región promotora del gen, representada por los fragmentos de 595, 736, 558, y 533 pb, amplificados con los partidores AmelxP1F-R, AmelxP2aF-R, AmelxP2bF-R y AmelxP3F-R, respectivamente. **Carriles 5 al 9:** 15 μ l de la reacción de amplificación de la región codificante del gen representada por los fragmentos de 600 (exón 1), 719 (exón 2), 575 (exón 3), 1612 (exones 4-5-6) y 523 (exón 7) pb, amplificados con los partidores AmelX1F-R, AmelX2F-R, AmelX3F-R, AmelX456F-R y AmelX7bF-R, respectivamente.

Una vez obtenidos los amplicones, representando la región regulatoria y codificante del gen amelogenina, éstos fueron purificados como se indicó en la sección de métodos. La **Figura 8** muestra un gel de agarosa representativo del procedimiento de extracción y cuantificación de ADN de los fragmentos amplificados, obtenidos cortando las bandas directamente desde el gel de agarosa.

La gran intensidad de las bandas revelan un óptimo resultado del proceso de purificación, con el cual se obtuvo una concentración y rendimiento promedio de aproximadamente 40 ng/ul y 800 ng totales por muestra, los que fueron disponibles para la posterior reacción de secuenciación.

5.2.3) Secuenciación de ADN de la región promotora y codificante del gen amelogenina (AMELX) en el probando de la familia en estudio.

El análisis de la secuencia de todos los fragmentos del gen amelogenina amplificados usando el ADNg de la paciente III.2, probando del estudio, y de un sujeto control sano (C1), reveló que no existían alteraciones de secuencia patogénicas en la región promotora del gen, ni en las regiones exónicas e intrónicas circundantes analizadas, que representan los exones 1 al 7 del gen completo. Tampoco se detectó la presencia de alguna de las quince mutaciones reportadas previamente en la literatura para AMELX (**Tabla 4**). A modo de ejemplo, en la Figura 9 se incluyen dos cromatogramas de secuenciación de ambas hebras del ADNg de la paciente III.2 que muestran parte de la región correspondiente al exón 5 (**Figura 9A**), donde se han descrito las mutaciones g.3455C>T, g.3458delC y g.3458C>G y parte de la secuencia del exón 6 (**Figura 9B**) donde se ha reportado la mutación g.3803A>T. En ambos esquemas se puede apreciar que no hay cambio de bases en las posiciones antes señaladas, encerradas en un rectángulo en la figura 9A y B, lo cual indica que esta paciente no presenta dichas mutaciones en el gen AMELX.

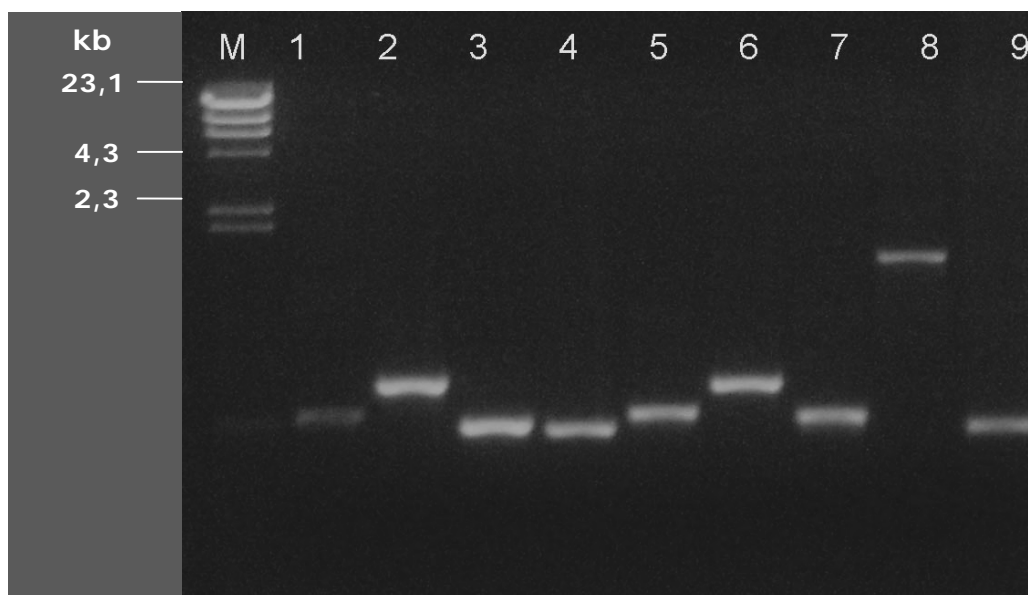


Figura 8: Gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra los resultados del procedimiento de purificación y cuantificación de productos de PCR desde los geles de agarosa, usando el sistema comercial "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" de Promega® o el método de *Gene Clean*. **Carril M:** 400 ng del marcador de tamaño molecular ADN del fago lambda digerido con la enzima *Hind* III. **Carriles 1 al 4:** 2 ul de los fragmentos de 595, 736, 558 y 533 pb purificados, correspondientes a la región promotora del gen amelogenina (*AMELX*). **Carriles 5 al 9:** 2 ul de los amplicones de 600, 719, 575, 1612 y 523 pb, correspondientes a los exones 1 al 7 con las respectivas vecindades intrónicas del gen *AMELX*.

Tabla 4: Tabla que resume los resultados de secuenciación del promotor y de todas las secuencias exónicas e intrónicas circundantes del gen amelogenina (*AMELX*), realizada en ADNg del probando del estudio y de un sujeto control sano no relacionado (C1).

Región del gen <i>AMELX</i> analizada	Mutaciones Reportadas	Paciente III.2	Sujeto Control 1
Región promotora	sin mutaciones descritas	-	-
Exón 1	sin mutaciones descritas	-	-
Exón 2	g.11G>A	-	-
	g.14_22del	-	-
	g.1148_54del	-	-
	g.2T>C	-	-
	g.11G>C	-	-
Exón 3	sin mutaciones descritas	-	-
Exón 4	sin mutaciones descritas	-	-
Exón 5	g.3455C>T	-	-
	g.3458delC	-	-
	g.3458C>G	-	-
Exón 6	g.3781C>A	-	-
	g. 3803 ^a >T	-	-
	g.3958delC	-	-
	g.3993delC	-	-
	g.4046delC	-	-
	g.4114delC	-	-
g.4144dG>T	-	-	
Exón 7	sin mutaciones descritas	-	-

Un signo (-) indica ausencia mutaciones en relación a la secuencia de referencia (AY040206) y a la secuencia del sujeto control.

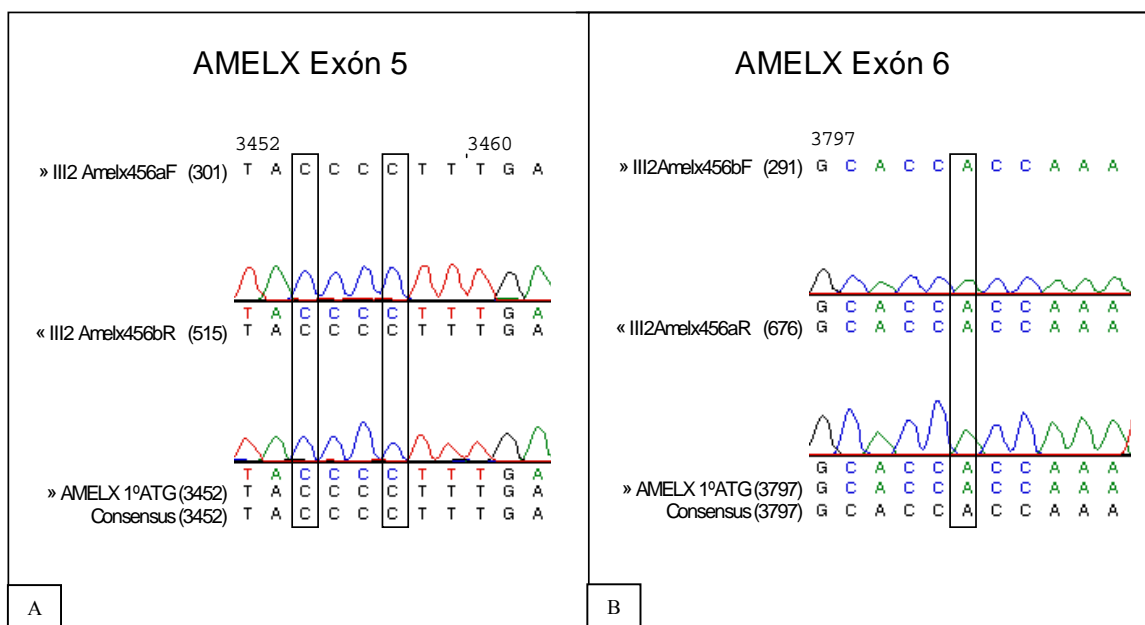


Figura 9: Cromatogramas de secuenciación de ambas hebras del ADN de la paciente III.2 (probando del estudio), correspondientes a secuencias parciales del exón 5 (**A**) y del exón 6 (**B**), donde se localizan algunas mutaciones previamente reportadas en el gen *AMELX*. La primera y segunda secuencia mostradas en ambas figuras corresponden a la secuencia obtenida con el partidador Amelx456F, la tercera y cuarta secuencias corresponden a la secuencia obtenida con el partidador Amelx456R, la quinta secuencia corresponde a la secuencia de referencia del gen amelogenina (AY040206) y la sexta secuencia corresponde a la secuencia consenso del alineamiento realizada por el programa de análisis (Vector NTI, v10.0). Los rectángulos indican las posiciones donde deberían ubicarse las mutaciones reportadas.

No obstante lo anterior, se encontró una variante de secuencia en la región correspondiente al intrón 2 del gen amelogenina en el ADNg del probando. Este cambio correspondió a una sustitución de tipo transición, que cambia una base T por C en la posición 119 del ADNg, considerando como +1 el primer nucleótido del codón ATG de la secuencia genómica de referencia AY040206 del gen *AMELX*. Para determinar si esta variante de secuencia podría ser patogénica en esta familia y explicar el fenotipo clínico de AI en los sujetos afectados, se procedió a verificar si esta variante reunía algunos de los criterios de causalidad descritos por Cotton and Scriver, 1998 y Kuhlenbäumer *et al.*, 2011.

Se realizó el análisis de segregación de la variante con el fenotipo clínico en la familia y en sujetos controles. La **Tabla 5** muestra los resultados de este análisis y en ella se puede observar que tanto los sujetos afectados como no afectados de la familia presentan el cambio, al igual que los dos sujetos control analizados. La **Figura 10** muestra dos cromatogramas de secuencia que permiten visualizar el cambio de una base T por C en la posición 119 del ADNg del paciente afectado II.5 y del sujeto control (C1). Tal como se aprecia en esta figura, la variante de secuencia detectada se encuentra en condición homocigota en estos sujetos y también en el resto de los individuos analizados (datos no mostrados).

Adicionalmente, se realizó una búsqueda de esta variante en la base de datos de polimorfismos de nucleótidos únicos (dbSNP), disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) y se encontró que esta variante corresponde a un SNP previamente descrito, designado con el código de identificación de grupos de SNP's de referencia: rs946252. Un análisis de este SNP intrónico usando el programa NNSPLICE 0.9, disponible en la dirección electrónica www.fruitfly.com.org, que detecta los sitios dadores y aceptores de *splicing* desde el extremo 5' a 3' de la secuencia, reveló que no hay diferencias entre la secuencia portadora del SNP rs946252 y la secuencia de referencia.

Tabla 5: Tabla resumen del análisis de detección de la variante g.119T>C encontrada en el intrón 2 del gen *AMELX* (corespondiente al SNP rs946252), realizado en todos los integrantes de la familia afectados y no afectados, de los cuales se disponía de material genético, además de dos sujetos control sanos no emparentados (C1, mujer y C2, varón).

Variante analizada	Integrantes de la familia y controles analizados para detección de la variante						
	afectado II.3	afectado II.5	afectado III.2	afectado III.3	sano III.4	sano C1	sano C2
Rs946252	+	+	+	+	+	+	+

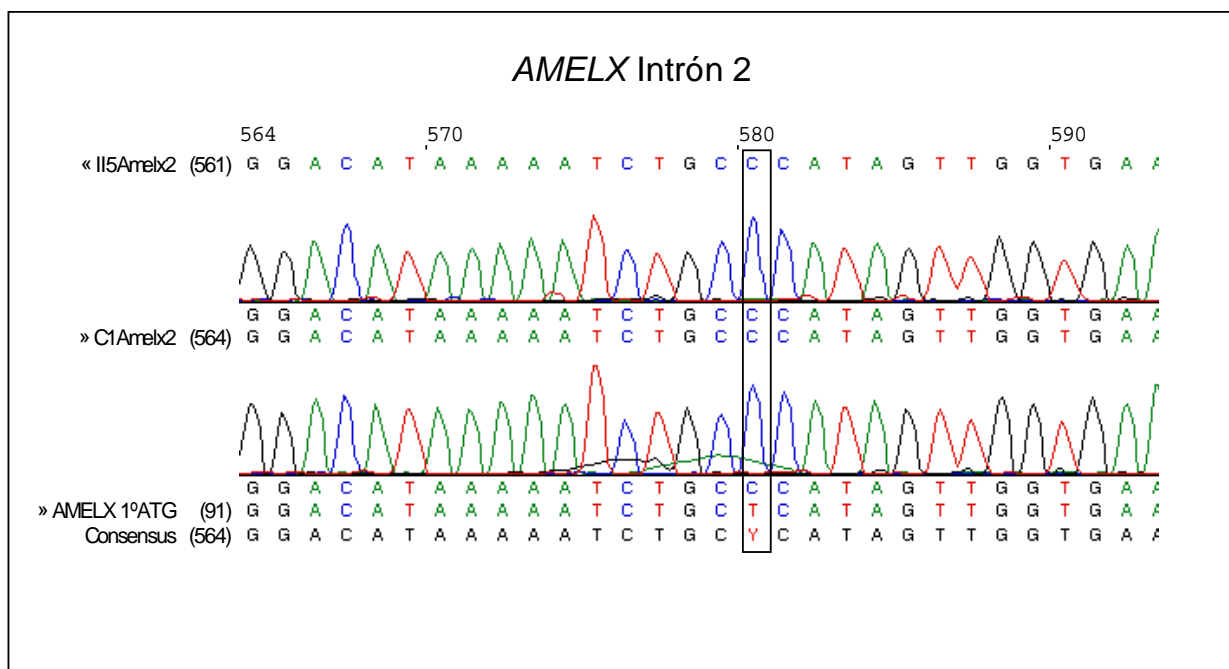


Figura 10: Cromatogramas de secuenciación de una hebra del ADN del paciente afectado II.5 y un sujeto control (C1), correspondientes a un sector del fragmento de 719 pb amplificado con los partidores Amelx2F-R. El cromatograma muestra parte de la secuencia del intrón 2 del gen amelogenina y el rectángulo señala la posición 119 del ADN donde se detectó el cambio de la base T por C. La primera y segunda secuencia corresponden a la secuencia obtenida con el partidador Amelx2F en el paciente II.5, la tercera y cuarta secuencia corresponden a la secuencia obtenida con el partidador Amelx2F en el sujeto C1, la quinta secuencia corresponde a la secuencia de referencia del gen amelogenina (AY040206) y la sexta secuencia corresponde a la secuencia consenso del alineamiento realizada por el programa de análisis (Vector NTI, v10.0).

El análisis de todos los antecedentes recopilados acerca de la causalidad de la variante intrónica encontrada en este estudio, nos permiten afirmar con un alto grado de certeza que este cambio de secuencia en el intrón 2 del gen amelogenina no es patógeno y por lo tanto no se puede considerar como una mutación causal de AI en esta familia.

5.3) ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE PIEZAS DENTARIAS AFECTADAS CON AI

5.3.1 Análisis de piezas dentarias afectadas con AI a través de microscopía de luz

Los cortes histológicos de un incisivo temporal inferior exfoliado de la paciente III.3 (**Figura 11B**), revelaron diferencias sustanciales en el grosor del esmalte con respecto al incisivo temporal inferior de una niña sana control (**Figura 11A**). Es posible apreciar que el esmalte afectado (**Figura 11D**) representa menos de la mitad del grosor del esmalte normal (**Figura 11C**). En este análisis y al nivel de resolución de la técnica empleada, no se detectaron cambios estructurales en el esmalte. Por otro lado, la dentina no presentó diferencias en cuanto a su apariencia entre el diente afectado por AI y el diente control.

5.3.2 Análisis de piezas dentarias afectadas con AI mediante microscopía electrónica de barrido

La observación a través de MEB permitió distinguir la microestructura del esmalte de las piezas temporales analizadas. En el diente control es posible distinguir el patrón prismático característico del esmalte, incluso con bajo aumento (**Figura 12A**). A mayor aumento la estructura cilíndrica y alargada de los prismas es más evidente (**Figura 12B**). En relación al diente temporal de la paciente III.3 (**Figura 12**

C, D y E), es posible reconocer diferencias con respecto al control sano, donde la característica principal es una organización prismática más irregular que en el control (**Figura 12C**). Con mayor aumento, en algunos segmentos del esmalte afectado, se pueden observar prismas relativamente bien conservados (**Figura 12D**), mientras que en otras áreas, la estructura de los prismas es menos clara (**Figura 12E**).

En la **Figura 13A** se muestra la dentina del sujeto control sano, en la cual se aprecia claramente los túbulos dentinarios, que corresponden a conductos que recorren la totalidad del tejido, desde la pulpa hasta el límite amelodentinario. En el diente afectado no se detectaron diferencias en la estructura dentinaria con respecto al control (**Figura 13B**).

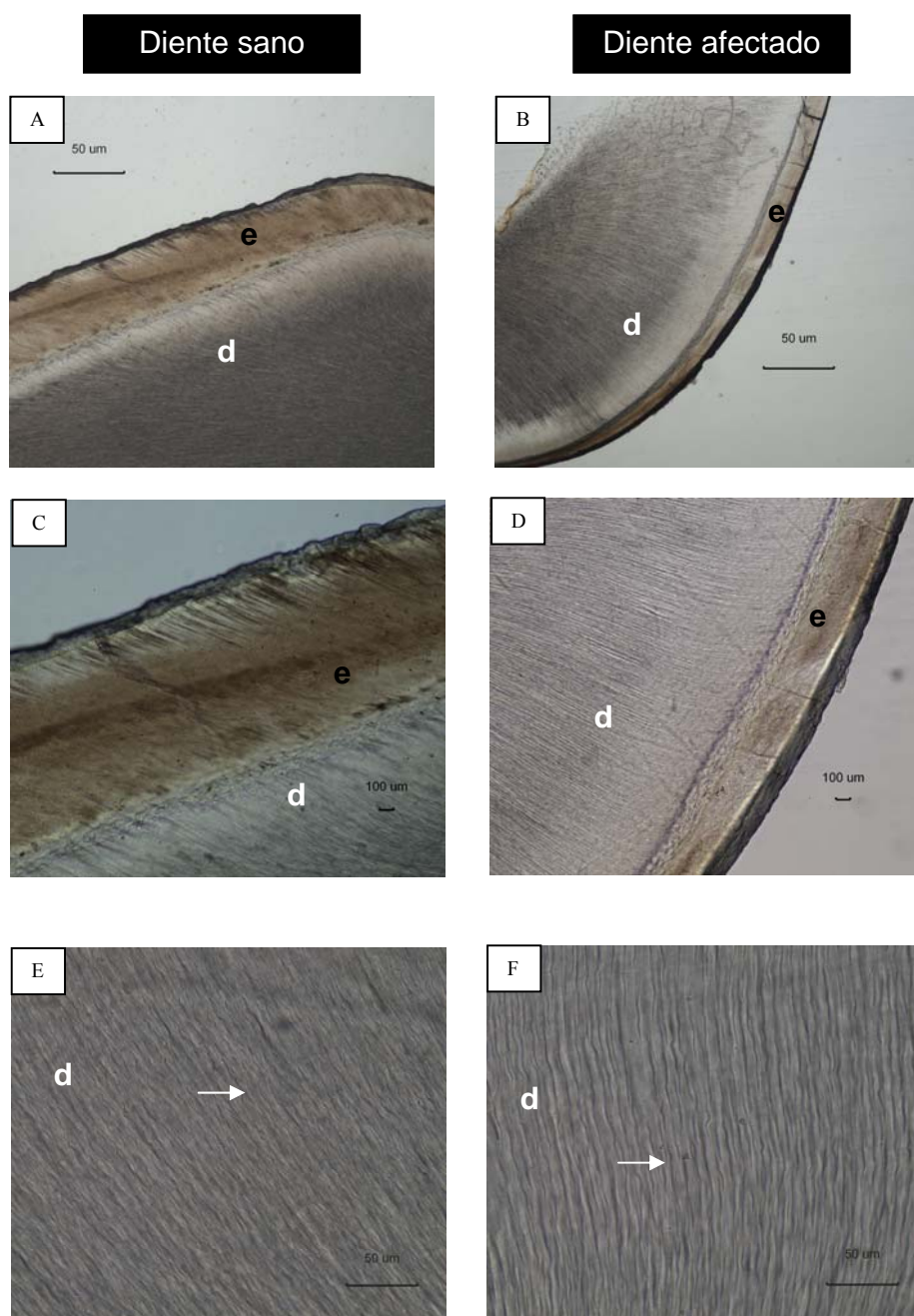


Figura 11: Microfotografías de cortes histológicos obtenidos por desgaste de dientes temporales sin descalcificar. Las fotos **A), C) y E)** corresponden a cortes de diente control sano y las fotos **B), D) y F)** a cortes de diente del paciente III.3 afectado con Amelogénesis Imperfecta. La letra **e** indica esmalte, **d** señala dentina y la flecha blanca muestra túbulos dentinarios.

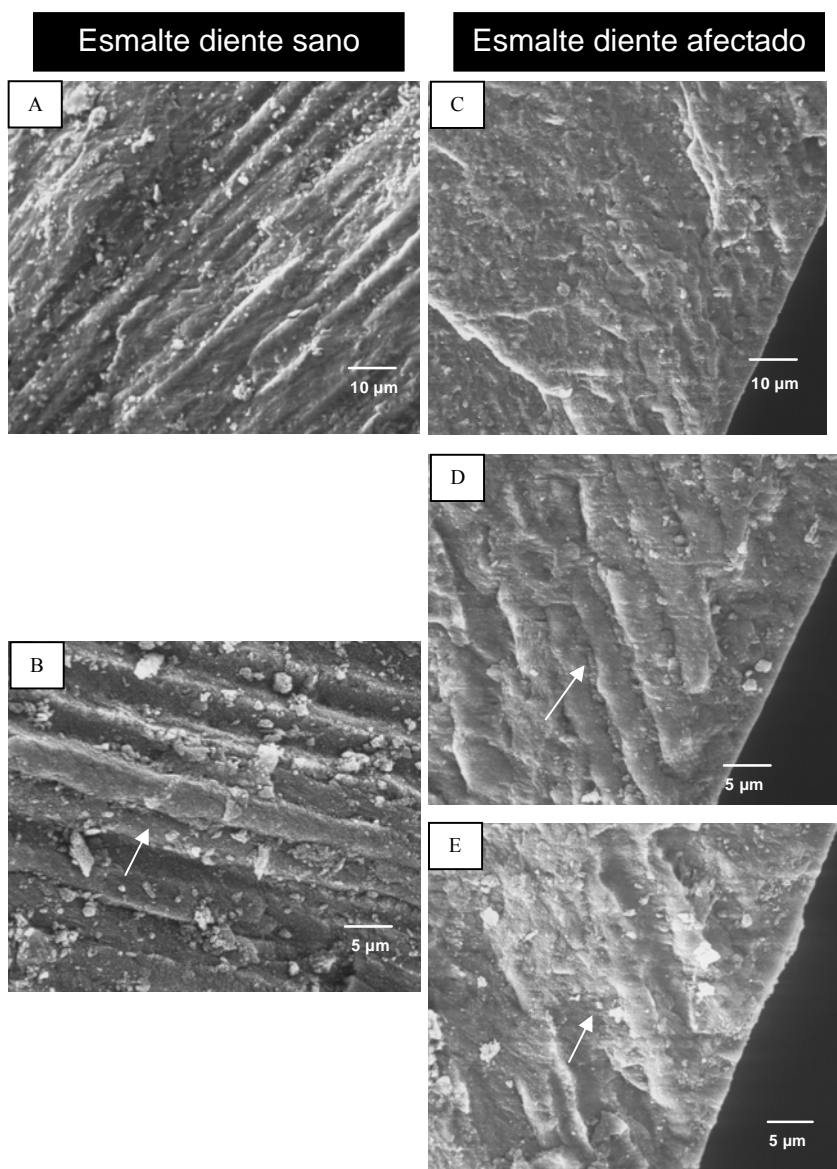


Figura 12: Microscopía electrónica de barrido de superficie de dientes temporales fracturados. **A)** Microfotografía del esmalte sano, 1000X. **B)** Vista del esmalte sano con mayor aumento, se pueden apreciar estructuras prismáticas (flecha blanca), 2000X. **C)** Microfotografía del esmalte dental de un sujeto afectado con Amelogénesis Imperfecta (paciente III.3), 1000X. **D)** y **E)** Vista con mayor aumento de diente afectado, zonas de esmalte en las que se distinguen estructuras prismáticas conservadas (flecha blanca) **(D)** intercaladas por segmentos donde éstas se observan parcialmente **(E)** (flecha blanca), 2000X.

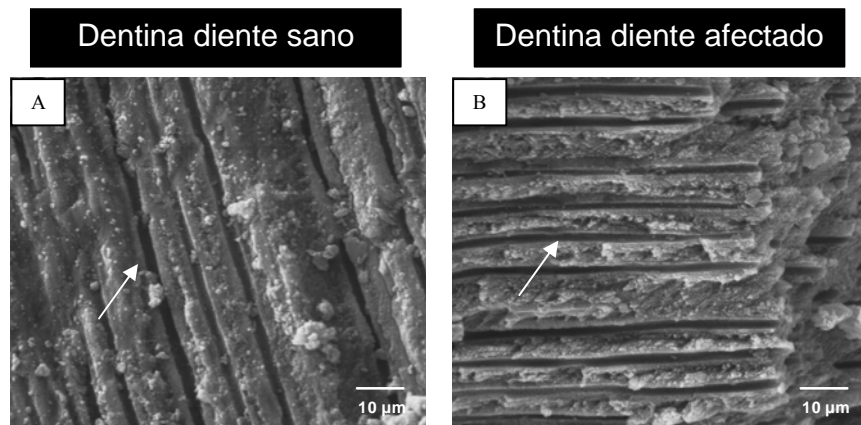


Figura 13: Microscopía electrónica de barrido de superficie de dientes temporales fracturados. **A)** Microfotografía de dentina de diente perteneciente a un control sano, 2000X. **B)** Dentina de diente de sujeto afectado con AI (paciente III.3), 2000X. En ambas microfotografías se pueden observar túbulos dentinarios intactos, característicos de la dentina (flecha blanca).

6. DISCUSIÓN

Las *Amelogénesis Imperfecta* (AI) no sindrómicas son un grupo de condiciones genéticas que afectan la estructura, composición química y apariencia clínica del esmalte dental. Los diferentes tipos de AI (hipoplásico, hipocalcificado e hipomaduro), se correlacionan con defectos en las etapas del proceso de síntesis del esmalte. Se han descrito casos de AI con patrones de herencia autosómico dominante, recesivo y ligados al cromosoma X, también dominantes y/o recesivos. Estos desórdenes son considerados clínica y genéticamente heterogéneos, dado que, hasta la fecha, se han reportado diferentes mutaciones en los genes: *AMELX*, *ENAM*, *MMP-20*, *KLK4*, *FAM83H*, *DLX3* y *WDR72* como causales de AI (Urzúa *et al.*, 2011).

En este trabajo se realizó un exhaustivo análisis de una familia chilena afectada con la patología del esmalte *Amelogénesis Imperfecta*. Esta familia estaba constituida por 13 personas, de las cuales se pudo analizar clínicamente a 7 integrantes del grupo, incluyendo 5 mujeres afectadas con AI y 2 hombres no afectados. Se construyó la genealogía de la familia y basándose en el análisis de ésta y en el fenotipo clínico encontrado, se determinó que el más probable patrón de herencia del rasgo AI en el grupo era dominante ligado al cromosoma X (Hart *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2003), lo que nos condujo a realizar el análisis mutacional de la región promotora, codificante completa y vecindades intrónicas del gen amelogenina, como el más probable candidato en esta familia. Además, con dientes temporales de un sujeto afectado, que fueron donados para el estudio, se pudo llevar a cabo un análisis a nivel ultraestructural del esmalte afectado, usando microscopía de luz y electrónica de barrido. Hasta donde es nuestro conocimiento, este es el único estudio de AI con herencia ligada al cromosoma X, en el cual se analiza la región codificante y promotora del gen amelogenina y puede considerarse como el estudio más completo realizado en una familia chilena con este desorden del esmalte.

6.1 ANÁLISIS CLÍNICO-RADIOGRÁFICO Y CONSTRUCCIÓN DE LA GENEALOGÍA

Aunque AI en general se considera una alteración principalmente del esmalte, otros defectos orales y dentales pueden coexistir (dientes sin erupcionar, retraso en la erupción, mordida abierta anterior, calcificaciones pulpares, reabsorción de raíces y coronas, raíces truncadas, taurodontismo y otros). Además, AI es una característica de variados síndromes multiorgánicos, pero es patognomónico de sólo algunos pocos (Hunter *et al.*, 2007).

Aunque la mayoría de los defectos mencionados no estuvieron presentes en la familia analizada en este estudio, el probando (paciente mujer III.2) presentó retardo de la erupción de caninos permanentes con alteración más severa del grosor del esmalte en estos dientes, por lo que se solicitó un examen complementario para descartar nefrocalcinosis en ella y su madre. El síndrome AI y nefrocalcinosis ha sido descrito en familias consanguíneas y no consanguíneas. Las características comunes son la presencia de un esmalte delgado o incluso ausente, presencia de calcificaciones intrapulpares, retardo bilateral de la erupción, nefrocalcinosis y calcio plasmático normal (Dellow *et al.*, 1998). Debido a la alta morbilidad asociada a nefrocalcinosis no detectadas y no tratadas a tiempo, y a que no está claro a qué tipo de AI podría estar asociada, algunos autores sugieren que todos los pacientes que presentan AI deben someterse a un examen de ultrasonido renal para descartar esta patología (Paula *et al.*, 2005).

Dada la complejidad en el diagnóstico de AI, producto de la gran heterogeneidad fenotípica que ésta presenta, han sido muchos los esfuerzos para establecer criterios de clasificación de esta patología (Witkop, 1988; Aldred *et al.*, 1992a). Sin embargo, aún existe cierta distensión y escaso acuerdo en la utilización de los términos utilizados para la descripción clínica de estos pacientes. Además, por otra parte, la ingesta de flúor y tetraciclina durante el desarrollo del diente pueden alterar

la composición y el grosor del esmalte, provocando defectos en la coloración y superficie de éste (Skinner & Nalbandian, 1975; Simmelink & Nygaard, 1979; Bronckers *et al.*, 2009). Por esta razón, es necesario realizar el diagnóstico diferencial de estas alteraciones con respecto a las manifestaciones clínicas de AI. Así, durante la anamnesis de los pacientes afectados y no afectados, pertenecientes a la familia en estudio, se evaluó exhaustivamente la posibilidad de que los defectos presentes en el esmalte hayan sido causados por factores ambientales, como el consumo de flúor u otros fármacos, durante los primeros años de vida. Todos los integrantes de la familia examinados han vivido en Santiago de Chile durante su vida, región en que el agua potable ha sido fluorada en las últimas décadas, pero en concentraciones máximas de una parte por millón, lo que según varios estudios no genera fluorosis (Villa, et al, 1998a, Villa, et al, 1998b). De tal forma que cualquier efecto ambiental fue descartado como causa de las alteraciones en el esmalte dental en esta familia.

El examen clínico y el análisis de las radiografías de los individuos afectados de la familia analizada en este trabajo, coinciden en que la alteración predominante y generalizada es la disminución en el grosor del esmalte. Sin embargo, la presencia de bandas verticales en el esmalte de algunas pacientes nos condujo a pensar en un defecto hereditario ligado al cromosoma X (Wright *et al.*, 2003).

En relación a la genealogía de este grupo familiar (**Figura 3**), se puede observar que en la segunda generación todas las hijas de un padre afectado presentaron el fenotipo de Amelogénesis Imperfecta. Si el sujeto I.2 tuviese un descendiente hombre, se esperaría que éste individuo fuera sano. En el contexto teórico de este tipo de herencia, los miembros de la tercera generación tienen 50% de probabilidades de presentar la enfermedad. Este análisis indicó que se trataría de herencia ligada al cromosoma X, sustentando los hallazgos clínicos de alternancia de bandas verticales de esmalte normal y defectuoso, en tres de cinco mujeres afectadas. No obstante, hasta la fecha, no ha sido posible examinar a los miembros que han sido

reportados como afectados en la genealogía (sujetos I.2, y II.7), razón por la cual no se puede descartar que se trate de una alteración autosómica dominante. Sin embargo, es importante mencionar también que otro hecho que permitió sustentar esta conjetura, de herencia ligada al sexo en la genealogía de esta familia fue que, en un trabajo anterior, el ADN del probando de esta familia fue analizado para detectar la presencia/ausencia de ocho mutaciones reportadas, en la época del estudio, en el gen *enamelin* (*ENAM*) y no se detectó ninguna de ellas (Adorno D., 2009). Estos casos de incongruencia entre el patrón de herencia, fenotipo clínico y posteriores hallazgos moleculares han sido descritos en la literatura sobre AI, realzando la importancia de analizar el mayor número posible de sujetos en una familia, con el objetivo de contribuir con un consejo genético acorde a cada caso (Aldred *et al.*, 2002).

6.2 ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR

El análisis genético-molecular de esta investigación consistió en el barrido mutacional del gen *amelogenina* (*AMELX*), mediante amplificación a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación directa, a nivel de regiones regulatorias (promotor y sitios de procesamiento) y codificantes (exones) del gen.

En la mayoría de los genes, cuyos productos son proteínas, la región promotora contiene los determinantes principales de la transcripción (tanto espaciales como temporales). A pesar de esto, las secuencias promotoras aún no son incluidas rutinariamente en la búsqueda y análisis de mutaciones, quizás porque su relevancia patológica sería difícil de establecer sin laboriosas pruebas de funcionalidad (Chen *et al.*, 2010). En ninguno de los trabajos publicados sobre AI los autores realizan el análisis de la región promotora del gen *AMELX*. En este trabajo, se diseñaron primers específicos para amplificar y secuenciar toda la región promotora, lo que demostró la ausencia de cambios en la secuencia de ADN del probando con respecto a la secuencia del control y de referencia utilizada. Además, el análisis de las regiones

codificantes y vecindades intrónicas, no evidenció ninguna de las 15 mutaciones previamente reportadas en la literatura y tampoco se observó presencia de nuevas variantes de secuencia en otras posiciones del gen. Sin embargo, se encontró un cambio puntual del tipo transición (C>T) en condición homocigota en el nucleótido N° 119 (numeración basada en el nucleótido +1 del codón ATG de la secuencia genómica de referencia AY040206), en el intrón 2 del gen, tanto en los individuos afectados y no afectados de la familia y en dos sujetos controles. Se realizó una búsqueda de las variantes descritas para *AMELX* en la base de datos de Entrez SNP (dbSNP), del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) y se encontró que existen 35 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) referidos para este gen. Se definió que la variante encontrada en los sujetos analizados correspondía al SNP rs946252. Este SNP ha sido descrito en diversos grupos étnicos, europeos, asiáticos, afroamericanos y africanos en distintas frecuencias alélicas. No existen antecedentes de este polimorfismo en población americana. Del total de los 35 SNP descritos, 3 se encuentran en la región promotora, 7 en las regiones exónicas y 25 en las regiones intrónicas. El exón 6 y el intrón 2 son los que presentan mayor cantidad de polimorfismos registrados en esta base de datos (4/7 y 7/25, respectivamente).

En mamíferos, el gen que codifica para amelogenina se encuentra en ambos cromosomas sexuales, denominándose *AMELX* y *AMELY*, respectivamente. Esta proteína ancestralmente se encontraba codificada en cromosomas autosómicos. Hace más de 100 millones de años, en el linaje de los mamíferos placentarios, el par de cromosomas homólogos autosómicos que contenía este gen fue translocado, convirtiéndose en el brazo pequeño de los cromosomas sexuales. Luego, en esta nueva región, la recombinación homóloga fue inhibida y paulatinamente dio origen a la diferenciación de los cromosomas X e Y. En hombres la expresión de *AMELY* es muy baja, tanto así que no puede compensar la función de *AMELX* si éste se encuentra inactivado por una mutación, como por ejemplo en AI ligada a X recesiva. Incluso, en

ratones que han perdido la copia de *AMELY*, no se observan efectos obvios (Iwase *et al.*, 2003; Iwase *et al.*, 2007).

Estudios filogenéticos han demostrado que la secuencia de *AMELX* se encuentra altamente conservada entre distintas especies de mamíferos, siendo los extremos N-terminal y C-terminal los que se encuentran más conservados, antecedente que se correlaciona con la importancia que cumplen estas regiones de la proteína en la formación del esmalte. Contrariamente, la región central de la proteína es menos conservada y se ha visto que durante la evolución de ésta la mayoría de sus residuos han sido cambiados sin alterar la función de la proteína (Delgado *et al.*, 2007).

El flujo de la información genética, clásicamente, ha sido visto como un proceso lineal donde el ADN es transcrito a ARN y éste traducido a una proteína. Niveles adicionales de regulación siguen siendo descubiertos, expandiendo enormemente esta idea simplista y revelando una compleja red que controla la expresión de los genes. Gracias a esta mejor comprensión de la regulación de la expresión génica, parece más claro que el ARN es más que un intermediario pasivo en este proceso. El control del procesamiento del ARN, es ahora, reconocido como un elemento crucial para la regulación de la expresión (Ward & Cooper, 2010). En este sentido, mutaciones presentes en este nivel, pueden provocar desequilibrios importantes en la expresión de genes y desencadenar diversos efectos sobre el fenotipo. Tras la ausencia de mutaciones en el total de las regiones secuenciadas y analizadas en este trabajo, no es posible descartar que exista alguna mutación en otro sector del gen y que ésta sea la causa de la alteración presentada por la familia en estudio.

Mutaciones en la región no traducida 5' (5'UTR), podrían alterar enormemente la regulación de la traducción. Existen varios ejemplos reportados en los cuales se describen enfermedades asociadas a variantes en 5'UTR y sus respectivos mecanismos patogénicos (creación/disrupción de horquillas, de sitios internos de entrada al ribosoma, de un codón AUG río arriba o un sitio de unión de elementos que actúan en

trans). Por otro lado, las regiones 3' no traducidas (3'UTR) de los genes humanos juegan un importante rol en la regulación del ARN mensajero, como por ejemplo, en la formación del extremo 3', en la estabilidad y degradación del mensaje, en la exportación nuclear, en la localización subcelular y traducción y en consecuencia esta región es rica en elementos regulatorios. Mutaciones en los 3'UTRs pueden causar efectos significativos en el ARN mensajero, y provocar enfermedades monogénicas (Chen *et al.*, 2010). Estos antecedentes refuerzan nuestra iniciativa de secuenciar el exón N° 1 y 7, que forman parte de las regiones no traducidas 5' y 3' del gen *AMELX*.

Adicionalmente, el primer intrón en muchos genes participa en la regulación de la expresión tejido-específica y estado-específica, por medio de actividad intrónica potenciadora o supresora, y/o mediando interacciones entre el promotor y el primer intrón. El grupo de Xu L., identificó un elemento potenciador o *enhancer* ubicado en el intrón 1 de *AMELX* (Xu *et al.*, 2010). Por esta razón, a pesar de que estas secuencias nucleotídicas no codifican parte de la proteína y de que no se han registrado mutaciones en sus secuencias, la posibilidad de analizar estas regiones del gen no debe ser descartada.

Con el objeto de comprender mejor el funcionamiento del genoma humano, el proyecto ENCODE (*ENCyclopaedia Of DNA Elements*) realizó un estudio, el cual indicó que un gran número de elementos genéticos funcionales se encuentran a distancias significativas del gen que éstos regulan (Birney *et al.*, 2007). Entre estos elementos, los que se encuentran mejor caracterizados, son los potenciadores transcripcionales que actúan sobre promotores de genes que se encuentran ubicados en sitios lejanos, por medio de curvaturas en la cromatina. Estos elementos regulatorios se pueden encontrar en los intrones de genes vecinos o incluso en cromosomas diferentes al gen que está siendo regulado (Kleinjan & van Heyningen, 2005; Cavalli, 2007). Se han reportados diversas enfermedades causadas por mutaciones en elementos regulatorios lejanos (Kleinjan & van Heyningen, 2005).

Se ha estimado que el 94% de los genes humanos sufren *splicing* alternativo, lo que produce gran variedad entre los ARN mensajeros de genes individuales, aumentando enormemente la diversidad de los transcritos expresados por estos genes. La mayoría de las variaciones ocurren en el marco de lectura abierto, resultando en la expresión de diferentes isoformas proteicas, las cuales, con frecuencia, poseen propiedades funcionales distintas. El *splicing*, puede ser afectado por mutaciones en elementos *cis*-activadores requeridos para un correcto procesamiento del pre ARN mensajero y por mutaciones que afectan elementos *trans*-activadores, que son necesarios para la regulación de este proceso. Se estima que 50 % de las enfermedades son causadas por mutaciones que afectan el *splicing* (Ward & Cooper, 2010). En el presente trabajo se analizó si la variante rs946252, encontrada en los pacientes y en los controles, pudiese crear o interrumpir un sitio dador o aceptor de *splicing*, mediante un análisis bioinformático, el cual mostró que no existían alteraciones de secuencia en las regiones consenso de estos sitios.

Debido a la gran cantidad de genomas publicados en los últimos años, la bioinformática ha permitido identificar un enorme número de estructuras genéticas que antes no habían sido percibidas. Estas aproximaciones han advertido la presencia de genes sobrepuestos, donde dos genes sobreponen sus extremos 5' ó 3', o donde uno de ellos se encuentra completamente dentro del otro (hospedero), pero orientado en la dirección contraria. Este último caso se ha denominado "genes anidados". Uno de los genes anidados de mayor importancia para la biología oral es *AMELX*, que se encuentra anidado en el intrón 1 del gen *ARHGAP6*. *ARHGAP6* codifica una proteína activadora de GTPasa con especificidad para una proteína G monomérica denominada Rho, que regula la formación de los filamentos de actina del citoesqueleto y que puede afectar el desarrollo de cambios programados en la forma de la célula. Ambas proteínas (codificadas por *AMELX* y *ARHGAP6*), se expresan en ameloblastos. Sin embargo, mientras *ARHGAP6* es ampliamente expresado en diferentes tipos de tejidos, *AMELX* es

expresado sólo antes de la erupción del diente (regulación temporal) y sólo en la cavidad oral (regulación espacial). Se piensa que el anidamiento de estos genes podría tener un efecto intrínseco en la regulación de su expresión. Esta regulación podría ocurrir a través de diferentes mecanismos como el impedimento estérico por factores de transcripción, alineamiento de ARNs antisentido (los cuales son más susceptibles a la degradación por ARNasas) o por dos ARN polimerasas convergentes, las cuales podrían encontrarse y colisionar al estar transcribiendo simultáneamente. Sin embargo, el mecanismo por el cual se regula la expresión de estos genes, en conjunto, aún no está claro (Crampton *et al.*, 2006).

En muchos casos el análisis mutacional fracasa en determinar la etiología genética de familias con AI. En un análisis realizado en 7 familias turcas afectadas con AI, se excluyó la participación de los genes que codifican ameloblastina (*AMB*), amelogenina (*AMELX*), enamelina (*ENAM*), calicreína 4 (*KLK4*), proteína FAM83H (*FAM83H*), enamelisina (*MMP20*) y tuftelina 1 (*TUFT1*) (Becerik *et al.*, 2009). Otro grupo descartó la participación de los genes *ENAM*, *AMBN*, *AMELX*, *MMP20*, *KLK4* y *AMNT* (amelotina) en dos familias de Brasil con AI no síndromica (Santos *et al.*, 2007). Por lo que concluyen, que aunque no se encontraron mutaciones, exónicas ni en sitios de *splicing* en la unión exón-intrón, es posible que otro tipo de mutaciones, ya sean intrónicas profundas o en regiones regulatorias, puedan definir la etiología de estas familias.

Finalmente, es importante señalar que a través de un estudio de ligamiento génico en dos familias con patrón de herencia y fenotipo clínico concordantes con AI ligada al cromosoma X, se definió la existencia y localización de un segundo locus causal de AI, denominado AIH3, ubicado en la región Xq22-28 (Aldred *et al.*, 1992a). Este antecedente permite considerar la posibilidad que mutaciones en esta región podrían estar involucradas en la etiología genética de esta familia, pero se requiere otro tipo de análisis para demostrar esta suposición.

6.3 ANÁLISIS HISTOPATÓLOGICO Y ULTRAESTRUCTURAL

El esmalte dental es un tejido altamente mineralizado, constituido principalmente por cristales de hidroxiapatita, que se encuentran altamente organizados conformando prismas (Smith, 1998). Se han descrito diversos defectos genéticos que determinan alteraciones tanto de la estructura o grosor del esmalte (hipoplasia), como de su composición (hipomaduración/hipocalcificación) (Aldred *et al.*, 2003).

Uno de los propósitos de este estudio fue caracterizar histológicamente y ultraestructuralmente piezas dentarias de la familia estudiada, afectada por AI de tipo hipoplásica. Con estos fines, se analizaron dientes temporales exfoliados naturalmente, provenientes de la hermana del probando (paciente III.3) a través de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. Estos análisis se realizaron comparando los dientes afectados con dientes provenientes de sujetos controles sanos.

En relación a casos de AI ligada al cromosoma X, los escasos estudios microscópicos concuerdan en que, en términos generales, se observa una disminución significativa y variable del grosor del esmalte y que existe una pérdida de la estructura prismática del tejido (Sauk *et al.*, 1972; Wright *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004). En mujeres afectadas, esta pérdida de la organización característica del esmalte, se percibe con un patrón alternado de zonas más alteradas que otras (Sauk *et al.*, 1972; Kim *et al.*, 2004). Este reducido número de publicaciones, en relación a la estructura microscópica de dientes afectados con Amelogénesis Imperfecta ligada al cromosoma X y otros tipos de AI, se debe a que para este tipo de estudios se requiere no sólo que estos dientes sean donados por el paciente, sino también que se encuentren sin caries y sin intervenciones restauradoras realizadas por un cirujano dentista. Esto reduce las posibilidades de obtener dientes temporales exfoliados en forma natural o terceros molares extraídos por falta de espacio en las arcadas dentarias.

En un modelo murino, se intentó simular mutaciones reportadas en familias con AI asociadas a mutaciones en *AMELX* (Barron *et al.*, 2010), provocando una mutación *missense* en el dominio TRAP, el cual se encuentra altamente conservado en esta proteína. Se observó que en hembras heterocigotas se producía una disminución significativa del grosor del esmalte, mientras que en ratones machos (hemicigotos), el esmalte resultó tan delgado que no permitió su medición, ya que en grandes segmentos de los dientes, el esmalte se encontraba ausente. En cuanto a la arquitectura del tejido, las hembras mostraron un esmalte con estructura prismática, aunque éste fue menos ordenado que el del ratón silvestre. En machos, el esmalte reveló alteraciones severas, con una apariencia lisa parecida al vidrio, sin estructuras prismáticas claras. En otro trabajo, se generó una línea transgénica de ratones con la mutación P70T, descrita en humanos (Collier *et al.*, 1997), y se observó que el ratón presentaba regiones de esmalte poroso y aprismático, alternado con áreas prismáticas. Las áreas aprismáticas fueron más prevalentes en machos (Gibson *et al.*, 2007).

Los resultados del análisis de microscopía de luz de este trabajo, coinciden con el diagnóstico clínico de la familia afectada, ya que es evidente la disminución del grosor del esmalte del diente temporal afectado analizado, llegando a corresponder a menos de la mitad del grosor del esmalte normal. Además no se observaron depresiones evidentes en la superficie del esmalte, lo que concuerda con un fenotipo de AI hipoplásica lisa.

En cuanto a lo observado en el diente afectado, mediante microscopio electrónico de barrido, fue posible detectar la desorganización del tejido del esmalte, con zonas donde se podían apreciar estructuras prismáticas poco definidas. Sin embargo, en algunos segmentos se pudieron observar prismas bien conservados, lo que es congruente con la hipótesis de la alteración genética ligada al cromosoma X, ya que producto de la inactivación al azar de una de las copias del cromosoma X

(*lyonización*) (Lyon, 1961), el defecto en mujeres afectadas se observaría como zonas de esmalte sano alternado por segmentos de esmalte alterado. Esta última observación se correlaciona con la presencia de bandas verticales en los dientes de esta paciente, observados macroscópicamente, hecho característico en mujeres con AI ligada al cromosoma X (Wright, 2006).

La heterogeneidad genética, de locus y alélica, sumado a la variabilidad de formas clínicas, con la que se presenta esta anomalía, ha dificultado enormemente su diagnóstico. A pesar de ser una patología poco prevalente, implica una grave alteración en la estética y funcionamiento del sistema estomatognático y puede considerarse de impacto negativo en la salud psicosocial de las personas que la poseen en todas las edades. La severidad de las lesiones puede resultar en la pérdida total de las piezas dentarias. La solución a este problema se traduce en tratamientos permanentes de alto costo para el paciente. Por esta razón, y debido a que en Chile los estudios de AI son incipientes, sólo abordados por nuestro grupo, la aproximación genética, implícita en este estudio, es un aporte importante al conocimiento de la estructura y función de las proteínas que participan en la síntesis de esmalte, a la identificación de genes desconocidos implicados en la etiología y al proceso de clasificación molecular de este grupo de desórdenes.

7. CONCLUSIONES

- ❖ En esta familia el estudio clínico radiográfico de los sujetos afectados evidenció un esmalte de menor grosor y escaso contraste entre esmalte y dentina con expresión variable entre individuos.
- ❖ El diagnóstico clínico en esta familia corresponde a Amelogénesis Imperfecta hipoplásica lisa, con herencia dominante ligada al cromosoma X, tipo IE, de acuerdo a la clasificación de Witkop (Witkop, 1988).
- ❖ El análisis mutacional realizado al gen amelogenina (*AMELX*) en el probando del estudio, no detectó ninguna de las mutaciones previamente reportadas, ni nuevas variantes de secuencia en la región codificante y promotora del gen.
- ❖ Estos resultados indican que mutaciones en otras regiones regulatorias del gen o mutaciones en otros genes del cromosoma X podrían estar involucradas en la etiología genética de esta familia.
- ❖ El análisis histológico y ultraestructural de piezas dentarias afectadas, evidenció la severa disminución del grosor del esmalte con pérdida parcial de la organización prismática del tejido, sustentando la hipótesis de herencia ligada al cromosoma X.

REFERENCIAS

- Adorno D. Análisis mutacional del gen ENAM y MMP20 en sujetos afectados por Amelogénesis Imperfecta. Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas, Universidad de Chile, 2009.
- Aldred, M.J., Crawford, P.J., Roberts, E., Gillespie, C.M., Thomas, N.S., Fenton, I., Sandkuijl, L.A. & Harper, P.S. (1992a) Genetic heterogeneity in X-linked amelogenesis imperfecta. *Genomics*, **14**, 567-573.
- Aldred, M.J., Crawford, P.J., Roberts, E. & Thomas, N.S. (1992b) Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Genet*, **90**, 413-416.
- Aldred MJ, Hall RK, Kilpatrick N, Bankier A, Savarirayan R, Lamandé SR, Lench NJ, Crawford PJ (2002). Molecular analysis for genetic counselling amelogenesis imperfecta. *Oral Dis*. Sep;8(5):249-53.
- Aldred, M.J., Savarirayan, R. & Crawford, P.J. (2003) Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century. *Oral Dis*, **9**, 19-23.
- Backman, B. & Holm, A.K. (1986) Amelogenesis imperfecta: prevalence and incidence in a northern Swedish county. *Community Dent Oral Epidemiol*, **14**, 43-47.
- Barron, M.J., Brookes, S.J., Kirkham, J., Shore, R.C., Hunt, C., Mironov, A., Kingswell, N.J., Maycock, J., Shuttleworth, C.A. & Dixon, M.J. (2010) A mutation in the mouse Amelx tri-tyrosyl domain results in impaired secretion of amelogenin and phenocopies human X-linked amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*, **19**, 1230-1247.
- Becerik, S., Cogulu, D., Emingil, G., Han, T., Hart, P.S. & Hart, T.C. (2009) Exclusion of candidate genes in seven Turkish families with autosomal recessive amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A*, **149A**, 1392-1398.
- Bei, M. (2009) Molecular genetics of ameloblast cell lineage. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, **312B**, 437-444.
- Berkovitz, B. (1995) *Atlas en color y texto: Anatomía Oral, Histología y Embriología* Mosby.
- Birney, E. & Stamatoyannopoulos, J.A. & Dutta, *et al.* (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, **447**, 799-816.
- Boyle, J. S. y Lew, A. M. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet*. 11: 8.
- Bronckers, A.L., Lyaruu, D.M. & DenBesten, P.K. (2009) The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res*, **88**, 877-893.

- Cavalli, G. (2007) Chromosome kissing. *Curr Opin Genet Dev*, **17**, 443-450.
- Collier, P.M., Sauk, J.J., Rosenbloom, S.J., Yuan, Z.A. & Gibson, C.W. (1997) An amelogenin gene defect associated with human X-linked amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol*, **42**, 235-242.
- Crampton, N., Thomson, N.H., Kirkham, J., Gibson, C.W. & Bonass, W.A. (2006) Imaging RNA polymerase-amelogenin gene complexes with single molecule resolution using atomic force microscopy. *Eur J Oral Sci*, **114 Suppl 1**, 133-138; discussion 164-135, 380-131.
- Crawford, P.J., Aldred, M. & Bloch-Zupan, A. (2007) Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*, **2**, 17.
- Chen, J.M., Ferec, C. & Cooper, D.N. (2010) Revealing the human mutome. *Clin Genet*, **78**, 310-320.
- Delgado, S., Ishiyama, M. & Sire, J.Y. (2007) Validation of amelogenesis imperfecta inferred from amelogenin evolution. *J Dent Res*, **86**, 326-330.
- Dellow, E.L., Harley, K.E., Unwin, R.J., Wrong, O., Winter, G.B. & Parkins, B.J. (1998) Amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, and hypocalciuria syndrome in two siblings from a large family with consanguineous parents. *Nephrol Dial Transplant*, **13**, 3193-3196.
- Ding, Y., Estrella, M.R., Hu, Y.Y., Chan, H.L., Zhang, H.D., Kim, J.W., Simmer, J.P. & Hu, J.C. (2009) Fam83h is associated with intracellular vesicles and ADHCAI. *J Dent Res*, **88**, 991-996.
- El-Sayed, W., Shore, R.C., Parry, D.A., Inglehearn, C.F. & Mighell, A.J. (2011). Hypomaturation Amelogenesis Imperfecta due to WDR72 Mutations: A Novel Mutation and Ultrastructural Analyses of Deciduous Teeth. *Cells Tissues Organs*.
- Gibson, C.W., Yuan, Z.A., Hall, B., Longenecker, G., Chen, E., Thyagarajan, T., Sreenath, T., Wright, J.T., Decker, S., Piddington, R., Harrison, G. & Kulkarni, A.B. (2001) Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem*, **276**, 31871-31875.
- Gibson, C.W., Yuan, Z.A., Li, Y., Daly, B., Suggs, C., Aragon, M.A., Alawi, F., Kulkarni, A.B. & Wright, J.T. (2007) Transgenic mice that express normal and mutated amelogenins. *J Dent Res*, **86**, 331-335.
- Gómez de Ferraris M. L., Campos A. (2002) Histología y embriología bucodentaria. Editorial Médica Panamericana, págs.: 271-315.
- Greene S., Yuan Z., Wright J., Amjad A., Abrams W., Buchanan J. et al. (2002) A gene deletion resulting in amelogenin with nine cysteine residues leads to amelogenesis imperfecta. *Arch. Oral Biol.* 47: 211-217.
- Hart S., Hart T., Gibson C., Wright J. T. (2000). Mutational analysis of X-linked amelogenesis imperfecta in multiple families. *Archs. Oral Biol.* 45: 79-86.

- Hart, P. S., Aldred, M. J., Crawford, P. J. M., Wright, N. J., Hart, T. C., & Wright, J. T. (2002). Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. *Archives of Oral Biology*, **47**(4), 261-265.
- Hu, J.C., Chun, Y.H., Al Hazzazi, T. & Simmer, J.P. (2007) Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*, **186**, 78-85.
- Hunter, L., Addy, L.D., Knox, J. & Drage, N. (2007) Is amelogenesis imperfecta an indication for renal examination? *Int J Paediatr Dent*, **17**, 62-65.
- Iwase, M., Kaneko, S., Kim, H., Satta, Y. & Takahata, N. (2007) Evolutionary history of sex-linked mammalian amelogenin genes. *Cells Tissues Organs*, **186**, 49-59.
- Iwase, M., Satta, Y., Hirai, Y., Hirai, H., Imai, H. & Takahata, N. (2003) The amelogenin loci span an ancient pseudoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5258-5263.
- Kida, M., Sakiyama, Y., Matsuda, A., Takabayashi, S., Ochi, H., Sekiguchi, H., Minamitake, S. & Ariga, T. (2007) A novel missense mutation (p.P52R) in amelogenin gene causing X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*, **86**, 69-72.
- Kim, J.W., Simmer, J.P., Hu, Y.Y., Lin, B.P., Boyd, C., Wright, J.T., Yamada, C.J., Rayes, S.K., Feigal, R.J. & Hu, J.C. (2004) Amelogenin p.M1T and p.W4S mutations underlying hypoplastic X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*, **83**, 378-383.
- Kindelan, S. A., Brook, A. H., Gangemi, L., Lench, N., Wong, F. S. L., Fearn, J., et al. (2000). Detection of a Novel Mutation in X-linked Amelogenesis Imperfecta. *J Dent Res*, **79**(12), 1978-1982.
- Kleinjan, D.A. & van Heyningen, V. (2005) Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet*, **76**, 8-32.
- Lagerstrom-Fermer, M. & Landegren, U. (1995) Understanding enamel formation from mutations causing X-linked amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res*, **32**, 241-246.
- Lagerstrom-Fermer, M., Nilsson, M., Backman, B., Salido, E., Shapiro, L., Pettersson, U. & Landegren, U. (1995) Amelogenin signal peptide mutation: correlation between mutations in the amelogenin gene (AMGX) and manifestations of X-linked amelogenesis imperfecta. *Genomics*, **26**, 159-162.
- Lagerstrom, M., Dahl, N., Nakahori, Y., Nakagome, Y., Backman, B., Landegren, U. & Pettersson, U. (1991) A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics*, **10**, 971-975.
- Lee, S.K., Seymen, F., Lee, K.E., Kang, H.Y., Yildirim, M., Tuna, E.B., Gencay, K., Hwang, Y.H., Nam, K.H., De La Garza, R.J., Hu, J.C., Simmer, J.P. & Kim, J.W. (2010). Novel WDR72 mutation and cytoplasmic localization. *J Dent Res*, **89**, 1378-1382.

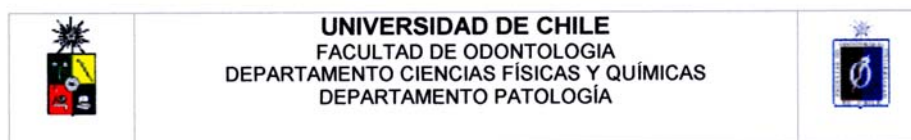
- Lench NJ, Brook AH, Winter GB. 1994. SSCP detection of a nonsense mutation in exon 5 of the amelogenin gene (AMGX) causing X-linked amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 3: 827-828.
- Lench, N. J., Winter, G. B. (1995) Characterization of molecular defects in X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum. Mut.* 5: 251-259.
- Lu, Y., Papagerakis, P., Yamakoshi, Y., Hu, J.C., Bartlett, J.D. & Simmer, J.P. (2008) Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem*, **389**, 695-700.
- Lyon, M.F. (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, **190**, 372-373.
- Margolis, H.C., Beniash, E. & Fowler, C.E. (2006) Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res*, **85**, 775-793.
- Nanci, A. (ed) (2008) *Ten Cate's Histology: Development, Structure, and Function*. Mosby.
- Neville B., D.D., Allen C. (ed) (1995) *Oral and Maxillofacial Pathology*. W.B. Saunders Company.
- Paine, M.L., Lei, Y.P., Dickerson, K. & Snead, M.L. (2002) Altered amelogenin self-assembly based on mutations observed in human X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *J Biol Chem*, **277**, 17112-17116.
- Paine, M.L. & Snead, M.L. (1997) Protein interactions during assembly of the enamel organic extracellular matrix. *J Bone Miner Res*, **12**, 221-227.
- Paula, L.M., Melo, N.S., Silva Guerra, E.N., Mestrinho, D.H. & Acevedo, A.C. (2005) Case report of a rare syndrome associating amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis in a consanguineous family. *Arch Oral Biol*, **50**, 237-242.
- Pavlic, A., Lukinmaa, P.L., Nieminen, P., Kiukkonen, A. & Alaluusua, S. (2007) Severely hypoplastic amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Int J Paediatr Dent*, **17**, 259-266.
- Price, J.A., Wright, J.T., Walker, S.J., Crawford, P.J., Aldred, M.J. & Hart, T.C. (1999) Tricho-dento-osseous syndrome and amelogenesis imperfecta with taurodontism are genetically distinct conditions. *Clin Genet*, **56**, 35-40.
- Pugach, M.K., Li, Y., Suggs, C., Wright, J.T., Aragon, M.A., Yuan, Z.A., Simmons, D., Kulkarni, A.B. & Gibson, C.W (2010). The amelogenin C-terminus is required for enamel development. *J Dent Res*, **89**, 165-169.
- Ravindranath, R.M., Moradian-Oldak, J. & Fincham, A.G. (1999) Tyrosyl motif in amelogenins binds N-acetyl-D-glucosamine. *J Biol Chem*, **274**, 2464-2471.
- Sambrook, J. y Russel, D. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Santos, M.C., Hart, P.S., Ramaswami, M., Kanno, C.M., Hart, T.C. & Line, S.R. (2007) Exclusion of known gene for enamel development in two Brazilian families with amelogenesis imperfecta. *Head Face Med*, **3**, 8.
- Sapp P., E.L., Wysocki G. (ed) (1998) *Patología Oral y Maxilofacial*. Harcourt Brace.
- Sasaki, S. & Shimokawa, H. (1995) The amelogenin gene. *Int J Dev Biol*, **39**, 127-133.
- Sauk, J.J., Jr., Lyon, H.W. & Witkop, C.J., Jr. (1972) Electron optic microanalysis of two gene products in enamel of females heterozygous for X-linked hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, **24**, 267-276.
- Sekiguchi, H., Tanakamaru, H., Minaguchi, K., Machida, Y. & Yakushiji, M. (2001) A case of amelogenesis imperfecta of deciduous and all permanent teeth. *Bull Tokyo Dent Coll*, **42**, 45-50.
- Shaw, W.J., Campbell, A.A., Paine, M.L. & Snead, M.L. (2004) The COOH terminus of the amelogenin, LRAP, is oriented next to the hydroxyapatite surface. *J Biol Chem*, **279**, 40263-40266.
- Simmelink, J.W. & Nygaard, V.K. (1979) Disturbances and defects in enamel development. *J Dent Res*, **58**, 717-724.
- Simmer, J.P. & Fincham, A.G. (1995) Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med*, **6**, 84-108.
- Skinner, H.C. & Nalbandian, J. (1975) Tetracyclines and mineralized tissues: review and perspectives. *Yale J Biol Med*, **48**, 377-397.
- Smith, C.E. (1998) Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med*, **9**, 128-161.
- Stephanopoulos, G., Garefalaki, M.E. & Lyroudia, K. (2005) Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*, **84**, 1117-1126.
- Ten Cate A. R. (1998) Oral Histology. Development, structure, and function. Editorial Mosby, págs.: 197-217.
- Toyosawa, S., O'HUigin, C., Figueroa, F., Tichy, H. & Klein, J. (1998) Identification and characterization of amelogenin genes in monotremes, reptiles, and amphibians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13056-13061.
- Urzúa, B., Ortega-Pinto, A., Morales-Bozo, I., Rojas-Alcayaga, G. & Cifuentes, V. (2010). Defining a new candidate gene for amelogenesis imperfecta: from molecular genetics to biochemistry. *Biochem Genet*, **49**, 104-121.
- Villa, A.E., Guerrero, S., Icaza, G., Villalobos, J. & Anabalón, M. (1998a) Dental fluorosis in Chilean children: evaluation of risk factors. *Community Dent Oral Epidemiol*, **26**, 310-315.
- Villa, A.E., Guerrero, S. & Villalobos, J. (1998b) Estimation of optimal concentration of fluoride in drinking water under conditions prevailing in Chile. *Community Dent Oral Epidemiol*, **26**, 249-255.

- Ward, A.J. & Cooper, T.A. (2010) The pathobiology of splicing. *J Pathol*, **220**, 152-163.
- Witkop, C.J., Jr. (1988) Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol*, **17**, 547-553.
- Wright, J.T. (2006) The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A*, **140**, 2547-2555.
- Wright, J.T., Aldred, M.J., Crawford, P.J., Kirkham, J. & Robinson, C. (1993) Enamel ultrastructure and protein content in X-linked amelogenesis imperfecta. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, **76**, 192-199.
- Wright, J.T., Hart, P.S., Aldred, M.J., Seow, K., Crawford, P.J., Hong, S.P., Gibson, C.W. & Hart, T.C. (2003) Relationship of phenotype and genotype in X-linked amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res*, **44 Suppl 1**, 72-78.
- Xu, L., Matsumoto, A., Sasaki, A., Harada, H. & Taniguchi, A. (2010) Identification of a suppressor element in the amelogenin promoter. *J Dent Res*, **89**, 246-251.
- Yang, X., Wang, L., Qin, Y., Sun, Z., Henneman, Z.J., Moradian-Oldak, J. & Nancollas, G.H. How amelogenin orchestrates the organization of hierarchical elongated microstructures of apatite. *J Phys Chem B*, **114**, 2293-2300.

9. ANEXOS

Anexo1



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este formulario de Consentimiento informado se aplicará a pacientes chilenos afectados con la patología del esmalte dental AMELOGÉNESIS IMPERFECTA y también a sujetos sanos, sin esta patología, que serán controles del estudio titulado:

"DETECCIÓN DE MUTACIONES DESCRITAS EN GENES CAUSALES DE AMELOGÉNESIS IMPERFECTA EN FAMILIAS CHILENAS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA VARIANTE MISSENSE DEL GEN MMP-20 (g.30675A>G)".

En este estudio el **Investigador Responsable** es: la Dra. Blanca Regina Urzúa Orellana, y los **Co-investigadores** son: la Dra. Irene Cecilia Morales Bozo, la Dra. Ana Verónica Ortega Pinto, la Dra.(c) Carla Lozano y el Dr. Víctor Cifuentes, todos académicos de la Universidad de Chile.

ANTECEDENTES GENERALES. Las **Amelogenesis Imperfecta** son un grupo de enfermedades hereditarias que afectan la primera capa del diente, llamada esmalte. Este defecto ocasiona graves problemas de estética, sensibilidad a cambios de temperatura, dolor de dientes, dificultades de adhesión de materiales de restauración del diente y serios problemas psicológicos y económicos a los individuos afectados, quienes pueden terminar sin dientes.

Por tratarse de una enfermedad heredada, con varias formas de la misma, interesa conocer los factores genéticos que la ocasionan, en cada caso particular. El **propósito de esta investigación** es por lo tanto caracterizar a los individuos afectados en nuestro país, para conocer los cambios en los genes que han sido identificados como responsables y analizar un nuevo gen posiblemente implicado en esta enfermedad.

PROCEDIMIENTO AL QUE SERÁN SOMETIDOS LOS VOLUNTARIOS. Los sujetos afectados y controles seleccionados para este estudio serán examinados intra y extraoralmente por dos Cirujanos-Dentista calibrados que participan como co-investigadores. Serán sometidos a entrevista y con los datos colectados se les confeccionará una ficha clínica. Se les tomará exámenes complementarios (radiografías, corte histológico de dientes donados, u otros) para establecer el diagnóstico. Se les solicitará además, una muestra de sangre, de células epiteliales de mucosa bucal y de dientes deciduos o extraídos por indicación ortodóncica, en caso de que existan tales circunstancias.

VENTAJAS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO. Como ventajas de participar en el presente estudio los pacientes y controles recibirán un tratamiento gratis de limpieza (destraraje) de sus dientes. Los exámenes complementarios realizados para el diagnóstico clínico y los exámenes moleculares no tendrán costo alguno para ellos, y recibirán un informe detallado de su caso particular al finalizar la investigación, si así lo estipulan. Además, serán derivados por los clínicos que participan en el estudio, para que obtengan atención preferencial en las clínicas que corresponda, según el estado de salud bucal que presenten. Allí, recibirán tratamiento adecuado, que cancelarán con una rebaja establecida para los participantes de este proyecto.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

1.- Al firmar este documento, voluntariamente doy mi consentimiento para que un(a) Cirujano Dentista, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, me entreviste, examine mi boca y tome fotografías de mi dentadura. Estos procedimientos durarán alrededor de 30 a 50 minutos.

2.- Comprendo que los datos obtenidos en estos procedimientos serán utilizados en un estudio de la U. de Chile para comparar la salud bucal de personas con y sin Amelogenesis Imperfecta. Entiendo que este estudio tiene como finalidad última el contribuir con información para mejorar la salud bucal y el diagnóstico de los afectados por Amelogenesis Imperfecta y serán publicados en revistas científicas.

3.- Comprendo que se me preguntará datos en relación a mi enfermedad y su evolución en el transcurso de mi vida, y que también deberé entregar datos que involucran a mis parientes cercanos, con el objeto de construir un patrón genealógico de mi condición a nivel familiar. Además, si el estudio lo requiere colaboraré para que mis parientes afectados también sean examinados y puedan ser parte del estudio voluntariamente.



4.- Entiendo además, que para realizar parte de esta investigación deberé donar una muestra de sangre (10 ml), de la cual se obtendrá DNA, el que será usado para estudiar los genes descritos en este y en otros proyectos que involucren el análisis de otros genes. Entiendo que esta muestra será tomada por un(a) enfermero(a) universitario(a) con los instrumentos adecuados, que asegurarán mi integridad física y mi salud en general.

5.- Comprendo también que, si es necesario, estaré dispuesto a que se me tomen radiografías dentales, que se requieren para el diagnóstico clínico de mi enfermedad y por lo tanto son de suma importancia para la investigación. Entiendo que el costo de estos exámenes será por cuenta del proyecto en estudio.

6.- Declaro que mi participación en este estudio es libre y voluntaria, pudiendo incluso dejar de participar en él cuando lo desee. Sé que la información obtenida de mi persona será tratada de manera absolutamente confidencial, y únicamente utilizada para fines de investigación, sin fines de lucro. Entiendo que mi nombre y mis datos personales no serán jamás identificados públicamente.

7.- Por mi condición de voluntario, entiendo que no recibiré ninguna retribución económica. Comprendo que mi participación en este estudio no obliga de manera alguna a la Facultad participante o a los investigadores a hacerse cargo en forma gratuita del tratamiento de posibles enfermedades de mi boca.

8.- Entiendo sí, que por el hecho de participar en el estudio, tengo derecho a que se me informe sobre los resultados del examen que se me practicó y a recibir un consejo al respecto, de parte del Cirujano-Dentista que me examinó.

9.- El resultado final de la investigación me deberá ser entregado por escrito, si así lo deseo. Si requiero cualquier aclaración o información adicional sobre este estudio y mi participación en él, debo dirigirme a la Dra. Blanca Urzúa O., Av. Sergio Livingstone N° 943, Independencia, Santiago. Fono 6781793 o a la Dra. Ana Verónica Ortega P. fono 6781810.

10.- Se me ha explicado que los datos clínicos y los resultados de los análisis genéticos permanecerán guardados en una base de datos, que será creada durante el desarrollo del proyecto, y que la información allí contenida será permanentemente respaldada y a ella tendrán acceso sólo el Investigador Responsable y los co-investigadores clínicos del equipo.

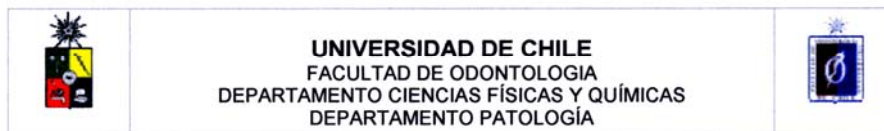
11.- Se me ha comunicado que las muestras de sangre y células epiteliales de mi boca, de las cuales se obtendrá DNA, serán guardadas por el investigador Responsable en las condiciones adecuadas y serán sólo usadas para los análisis de factores genéticos contemplados en este estudio y en otros similares que deriven de él.

Firma del voluntario	Firma del Cirujano-Dentista
Nombre:	Nombre: Dra. Ana Ortega Pinto
Solicita Informe: Si _____ No _____	

Fecha: Santiago, ____ de _____ de 20 ____



Anexo 2



**ASENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS CON AMELOGÉNESIS IMPERFECTA
(MENORES DE 18 AÑOS)**

Este formulario de Asentimiento Informado se aplicará a pacientes chilenos, menores de 18 años, afectados con la patología del esmalte dental AMELOGÉNESIS IMPERFECTA y también a sujetos sanos de la misma edad, sin esta patología, que serán controles del estudio.

TÍTULO DEL ESTUDIO: "DETECCIÓN DE MUTACIONES DESCRITAS EN GENES CAUSALES DE AMELOGÉNESIS IMPERFECTA EN FAMILIAS CHILENAS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA VARIANTE MISSENSE DEL GEN MMP-20 (g.30675A>G)".

En este estudio el **Investigador Responsable** es: la Dra. Blanca Regina Urzúa Orellana, y los **Co-investigadores** son: la Dra. Irene Cecilia Morales Bozo, la Dra. Ana Verónica Ortega Pinto, la Dra.(c) Carla Lozano y el Dr. Víctor Cifuentes, todos académicos de la Universidad de Chile.

INTRODUCCIÓN.

Mi nombre es Blanca Urzúa (Dra. Ana Ortega/Dra. Irene Morales), y soy profesora de la Universidad de Chile. Mi trabajo consiste en conocer las causas hereditarias que provocan que tus dientes luzcan así, como tú los tienes. A largo plazo esta investigación permitirá saber qué tipo de tratamiento se le aplicará a tus dientes y en el corto plazo recibirás tratamiento adecuado en este servicio.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN.

Con este estudio queremos averiguar las causas genéticas que provocan tu enfermedad, con el fin de aplicar este conocimiento para ayudarte a proteger tus dientes y a que el Dentista pueda mejorar los tratamientos que le realizará a tus dientes, para que no sufras molestias.

ELECCIÓN DE PARTICIPANTES.

Te hemos elegido a ti, porque es muy poco frecuente encontrar otros niños que tengan los dientes como tú, y por eso es muy importante que participes.

VOLUNTARIEDAD EN LA PARTICIPACIÓN.

Hemos discutido esta investigación con tus Padres y ellos saben que te estamos preguntando a ti también para que nos des tu aceptación. Puedes elegir participar o no. Si vas a participar en este estudio, tus Padres deben saberlo y también deben aceptarlo. Si no deseas tomar parte de esta investigación, no tienes por qué hacerlo, aún cuando tus Padres lo hayan aceptado. Puedes discutir tu decisión con quien te sientas más cómodo. No tienes que decidirlo inmediatamente. Si no entiendes algo, puedes detenerme para que te lo explique nuevamente.

PROCEDIMIENTOS.

Un Dentista examinará tu dentadura, te hará varias preguntas y tomará una muestra de células de tu boca mediante un enjuague bucal, con una solución dulce, que deberás mover en tu boca por más de 1 minuto, en lo posible. Además, sólo si lo deseas, una enfermera que tiene mucha experiencia, te tomará una muestra de sangre, y probablemente el pinchazo te dolerá un poquito. Una vez que el Dentista te haya examinado te pedirá algunos exámenes adicionales y te enviará con un especialista que restaurará tus dientes. Tal vez en otra ocasión te pediremos que nos des más muestra y tengas que volver al Servicio.

RIESGOS.

Tu participación en este estudio no implica ningún riesgo

CONTACTO.

Puedes hacerme preguntas ahora o más tarde. Le daremos una copia de este formulario a tus padres y allí encontrarás un número y dirección donde puedes contactarnos si tienes dudas que aclarar. Si quieres hablar con alguien más que conoces como tu profesor, médico o un familiar, puedes hacerlo también.



FORMULARIO DE ASENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____, declaro que he entendido lo que se me ha explicado acerca de este estudio y que soy libre de participar o no. Entiendo que puedo retirarme del mismo en cualquier momento. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo

"Yo deseo participar en la investigación y he firmado el asentimiento que sigue".

 (iniciales del niño/menor)

Solo si el niño/a asiente:

Nombre del niño/a _____

Firma del niño/a: _____

Fecha: _____

Día/mes/año: Santiago; ____ de _____ de 2009.

Si es analfabeto:

Una persona que sepa leer y escribir debe firmar (si es posible, esta persona debería ser seleccionada por el participante, no ser uno de los padres, y no debería tener conexión con el equipo de investigación). Los niños analfabetos deberían incluir su huella dactilar también.

"He sido testigo de la lectura exacta del documento de asentimiento al participante potencial y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando de que ha dado su asentimiento libremente".

Nombre del testigo (diferente de los padres) _____

Y Huella dactilar del niño/menor:

Firma del testigo _____

Fecha _____

Día/mes/año

Copia dada al participante _____ (iniciales del investigador/asistente)

El Padre/madre/apoderado ha firmado un consentimiento informado _Si _No

Firma del Testigo	Firma del Cirujano-Dentista
Nombre:	Nombre: Dra. Ana Ortega Pinto.
Solicita Informe: Si _____ No _____	

Fecha: Santiago, ____ de _____ de 20____



Anexo 3



ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN.

ACTA N°: 2010/01

En Santiago, el 15/03/2010, el H. Consejo del Comité Ético de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, con asistencia de sus miembros permanentes:

Prof. Francisco Omar Campos S. (DDS).

Presidente CEC, Vicedecano Facultad de Odontología, U de Chile

Prof. Jorge Gamonal A. (DDS, PhD)

Miembro permanente del CEC; Director del Departamento de Odontología Conservadora.

Fac Odontología. U de Chile

Prof. Juan Cortes A (DDS)

Miembro permanente del CEC; Director del Departamento de Cirugía y Traumatología

Bucal y Maxilofacial Fac. de Odontología, U de Chile

Han revisado y aprobado el siguiente protocolo:

1. **Título completo del proyecto Clínico N° 2009/15:** "DETECCIÓN DE MUTACIONES DESCRITAS EN GENES CAUSALES DE AMELOGÉNESIS IMPERFECTA EN FAMILIAS CHILENAS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA VARIANTE MISENSE DEL GEN MMP-20 (g.306754>G)".
2. **Investigador responsable:** Prof. Blanca Urzúa Orellana
3. **Institución:** Área de Bioquímica, Departamento de Ciencias Físicas y Químicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
4. **Documentación Revisada:**
 - Proyecto Original
 - Consentimiento Informado (CI) y Asentimiento
 - Currículo del investigador responsable
 - Nómina y CV de los coinvestigadores y colaboradores directos de la investigación.
 - Carta de aceptación de la autoridad o autoridades administrativas de los establecimientos donde se realizará el estudio.

5.- Carácter de la población:

Se trata de una investigación Observacional, descriptivo clínico, histológico e imagenológico, y genético de Familias portadoras de Amelogenesis Imperfecta

6.- Fundamentación de la aprobación

Este comité ha considerado que el proyecto planteado por la Dra. Blanca Urzúa es de gran interés para potenciar el desarrollo de guías clínicas y protocolos específicos de manejo diagnóstico y rehabilitación oral, y/o beneficios directos a los afectados que surjan del proyecto mismo, como la organización de Grupos de Autoayuda en Familias Portadoras de AI u otros.

Este proyecto cumple con los principios de respeto a los derechos de las personas participantes y se asegura de garantizarlos en todos los procedimientos, durante el reclutamiento, comunicación con los participantes, manejo de sus muestras biológicas, así como en los procedimientos propuestos para el tratamiento y divulgación de los datos obtenidos.

Este comité además considera que esta investigación apoyará con mayor información a los individuos afectados de Amelogenesis Imperfecta y no vulnera la dignidad de los participantes pues no constituye para ellos una amenaza ni causa de daño emocional ni moral. El formulario de consentimiento informado cumple con los requisitos exigidos y se corregirán algunas enmiendas menores de forma e idioma, para que el participante entienda plenamente el objetivo y todos los procedimientos a los que será sometido.

La razón riesgo/beneficio fue estimada aceptable para los participantes, donde los exámenes no implican mayores riesgos para ellos que el examen clínico y radiográfico no invasivo y sin costo, toma de muestra de sangre y cuando se pueda obtención de biopsias dentarias. El investigador se ha comprometido a resguardar la confidencialidad de los datos. Los participantes serán controlados constantemente para prevenir y limitar los daños de su enfermedad y aunque no recibirán pago por su participación, ellos serán beneficiados por la protección y mantención al máximo de su dentadura en boca generando redes multidisciplinarias para hacer efectivo estos procesos.

Aunque estas patologías genéticas a estudiar son en general de baja incidencia, una estrategia para su estudio puede darse realizando una sistematización del conjunto de enfermedades genéticas que afectan al territorio Estomatognático, en una plataforma de la Facultad al respecto, a través de estructuras ya existentes, del tipo IRMADEMA o IREPO o bien a través de nuevas estructuras diseñadas Ad-hoc. Esto redundará en un fortalecimiento institucional de la disciplina –la genética, básica y clínica- que habitualmente se desarrolla en concordancia con el mejoramiento socio-económico y cultural de los países.

Los antecedentes curriculares de la Dra. Blanca Urzúa y de su equipo colaborador garantizan la ejecución del Estudio dentro de los marcos éticamente aceptables.

El investigador se ha comprometido a mantener informado al comité de cualquier evento adverso y una vez finalizado el estudio el comité deberá ser informado de la totalidad de los resultados del estudio. El Comité de Evaluación Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile es solidario ante eventuales daños a los pacientes y podrá monitorear el cumplimiento del protocolo y protección de los participantes.



DRA. MARIA ANGELICA TORRES V.
Presidente Comité Ético Científico Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Santiago, 15 de marzo de 2010.
C.E.# 15/2009
Acta N°: 01/2009



CERTIFICADO

El Comité de Ética Científico de la Facultad de Odontología, según acta N° 2010/01 del 15 de marzo del 2010, aprobó el Proyecto de Investigación ***“Detección de mutaciones descritas en genes causales de amelogénesis imperfecta en familias chilenas y caracterización de una variante missense del gen MMP-20 (g.306754>G)”***, cuyo Investigador Responsable es la Prof. Dra. BLANCA URZUA ORELLANA, del Departamento Ciencias Básicas y Comunitarias, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Este proyecto dentro de la Dirección de Investigación de nuestra Facultad es equivalente a FIOUCH 09-1.

Se extiende la presente certificación a solicitud de la interesada para los fines que estime pertinentes.

SANTIAGO, 09 de junio de 2011.


PROF. JUAN CORTÉS ARAYA
PRESIDENTE COMITÉ DE ÉTICA



Anexo 4

N° _____

Ficha Clínica Amelogenesis Imperfecta

A. ANAMNESIS ESTADÍSTICA

Nombre completo: _____
 Fecha de nacimiento: _____ Edad: _____ Sexo: M F
 Dirección: _____ Fono: _____
 Ocupación: _____ Nivel educacional _____
 Fecha: _____ Rut: _____

B. ANAMNESIS REMOTA FAMILIAR

1. Enfermedades sistémicas: SI NO

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

Antecedentes de:
 Consumo medicamentos: Alteraciones visuales:
 Nefrocalcinosis:
 Fuma: Otro :

C. EXÁMEN CLÍNICO

1. Extraoral: indicar SI o NO

Hipotricosis	<input type="checkbox"/>	Cejas esc/aumen	<input type="checkbox"/>	Cabello canoso	<input type="checkbox"/>
Uñas disp. mano	<input type="checkbox"/>	Pestañas esc/aum.	<input type="checkbox"/>	hidrosis	<input type="checkbox"/>
Uñas disp. pies	<input type="checkbox"/>	Hiperpig. Parp. inf.	<input type="checkbox"/>	as displásic.	<input type="checkbox"/>
Bronquitis frecuen	<input type="checkbox"/>	Sequedad piel.....	<input type="checkbox"/>	Nariz displásica	<input type="checkbox"/>
Frente displasica	<input type="checkbox"/>	Micrognatia	<input type="checkbox"/>	dos displa	<input type="checkbox"/>

.....

2. Intraoral:

Mucosa
 Frenillo labial superior..
 Paladar
 Uvula
 Lengua.....
 Secreción de glándulas salivales mayores.
 Mordida abierta anterior.....
 Observaciones

Dentición permanente

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

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

Dentición temporal

X = ausente

△ = en arroz

M = en Mora

D = Displasia otra

Ab= abrasión cervical

Tau= Taurodontismo

C = caries

O = Coronada

P = Pilar Puente

Di= diente invaginado

T= transposición dentaria

G= giroversion

Sp= supernumerario

S= sano

Estatura: _____ cm

Test de saliva global _____ ml x 5min. Tubo N°: _____

Test de Schirmer oral= _____ mm x 5 min.

Medición de densidad de GSM Labiales= _____

Foto clínica: _____

Impresión de arcadas dentarias: _____

Entrega de orden de Radiografía panorámica: _____

Diagnóstico del paciente: _____