



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ÁREA DE BIOQUÍMICA

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL

“Análisis mutacional del gen amelogenina (*AMELX*) de una familia Colombiana afectada por Amelogénesis Imperfecta, usando amplificación de genoma completo”.

Manuel Alejandro Morales Gómez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

Tutor Principal

Prof. Dra. Blanca Regina Urzúa Orellana

Tutores Asociados

Prof. Dra. Sandra Janeth Gutiérrez Prieto

Prof. Dra. Patricia Méndez

Consultor Experto

Prof. Dra. Ana Verónica Ortega Pinto

FINANCIAMIENTO: Proyecto Fondecyt Regular N° 1140905

2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora principal, la Prof. Dra. Blanca Urzúa, por su entrega de conocimiento, guía y apoyo, lo que fue fundamental en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A cada una de las personas que conforman el laboratorio de bioquímica y biología oral quienes tuvieron siempre la mejor disposición e hicieron de éste un lugar cálido y agradable, donde siempre se demostró responsabilidad, voluntad, unión y cariño.

A mis padres Alicia y José, y a mis hermanos Paulina y José por el apoyo constante durante este proceso tan importante.

A Natalia Rodríguez Pérez por tu apoyo, compañía y motivación en la etapa final de mis estudios.

Por último, agradezco a todos mis amigos, en particular a Daniela Mansilla Durán, por la gran persona que eres, por tu ayuda y por esas numerosas tardes de laboratorio. A Diego Matamoros Caruman, Oriana Rivera Mamani y Hetiel Miranda Guerra, por acompañarme y alentarme en cada una de las etapas de mi formación como profesional.

ÍNDICE

PÁGINA

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1 Marco teórico.....	6
2.2 Planteamiento del problema.....	17
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6. RESULTADOS.....	27
7. DISCUSIÓN.....	54
8. CONCLUSIONES.....	62
9. REFERENCIAS.....	63
10. ANEXOS.....	70

1. RESUMEN

Amelogénesis imperfecta (AI) es un término utilizado para describir un grupo de desórdenes hereditarios de manifestación clínica y genética heterogénea, de baja prevalencia, que afectan el desarrollo del esmalte dentario, causando anomalías en su cantidad y calidad. Las AI se clasifican en 14 subtipos distintos basados en el fenotipo clínico, rasgos secundarios específicos (como textura y localización de los defectos del esmalte) y patrón de herencia.

Hasta la fecha, se han descrito al menos 13 genes relacionados con casos de AI no sindrómica. El gen amelogenina (*AMELX*) es el principal gen relacionado con AI con patrones de herencia ligada al cromosoma X y se asocia con fenotipos hipoplásicos/hipomaduros. Actualmente, se han reportado 21 mutaciones en este gen.

El propósito de este trabajo fue identificar mutaciones descritas o nuevas variantes de secuencia en el gen amelogenina (*AMELX*), usando DNA amplificado de un sujeto afectado perteneciente a una familia Colombiana con AI hipoplásica que presenta un probable patrón de herencia ligado al cromosoma X.

Para llevar a cabo el estudio, se realizó un análisis clínico, genealógico y radiográfico del probando con los datos obtenidos por las tutoras asociadas. El análisis genético molecular consistió en la secuenciación completa del gen *AMELX* incluyendo región promotora y regiones codificantes, más secuencias intrónicas circundantes, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación directa de fragmentos de ADN amplificado del probando y de un sujeto control. Posteriormente, las secuencias fueron comparadas con la secuencia de referencia de *AMELX* (NM_012090.1). Paralelamente, se realizó un análisis bioinformático de las principales variantes exónicas, intrónicas y del promotor del gen *AMELX*, con el objetivo de conocer el potencial efecto que éstas podrían causar en el gen si se encontraran presentes en la secuencias del paciente.

El análisis de los resultados no evidenció la presencia de ninguna de las 21 mutaciones reportadas o nuevas variantes de secuencia. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de una mutación en alguna región no cubierta en este estudio u en otro gen del cromosoma X. Por otra parte, los resultados del análisis bioinformático mostraron que algunas variantes *missense* e intrónicas poseen un alto potencial de causar un efecto dañino en la proteína y/o en su procesamiento. Sin embargo, estas variantes tampoco fueron encontradas en el rastreo de la secuencia.

Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan el concepto de una enfermedad con manifestación clínica y genética heterogénea, causada en este caso probablemente por un gen distinto a amelogenina.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 AMELOGÉNESIS IMPERFECTA.

Amelogénesis imperfecta (AI) es un término utilizado para describir un grupo de desórdenes hereditarios de manifestación clínica y genética heterogénea, que afectan el desarrollo del esmalte dentario, causando anomalías en su cantidad y calidad (Witkop 1988; Neville y cols., 1995; Saap y cols., 1998). A menudo estas anomalías se pueden presentar con otras manifestaciones ectodérmicas o sistémicas (AI sindrómicas). La estructura y apariencia del esmalte pueden estar afectadas en dentición primaria y permanente (Aldred y cols., 2003; Gadhia y cols., 2012) y ésta puede ser ampliamente variable, desde formas leves donde sólo hay una decoloración del esmalte a formas en que la hipocalcificación del esmalte causa la fractura de éste tempranamente luego de que el diente ha erupcionado en boca (Wright y cols., 1995).

Adicionalmente, se han reportado otras características clínicas asociadas con AI como retraso en la erupción, microdoncia, resorción radicular, raíces cortas, pulpolitos, *dens in dente*, agenesia dental, agrandamiento gingival, gingivitis y periodontitis. También se han reportado anomalías esqueléticas como sobremordida y mordida cruzada (Poulsen y cols., 2008; Gadhia y cols., 2012). Lo anterior ocasiona problemas estéticos, funcionales, psicológicos y sociales al individuo afectado, los que pueden ser manejados con intervenciones tempranas tanto preventivas como restauradoras y con un tratamiento que deberá prolongarse hasta la edad adulta, considerando siempre un equipo multidisciplinario (Crawford y cols., 2007).

2.1.2 PREVALENCIA.

La prevalencia reportada de la AI varía ampliamente en la literatura. Estudios han reportado prevalencias entre 43:10.000 en Turquía (Altug-Atac 2007), 14:10.000 en Suecia (Bäckman y cols., 1986), 10:10.000 en Argentina (Sedano y

cols., 1975), 1.25:10.000 en Israel (Chosack y cols., 1979) y 1:14,000 en Estados Unidos (Witkop, 1976). Las AI de tipo hipoplásica representan entre 60-73% de los casos, las AI tipo hipomadura representan 20-40% y las AI de tipo hipocalcificada representan un 7% (Rajendran y cols., 2007). Se ha descrito también que las formas autosómicas recesivas son las más prevalentes en Medio Oriente y algunas partes de Asia, mientras que formas autosómicas dominantes son más prevalentes en Estados Unidos y Europa (Witkop, 1976; Chosack y cols., 1979).

2.1.3 CLASIFICACIÓN.

Las AI se clasifican en 14 subtipos distintos basados en el fenotipo clínico, rasgos secundarios específicos (como textura y localización de los defectos del esmalte) y patrón de herencia (Witkop, 1989). También se han descrito otros sistemas de clasificación en la literatura. Un reciente estudio discute clasificaciones utilizadas y propone un nuevo modelo de clasificación de AI basado en 4 criterios: 1) patrón de herencia: autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado a X y caso esporádico; 2) base molecular: localización cromosómica/locus/mutación; 3) resultado bioquímico: posible resultado/efecto de las mutaciones cuando se conocen; 4) fenotipo: AI hipoplásica, hipocalcificada, hipomadura, hipomadura-hipoplásica con taurodontismo (Aldred y cols., 2003).

Clínicamente, es posible distinguir cada subtipo de AI, como se indica a continuación :

AI Hipoplásica (AIHP): Se caracteriza por un esmalte con un grosor disminuido debido a un defecto en la formación normal de la matriz. Se observan fositas y hendiduras, la dureza del esmalte y su translucidez es normal y radiográficamente éste presenta un contraste normal con la dentina.

AI Hipocalcificada (AIHC): El esmalte presenta un grosor normal, la estructura del tejido es débil, presenta apariencia opaca o tizosa, esmalte manchado que rápidamente se fractura, radiográficamente es menos radiopaco que la dentina.

AI Hipomadura (AIHM): El esmalte presenta un grosor normal pero con apariencia moteada, también se observan manchas blanco-opacas en la superficie del esmalte (dientes con gorro de nieve). El esmalte es levemente más frágil que en un diente

normal y retiene proteínas del tipo amelogenina. Radiográficamente, tiene una radiopacidad similar a la dentina.

AI Hipomadura-Hipoplásica con Taurodontismo (AIHPT): El esmalte presenta una apariencia combinada entre hipoplasia e hipomaduración y los dientes presentan una cámara pulpar alargada con el piso de ésta y la furca desplazada apicalmente (Sapp y cols.,2005; Hu y cols,2007).

2.1.4 ETIOLOGÍA GENÉTICA DE LAS AI.

Las AI son desórdenes hereditarios del esmalte, clínica y genéticamente heterogéneos, por lo que se presentan con gran variabilidad fenotípica y diversos patrones de herencia, ya sea, autosómicos o ligados al cromosoma X, dominantes y/o recesivos en ambos casos (Crawford y cols., 2007; Urzúa y cols., 2011).

Actualmente, se conoce que las AI no sindrómicas de tipo hipoplásicas pueden ser ocasionadas por mutaciones en los genes *AMELX* (amelogenina), *ENAM* (enamelina), *AMBN* (ameloblastina), *LAMB3* (cadena β 3 de laminina 332), *ITGB6* (cadena β 6 de integrina) y *COL17A1* (cadena α 1 del colágeno XVII) (Wright y cols., 2015). Las AI de tipo hipomaduras se han asociado a mutaciones en los genes *MMP20* (enamelisina), *KLK4* (calicreína 4), *WDR72* (proteína 72 con repetidos WD), *C4orf26* (fosfoproteína ácida), *SLC24A4* (Transportador de solutos 24, miembro A4) y *STIM1* (molécula 1 de interacción estromal) (Moradian-Oldak, 2012; Kim y cols., 2008; El-Sayed y cols., 2009; Parry y cols., 2012; Parry y cols., 2013). Por otra parte, el único gen cuyas mutaciones han sido asociadas con AI de tipo hipocalcificada es *FAM83H* (familia con similitud de secuencia 83, miembro H) (Zhang y cols., 2015; Urzúa y cols., 2015).

Otros estudios, sugieren como posibles genes candidatos para AI a *ODAM* (Odontogenic Ameloblast-associated protein) y *AMTN* (amelotina). En AI sindrómicas se ha encontrado asociación de mutaciones en genes como *LTBP3*, *FAM20A*, *CNNM4*, *ROGDI* y *FAM20C*. Casos de AI sindrómica y no sindrómica se han asociado a genes como *COL17A1*, *LAMA3*, *LAMB3* y *DLX3* (Seymen y cols., 2015).

2.1.5 GEN *AMEL* Y SU PRODUCTO GÉNICO: AMELOGENINA.

Amelogenina es la proteína más abundante de la matriz extracelular del esmalte en desarrollo (Fincham y cols., 1991 ; Salido y cols., 1992). El gen que codifica la proteína amelogenina se denomina *AMEL* y existen dos formas de éste en los mamíferos (genes duplicados); uno se ubica en el cromosoma sexual X (*AMELX*) y el otro en el cromosoma sexual Y (*AMELY*). En hombres, *AMELY* se expresa en muy bajo nivel, no tiene una fuerte restricción funcional y está enmascarado por la función del homólogo ligado a X. Además, al ser su expresión muy baja no puede recuperar la función de su homólogo, por lo tanto, *AMELX* es el principal participante en la organización y estructura del tejido adamantino (Hart y cols., 2002; Kim y cols., 2004; Kida y cols., 2007).

El gen *AMELX* (locus AIH1,Xp22.3), está constituido por 7 exones, abarcando una longitud total de 8 kb en el genoma, de la cual parte del exón 2, los exones 3, 5, 6 y parte del exón 7 codifican para la proteína amelogenina (**Figura 1A**). En humanos, existen 3 isoformas de amelogenina, producto del procesamiento alternativo de su ARN mensajero (Sasaki y cols., 1995). Amelogenina, 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 y cols., 2003). La secuencia aminoacídica de amelogenina puede ser dividida en 3 dominios en su estructura primaria (**Figura 1B**), basados en diferencias en su composición: a) un dominio N-terminal hidrofóbico de 45 aminoácidos que contiene 6 residuos de tirosina (región llamada TRAP por *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. El dominio N-terminal y C-terminal son altamente conservados en los mamíferos, sugiriendo que estas regiones tienen un importante rol en desarrollo y mineralización del esmalte. Amelogenina contiene un único grupo fosfato en la posición Serina 16, que se presume estaría involucrado en la interacción entre amelogenina y calcio, contribuyendo a estabilizar el precursor de fosfato de calcio amorfo (Ruan y cols., 2015). La remoción del segmento C-terminal

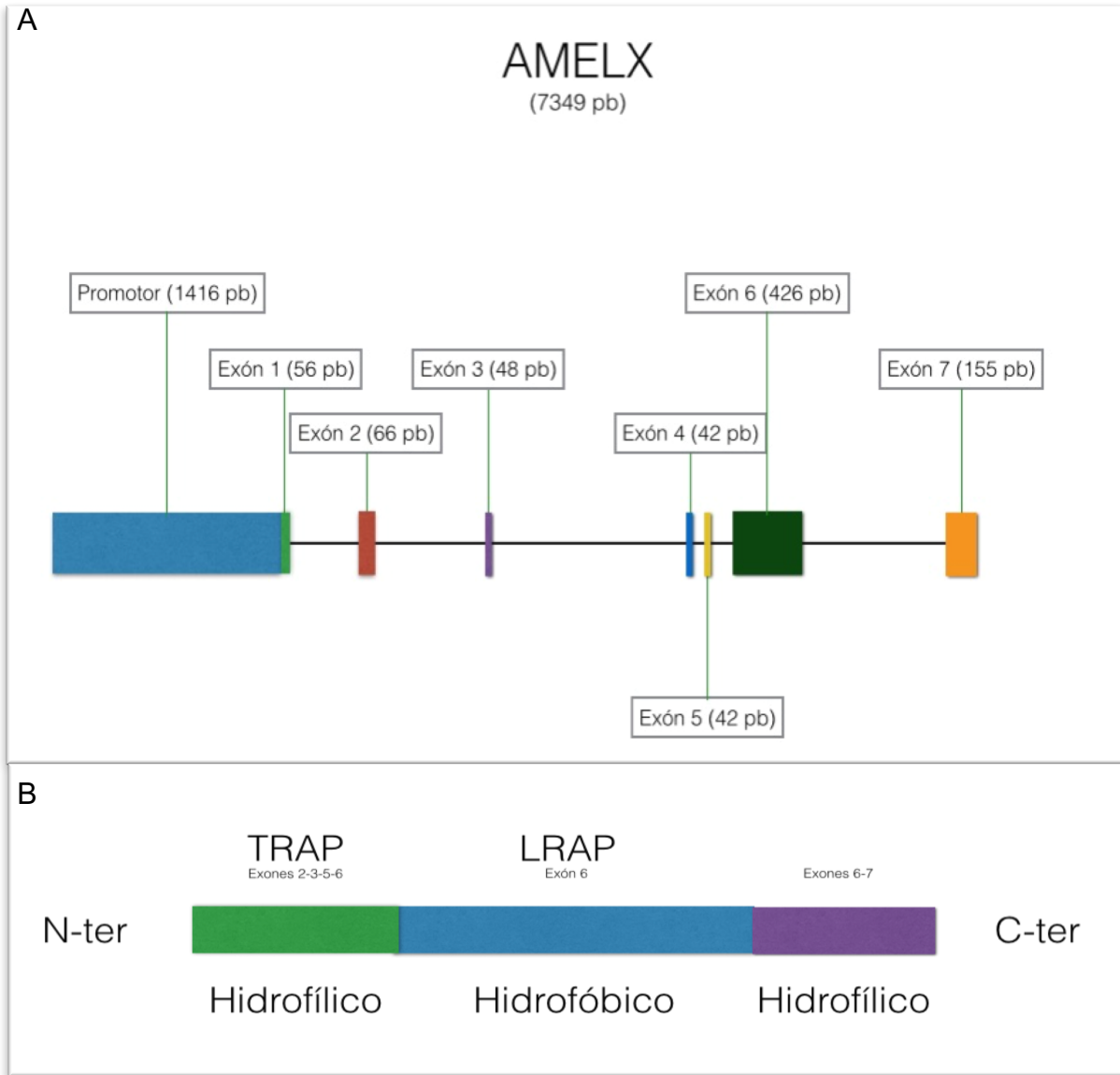


Figura 1: Organización de la estructura del gen amelogenina (*AMELX*) humano y de su producto proteico. A) Organización de la estructura exón-intrón del gen *AMELX* con la región promotora y los 7 exones que lo componen, donde se indica en número de pares de bases que contiene cada uno. B) Organización de la estructura de dominios proteicos de Amelogenina, contribuída por los diferentes exones.

provoca una disminución de la afinidad de amelogenina con los cristales de apatita. Se han propuesto roles específicos de amelogenina en la nucleación, crecimiento, regulación de la forma y tamaño del cristal y control de la agregación cristal-cristal (Wang y cols., 2007; Tarasevic y cols., 2007; Uskokovic y cols., 2011). 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 y cols., 2001).

Amelogenina una vez que es secretada es procesada por proteasas del esmalte y se auto-ensambla para generar nanosferas, que son estructuras supramoleculares de alrededor de 20 nm, que facilitarían la organización y crecimiento de los cristales en el frente de mineralización del esmalte (Yang y cols., 2010). A la proteína amelogenina se le atribuyen diversas funciones, como: 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 y cols., 2010; Yang y cols., 2010; Paine y cols., 2002; Shaw y cols., 2004; Margolis y cols., 2006). También se ha encontrado expresión del gen *AMELX* en odontoblastos y cementoblastos, postulando así un posible rol no identificado en la erupción dental (Oida y cols., 2002; Nuñez y cols. 2010). Recientemente se ha estudiado la función de amelogenina como regulador del pH durante el proceso de maduración del esmalte (Guo y cols., 2015).

2.1.6 VALIDACIÓN DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN *AMEL* BASADA EN LA EVOLUCIÓN DEL GEN.

Amelogenina surgió previo a la emergencia de los tetrápodos (Kawasaki y cols., 2004). En euterios (mamíferos placentarios) *AMEL* reside en un largo intrón perteneciente al gen que codifica la proteína 6 activante de la GTPasa Rho (Rho

GTPase-activating protein 6 (*ARHGAP6*) en orientación opuesta a éste, teniendo una estructura de gen anidado, producto de una transposición (Iwase y cols.,2007).

AMEL pertenece a la familia de las fosfoproteínas secretadas de unión a calcio (secretory Ca-binding phosphoproteins SCPP). Todos los genes de esta familia están ubicados en tándem en el cromosoma 4 en humano (Kawasaki y cols.,2003). Se postula que evolutivamente sufrió translocaciones mediante las cuales llegó a los cromosomas sexuales (Graves y cols., 2000). Inicialmente el gen *AMEL* era un gen autosómico. En ancestros, un par de autosomas homólogos que codificaban para *AMEL* se translocaron y llegaron al brazo corto de los cromosomas sexuales hace 100-180 millones de años atrás. Además, la recombinación homóloga fue inhibida y la diferenciación cromosómica X-Y tomó lugar en forma escalonada, un segmento a la vez (Lahn y cols.,1999). Tal forma de diferenciación de los cromosomas sexuales dejó un antiguo límite pseudoautosómico dentro del segundo intrón de *AMEL* (Iwase y cols., 2001, 2003).

AMEL solo es encontrado en anfibios, reptiles y mamíferos (Ishiyama y cols., 1998; Delgado y cols.,2005). En algunos casos el gen ha desaparecido en la historia evolutiva como el caso de la gallina y tortuga. Una explicación de esto sería una pérdida secundaria del gen al estar ausente el exón 1 y el intrón 1 de *ARHGAP6* en los tetrápodos antes mencionados (Iwase y cols., 2007).

La comparación de secuencias del gen *AMEL* en mamíferos, reptiles y anfibios ha revelado que el exón 1 no es traducido, el exón 4 sufre procesamiento alternativo y está ausente en algunos mamíferos y en todos los reptiles; el exón 7 codifica sólo para 1 aminoácido y las secuencias de los exones 2, 3 y 5 están bien conservadas. Por otra parte, la comparación de secuencias del exón 6 mostró que zonas de esta región eran altamente variable entre especies. Por ende se concluye que los estudios evolutivos se enfocan principalmente en el exón 6 (Delgado y cols., 2007). Dentro de los parámetros que se han comparado, se encontraron diferencias en el largo del gen; el contenido de prolina, glutamina y el número de repeticiones del tripéptido de prolina entre mamíferos y no mamíferos, siendo menor en todos los casos para anfibios y reptiles. Lo anterior podría explicar que la microestructura del esmalte en los no mamíferos es menos organizada (Diekwisch y cols., 2009).

La alta conservación de algunas zonas del gen indican importantes funciones soportadas por residuos o grupos de residuos específicos. En comparaciones del exón 6 de *AMEL* humano con el de primates, se ha observado un 100% de similitud con el exón 6 de Chimpancé, a pesar de que la divergencia de estos linajes se estima que ocurrió hace 5-6 millones de años atrás. Otros primates conservan gran similitud (entre 99,3 % a 97,1 %), demostrando una gran conservación y fijación del gen durante la evolución (Richard y cols., 2007).

La caracterización de mutaciones ayuda a identificar regiones particulares del gen o residuos que juegan un rol importante en la función de la proteína, en este caso: amelogenina. El análisis evolutivo de *AMEL* se ha convertido en una alternativa que permite validar las mutaciones causales de Amelogénesis Imperfecta. Dado el bajo número de mutaciones reportado en la mayoría de los linajes y la gran conservación de la secuencia de *AMEL*, cualquier cambio podría interpretarse como relevante para la estructura. Cuando se encuentran mutaciones en un gen, como grandes deleciones con cambios en el marco de lectura que conducen a un codón de terminación prematuro, estas alteraciones obviamente se consideran como las responsables del fenotipo observado. Sin embargo, cuando una mutación provoca la sustitución de un aminoácido, la correlación genotipo-fenotipo es menos obvia. Si la mutación se encuentra en una posición que está bien conservada en otras especies es muy probable que esto constituya sustento para plantear que realmente es una mutación, ya que los sitios de importancia crucial deben mantenerse conservados durante la evolución y cualquier sustitución conllevaría a la condición genética. En cambio, aquellas zonas que aceptan variación durante el proceso evolutivo serán tendientes a presentar cambios que probablemente no alteren sustancialmente la estructura ni la función de la proteína codificada (Delgado y cols., 2007).

2.1.7 CORRELACIONES FENOTIPO-GENOTIPO EN AI LIGADAS AL CROMOSOMA X.

Hasta la fecha se han descrito 21 mutaciones en el gen *AMELX* que incluyen deleciones de varios tamaños y mutaciones sin sentido (*nonsense*) y de sentido

equivocado (*missense*) (**ver tabla 1**) Estos errores determinan marcadas diferencias en los fenotipos resultantes; desde hipoplasia del esmalte hasta hipomineralización-hipomaduración del tejido dependiendo del dominio donde se ubique la mutación (Lee y cols., 2011; Hu y cols., 2012). 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 y cols., 1961), que consiste en la inactivación aleatoria de una copia del cromosoma X como una forma de compensación de la 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 de los 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 y cols., 2003).

En pacientes con hipoplasia del esmalte se han descrito cuatro mutaciones en el péptido señal. Estas mutaciones consisten 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 falta de 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 en la mayoría de los casos (Lagerstrom-Fermer y cols., 1995; Sekiguchi y cols., 2001; Kim y cols., 2004). Una delección de 5 kb compromete desde el exón 3 hasta parte del exón 7. 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/hipomadura. El esmalte se observa manchado, con una coloración opaca y las micro-radiografías demuestran que es hipomineralizado. Además, existe una hipoplasia variable generalizada (Lagerstrom y cols., 1991).

Tabla 1. Mutaciones descritas en el gen *AMELX* en casos de AI ligadas al cromosoma X.

N°	ADN Genómico	Exón	Proteína	Región afectada	Fenotipo	Referencia
1	q.6378T>C	2	p.M1T	Péptido Señal	Hipoplásica	Kim y cols., 2004
2	q.6387G>A	2	p.W4X	Péptido Señal	Hipoplásica Lisa	Sekiquchi y cols., 2001
3	q.6387G>C	2	p.W4S	Péptido Señal	Hipoplásica	Kim y cols., 2004
4	q.6390_98del	2	p.I5_A8delinsT	Péptido Señal	Hipoplásica Lisa	Lagerström-Fermer y cols., 1995
5	g.1148_54del	3-7	p.18del	Toda la proteína	Hipomineralizada/ hipomadura	Lagerstöm y cols., 1991
6	q.9708T>C	4	p.A40A	N-terminal	Hipoplásica/Hipomadura	Cho y cols., 2014
7	q.9831C>T	5	p.T51Y	N-terminal	Hipomadura	Lench and Winter, 1995
8	g.9834delC	5	p.P52fsX53	N-terminal	Hipomadura	Aldred y cols., 1992; Lench y cols., 1994
9	q.9834C>G	5	p.P52R	N-terminal	Hipoplásica Lisa	Kida y cols., 2007
10	q.9834C>T	5	p.P52L	N-Terminal	Hipoplásica	Frasad y cols., 2015
11	g.10157C>A	6	p.P70T	C-terminal	Hipomadura	Collier y cols., 1997; Hart y cols., 2000
12	g.10179A>T	6	p.H77L	C-terminal	Hipoplásica/Hipomadura	Hart y cols., 2001
13	q.10191C>T	6	p.P81L	C-terminal	Hipoplásica	Kim y cols., 2017
14	q.10333_34delC	6	p.H129fsX187	C-terminal	Hipoplásica Lisa	Sekiquchi y cols., 2001
15	q.10367_69delC	6	p.Y141fsX187	C-terminal	Hipoplásica Lisa	Greene y cols., 2002
16	q.10421_22delC	6	p.P158fsX187	C-terminal	Hipoplásica Lisa	Lench and Winter, 1995
17	q.10466_67delC	6	p.P173LfsX16	C-terminal	Hipoplásica Lisa	Lee K-E y cols., 2011
18	g.10487_90delC	6	p.L181fsX187	C-terminal	Hipoplásica Lisa	Kindelan y cols., 2000; Hart y cols., 2001
19	q.10520dG>T	6	p.E191X	C-terminal	Hipoplásica Lisa	Lench and Winter, 1995
20	Delección 96240		No hay	Toda la proteína	Hipoplásica Rugosa	Hu y cols., 2012
21	Delección 52654		No hay	Toda la proteína	Hipoplásica Rugosa	Hu y cols., 2012

Todas las mutaciones que afectan parte del extremo N-terminal de la proteína amelogenina están asociadas con 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.

Las mutaciones reportadas en el extremo C-terminal 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 (Pugach y cols. 2010). Nueve mutaciones reportadas en *AMELX* tienen como consecuencia una alteración en el extremo C-terminal de amelogenina.

Además, otras dos mutaciones que provocan el cambio de prolina por treonina en la posición 41 y el de Histidina por Leucina en la posición 47, sugieren que estos cambios alteran sitios de clivaje altamente conservados, importantes en el procesamiento post secretorio y en la maduración de la matriz del esmalte (Collier y cols., 1997). Otra mutación encontrada en el C-terminal asocia por primera vez el gen *AMELX* a la presencia de múltiples reabsorciones en la corona de los dientes. La mutación se ubica en el exón 6, produciendo un codón de terminación prematuro. El fenotipo de los individuos estudiados consiste en AI de tipo hipoplásica y reabsorción de la corona de premolares y molares (Lee y cols., 2011).

2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el presente trabajo se pretende realizar el análisis mutacional de la región promotora y de la región codificante completa, junto con las regiones intrónicas circundantes del gen amelogenina (*AMELX*), usando ADN de un probando proveniente de una familia Colombiana afectada con AI hipoplásica/hipomadura y con patrón de herencia ligado al cromosoma X. Este estudio se enmarca en el proyecto Fondecyt N° 1140905, en el cual se están analizando 11 familias Chilenas y 9 familias Colombianas afectadas con AI, para dilucidar la etiología genética en cada caso.

En general, el estudio molecular con ADN de pacientes, implica contar con gran cantidad de muestra inicial, sobre todo cuando la patología investigada es genéticamente heterogénea y son varios los genes a analizar. Cuando el probando es un niño, la situación es más compleja aún, ya que la toma de muestra de sangre periférica es invasiva y por lo general, los padres y los niños se niegan a donar sangre para el estudio. En estos casos, el investigador acude a la toma de muestras de sangre en los padres (si acceden) y de saliva o de células epiteliales de la mucosa bucal en el niño(a), pero este último tipo de muestras da como resultado un bajo rendimiento de DNA, independientemente de la marca del *kit* utilizado para la extracción, lo que hace necesario conseguir varias muestras, que deben ser tomadas en forma diferida en el tiempo. Como la cantidad de ADN de este probando Colombiano es limitante para el estudio de secuenciación directa, se ha decidido amplificar esta muestra de ADN con la técnica de amplificación del genoma completo, usando el paquete comercial “*Illustra™ Ready-To-Go™ GenomiPhi™ HY DNA Amplification*”. Se secuenciará el gen amelogenina completo con el ADN amplificado del probando y con ADN genómico *original* control (no amplificado) de un sujeto sin AI. Si se encuentra algún cambio compatible con mutación en el ADN del probando, se recurrirá al DNA original de éste para corroborar dicho cambio. Si el ADN original, usado para la amplificación es de buena calidad, el genoma completo del individuo debería estar representado en la muestra, por lo que se esperaría que fuera posible amplificar los diferentes exones del gen amelogenina y

su promotor, para posteriormente purificarlos y secuenciarlos directamente. El posterior análisis comparativo de secuencias obtenidas con el ADN amplificado del probando, el ADN original del sujeto control y la secuencia de referencia del gen *AMELX*, permitirá determinar la existencia o no de posibles cambios mutacionales, que serán corroborados con ADN original del afectado y sus familiares.

3. HIPÓTESIS.

El probando colombiano y sus familiares afectados con Amelogénesis Imperfecta hipoplásica/hipomadura, con probable patrón de herencia ligado al cromosoma X, presentan alguna de las mutaciones descritas o una nueva variante causal en el gen amelogenina (*AMELX*).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Identificar mutaciones descritas o nuevas variantes de secuencia en el gen amelogenina (*AMELX*), en sujetos afectados pertenecientes a una familia colombiana con amelogénesis imperfecta hipoplásica ligada al cromosoma X.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar clínico-radiográfica y genealógicamente la familia Colombiana en estudio.
- Identificar mutaciones y polimorfismos de nucleótido único (SNP's) previamente descritos del gen amelogenina (*AMELX*), en el probando Colombiano con AI hipoplásica/hipomadura ligada al cromosoma X.
- Detectar nuevas variantes de secuencia (mutaciones nuevas) del gen amelogenina (*AMELX*) en el probando Colombiano con AI hipoplásica/hipomadura ligada al cromosoma X.
- Asociar los hallazgos genéticos encontrados con el fenotipo clínico que presenta la familia Colombiana analizada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1. INDIVIDUOS PARTICIPANTES

a) Pacientes con AI. En la presente tesis se estudió una familia Colombiana con Amelogénesis Imperfecta. Las muestras de ADN del probando y de tres familiares fueron gentilmente proporcionadas por la colaboradora internacional del proyecto Fondecyt N° 1140905, Dra. Sandra Gutiérrez Prieto de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.

b) Grupo control. Se realizó la secuenciación completa del gen amelogenina (*AMELX*) en un individuo sano sin Amelogénesis Imperfecta u otra patología del esmalte. Si se encontraba un cambio compatible con nueva mutación en el DNA del probando, se realizaría el estudio de la variante usando la técnica de PCR-FLRP o secuenciación directa en 200 sujetos controles sin AI, para determinar la frecuencia de dicho cambio.

c) Procedimiento de consentimiento informado, autorización ética y de bioseguridad. Los individuos afectados y sujetos control firmaron un consentimiento y asentimiento informado de su participación en este estudio, lo cual consta en el proyecto Fondecyt N° 1140905, que cuenta además con la aprobación del Comité de Ética y de Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (**Anexos 1 y 2**).

d) Diagnóstico clínico de AI. El diagnóstico clínico de la familia en estudio fue realizado por las Odontólogas Dra. Sandra Gutiérrez y Dra. Patricia Méndez, de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia. De acuerdo a los datos proporcionados por estas profesionales, se trataría de Amelogénesis Imperfecta de tipo Hipoplásica, con probable patrón de herencia ligado al cromosoma X. Además del ADN del probando, se dispone de muestras de ADN original de la abuela materna afectada, madre afectada y de una tía no afectada.

5.2 ANÁLISIS GÉNÉTICO-MOLECULAR

a) Toma de muestra de sangre. Se procedió a extraer 10 ml de sangre venosa del sujeto control, el cual fue depositado en tubos sellados al vacío que contienen EDTA como anticoagulante. Los tubos fueron agitados y almacenados a 4-6° C para la purificación de ADN.

b) Purificación de ADN genómico. El ADN genómico se aisló a partir de sangre periférica, utilizando el protocolo descrito por Miller y cols. (1998). Este procedimiento consistió en mezclar por inversión 5-10 ml de sangre con 20-25 ml de solución A (10 mM de Tris-HCl pH 7,5; 0,32 M de Sacarosa; 5 mM de MgCl₂ y 1% de tritón X-100) e incubar esta mezcla por 30 min en hielo, para luego centrifugar durante 15 min a 5.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en vórtex suavemente con 1,5 ml de solución A. Luego se adicionó 18,5 ml de esta misma solución, se incubaron en hielo por 20 min y se repitió el paso de centrifugación, eliminando posteriormente el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido suavemente en vórtex agregando 1,5 ml de solución B (10 mM de Tris-HCl pH 7,5; 0,4 M de NaCl y 2 mM de E. D. T. A. pH 8,0), posteriormente se adicionó 50 µl de SDS al 20% y 300 µl de una mezcla de proteinasa K-SDS (2mg/ml de Proteinasa K; 1% de SDS). La muestra fue incubada a 37°C durante 1 hora con agitación moderada y durante toda la noche sin agitación. Las proteínas fueron precipitadas por agitación suave en vórtex durante 15-30 seg, agregando 500 µl de una solución de NaCl saturado (5M). La muestra fue centrifugada por 5 minutos a 10.000 rpm en frío y el sobrenadante fue transferido a tubos limpios, a los que se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Las muestras se centrifugaron nuevamente por 5 minutos a 10.000 rpm y el ADN se lavó con etanol frío al 70%. El sedimento obtenido se secó y finalmente se resuspendió en 400 µl de tampón TE (100mM Tris-HCl, 10mM EDTA).

c) Amplificación de genoma completo. Se realizó la amplificación del ADN del probando utilizando el paquete comercial de amplificación de genoma completo

“*Illustra™ Ready-To-Go™ GenomiPhi™ HY DNA Amplification*“, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezcló en un tubo Eppendorf 9 uL del tampón de reacción con 1 uL de la muestra de ADN, depositando en total 10 ng. La muestra fue incubada a 95° por 3 minutos y luego se puso en hielo para enfriarla hasta 4° C. Se preparó una mezcla en otro tubo según la cantidad de reacciones a realizar. Se mezcló 9 uL de tampón de reacción con 1 uL de la enzima DNA polimerasa de Phi 29. Luego, 10 uL de la mezcla antes descrita fueron depositados en las muestras. Se incubó por 90 minutos a 30°C. Luego se calentaron las muestras a 65°C por 10 minutos y se pusieron en hielo inmediatamente después para enfriar a 4°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

d) Análisis mutacional del gen amelogenina (AMELX). El análisis mutacional del gen amelogenina se realizó usando ADN amplificado del probando de la familia Colombiana analizada y ADN genómico original correspondiente a un sujeto control sin AI. Si se encontraban variantes de secuencia, compatibles con mutación, se realizaría el análisis de co-segregación de la variante usando DNA de dos familiares afectados y uno no afectado. Se analizaron los siete exones del gen con secuencias intrónicas circundantes, lo que incluye la región codificante completa y además, la región promotora del gen, mediante amplificación por PCR y secuenciación directa de los amplicones obtenidos.

e) Diseño de partidores. Los exones del gen amelogenina y la región promotora fueron amplificados usando los partidores específicos diseñados por Plaza (2011), partidores disponibles en la literatura (Kim, 2004; Kindelam, 2000) y una pareja diseñada por Morales (2015), los cuales se muestran en la **tabla 2**. Estos partidores fueron diseñados en base a la secuencia de referencia del gen *AMELX*, cuyo número de acceso es NM_012090.1 y 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.

Tabla 2. 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*).

Ubicación	Nombre	Secuencia	Tamaño	T° de annealing
Promotor	Amelx P1F	CTCCCTGATTGGAAGGTCTTACC	595	59°
	Amelx P1R	CCCCTTTCCCTAAGCAATGACC		
	Amelx P2aF	GCTGACAGGGTTGGGGAGAGTAA	736	61°
	Amelx P2aR	GGCAAGGAGTGCACACCAGAC		
	Amelx P2abF	AGGTAGAGGGGTAAAACACAC	509	58°
	Amelx P2abR	GTTCCCCTTGGCTACTCCTTT		
	Amelx P2bF	GGGCAAAGAAGGGCCGCCATA	558	61°
	Amelx P2bR	AAGCTTCTCTGCCATCGCCTTTTCC		
	Amelx P3F	AAGCTTCTCTGCCATCGCCTTTTCC	533	59°
	Amelx P3R	AAACTCAGGGATGCTTGATCCT		
Exón 1	Amelx 1F	GCTAGAAGTGGAGAAAAGGCGA	600	58°
	Amelx 1R	TGTGGCCAAGAAAGACCTTTGG		
Exón 2	Amelx 2F	GGTAGACTGTGCACGAGACATTT	719	58°
	Amelx 2R	CCCCAGCTGTACCAAATCAGAA		
Exón 3	Amx 3F	TGTGTGCTGGTTTCTGCTTC	575	60°
	Amx 3R	CGGCCATATTTAGGAGGACA		
Exón 4 y 5	Amelx 45F	ACAGGAAGCACCCAACAAT	325	60°
	Amelx 45R	TCCATTAATGTCTGCATGTG		
Exón 6	Amelx 6F	AAGGCCACCGGTATGTAGAC	775	60°
	Amelx 6R	ACTCTGGGGCCTATTTTGCT		
Exón 7	Amelx 7F	AGCCTGACATGCAAGACGTAC	523	58°
	Amelx 7R	TTGATTGCCAGTGTGGTGTGAA		

f) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones de amplificación se realizaron usando un termociclador Labnet Multigene Gradient en las condiciones descritas a continuación: las muestras fueron sometidas a un paso de desnaturalización inicial a 95° C por 5 min y posteriormente a 35 ciclos de desnaturalización a 95° C por 30 segundos; alineamiento a temperatura variable según pareja de partidores por 30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto, con un paso de extensión final a 72° C por 10 min. Dependiendo de los resultados, en determinados casos se evaluó la necesidad de optimizar las condiciones de alineamiento y en algunos casos la concentración de DNA molde o de los partidores. La reacción fue diseñada para un volumen final de 15µl que contenían: tampón PCR 10X pH 8,4 (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3); MgCl₂; colorante; agua miliQ; 0,2 mM de una mezcla equimolar de los cuatro desoxirribonucleótidos (Invitrogen®), 1µM de cada partidor, 0,2 unidades de enzima Accuzyme™ DNA Polymerase de la marca BIOLINE.

g) Electroforesis de ADN. La técnica de electroforesis de ADN en geles de agarosa se realizó según Sambrook & Russel, 2001. 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 de 0,5 µg/ml y llevada a ebullición. Las muestras de ADN fueron cargadas en el gel. El voltaje de corrida fluctuó entre 60 Volts durante 30-60min luego a 80 volts por 60min. Posteriormente, se observaron los geles en un transiluminador UV a una longitud de onda de 302 nm y se digitalizaron mediante el programa computacional Molecular Imaging de la empresa Carestream. Para determinar el tamaño molecular de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, se utilizó el marcador de tamaño molecular 50 bp plus (Bioline®).

h) Purificación de productos PCR y cuantificación. La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el uso del paquete comercial de purificación FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen BiotechCorp.), según las condiciones descritas en el boletín técnico proporcionado por el fabricante. De

acuerdo al protocolo, a partir de una corrida electroforética se rescataron bandas del gel de agarosa correspondientes a cada amplificado. Estos bloques de agarosa se colocaron en diferentes tubos de forma que cada uno tenía una cantidad máxima de 300 mg de gel. Luego se agregó a cada tubo 500 ul de tampón FADH y se mezcló en vórtex. Se incubaron los tubos a 55°C por 10-15 minutos y se agitaron suavemente en vórtex cada 2-3 minutos hasta que se disolviera la agarosa. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se tomaron 800 ul de la muestra y se transfirieron a columnas FADH. Se centrifugaron por 30 segundos descartando el sobrenadante. Posteriormente, se agregó 750 ul de Tampón Wash a las columnas y se centrifugó por 30 segundos eliminando al final del proceso el sobrenadante. Luego, se centrifugó por 3 minutos adicionales, nuevamente eliminando el sobrenadante. Las columnas FADH se dispusieron en nuevos tubos, se agregó 40 ul de tampón de elución y se dejó 2 minutos en reposo. Finalmente, se centrifugaron las muestras por 2 minutos y se almacenaron. Para comprobar el rendimiento del proceso se tomó una alícuota de la muestra, la que fue chequeada mediante electroforesis en gel de agarosa. La cuantificación de las muestras se realizó mediante transiluminación UV del gel de agarosa y comparación con estándar de tamaño molecular.

i) Secuenciación de productos PCR. Muestras de los productos de PCR purificados fueron enviados a la empresa MacroGen de Korea para ser secuenciados directamente en ambas direcciones, utilizando los partidores con los que fueron amplificados.

j) Análisis bioinformático de secuencias. Las secuencias obtenidas, fueron comparadas con la secuencia de referencia del gen *AMELX* (NM_012090.1) usando el programa computacional Vector NTI versión 10.0 (Invitrogen, Informax). Esta secuencia de referencia fue obtenida desde la base de datos de secuencias de nucleótidos (Entrez Nucleotide) del NCBI National Center for Biotechnology Information, disponible en el sitio web:

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nuccore&cmd=search&term=>].

Paralelamente, se recopiló la lista de polimorfismos de nucleótido único (SNP) del gen *AMELX* en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Se clasificaron las variantes de acuerdo a su ubicación genómica y consecuencia funcional. Los SNP's agrupados como variantes *missense* fueron analizados *in silico* con los programas computacionales PolyPhen v2.0 y PANTHER para predecir su consecuencia funcional y luego detectar la presencia/ausencia de éstas en la secuencia del probando. Asimismo, si el estudio detectaba nuevas variantes de secuencia (*missense, nonsense, frameshifts*) éstas deberían ser analizadas usando los mismos programas. Aquellas variantes que se detecten en zonas de procesamiento en límites exón-intrón, deberían ser analizadas *in silico* mediante el programa Human Splice Finder. Las variantes de secuencia que se encuentren en la región promotora del gen serían analizadas *in silico* mediante el programa bioinformático con disponibilidad *on-line* en Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP).

6. RESULTADOS:

6.1.- Análisis clínico, genealógico y radiográfico de la familia en estudio.

6.1.1 Análisis clínico y genealógico

El diagnóstico clínico de la familia en estudio fue realizado por las Odontólogas Dra. Sandra Gutiérrez y Dra. Patricia Méndez, de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia. De acuerdo a los datos proporcionados por estas profesionales, se trataría de un caso de Amelogénesis Imperfecta de tipo hipoplásica/hipomadura, con probable patrón de herencia ligado al cromosoma X.

La historia clínica del probando detallaba lo siguiente:

Paciente sexo femenino de 9 años 9 meses de edad.

Motivo de consulta: Padre refiere "por amelogenesis y remisión de ortodoncista".

Historia de enfermedad actual: Paciente acude a consulta de Odontopediatría, con remisión para valoración y tratamiento por ortodoncista. Padre refiere que madre y tía materna presentan la misma alteración que la niña. Paciente refiere sensibilidad en molares superiores e inferiores desde que realizaron erupción, no ha recibido tratamiento alguno.

Antecedentes médicos personales y familiares: Embarazo y parto normal.

Presenta miopía corregida con gafas. Madre y tía materna presentan amelogenesis imperfecta, no hay diagnóstico genético. Nadie más en la familia con antecedentes de AI.

Lactancia: dos meses

Mamadera: 5 años

Chupete: 5 años.

Succión digital hasta los 7 años. Usó aparato por 3-4 meses

Presenta succión labial superior e inferior y onicofagia.

Crema dental: para niños hasta los 6 años, después crema para adultos.

Enjuague: Reach niños hasta los 3-4 años, actualmente Listerine ocasionalmente.

En el examen clínico de la paciente se describe: Clase I Molar izquierda, clase II Molar derecho. Mordida cruzada post Bilateral.

ODONTOGRAMA:

1.6 Destrucción coronal

5.5 Obturación Oclusal, Caries palatina.

5.4 Ausente

5.3 Desgaste

1.2 Fractura Disto vestibular

1.1, 2.2, 6.3, 7.5, 3.1, 8.5, Sano

2.1 Opacidad Vestibular, Hipoplasia de esmalte IVP

6.4 Ausente

6.5 Caries Oclusal

2.6 Opacidad demarcada ocluso vestibular, caries palatina

3.6 Hipoplasia coronal

3.3 erupcionando

3.4 erupcionando

3.2 Opacidad demarcada

4.1,4.2 Opacidad demarcada

4.6 Sellante Oclusal, Hipoplasia vestibular

Además del examen clínico, se realizó la genealogía de la familia. En la **figura 2** se observa que en las generaciones I y II no hay sujetos afectados y que en la generación III aparece por primera vez una mujer afectada, quien se une consanguíneamente con su primo, el sujeto III.1. La falta de antecedentes de la enfermedad en las generaciones I y II hace sospechar que la primera mutación se produjo en la mujer III.2 o en la línea germinal de alguno de sus padres, quienes no se encuentran afectados. El sujeto III.2 transmite el rasgo a dos de sus tres hijas (sujetos IV:1 y IV:3) y una de éstas (sujeto IV.1) se lo transmite a su única hija, sujeto V.1, probando de este estudio. La genealogía es compatible con un patrón de herencia ligado al cromosoma X dominante y dado que el fenotipo clínico es

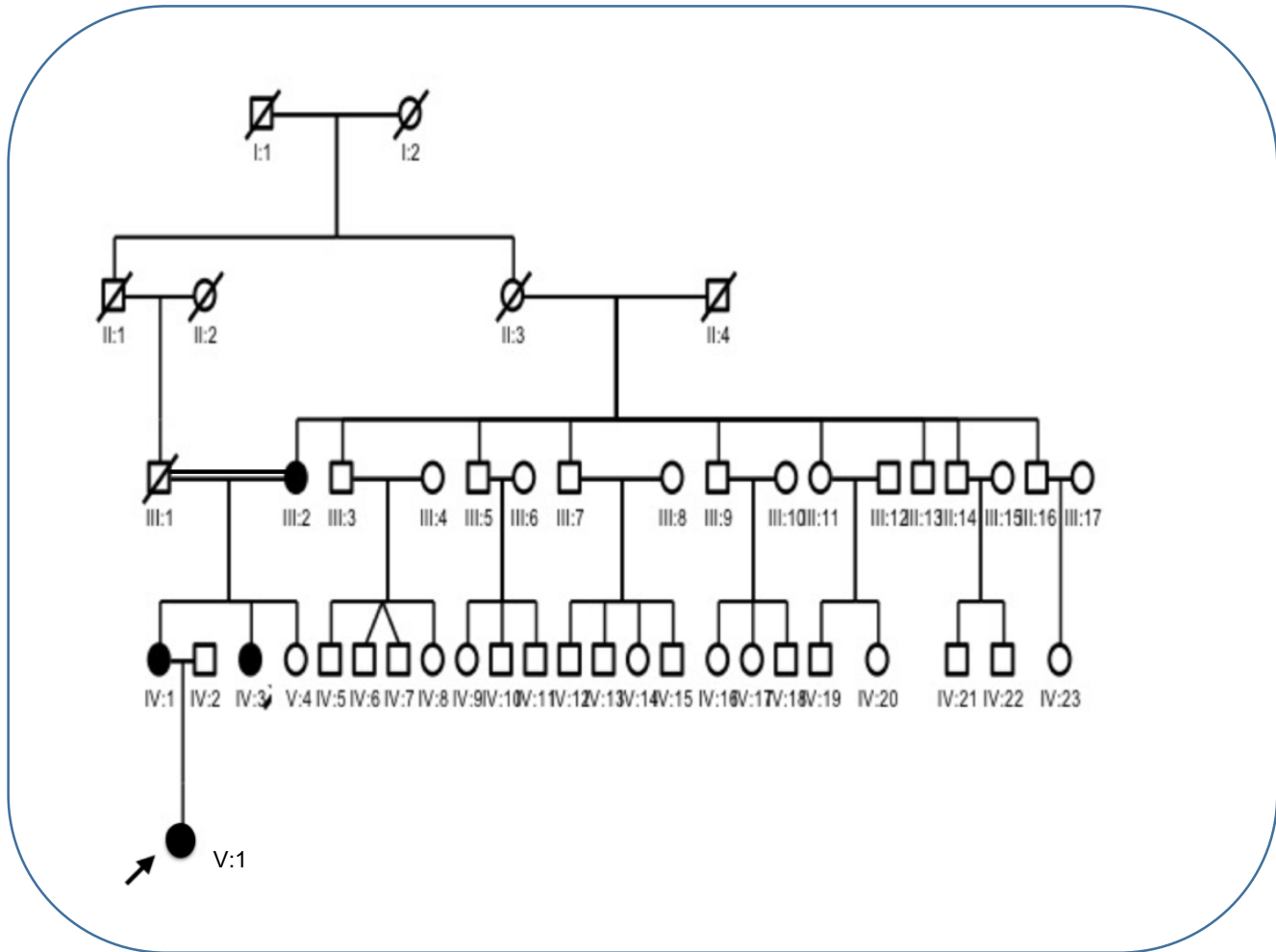


Figura 2. Genealogía de la familia en estudio.

hipoplasia e hipomaduración del esmalte, se decide analizar el gen amelogenina. Sin embargo, no se puede descartar un patrón de herencia autosómico dominante.

6.1.2 Análisis radiográfico

El estudio radiográfico cuenta con radiografía panorámica y radiografías retroalveolares periapicales. En la **Figura 3**, se observa la radiografía panorámica del probando en que se puede observar que el paciente se encuentra en dentición mixta 2º fase, sin agenesias en grupos incisivo, canino, premolar, 1º molares y 2º molares. Los terceros molares superiores se encuentran en estado de calcificación cuspídea compatible con etapa 3 de Nolla. Los terceros molares inferiores no se observan en desarrollo ni estado de cripta. No se observan alteraciones de posición dentaria, tampoco anomalías en los huesos maxilares. Las articulaciones tèmporo-mandibulares se observan simétricas.

Por otra parte, en las radiografías retroalveolares periapicales, mostradas en las **Figuras 4a y 4b**, se observa dentición mixta 2º fase. En maxilar pueden observarse las siguientes alteraciones: en diente 1.6 amplia área de menor radiopacidad que abarca caras mesiales y oclusales y que se extiende hasta dentina profunda; en diente 1.2 se observa zona radiolúcida mesial hasta dentina media. El diente 1.1 presenta alteración del contorno en cara mesial y distal, en mitad externa del esmalte. Diente 2.1 presenta zona radiolúcida de forma redondeada en ángulo disto incisal con profundidad hasta dentina superficial. En mandíbula, en la pieza 3.6 se observa área de menor radiopacidad que abarca caras mesial y oclusal, con profundidad dentinaria superficial. No se observan otras alteraciones en el grosor del esmalte o en la radiopacidad de éste en relación a la dentina.

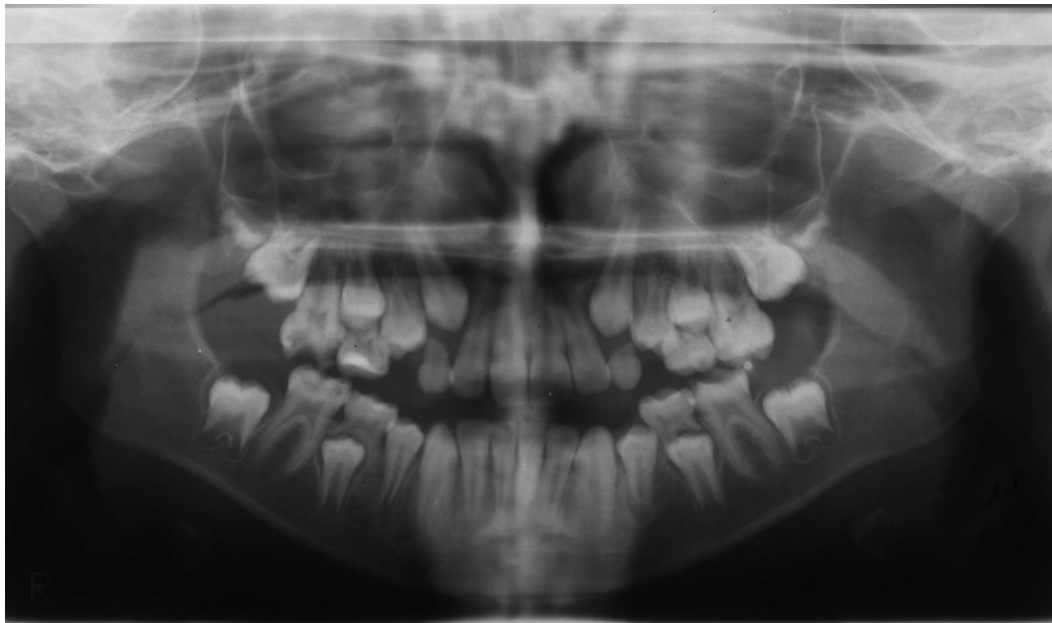


Figura 3. Radiografía panorámica del probando F10-4. Paciente en dentición mixta 2º fase.

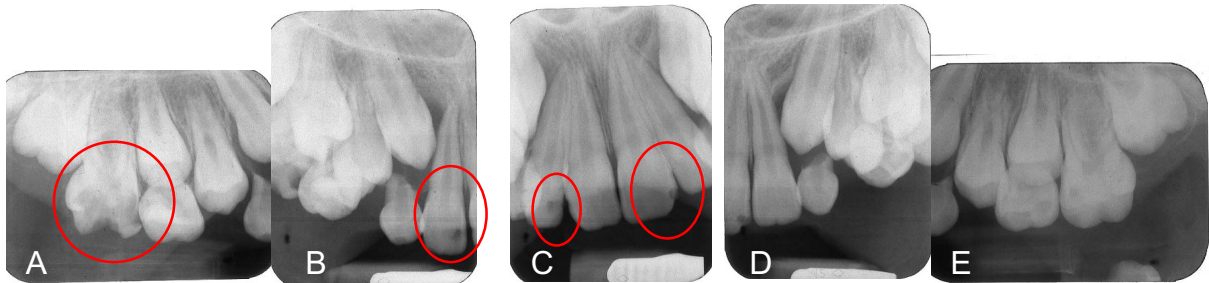


Figura 4a. Radiografías retroalveolares periapicales maxilares del probando F10-4. Encerradas en rojo, se circunscriben los principales hallazgos radiográficos en que se detectan cambios importantes en la radiopacidad de los tejidos dentarios, compatibles con alteraciones en la estructura.

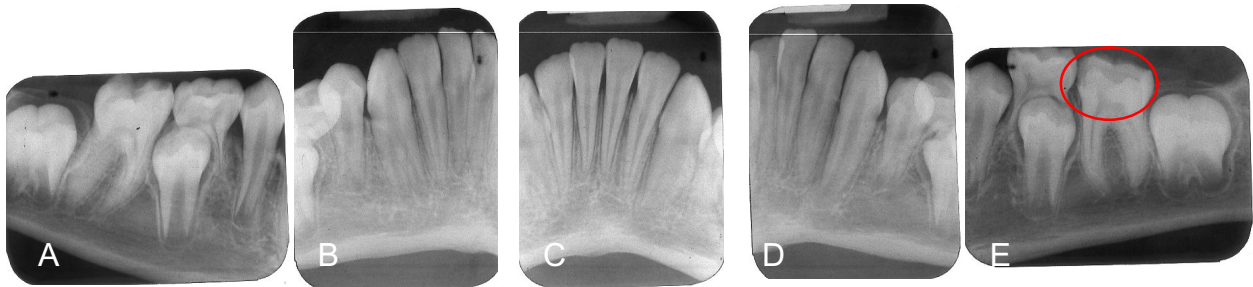


Figura 4b. Radiografías retroalveolares periapicales mandibulares del probando F10-4. En E se observa principal alteración en la radiopacidad detectada en las radiografías mandibulares.

6.2 ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR

6.2.1 Obtención de ADN del probando y del sujeto control

El ADN del sujeto control se obtuvo a partir de sangre periférica de la forma descrita en la sección materiales y métodos. El ADN del probando F10-4 fue aportado por la Odontóloga Dra. Sandra Gutiérrez, de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia. Por la cantidad limitada de ADN y la evidente dificultad de obtener nuevas muestras de ser necesario, se realizó una amplificación de éste utilizando el kit de amplificación Genomiphi, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras esto se obtuvo una concentración de 200 ng/uL de amplificado. Para las reacciones en cadena de la polimerasa se utilizó una dilución 1:10 del amplificado.

6.2.2 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, en las **Figuras 5 y 6** se muestran geles de agarosa representativos del proceso de amplificación del gen amelogenina realizado con ADNg del probando de la familia y el control respectivamente, utilizando los partidores descritos en la **Tabla 2**. En dichas figuras se muestran los fragmentos ya purificados, con el método anteriormente descrito en la sección de materiales y métodos (Letra H). En ambas figuras, los fragmentos amplificados de 595 y 558 pb corresponden a las parejas AMELXP1 y AMELXP2b respectivamente, los que forman parte de las parejas utilizadas para amplificar el promotor del gen amelogenina. La región codificante completa del gen amelogenina se encuentra en los exones 1 al 7. En las figuras 5 y 6 se muestra parte de la región codificante del gen, representada por los exones 1 (600 pb), exón 2 (719 pb) y exón 3 (575 pb),

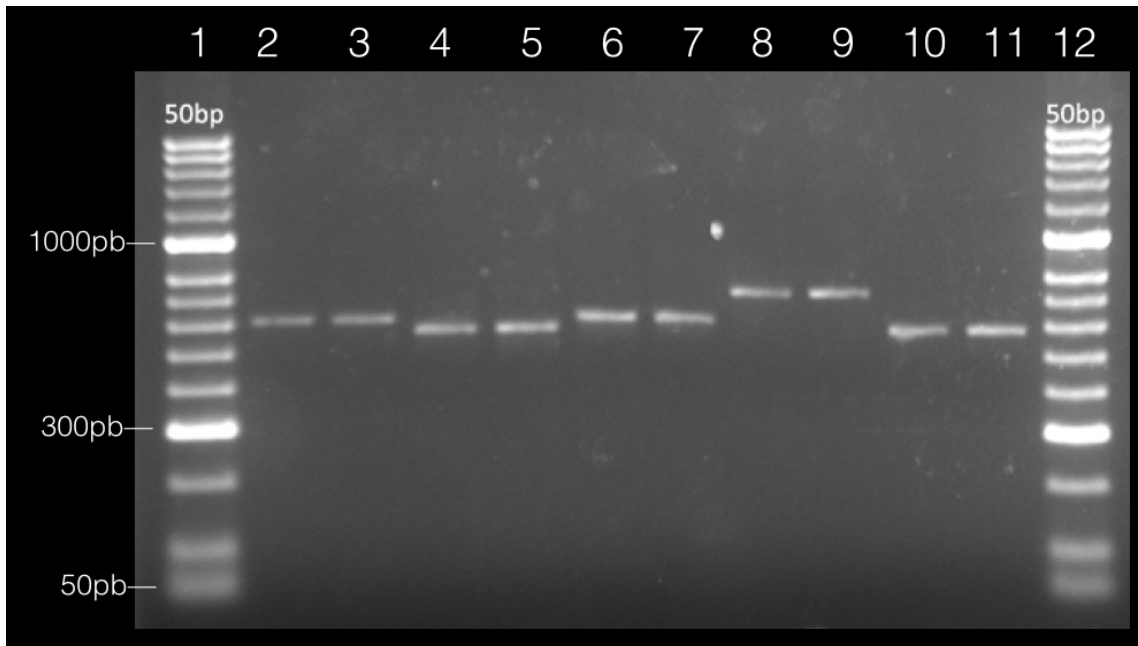


Figura 5. Gel agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra resultados representativos del proceso de purificación de fragmentos exónicos con el paquete FavorPrep GEL/PCR™. Los purificados se obtuvieron a partir del corte de bandas de agarosa de los amplificados utilizando el ADN amplificado con el paquete Genomiphi™ del probando. Carriles 1 y 12: 5 uL de marcador de tamaño molecular 50 bp plus (Bioline®), respectivamente; Carriles 2 y 3: 2 uL de muestra del fragmento AMELXP1 de 595 pb, respectivamente; Carriles 4 y 5: 2 uL de muestra del fragmento AMELXP2b de 558 pb, respectivamente; Carriles 6 y 7: 2 uL de muestra del fragmento AMELX1 (exón 1) de 600 pb, respectivamente; Carriles 8 y 9: 2 uL de muestra del fragmento AMELX2 (exón 2) de 719 pb, respectivamente; Carriles 10 y 11: 2uL de muestra del fragmento AMELX3 (exón 3) de 575 pb, respectivamente.

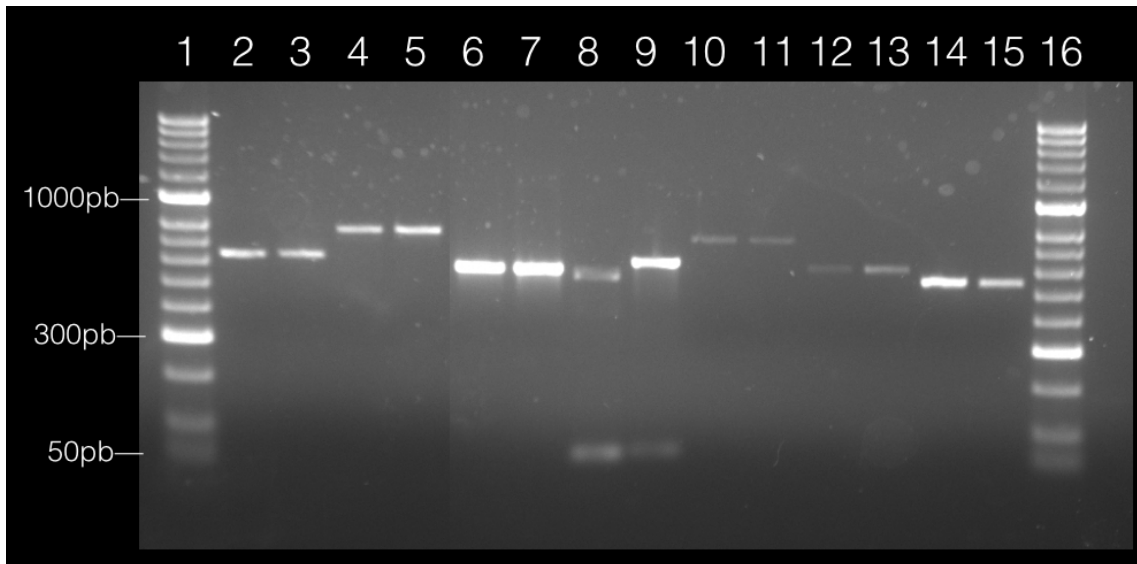


Figura 6. Gel agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra resultados representativos del proceso de purificación de fragmentos exónicos con el paquete FavorPrep GEL/PCR™. Los purificados se obtuvieron a partir del corte de bandas de agarosa de los amplificadores utilizando el ADN de extracción directa del sujeto control. Carriles 1 y 16: carga de 5uL de marcador de tamaño molecular 50 bp plus (Bioline®), respectivamente; Carriles 2 y 3: 2uL de muestra de purificado del fragmento AMELXP1, de 595 pb, respectivamente; Carriles 4 y 5: 2uL de muestra de purificado del fragmento AMELXP2a de 736 pb, respectivamente; Carriles 6 y 7: 2uL de muestra de purificado del fragmento AMELXP2b de 558 pb, respectivamente; Carril 8: producto PCR del fragmento AMELXP3 de 533 pb, respectivamente; Carril 9: 2uL de muestra de PCR del fragmento AMELX1 (exón 1) de 600 pb, respectivamente; Carriles 10 y 11: 2uL de muestra de purificado del fragmento AMELX2 (exón 2) de 719 pb, respectivamente; Carriles 12 y 13: 2uL de muestra de purificado del fragmento AMELX3 (exón 3) de 575 pb, respectivamente; Carriles 14 y 15: 2uL de muestra de purificado del fragmento AMELX7 (exón 7) de 523 pb, respectivamente.

que se amplifican con las parejas de partidores AMELX1, AMELX2 y AMELX3 respectivamente (Tabla 2).

A este nivel de resolución, los tamaños de los fragmentos producidos a partir del ADNg 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.

La intensidad de las bandas revelan un adecuado resultado del proceso de purificación, con el cual se obtuvo una concentración y rendimiento promedio de aproximadamente 30 ng/ul, los que fueron disponibles para la posterior reacción de secuenciación.

Así mismo se puede comprobar que no existe una diferencias entre el procedimiento realizado con ADN genómico original y el realizado con el ADN amplificado mediante el paquete comercial GenomiPhiTM.

6.2.3- Análisis mutacional de la región codificante y no codificante (Promotor/intrones) del gen amelogenina.

El análisis de la secuencia de todos los fragmentos del gen amelogenina usando el ADNg amplificado del paciente F10-4, probando del estudio y de un sujeto control sano, 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 veintiuna mutaciones reportadas previamente en la literatura para el gen *AMELX* (Tabla 1). A modo de ejemplo, en la **Figura 7** se incluyen dos cromatogramas de secuenciación de ambas hebras del ADNg de la paciente F10-4 que muestran parte de la región correspondiente al exón 2 (**figura 7a**), donde se ha descrito la mutación g.6390_98del y parte de la secuencia del exón 5 (**figura 7b**) donde se han reportado las mutaciones g.9834C>T, g.9834delC y g.9834C>G en la misma posición. En ambos esquemas se puede apreciar que no hay cambio de bases en las posiciones antes señaladas, encerradas en un

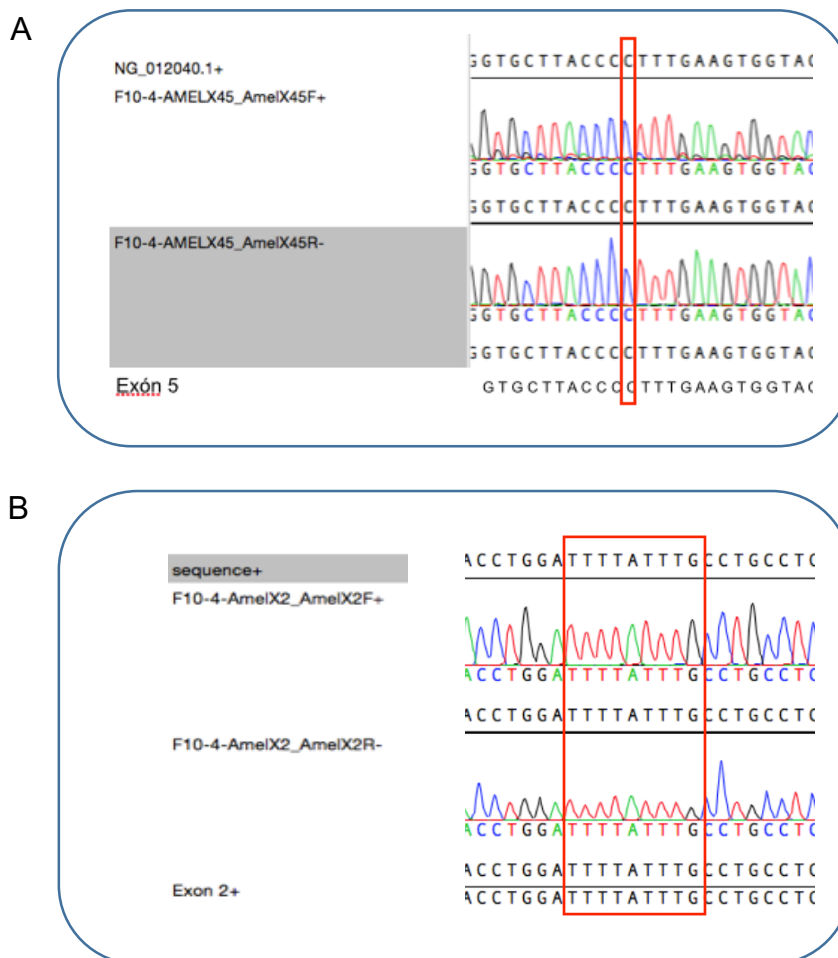


Figura 7. Sección de cromatogramas de secuenciación de ambas hebras del ADN_g del probando F10-4, ambas comparadas con la secuencia consenso NG_012040.1. **A.** Secuencia parcial del exón 5 amplificado con la pareja de partidores AMELX45 F y R. Encerrado en el rectángulo rojo se muestra ubicación en que se han reportado 3 mutaciones g.9834delC (Aldred y cols., 1992), g.9834C>G (Kida y cols., 2007) y g.9834C>T (Prasad y cols., 2016); **B.** Secuencia parcial del exón 2 amplificado con la pareja de partidores AMELX2 F y R. Encerrado en el rectángulo rojo se muestra la ubicación en que se ha reportado la mutación g.6390_98del (Lagerström y cols., 1995).

rectángulo en la **figura 7**, lo cual indica que este paciente no presenta dichas mutaciones en el gen *AMELX*.

a) Análisis de variantes de la región codificante del gen amelogenina.

El análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNP) se realizó recopilando los datos desde la página web de Centro Nacional de Información de Biotecnología. Se tabularon y se ordenaron los SNP's por su ubicación, separando aquellos ubicados en regiones codificantes y no codificantes. En la **tabla 3** se muestra un resumen de los SNPs reportados, ordenados por su posición en zonas codificantes y no codificante y se detalla su clasificación funcional. La búsqueda arrojó un total de 480 SNPs, de ellos, 377 se localizaron en regiones no codificantes y 103 en zonas codificantes. La mayoría de los SNPs que se encuentran en regiones no codificantes corresponden a variantes intrónicas con un total de 261, seguidas por las variantes en el extremo 5' cercano al gen. En menor cantidad se reportan variantes en las regiones no traducidas tanto 5' como 3' (UTR5' y UTR3'). Por otra parte, las variantes en regiones codificantes corresponden en su mayoría a cambios de tipo *missense*.

Las variantes estudiadas fueron clasificadas, como se muestra en la **tabla 4**, por su ubicación y se determinó su posición en el ADN_g según la secuencia de referencia utilizada (NG_012040.1), también el cambio en la proteína en el caso que corresponda. De todas estas variantes se seleccionaron aquellas *missense* para ser analizadas en programas bioinformáticos con disponibilidad en línea como: PolyPhen y PANTHER. En la **tabla 5** se muestran las variantes estudiadas con sus respectivos resultados. Se analizó un total de 61 variantes *missense*, 44 se ubicaron en el exón 6 mientras que en el exón 1 y 7, que corresponden mayoritariamente a regiones no traducidas, no se encontraron variantes. El análisis arrojó resultados para 60 variantes en el caso de Polyphen. Con PANTHER se obtuvo resultado con 58 de las variantes. Del total, 28 de estas variantes se clasificaron como probablemente dañinas por el programa Polyphen, mientras que PANTHER clasificó sólo a 10 de ellas dentro de la misma categoría. Si bien, ambos programas

Tabla 3. Clasificación de variantes de nucleótido único (SNP). Se muestra cantidad de SNP reportados en la base de datos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) agrupados según se encuentran en región codificante o no codificante del gen *AMELX*, con su respectiva subclasificación funcional.

Tipo de SNP	Clasificación funcional	SNPs
		<i>AMELX</i>
No codificante	UTR-3'	12
	UTR-5'	1
	Cercano al gen 3'	23
	Cercano al gen 5'	77
	Intrónico	261
	Variante en sitio aceptador de procesamiento	3
	Total	377
Codificante	Sinónimo	37
	<i>Frameshift</i>	4
	<i>Missense</i>	61
	<i>Nonsense</i>	1
	Total	103
Total SNP		480

Tabla 4. Listado del total de SNPs reportados en base de datos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) en los diferentes exones del gen *AMELX*. Se detalla ubicación, número rs, cambio en ADNg según secuencia de referencia (NG_012040.1), significado funcional y clínico. Aquellos SNP's reportados como patogénicos se encuentran marcados en la última columna de la tabla. Además, en la tabla se incluyeron aquellos SNP's ubicados en el exón 7, pero que corresponden a la región no traducida.

Ubicación y N°	SNP	Cambio en DNAG y proteína	Significado funcional	Significado clínico
EXÓN 2	1 rs104894737	g.6378T>C, p.Met1Thr	Missense	Patogénica
	2 rs104894738	g.6387G>C, p.Trp4Ser	Missense	Patogénica
	3 rs387906488	g.6390_6398delTTTTATTG,p.Ile5_Ala8delinsThr	Indel	Patogénica
	4 rs751652555	g.6411G>A, p.Gly12Glu	Missense	
	5 rs753863554	g.6384C>A, p.Thr3Asn	Missense	
	6 rs755158864	g.6426T>C, p.Met17Thr	Missense	
	7 rs757235287	g.6394A>G, p.Leu6	Synonymous codon	
	8 rs764153884	g.6370T>C	UTR variant 5'	
	9 rs780336512	g.6406C>G, p.Leu10	Synonymous codon	
EXÓN 3	1 rs145299463	g.8390T>G	Synonymous codon	
	2 rs745846151	g.8408C>G, p.Ser32Arg	Missense	
	3 rs776498485	g.8373C>T, p.Pro21Ser	Missense	
	4 rs776551701	g.8383G>T, p.Gly24Val	Missense	
	5 rs867269105	g.8399C>T, p.Ile29	Synonymous codon	
EXÓN 4	1 rs746714110	g.9713A>G, p.Asn42Ser	Missense	
	2 rs867528957	g.9725C>T, p.Thr46Ile	Missense	
EXÓN 5	1 rs104894733	g.9831C>T,, p.Thr51Ile	Missense	Patogénica
	2 rs387906487	g.9834delC, p.Pro52Leufs	Frameshift variant	Patogénica
	3 rs431825176	g.9850G>C, p.Gln57His	Missense	
	4 rs431825177	g.9852G>A, p.Ser58Asn	Missense	
	5 rs431825178	g.9853C>A, p.Ser58Arg	Missense	
	6 rs144955572	g.9864C>T, p.Pro62Leu	Missense	
	7 rs149068672	g.9865G>A, p.Pro62	Synonymous codon	
	8 rs758813809	g.9860C>T, p.Pro61Ser	Missense	
	9 rs765738846	g.9844G>C, p.Trp55Cys	Missense	
EXÓN 6	1 rs104894734	g.10520G>A, p.Glu191Ter	Stop Gained, missense	Patogénica
	2 rs104894736	g.10157C>A, p.Pro70Thr	Missense	Patogénica
	3 rs387906489	g.10422delC, p.Pro158Hisfs	Frameshift variant	Patogénica
	4 rs387906490	g.10490delC, p.Leu181Cysfs	Frameshift variant	Patogénica
	5 rs387906491	g.10369delC, p.Tyr141Thrfs	Frameshift variant	Patogénica
	6 rs2106416	g.10210C>T, p.His87	Synonymous codon	
	7 rs6639060	g.10445C>T, p.Leu166	Synonymous codon	
	8 rs138249749	g.10427G>T, p.Val160Leu,	Missense	
	9 rs139757230	g.10530C>A, p.Pro194Gln	Missense	
	10 rs142884100	g.10216G>A, p.Pro89	Synonymous codon	
11 rs143860203	g.10465G>A, p.Leu172	Synonymous codon		
12 rs147013110	g.10357C>T, p.Pro136	Synonymous codon		
13 rs148259441	g.10215C>T, p.Pro89Leu	Missense		
14 rs150631365	g.10498C>T, p.Pro183	Synonymous codon		
15 rs200101076	g.10360C>T, p.Ala137	Synonymous codon		
16 rs200842202	g.10297C>T, p.Pro116	Synonymous codon		
17 rs201127558	g.10450G>A, p.Pro167	Synonymous codon		
18 rs367556910	g.10298G>A, p.Val117Ile	Missense		
19 rs368149347	g.10153C>T, p.Tyr68	Synonymous codon		
20 rs371530769	g.10193G>A, p.Val82Met	Missense		

Tabla 4.(continuación)

Ubicación y N°	SNP	Cambio en DNAG y proteína	Significado funcional	Significado clínico	
	21	rs372332800	g.10448C>A, p.Pro167Thr	Missense	
	22	rs373800800	g.10271G>A, p.Val108Met	Missense	
	23	rs374272157	g.10140C>T, p.Pro64Leu	Missense	
	24	rs745822682	g.10335A>C, p.His129Pro,	Missense	
	25	rs748166713	g.10355C>T, p.Pro136Ser	Missense	
	26	rs748301023	g.10462T>C, p.Pro171	Synonymous codon	
	27	rs749154172	g.10324A>T, p.Pro125	Synonymous codon	
	28	rs749213434	g.10209A>C, p.His87Pro,	Missense	
	29	rs749486136	g.10471G>A, p.Pro174	Synonymous codon	
	30	rs750270295	g.10553G>A, p.Glu202Lys,	Missense	
	31	rs750746199	g.10163G>A, p.Gly72Ser,	Missense	
	32	rs751135700	g.10178C>G, p.His77Asp	Missense	
	33	rs752151612	g.10289A>G, p.Met114Val	Missense	
	34	rs752308034	g.10396G>A, p.Gln149	Synonymous codon	
	35	rs753327781	g.10534A>G, p.Ser195	Synonymous codon	
	36	rs753460403	g.10410T>G, p.Met154Arg	Missense	
	37	rs754022687	g.10154G>A, p.Glu69Lys	Missense	
	38	rs755554117	g.10402C>T, p.His151	Synonymous codon	
	39	rs755797941	g.10309A>G, p.Gln120	Synonymous codon	
	40	rs756968232	g.10327C>A, p.Ile126	Synonymous codon	
	41	rs758160581	g.10556G>C, p.Glu203Gln	Missense	
	42	rs758391877	g.10449C>T, p.Pro167Leu	Missense	
	43	rs758945581	g.10172C>G, p.Leu75Val	Missense	
	44	rs759964053	g.10487C>T, p.Pro180Ser,	Missense	
EXÓN 6	45	rs760125073	g.10393A>C,p.Pro148,	Synonymous codon	
	46	rs760145611	g.10378C>A, p.Pro143	Synonymous codon	
	47	rs760321133	g.10334C>T, p.His129Tyr	Missense	
	48	rs760691566	g.10146A>G, p.Tyr66Cys	Missense	
	49	rs761524591	g.10539A>G, p.Asp197Gly	Missense	
	50	rs761996476	g.10161T>C, p.Met71Thr	Missense	
	51	rs762158191	g.10261T>A, p.Ala104	Synonymous codon	
	52	rs763177333	g.10283C>A	Missense	
	53	rs763844854	g.10406C>G, p.Pro153Ala	Missense	
	54	rs764860638	g.10550C>T, p.Arg201Trp,	Missense	
	55	rs765306052	g.10270C>T, p.Pro107,	Synonymous codon	
	56	rs765687165	g.10162G>A, p.Met71Ile	Missense	
57	rs766873495	g.10369C>T, p.Pro140,	Synonymous codon		
58	rs766939481	g.10285A>G, p.Gln112	Synonymous codon		
59	rs768133135	g.10395A>C, p.Gln149Pro,	Missense		
60	rs768186118	g.10497C>A, p.Pro183His	Missense		
61	rs768768651	g.10224C>A, p.Thr92Asn	Missense		
62	rs771211286	g.10477C>G, p.Phe176Leu	Missense		
63	rs771775925	g.10225C>G, p.Thr92	Synonymous codon		
64	rs771933695	g.10353C>T, p.Pro135Leu	Missense		
65	rs773277711	g.10358G>A, p.Ala137Thr	Missense		
66	rs773295163	g.10470C>T, p.Pro174Leu	Missense		

Tabla 4.(continuación)

Ubicación y N°	SNP	Cambio en DNAg y proteína	Significado funcional	Significado clínico	
	67	rs774798326	g.10371A>C, p.Tyr141Ser	Missense	
	68	rs774922647	g.10486G>A, p.Gln179	Synonymous codon	
	69	rs775826448	g.10508G>C, p.Asp187His	Missense	
	70	rs776675035	g.10246C>T, p.Ile99	Synonymous codon	
	71	rs776762719	g.10354G>A, p.Pro135	Synonymous codon	
	72	rs777235911	g.10315C>T, p.Ser122	Synonymous codon	
	73	rs778441921	g.10213C>T, p.Pro88	Synonymous codon	
	74	rs778689286	g.10432C>A, p.His161Gln	Missense	
	75	rs779785692	g.10561G>C, p.Val204	Synonymous codon	
	76	rs780365505	g.10173T>C, p.Leu75Pro	Missense	
	77	rs780818544	g.10207G>A, p.Gln86	Synonymous codon	
	78	rs866360000	g.10232C>T, p.Pro95Ser	Missense	
79	rs866651139	g.10332A>C, p.His128Pro	Missense		
EXÓN 7	1	rs188715671	g.12340T>C	UTR variant 3'	
	2	rs200715488	g.12238G>A	UTR variant 3'	
	3	rs369247345	g.12239C>T	UTR variant 3'	
	4	rs372488657	g.12214G>A	UTR variant 3'	
	5	rs373589740	g.12254C>A	UTR variant 3'	
	6	rs750108771	g.12213T>A,	UTR variant 3'	
	7	rs751302355	g.12218G>A	UTR variant 3'	
	8	rs754937993	g.12225G>T	UTR variant 3'	
	9	rs775957398	g.12320T>A,	UTR variant 3'	
	10	rs781175862	g.12236A>G	UTR variant 3'	
	11	rs867629707	g.12220G>A	UTR variant 3'	
	12	rs868271285	g.12221G>A	UTR variant 3'	

Tabla 5. SNPs de tipo missense reportados en la base de datos NCBI analizados con los programas bioinformáticos Polyphen y PANTHER. Marcados en rojo se encuentran aquellos SNPs reportados como patogénicos. En las columnas de Polyphen y PANTHER se muestra el resultado del análisis y el puntaje asignado por cada programa, se asignan 3 categorías: en verde: benigno o probablemente benigno; en amarillo: posiblemente dañino; en rojo: probablemente dañino.

Nº	SNP	Cambio en DNA y proteína	Proteína	Ubicación		Predicción Polyphen	Predicción PANTHER		
1	rs104894733	g.9831C>T, p. Thr51Ile	T51I	Exón 5	Patogénica	PROBABLY DAMAGING	1.00	probably begin	176
2	rs104894736	g.10157C>A, p. Pro70Thr	P70T	Exón 6	Patogénica	PROBABLY DAMAGING	0.999	probably damaging	1368
3	rs104894737	g.6378T>C, p. Met1Thr	M1T	Exón 2	Patogénica	PROBABLY DAMAGING	0.994	possibly damaging	324
4	rs104894738	g.6387G>C, p. Trp4Ser	W4S	Exón 2	Patogénica	PROBABLY DAMAGING	1.000	probably begin	176
5	rs431825176	g.9850G>C, p. Gln57His	Q57H	Exón 5		PROBABLY DAMAGING	0.999	possibly damaging	324
6	rs431825177	g.9852G>A, p. Ser58Asn	S58N	Exón 5		BENIGN	0.000	probably begin	97
7	rs431825178	g.9853C>A, p. Ser58Arg	S58R	Exón 5		PROBABLY DAMAGING	0.983	probably begin	97
8	rs138249749	g.10427G>T, p. Val160Leu,	V160L	Exón 6		BENIGN	0.000	possibly damaging	324
9	rs139757230	g.10530C>A, p. Pro194Gln	P194Q	Exón 6		POSSIBLY DAMAGING	0.940	possibly damaging	324
10	rs144955572	g.9864C>T, p. Pro62Leu	P62L	Exón 5		PROBABLY DAMAGING	0.998	probably begin	176
11	rs148259441	g.10215C>T, p. Pro89Leu	P89L	Exón 6		BENIGN	0.139	possibly damaging	324
12	rs367556910	g.10298G>A, p. Val117Ile	V117I	Exón 6		BENIGN	0.003	possibly damaging	324
13	rs371530769	g.10193G>A, p. Val82Met	V82M	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	1.000	possibly damaging	324
14	rs372332800	g.10448C>A, p. Pro167Thr	P167T	Exón 6		BENIGN	0.062	possibly damaging	324
15	rs373800800	g.10271G>A, p. Val108Met	V108M	Exón 6		BENIGN	0.216	probably begin	176
16	rs374272157	g.10140C>T, p. Pro64Leu	P64L	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.996	probably damaging	1368
17	rs745822682	g.10335A>C, p. His129Pro,	H129P	Exón 6		POSSIBLY DAMAGING	0.899	possibly damaging	324
18	rs745846151	g.8408C>G, p. Ser32Arg	S32R	Exón 3		PROBABLY DAMAGING	1.000	probably damaging	1368
19	rs746714110	g.9713A>G, p. Asn42Ser	N42S	Exón 4		BENIGN	0.000	Cannot score substitution	
20	rs748166713	g.10355C>T, p. Pro136Ser	P136S	Exón 6		BENIGN	0.001	possibly damaging	324
21	rs749213434	g.10209A>C, p. His87Pro,	H87P	Exón 6		BENIGN	0.118	possibly damaging	324
22	rs750270295	g.10553G>A, p. Glu202Lys,	E202K	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.996	possibly damaging	324
23	rs750746199	g.10163G>A, p. Gly72Ser,	G72S	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.996	possibly damaging	324
24	rs751135700	g.10178C>G, p. His77Asp	H77D	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	1.000	possibly damaging	324
25	rs751652555	g.6411G>A, p. Gly12Glu	G12E	Exón 2		PROBABLY DAMAGING	1.000	probably begin	176
26	rs752151612	g.10289A>G, p. Met114Val	M114V	Exón 6		BENIGN	0.000	possibly damaging	324
27	rs753460403	g.10410T>G, p. Met154Arg	M154R	Exón 6		BENIGN	0.118	probably begin	97
28	rs753863554	g.6384C>A, p. Thr3Asn	T3N	Exón 2		PROBABLY DAMAGING	0.998	probably begin	176
29	rs754022687	g.10154G>A, p. Glu69Lys	E69K	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	1.000	possibly damaging	324
30	rs755158864	g.6426T>C, p. Met17Thr	M17T	Exón 2		PROBABLY DAMAGING	0.997	probably begin	176
31	rs758160581	g.10556G>C, p. Glu203Gln	E203Q	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.999	possibly damaging	324
32	rs758391877	g.10449C>T, p. Pro167Leu	P167L	Exón 6		BENIGN	0.005	possibly damaging	324
33	rs758813809	g.9860C>T, p. Pro61Ser	P61S	Exón 5		POSSIBLY DAMAGING	0.951	probably begin	91
34	rs758945581	g.10172C>G, p. Leu75Val	L75V	Exón 6		POSSIBLY DAMAGING	0.955	possibly damaging	324
35	rs759964053	g.10487C>T, p. Pro180Ser,	P180S	Exón 6		BENIGN	0.010	possibly damaging	324
36	rs760321133	g.10334C>T, p. His129Tyr	H129Y	Exón 6		POSSIBLY DAMAGING	0.557	possibly damaging	324
37	rs760691566	g.10146A>G, p. Tyr66Cys	Y66C	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	1.000	probably damaging	1368
38	rs761524591	g.10539A>G, p. Asp197Gly	D197G	Exón 6		BENIGN	0.004	possibly damaging	324
39	rs761996476	g.10161T>C, p. Met71Thr	M71T	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.997	probably damaging	1368
40	rs763177333	g.10283C>A	Q112K	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.996	possibly damaging	324
41	rs763844854	g.10406C>G, p. Pro153Ala	P153A	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.994	probably damaging	1368
42	rs764860638	g.10550C>T, p. Arg201Trp,	R201W	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	1.000	possibly damaging	324
43	rs765687165	g.10162G>A, p. Met71Ile	M71I	Exón 6		POSSIBLY DAMAGING	0.915	probably damaging	1368
44	rs765738846	g.9844G>C, p. Trp55Cys	W55C	Exón 5		PROBABLY DAMAGING	1.000	probably damaging	1368
45	rs768133135	g.10395A>C, p. Gln149Pro,	Q149P	Exón 6		BENIGN	0.004	probably begin	176
46	rs768186118	g.10497C>A, p. Pro183His	P183H	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.992	probably damaging	1368
47	rs768768651	g.10224C>A, p. Thr92Asn	T92N	Exón 6		BENIGN	0.062	probably begin	91
48	rs771211286	g.10477C>G, p. Phe176Leu	F176L	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	0.965	possibly damaging	324
49	rs771933695	g.10353C>T, p. Pro135Leu	P135L	Exón 6		BENIGN	0.000	probably begin	97
50	rs773277711	g.10358G>A, p. Ala137Thr	A137T	Exón 6		POSSIBLY DAMAGING	0.456	possibly damaging	324
51	rs773295163	g.10470C>T, p. Pro174Leu	P174L	Exón 6		BENIGN	0.350	probably damaging	1368
52	rs774798326	g.10371A>C, p. Tyr141Ser	Y141S	exón 6		BENIGN	0.118	probably begin	7
53	rs775826448	g.10508G>C, p. Asp187His	D187H	Exón 6		BENIGN	0.229	possibly damaging	324
54	rs776498485	g.8373C>T, p. Pro21Ser	P21S	Exón 3		POSSIBLY DAMAGING	0.811	possibly damaging	324
55	rs776551701	g.8383G>T, p. Gly24Val	G24V	Exón 3		PROBABLY DAMAGING	1.000	possibly damaging	324
56	rs778689286	g.10432C>A, p. His161Gln	H161Q	Exón 6		BENIGN	0.012	possibly damaging	324
57	rs780365505	g.10173T>C, p. Leu75Pro	L75P	Exón 6		PROBABLY DAMAGING	1.000	possibly damaging	324
58	rs866360000	g.10232C>T, p. Pro95Ser	P95S	Exón 6		POSSIBLY DAMAGING	0.713	possibly damaging	324
59	rs866651139	g.10332A>C, p. His128Pro	H128P	Exón 6		BENIGN	0.004	possibly damaging	324
60	rs867528957	g.9725C>T, p. Thr46Ile	T46I	Exón 4		BENIGN	0.122	Cannot score substitution	
61	rs104894734	g.10520G>A, p. Glu191Ter		Exón 6	Patogénica				

utilizan diferentes metodologías de análisis, los resultados fueron coincidentes en 22 casos, siendo 8 catalogadas como probablemente dañinas. De aquellas ocho variantes, se investigó sus respectivas MAF (datos no mostrados). Tres variantes reportan frecuencias de 0,001%, estas son: g.10146A>G, g.10161T>C, g.10497C>A, por lo que se analizó con más detención la presencia o ausencia de éstas en las secuencias analizadas. El resto de las variantes se distribuyeron en las categorías de benigno y posiblemente dañino.

Utilizando el conocimiento entregado por los resultados del análisis antes mencionado, se realizó la búsqueda de aquellas variantes catalogadas como probablemente dañinas en las secuencias del paciente y del sujeto control, utilizando el programa Vector NTI Express versión 1.6.0. La búsqueda no arrojó resultados que dieran cuenta de la presencia de alguna de las variantes señaladas. De igual forma se analizó la presencia del resto de las variantes. A modo de ejemplo en la **figura 8** se muestra un cromatograma representativo de la búsqueda de varios SNP's.

Finalmente se analizó el total de las variantes en el paciente y el control, no encontrándose la presencia de alguna de éstas. Asimismo, tampoco se detectó la presencia de alguna variante nueva, no reportada.

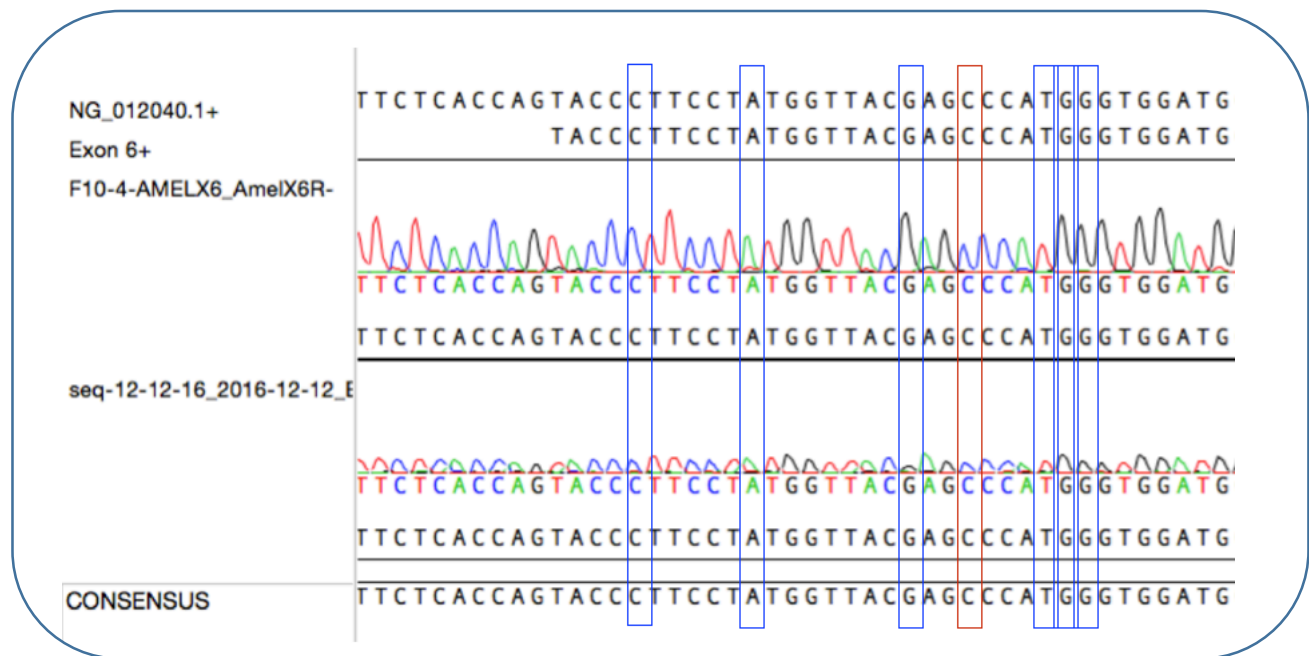


Figura 8. Sección de cromatogramas de secuenciación de ambas hebras del ADN_g del probando F10-4, correspondientes exón 6 amplificado con la pareja de partidores AMELX6 F y R, ambas hebras comparadas con la secuencia consenso NG_012040.1, Encerrados en rectángulos azules se encuentran los SNP's de tipo *missense* analizados con los programas bioinformáticos. En orden corresponden a: g.10140C>T, p.Pro64Leu; g.10146A>G, p.Tyr66Cys; g.10154G>A, p.Glu69Lys; g.10161T>C, p.Met71Thr; g.10162G>A, p.Met71Ile; g.10163G>A, p.Gly72Ser, en el rectángulo rojo se destaca la posición que tendría la mutación g.10157C>A, p.Pro70Thr (Collier y cols.,1997).

b) Análisis de variantes de la región no codificante del gen amelogenina.

b1) Análisis de variantes de la region promotora del gen amelogenina.

El promotor del gen amelogenina tiene una longitud de 1416 pb. Su amplificación se realizó utilizando 4 parejas de partidores: AMELX P1, AMELX P2a, AMELX P2ab, AMELX P2b y AMELX P3. El análisis de esta región consistió en la revisión de las variantes reportadas en la base de datos NCBI. Los datos fueron tabulados y los resultados fueron los siguientes: se encontraron un total de 77 variantes, 2 de ellas se correspondían con otras existentes también polimórficas. Del total de 75 variantes, 35 se encuentran dentro de la secuencia del promotor. Éstas fueron analizadas con el programa bioinformático con disponibilidad en línea Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP), programa que permite el análisis y búsqueda de secuencias promotoras en ADN eucarionte y procarionte, y que consistió en la búsqueda de elementos en la secuencia original y la contrastación con la secuencia en que se ingresó cada una de las variantes por separado. Se obtuvo resultado con las 35 variantes ingresadas, la información se encuentra resumida en la **tabla 6**. Treinta y dos de las variantes no tienen impacto sobre la función del promotor, mientras que sólo 3 tuvieron un impacto sobre elementos del promotor, pero con resultados benignos.

Se realizó el análisis de la secuencia promotora del gen amelogenina en el probando y en el sujeto control. Se apuntó a la búsqueda en primera instancia de las variantes reportadas y con algún grado de impacto según el análisis antes mencionado. En la **figura 9** se muestra un cromatograma representativo en que se destaca la posición en que debería encontrarse una variante reportada. Posteriormente, se realizó el análisis completo de la secuencia promotora en búsqueda de nuevas variantes. Finalmente no hubo diferencias entre la secuencia del promotor del probando ni del control con respecto a la secuencia de referencia NG_012040.1, descartándose la presencia de alguna variante antes reportada o alguna nueva.

Tabla 6. Variantes ubicadas en la secuencia promotora del gen amelogenina reportados en la base de datos NCBI. En la segunda columna se muestra el número rs de la variante en la base de datos. La tercera columna muestra el cambio en el ADN_g según la secuencia de referencia NG_012040.1. En la cuarta columna se presentan los resultados del análisis de cada una de las variantes mediante el uso del programa bioinformático Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP), disponible *on-line*.

N°	SNP	Cambio en DN _{Ag}	Análisis BDGP
1	rs755871234	g.3597A>T,	Sin impacto
2	rs371209107	g.3705G>C	Sin impacto
3	rs546491617	g.3717G>A	Creación de nuevo elemento promotor
4	rs749729180	g.3720T>C	Sin impacto
5	rs769158903	g.3726C>T	Creación de nuevo elemento promotor
6	rs774792121	g.3727G>A	Sin impacto
7	rs748638870	g.3738T>A,	Sin impacto
8	rs772586009	g.3802_3803delTG	Sin impacto
9	rs773210099	g.3824A>G	Sin impacto
10	rs760773555	g.3826C>T,	Sin impacto
11	rs183365414	g.3837A>G	Sin impacto
12	rs187878160	g.3859G>A	Sin impacto
13	rs368528630	g.3863G>T	Sin impacto
14	rs763879193	g.3877C>G	Sin impacto
15	rs5979394	g.3887C>A	Sin impacto
16	rs757162750	g.3943G>A	Sin impacto
17	rs929190	g.3972C>T	Sin impacto
18	rs764134574	g.4080C>G	Sin impacto
19	rs796613960	g.4127C>T	Sin impacto
20	rs753946904	g.4159T>C	Sin impacto
21	rs749967892	g.4165C>T	Alteración en elemento promotor
22	rs755674508	g.4228T>A	Sin impacto
23	rs779655130	g.4253A>G	Sin impacto
24	rs762165854	g.4281T>G	Sin impacto
25	rs12834615	g.4344A>C	Sin impacto
26	rs147768666	g.4368C>T	Sin impacto
27	rs200685008	g.4416T>G,	Sin impacto
28	rs750622449	g.4486C>T	Sin impacto
29	rs754639418	g.4554T>G	Sin impacto
30	rs779172647	g.4657T>C	Sin impacto
31	rs190979631	g.4677G>A	Sin impacto
32	rs772491184	g.4704G>A	Sin impacto
33	rs532010191	g.4817_4818insC,	Sin impacto
34	rs780400856	g.4866G>A	Sin impacto
35	rs201841630	g.4994G>A	Sin impacto

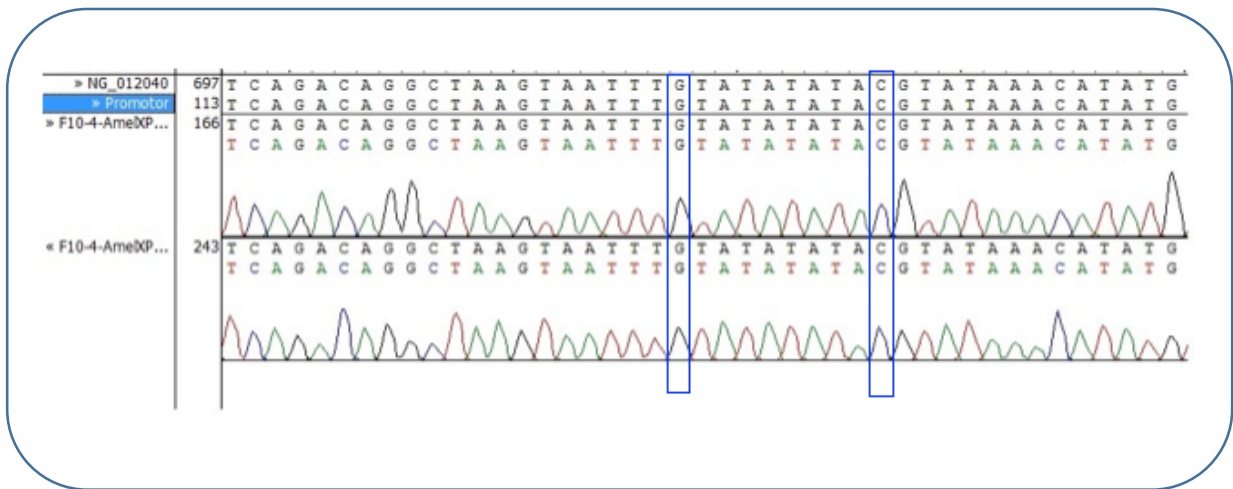


Figura 9. Sección de cromatogramas de secuenciación de ambas hebras del ADN_g del probando F10-4, correspondientes a parte del promotor del gen amelogenina amplificado con la pareja de partidores AMELXP1 F y R, ambas hebras comparadas con la secuencia consenso NG_012040.1, Encerrados en rectángulos azules se encuentran los SNPs analizados con el programa bioinformático Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) y destacado por crear un nuevo elemento promotor. En orden corresponden a los rs546491617 y rs769158903, en ADN_g g.3717G>A y g.3726C>T, respectivamente. Ninguna de las variables antes descritas fueron encontradas.

b2) Análisis de variantes de regiones intrónicas del gen amelogenina.

De la cantidad total de SNP's reportados en la base de datos NCBI, 377 se ubican en regiones no codificantes. La mayor parte corresponden a variantes intrónicas con un total de 261, pudiéndose sumar 3 que se ubican en sitios de procesamiento pero que forman parte de los intrones. La utilización de las parejas de partidores para la secuenciación del sectores codificantes del gen amelogenina, dado el tamaño del producto esperado, permiten la secuenciación de regiones intrónicas adyacentes. Esto permitió obtener entre 100 a 150 pares de bases 5' y 3' de cada intrón. El intrón 4 fue completamente secuenciado, dado que el diseño de la pareja de partidores AMELX45 F y R amplifica tanto el exón 4 y 5 del gen amelogenina simultáneamente.

El análisis de las secuencias en el programa Vector NTI Express versión 1.6.0 permitió establecer el número de SNPs posibles de analizar en el probando y en el control.

Con esto se obtuvo que del total de 263 variantes intrónicas se analizaron 86 de éstas con el programa bioinformático en línea Human Splice Finder, en busca de alteraciones en sitios de procesamiento. Las variantes del intrón 1 fueron excluidas debido a que el exón 1 y parte del exón 2 corresponden a regiones no traducidas. Finalmente se analizaron: 21 variantes del intrón 2; 18 del intrón 3; 17 del intrón 4; 16 del intrón 5 y 14 del intrón 6. Los resultados del análisis, mostrado en la **tabla 7**, permiten observar que 45 de las variantes no tienen impacto sobre los sitios de procesamiento, 38 producen alguna alteración en sitios potenciadores del procesamiento pero que son caracterizados por probablemente no causar impacto en el procesamiento. Dos tienen un potencial impacto y sólo 1 presentaría un impacto altamente probable.

Se analizó la presencia/ausencia de todas estas variantes tanto en el probando como en el control. No se detectó ninguna de ellas. A modo de ejemplo en la **figura 10** se muestra el cromatograma con la ubicación donde debería estar el cambio g.12190G>A, el cual fue caracterizado como muy probable de causar alteración en el procesamiento.

Tabla 7. SNP's intrónicos de la base de datos NCBI analizados con el programa bioinformático Human Splice Finder (86 variantes estudiadas y tabuladas). Se detalla en la segunda columna el número rs de la variante, en la tercera columna el cambio en el ADNg en la secuencia de referencia NG_012040.1. En la quinta columna aparece la frecuencia del alelo menor (Proyecto 1000 genomas). La sexta columna presenta los resultados del análisis con el programa en línea Human Splice Finder.

N°	SNP	Cambio en DNAg	Significado funcional	Frecuencia	Resultado Human Splice Finder	
INTRÓN 2	1	rs775768556	g.6439A>C	intron variant	C=0.0003/1	Sin impacto
	2	rs748483718	g.6443C>A	intron variant		Probablemente sin impacto
	3	rs756431625	g.6450C>T	intron variant		Sin impacto
	4	rs778080525	g.6455G>T	intron variant		Probablemente sin impacto
	5	rs749844204	g.6466A>G	intron variant		Sin impacto
	6	rs946252	g.6495T>C,	intron variant	T=0.3139/1185	Probablemente sin impacto
	7	rs771907722	g.6519A>G	intron variant	G=0.0003/1	Probablemente sin impacto
	8	rs772844760	g.6525G>T	intron variant	T=0.0003/1	Sin impacto
	9	rs760714398	g.6558T>C,	intron variant	C=0.0011/4	Probablemente sin impacto
	10	rs766401250	g.6562A>T	intron variant	T=0.0003/1	Sin impacto
	11	rs946251	g.6608C>T	intron variant	T=0.0196/74	Probablemente sin impacto
	12	rs766596145	g.8224A>C,	intron variant		Sin impacto
	13	rs181251476	g.8273T>C	intron variant	C=0.0003/1	Probablemente sin impacto
	14	rs774632042	g.8294T>C,	intron variant		Probablemente sin impacto
	15	rs772359150	g.8296C>A	intron variant		Probablemente sin impacto
	16	rs771416423	g.8317T>C	intron variant		Probablemente sin impacto
	17	rs373394187	g.8318C>G	intron variant		Sin impacto
	18	rs745320292	g.8321T>G	intron variant		Probablemente sin impacto
	19	rs185763648	g.8322C>G,	intron variant	G=0.0005/2	Sin impacto
	20	rs775163233	g.8341T>C	intron variant		Probablemente sin impacto
	21	rs760209734	g.8343C>G	intron variant		Sin impacto
INTRÓN 3	22	rs751602067	g.8426C>G	intron variant		Probablemente sin impacto
	23	rs755035318	g.8431C>T	intron variant		Sin impacto
	24	rs769567581	g.8433A>G	intron variant	G=0.0003/1	Sin impacto
	25	rs753003209	g.8443A>T	intron variant		Probablemente sin impacto
	26	rs201968803	g.8444T>C	intron variant	C=0.0003/1	Sin impacto
	27	rs778170205	g.8446G>A	intron variant		Sin impacto
	28	rs749650835	g.8451C>T,	intron variant		Sin impacto
	29	rs762338830	g.8465T>G	intron variant	G=0.0003/1	Probablemente sin impacto
	30	rs759971590	g.8544C>G	intron variant		Probablemente sin impacto
	31	rs188865418	g.8547C>T	intron variant	T=0.0026/10	Probablemente sin impacto
	32	rs112174012	g.8565G>A	intron variant	A=0.0003/1	Probablemente sin impacto
	33	rs761389595	g.8589G>A	intron variant	A=0.0003/1	Sin impacto
	34	rs760940170	g.9655A>G	intron variant	G=0.0003/1	Sin impacto
	35	rs745396130	g.9665T>C	intron variant		Sin impacto
	36	rs772080502	g.9672_9674delCTT	intron variant		Sin impacto
	37	rs200884777	g.9673T>C	intron variant		Probablemente sin impacto
	38	rs185985105	g.9674T>C	intron variant		Probablemente sin impacto
39	rs766963883	g.9675C>T	intron variant	T=0.0003/1	Sin impacto	

Tabla 7(continuación).

N°	SNP	Cambio en DNAg	Significado funcional	Frecuencia	Resultado Human Splice Finder
INTRÓN 4	40	rs768417162	g.9737G>T		Sin impacto
	41	rs201515468	g.9742T>C	C=0.0003/1	Probablemente sin impacto
	42	rs200163085	g.9743A>G	G=0.0034/13	Sin impacto
	43	rs373696473	g.9750A>G		Probablemente sin impacto
	44	rs765286677	g.9754C>T		Sin impacto
	45	rs773161383	g.9758A>C		Probablemente sin impacto
	46	rs765441386	g.9768T>C	C=0.0003/1	Sin impacto
	47	rs199717275	g.9769A>C		Probablemente sin impacto
	48	rs767685604	g.9772T>C		Probablemente sin impacto
	49	rs752708064	g.9775G>T		Sin impacto
	50	rs776437048	g.9784_9785delAA		Sin impacto
	51	rs754292311	g.9795A>T		Sin impacto
	52	rs762554859	g.9799G>C		Probablemente sin impacto
	53	rs764237259	g.9807T>C		Probablemente sin impacto
	54	rs759477208	g.9809delT		Sin impacto
	55	rs754218426	g.9811T>C		Probablemente sin impacto
	56	rs779323924	g.9823G>A	splice acceptor variant	Sin impacto
INTRÓN 5	57	rs375383821	g.9875C>T		Sin impacto
	58	rs768435519	g.9884C>T		Sin impacto
	59	rs780941596	g.9889T>A		Probablemente sin impacto
	60	rs191283789	g.9894T>C	C=0.0005/2	Probablemente sin impacto
	61	rs182747238	g.9922C>T	T=0.0011/4	Sin impacto
	62	rs778112293	g.9976T>A	A=0.0003/1	Probablemente sin impacto
	63	rs750299843	g.9989A>G	G=0.0005/2	Sin impacto
	64	rs187280112	g.9996C>T	T=0.0003/1	Sin impacto
	65	rs779831463	g.10048A>G	G=0.0003/1	Probablemente sin impacto
	66	rs371324708	g.10097C>T		Sin impacto
	67	rs769670776	g.10100A>T		Probablemente sin impacto
	68	rs772861040	g.10112A>C		Probablemente sin impacto
	69	rs764959956	g.10118_10119delCT		Probablemente sin impacto
	70	rs763006746	g.10128C>T		Sin impacto
	71	rs770771001	g.10132C>T		Sin impacto
	72	rs754573529	g.10134A>G,	splice acceptor variant	Sin impacto

Tabla 7 (continuación).

N°	SNP	Cambio en DNAg	Significado funcional	Frecuencia	Resultado Human Splice Finder
INTRÓN 6	73	rs751474750	g.10570A>T		Sin impacto
	74	rs746508249	g.12044G>A	A=0.0003/1	Sin impacto
	75	rs191399494	g.12066A>C	C=0.0003/1	Probablemente sin impacto
	76	rs771336026	g.12146T>G		Probablemente sin impacto
	77	rs779253128	g.12153A>G		Sin impacto
	78	rs746272574	g.12157G>A		Probablemente sin impacto
	79	rs376830760	g.12158T>C	C=0.0003/1	Sin impacto
	80	rs369891804	g.12162T>C		Sin impacto
	81	rs183940749	g.12171C>G	G=0.0003/1	Sin impacto
	82	rs769206570	g.12173G>T		Sin impacto
	83	rs776065625	g.12182C>T		Sin impacto
	84	rs762731577	g.12185delT		Potencial alteración
	85	rs761293454	g.12190T>G		Alteración muy probable
	86	rs764911951	g.12194G>A	splice acceptor variant	Potencial alteración

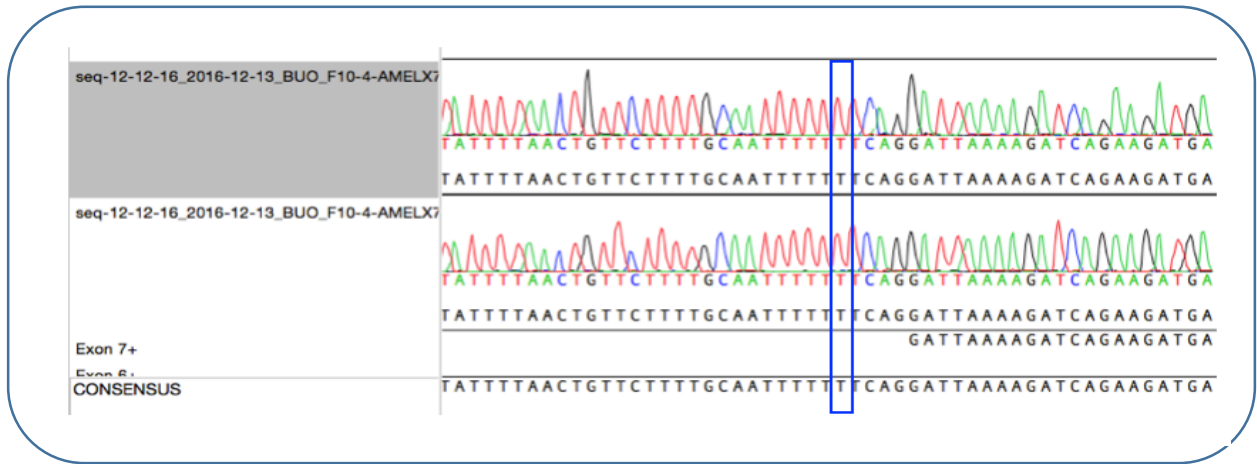


Figura 10. Sección de cromatogramas de secuenciación de ambas hebras del ADNg del probando F10-4, correspondientes al exón 7 amplificado con la pareja de partidores AMELX7 F y R, ambas hebras comparadas con la secuencia consenso NG_012040.1. Encerrado en rectángulo azul se encuentra la variante rs761293454, g.12190T>G, caracterizada como muy probable de causar alteración en el procesamiento, con el programa bioinformático Human Splice Finder.

7. DISCUSIÓN

Las AI son desórdenes hereditarios del esmalte, clínica y genéticamente heterogéneos, por lo que se presentan con gran variabilidad fenotípica y diversos patrones de herencia, ya sea, autosómicos o ligados al cromosoma X, dominantes y/o recesivos en ambos casos (Crawford y cols., 2007; Urzúa y cols., 2011).

Actualmente, se conoce que las AI no sindrómicas de tipo hipoplásicas, hipomaduras e hipocalcificadas pueden ser ocasionadas por mutaciones en diversos genes, entre ellos Amelogenina (Wright y cols., 2015; Moradian-Oldak, 2012; Kim y cols., 2008; El-Sayed y cols., 2009; Parry y cols., 2012; Parry y cols., 2013; Zhang y cols., 2015; Urzúa y cols., 2015). En AI sindrómicas se ha encontrado asociación de mutaciones en genes como *LTBP3*, *FAM20A*, *CNNM4*, *ROGDI* y *FAM20C*. Casos de AI sindrómica y no sindrómica se han asociado a genes como *COL17A1*, *LAMA3*, *LAMB3* y *DLX3* (Seymen y cols., 2015).

Amelogenina es la proteína más abundante de la matriz extracelular del esmalte en desarrollo (Fincham y cols., 1991 ; Salido y cols., 1992). El gen que codifica la proteína amelogenina se denomina *AMEL* y existen dos formas de éste en los mamíferos (genes duplicados); uno se ubica en el cromosoma sexual X (*AMELX*) y el otro en el cromosoma sexual Y (*AMELY*). *AMELX* es el principal participante en la organización y estructura del tejido adamantino (Hart y cols., 2002; Kim y cols., 2004; Kida y cols., 2007).

El gen *AMELX* (locus AIH1,Xp22.3), está constituido por 7 exones, abarcando una longitud total de 8 kb en el genoma, de la cual parte del exón 2, los exones 3, 5, 6 y parte del exón 7 codifican para la proteína amelogenina.

En el presente trabajo se realizó el análisis genético molecular de un probando proveniente de una familia Colombiana afectada con AI hipoplásica/hipomadura con un posible patrón de herencia ligado al cromosoma X, diagnóstico clínico y genealogía realizados en la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Dado los hallazgos clínicos y el patrón de herencia de la AI en el probando, es que se estudió el gen amelogenina como potencial candidato en la etiología de la enfermedad para esta familia. Se realizó el estudio de la región

promotora y de la región codificante completa, junto con las regiones intrónicas circundantes del gen amelogenina (*AMELX*), usando ADN del probando amplificado mediante el uso del paquete comercial GenomiPhi dado que se contaba con baja cantidad de ADN original.

7.1 Análisis clínico radiográfico y genealogías de las familias analizadas.

La amelogenesis imperfecta se subdivide a nivel clínico en varias formas dependiendo el tipo de defecto y la etapa de formación del esmalte afectada: hipoplásica, hipocalcificada e hipomadura. Los dientes afectados pueden presentarse con cambios de coloración, sensibilidad o propensos a desintegración del esmalte pre o post-erupción. La demarcación entre fenotipos no siempre es exacta (Wright y cols., 2003). Así mismo, existen diferentes grados de alteración en cada forma y se ha visto que pueden coexistir en el mismo paciente o incluso en el mismo diente diferentes fenotipos, por ejemplo: formas hipoplásica e hipomaduras. Las formas hipomaduras pueden ser confundidas con fluorosis (Crawford y cols., 1992).

En el probando de la familia Colombiana afectada, se describen sensibilidad en dientes permanentes y al examen clínico se observó que el paciente presentaba dientes afectados con fenotipo hipoplásico/hipomadura. Los primeros molares presentaron hipoplasias y en los dientes anteriores opacidades compatibles con hipomeralizaciones. En el probando se descartaron alteraciones sistémicas, como posibilidad de que la AI se presente formando parte de un síndrome como sucede en algunos casos, como por ejemplo, Síndrome **T**rico **D**ento **O**seo (TDO) en que los pacientes se caracterizan por, adicional a presentar amelogénesis imperfecta, cabello rizado y cambios esqueléticos como esclerosis ósea. Como característica común se explica la alteración del cabello y AI por la afección al ectodermo, mientras que la esclerosis ósea estaría relacionada al mesodermo. No obstante, la etiología estaría sustentada en una mutación en el gen *DLX3* (Dong y cols., 2003). En estos casos el diagnóstico diferencial debe hacerse con respecto a Amelogénesis imperfecta con taurodontismo no sindrómica, ya que en ambos casos el fenotipo es

similar. Si bien la probando presenta cabello rizado, el fenotipo de la AI no incluye taurodontismo. En general, en los diferentes casos de AI, la literatura indica que existen variadas condiciones que se acompañan con AI, por lo que el diagnóstico diferencial es importante, por ejemplo en el síndrome de Kohlshutter, Platispondilia, Distrofia de conos y bastones, Nefrocalcinosis, entre otros (Hunter y cols., 2007).

Por otro lado, también se ha postulado la posibilidad de que la AI se clasifique como síndrome por sí solo. Esto debido a que se ha observado clínicamente mordida abierta anterior de tipo esquelético, con prevalencia que varía entre 24 y 60% de los casos de pacientes con algún tipo de diagnóstico de AI, ya sea de herencia asociada a X o autosómica (Rowley y cols., 1982; Crawford y cols., 2007). Sin embargo, no existe clasificación en que se hable de la AI como síndrome y, por otro lado, la relevancia de la asociación antes descrita aún debe ser bien dilucidada.

El probando en estudio presenta antecedentes de recibir tratamiento ortodóncico y al examen clínico se reporta mordida cruzada bilateral. No se puede establecer con certeza que en este caso el diagnóstico de AI vaya acompañado de la existencia de mordida abierta anterior. Además, tampoco se puede determinar que ésta no sea originada por la presencia de malos hábitos, lo cual lo hace muy probable ya que se relata succión digital hasta los 7 años. Existen diversos reportes en que se presenta mordida cruzada, anomalías en la erupción, agenesias, calcificaciones pulpares, reabsorción radicular, hipercementosis, malformaciones radiculares (Souza y cols., 2014). No se observaron en este estudio este tipo de anomalías y otras alteraciones locales.

En el examen radiográfico se evidencian algunos hallazgos clínicos, principalmente hipoplasias. Aquellas más marcadas y que involucran gran cantidad de estructura dental son visibles en el estudio radiográfico, caso de primeros molares. Las hipoplasias que comprometen caras libres, como sucede en caras vestibulares de los molares y los signos de AI hipomadura no son visibles en las radiografías por efecto de los fenómenos proyectivos y sobreproyección de otras caras del diente.

La genealogía de la familia estudiada muestra que el sujeto III:2 es el único individuo de sexo femenino afectado, ya que de los nueve descendientes en total,

se aprecia una mujer y 7 varones sanos. Luego, III.2 transmite el rasgo a parte de la descendencia, 2 de 3 hijas (sujetos IV:1 y IV:3). Una de las hijas afectadas transmite el rasgo a su única hija (sujeto V:1) quien es la probando de este estudio. Al analizar esta genealogía podemos conjeturar que es en el sujeto III:2 donde aparece por primera vez la enfermedad y se expresa en el fenotipo. Este sujeto transmite el rasgo no a todas sus hijas, siendo el padre sano. Esto sugiere que se trata de un rasgo dominante y que el sujeto III:2 sería heterocigoto para la condición. Esto da la posibilidad de que sea autosómico o ligado a X. Por otro lado, el fenotipo que presenta el probando, tiene similitudes a fenotipos con herencia ligadas a X con esmalte hipoplásico/hipomaduro. En la literatura es ampliamente postulado que todas las formas de amelogenénesis imperfecta con una conocida base molecular con herencia ligada a X se asocian a una mutación en el gen *AMELX*. Sin embargo, existe reporte de familias afectadas y con herencia ligada a X pero asociada a otra región de X (Xq22-28) (Aldred y cols., 1992). También existen otras condiciones ligadas a X que involucran al esmalte, sugiriendo que otros genes de importancia en la formación del esmalte se encuentran en el cromosoma X (Landy y cols., 1993; Mikkola y cols., 2003; Balmer y cols., 2004).

Dado que los hombres afectados expresarán solo el alelo mutado y que por otro lado, las mujeres muestran un patrón mosaico de expresión debido a la inactivación del cromosoma X (lionización), los fenotipos en hombres y mujeres varían marcadamente en severidad y apariencia. Las mujeres afectadas por AI con mutaciones en *AMELX*, presentan un patrón típico con descoloraciones o bandas hipoplásicas debido a agrupaciones de ameloblastos que pueden expresar el alelo normal o el alelo mutado (Witkop y cols., 1967; Hart y cols., 2002).

En este estudio solo se observan mujeres afectadas. En las distintas generaciones afectadas no hay hombres en las descendencias. Solo se cuenta con el antecedente de que la madre y la tía están afectadas con AI, pero no se sabe con certeza los patrones de AI presentes en ellas. Sería conveniente realizar un estudio clínico exhaustivo para poder establecer una comparación en la expresión de la enfermedad y analizar los aspectos comunes entre los afectados.

7.2 Análisis genético molecular del caso de AI estudiado.

El análisis genético-molecular de esta investigación consistió en el estudio genético molecular 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 y cols. , 2010). Con anterioridad, existen trabajos en que sí se ha estudiado la región promotora del gen *AMELX*, como se realizó en el trabajo de investigación sobre Amelogénesis Imperfecta de tipo hipoplásica, en sujetos pertenecientes a una familia Chilena, mediante métodos clínicos, histológicos y genéticos, llevado a cabo el año 2011 por A. Plaza y desarrollado en el Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD) en el área de bioquímica. En este trabajo se diseñaron partidores específicos para amplificar y secuenciar toda la región promotora, demostrándose la ausencia de cambios en la secuencia de ADN del probando con respecto a la secuencia del control y de referencia utilizadas. Además, el análisis de las regiones codificantes y vecindades intrónicas, no evidenció ninguna de las 21 mutaciones previamente reportadas en la literatura y tampoco se observó presencia de variantes reportadas y/o nuevas variantes de secuencia en otras posiciones del gen, tal como sucede en nuestro estudio.

Existen 3 isoformas de amelogenina, producto del procesamiento alternativo de su ARN mensajero. Aunque actuales investigaciones han descrito hasta 6 isoformas distintas (Cho y cols., 2014). El ARN mensajero más abundante tiene la particularidad de que prescinde del exón 4 en su totalidad. Se ha demostrado que mutaciones silentes en el exón 4 pueden causar patología al afectar el

procesamiento alternativo. En un estudio se analizó una familia con AI con fenotipo hipoplásico/hipomaduro, en que el análisis genético-molecular desarrollado detectó la presencia de un cambio en la secuencia que conduce a un codón sinónimo, provocando un cambio en los motivos que participan como potenciadores o silenciadores en el procesamiento. El cambio que se detectó produciría una mayor definición del exón 4. Dado lo anterior es que se incluye en el ARN mensajero parte del exón 4 (Cho y cols., 2014).

Por otro lado, se postula que el exón 4 da origen a un microRNA, el cual puede contribuir a la diferenciación de ameloblastos y osteoblastos al potenciar la acción de *RUNX2* (Le MH y cols., 2016), con lo cual toma relevancia el estudio de vecindades intrón-exón.

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 (*AMBN*), 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 *AMTN* (amelotina) en dos familias de Brasil con AI no síndromica (Santos y cols., 2007). Por lo que concluyen, que aunque no se encontraron mutaciones, exónicas ni en sitios de procesamiento 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.

Lo anterior, en conjunto a la posibilidad de que otras regiones del cromosoma X puedan estar involucradas en la etiología de las AI, nos hacen concluir que si bien en este trabajo no se detectaron alteraciones en las regiones estudiadas del gen *AMELX*, no se puede descartar de forma absoluta que la alteración no sea ligada a X, pero también, se mantiene la probabilidad de que la etiología de la AI en la familia se encuentre en la alteración de otro gen diferente de amelogenina y también localizado en el cromosoma X.

7.3 Análisis de variantes de la región codificante y no codificante del gen amelogenina.

No solo se realizó la pesquisa de mutaciones reportadas, también, la búsqueda de variantes SNPs para el gen *AMELX*. El estudio se enfocó en aquellas que producen un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína resultante (*missense*). De las variantes SNPs encontradas, se sometieron a análisis *in silico* variantes *missense*, intrónicas adyacentes a los diferentes exones y aquellas ubicadas en la secuencia promotora. Aquellas resultantes con potenciales efectos deletéreos fueron buscadas en la secuencia del probando.

Aún cuando existe una gran cantidad de programas disponibles, el análisis de las variantes *missense* se realizó usando 2 programas distintos con soporte en línea: Polyphen 2.0 el que predice el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína humana utilizando diferentes algoritmos (Adzhubei y cols., 2010) y por otro lado PANTHER, que se basa en el grado de conservación de los residuos aminoácidos (Mi y cols., 2013). La alta conservación de algunas zonas del gen indican importantes funciones desempeñadas por residuos o grupos de residuos específicos. 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 y cols., 2007).

La caracterización de mutaciones ayuda a identificar regiones particulares del gen o residuos que juegan un rol importante en la función de la proteína. Este análisis se basa en que residuos importantes en la proteína no deberían experimentar cambios debido a que su alteración o pérdida conduciría a severos defectos en el esmalte. Por otra parte, aquellos residuos menos importantes en la estructuración de la proteína podrían ser sustituidos sin provocar daños y deberían,

por lo tanto, ser considerados simplemente como polimorfismos (Delgado y cols., 2007).

Las variantes y cambios ubicadas en proximidades al inicio de los exones tienen importancia por el hecho de que pueden constituir motivos silenciadores o potenciadores del procesamiento. Hasta la fecha, solo se conocen 2 mutaciones en *AMELX* que afecta un motivo, uno dentro del exón 4 y el otro en el exón 6. En el caso del primero provoca que el mensajero incluya el exón 4 llevando a una modificación en la estructura de la proteína con el consiguiente efecto deletéreo. En el segundo caso, se produce una interacción con otro motivo dentro del exón 6 y lleva a un mensajero con solo una pequeña parte de éste (Cho y cols., 2014; Kim y cols., 2017).

Ninguna de las variantes descritas y estudiadas fueron detectadas en el probando del estudio.

8. CONCLUSIONES

- 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 las regiones codificantes, intrónicas y promotoras 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.
- Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan el concepto de una enfermedad con manifestación clínica y genética heterogénea, puesto que, el patrón de herencia resultó ser no compatible con lo encontrado a nivel molecular.
- Según el análisis bioinformático se encontró que las variantes *missense* g.10146A>G(c.155A>G), g.10161T>C(c.170T>C), g.10497C>A(c.506C>A), tienen probabilidad de producir daño en caso de estar presentes y además son variantes de baja frecuencia.
- El análisis bioinformático reveló que la variante intrónica g.12190G>A (c.571-5T>G) tiene alta probabilidad de causar alteración en el procesamiento del gen, lo cual la convierte en una variante interesante de analizar en estudios de secuenciación.

9. REFERENCIAS.

Aldred, M.J., Savarirayan, R. & Crawford, P.J. (2003) Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century. *Oral Dis*, 9, 19-23.

Altug-Atac A T, Erdem D.(2007) Prevalence and distribution of dental anomalies in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*; 131: 510–514

Bäckman B, Holm A K.(1986) Amelogenesis imperfecta: prevalence and incidence in a northern Swedish county. *Community Dent Oral Epidemiol*; 14: 43–47

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.

Cho, E. S., Kim, K.-J., Lee, K.-E., Lee, E.-J., Yun, C. Y., Lee, M.-J., ... Kim, J.-W. (2014). Alteration of Conserved Alternative Splicing in AMELX Causes Enamel Defects. *Journal of Dental Research*, 93(10), 980–987.

Chosack A, Eidelman E, Wisotski I, Cohen T.(1979) Amelogenesis imperfecta among Israeli Jews and the description of a new type of local hypoplastic autosomal recessive amelogenesis imperfecta. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 47: 148–156

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.

Crawford P J, Aldred M, Bloch-Zupan A.(2007) Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*; 2: 17

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.

Gadhia, K., McDonald, S., Arkutu, N., Malik, K.,(2012) Amelogenesis imperfect: an introduction. *British Dent J.*, 212, 377-379.

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.

Gutiérrez SJ, Chaves M, Torres D and Briceño I (2007) Identification of a novel mutation in the enamelin gene in a family with autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol* 52:503-506.

Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S, y cols.(2004) Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet* 41(7):545-9.

Hart PS, Michalec MD, Seow WK, Hart TC, Wright JT. (2003) Identification of the enamelin (g.8344delG) mutation in a new kindred and presentation of a standardized ENAM nomenclature. *Arch Oral Biol* 48(8):589-96.

Hillson S., Bond S., (1997) Relationship of enamel hypoplasia to the pattern of tooth crown growth: a discussion. *Am J Phys Anthropol*; 104:98-103.

Hu JC, Yamakoshi Y. (2003) Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Crit Rev Oral Biol Med* 14(6):387-98.

Hu, J.C., Chun, Y.H., Al Hazzazzi, T. & Simmer, J.P. (2007) Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*, 186, 78-85.

Kim, J.W., J.P. Simmer, T.C. Hart, P.S. Hart, M.D. Ramaswami, J.D. Bartlett, J.C. Hu (2005b) MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet* 42: 271–275.

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.

Kim, YJ., Kang, J., Shin, TJ., Hyun, HK., Lee, SH., Lee, ZH., Kim, JW. (2017) A novel AMELX mutation causes hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol*; 76:61-65.

Lagerstrom, M., Dahl, N., Nakahori, Y., Nakagome, Y., Backman, B., Landegren, U. & Pettersson, U. (1991) A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes Xlinked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics*, 10, 971-975.

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.

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. Novel WDR72 mutation and cytoplasmic localization. *J Dent Res*, 89, 1378-1382.

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.

Märth CK, Bäckman B., Holmgren G., Hu JC., Simmer JP., Forsman-Semb K. (2002) A nonsense mutation in the enamelin gene causes local hypoplastic autosomal dominant amelogenesis imperfect. *Hum Mol Genet*; 11: 1069-1074.

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.

Neville B., D.D., Allen C. (ed) (1995) *Oral and Maxillofacial Pathology*. W.B.Saunders Company.

Paine, M.L. & Snead, M.L. (1997) Protein interactions during assembly of the enamel organic extracellular matrix. *J Bone Miner Res*, 12, 221-227.

Paine, M.L., Lei, Y.P., Dickerson, K. & Snead, M.L. (2002) Altered amelogenin selfassembly based on mutations observed in human X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *J Biol chem*, 277, 17112-17116.

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.

Plaza A. Caracterización clínica, histológica y genética de sujetos afectados con amelogénesis imperfecta. Tesis de magíster en ciencias médicas con mención en biología celular y molecular, Universidad de Valparaíso, 2011.

Poulsen S, Gjørup H, Haubek D et al.(2008) Amelogenesis imperfecta – a systematic literature review of associated dental and oro-facial abnormalities and their impact on patients. *Acta Odontol Scand*; 66: 193–199.

Poulter JA., Murillo G., Brookes SJ., Smith CE-L., Parry DA., Silva S., Kirkham J., F.

Inglehearn CF., Mighell AJ. (2014) Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfect. *Hum Mol Genet*, 23, 5317-5324.

Prasad, M. K., Geoffroy, V., Vicaire, S., Jost, B., Dumas, M., Le Gras, S., ... Bloch-Zupan, A. (2016). A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement. *Journal of Medical Genetics*, 53(2), 98–110.

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.

Rajendran R.(2007) Chptr: 1. Developmental disturbances of oral and paraoral structures. In: Rajendran R, Sivapathasundharam B, editors. *Shafer's Textbook of Oral Pathology*. 5th ed. Elsevier: Pub;. p. 67

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.

Reid DJ., Dean MC. (2000) Brief communication: the timing of linear hypoplasias on human anterior teeth. *Am J Phys Anthropol*; 113: 135-139.

Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. (2005) *Patología oral y maxilofacial contemporánea*. 2ª ed. Madrid: Elsevier.

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.

Sedano H O. (1975) Congenital oral anomalies in Argentinian children. *Community Dent Oral Epidemiol*; 3: 61–63

Sekiguchi H, Kiyoshi M, Yakushiji M. (2001) DNA diagnosis of X-linked amelogenesis imperfecta using PCR detection method of the human amelogenin gene. *Dent Jan* 37:109-12.

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.

Simmer JP., X. Sun Y. Yamada, Zhang CH., Bartlett JD., Hu JC-C. (2004) Enamelysin and kallikrein-4 expression in the mouse incisor. Hadano, Tokai University Press, pp 348-352.

Stephanopoulos, G., Garefalaki, M.E. & Lyroudia, K.(2005) Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*, 84, 1117-1126.

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.

Urzua, B., Ortega-Pinto, A., Morales-Bozo, I., Rojas-Alcayaga, G. & Cifuentes, V.(2011)Defining a new candidate gene for amelogenesis imperfecta: from molecular genetics to biochemistry. *Biochem Genet*, 49, 104-121.

Witkop, C.J., Jr. (1988) Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol*, 17, 547-553.

Witkop, C.J., Jr., J.J. Sauk, Jr (1976) Heritable defects of enamel; in Stewart, R.E., G.H. Prescott (eds): Oral Facial Genetics. St. Louis, Mosby, pp 151-226

Wright J T, Hart T C, Hart P S et al. (2009) Human and mouse enamel phenotypes resulting from mutation or altered expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4. *Cells Tissues Organs*; 189: 224–229.

Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred MJ, et al. (2011). Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. *Cells Tissues Organs* 194:279-283.

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 Xlinked amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res*, 44 Suppl 1, 72-78.

Yang, X., Wang, L., Qin, Y., Sun, Z., Henneman, Z.J., Moradian-Oldak, J. & Nancollas, G.H.(2010) How amelogenin orchestrates the organization of hierarchical elongated microstructures of apatite. *J Phys Chem B*, 114, 2293-2300.

10. ANEXOS

ANEXO 1: Certificado comité de Ética.



12/07/2013

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2013/06

1. **Acta De Aprobación De Protocolo De Estudio N° 2013/11.**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

Dra. María Angélica Torres
Presidente CEC

Dra. Claudia Lefimil Puente
Secretaría CEC

Srta. Karin Lagos
Miembro permanente del CEC

Dr. Eduardo Rodríguez Y.
Miembro permanente del CEC

3. **Fecha de Aprobación:** 10/07/2013.
4. **Título completo del proyecto:** "MUTATIONAL ANALYSIS OF CAUSAL GENES OF AMELOGENESIS IMPERFECTA AND A SEARCH FOR NEW GENES INVOLVED IN ITS ETIOLOGY THROUGH TECHNIQUES OF EXOME CAPTURE AND MASSIVE PARALLEL SEQUENCING". Proyecto Fondecyt Regular, Versión Oficial 26-06-2013.
5. **Investigador responsable:** Dra. Blanca Urzúa Orellana
6. **Institución Patrocinante:** Facultad de Odontología de la U. de Chile. Dpto. de Ciencias Básicas y Comunitarias y Fondecyt.
7. **Documentación Revisada:**
 - **Protocolo de Investigación en versión en Inglés del proyecto** "MUTATIONAL ANALYSIS OF CAUSAL GENES OF AMELOGENESIS IMPERFECTA AND A SEARCH FOR NEW GENES INVOLVED IN ITS ETIOLOGY THROUGH TECHNIQUES OF EXOME CAPTURE AND MASSIVE PARALLEL SEQUENCING". Proyecto Fondecyt Regular, Versión Oficial 26-06-2013.
 - **CV del Investigador principal** y de los Coinvestigadores
 - **Formulario de Consentimiento Informado (CI)** en español para pacientes mayores de 18 años del Proyecto "Mutational analysis of causal genes of amelogenesis imperfecta and a search for new genes involved in its etiology through techniques of exome capture and massive parallel sequencing". Versión Oficial 19-06-2013.
 - **Formulario de Consentimiento Informado (CI)** en español para individuos sanos adultos del proyecto "Mutational analysis of causal genes of amelogenesis imperfecta and a search for new genes involved in its etiology through techniques of exome capture and massive parallel sequencing". Versión Oficial 19-06-2013.
 - **Formulario de Asentimiento en español para pacientes entre 11 y 18 años (AI)** del Proyecto "Mutational analysis of causal genes of amelogenesis imperfecta and a search for new genes involved in its etiology through techniques of exome capture and massive parallel sequencing". Versión Oficial 19-06-2013.
 - **Formulario de Consentimiento en español para padres de pacientes menores de 11 años** del Proyecto "Mutational analysis of causal genes of amelogenesis imperfecta and a search for new genes involved in its etiology through techniques of exome capture a and massive parallel sequencing". Versión Oficial 19-06-2013.

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

• Cartas de Compromiso y Colaboración de :

- Director de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la U. de Chile: Rodrigo Caravantes.
- Directora del Departamento de Ciencias Básicas y Comunitarias de la Facultad de Odontología de la U. de Chile: Dra. Irene Morales.
- Investigadora del Centro de investigaciones Odontológicas, Dpto. del Sistema Dentario Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia: Profesora Dra. Sandra Gutiérrez Prieto.
- Directora del Programa Doctoral en Ciencias de la Salud Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Michigan, EEUU: Dra. Jan Ching Chun Hu.

8. Carácter de la población: En este estudio se realizará en pacientes chilenos y colombianos afectados con AMELOGÉNESIS IMPERFECTA y también en sanos, sin esta patología, que serán controles del estudio.

9. Fundamentación de la aprobación

Este proyecto busca caracterizar a los individuos afectados, en nuestro país y en familias colombianas, con Amelogenesis Imperfecta, para conocer los cambios en los genes que han sido identificados como responsables y buscar nuevos genes implicados en esta condición patológica dentaria. La Amelogenesis imperfecta es una patología dentaria rara que afecta el esmalte dental generando denticiones anormales con grandes defectos, afectando negativamente la calidad de vida de quienes los padecen, por sus dientes sensibles, débiles y con mayor riesgo a fracturas y ataque carioso, muchos pierden tempranamente sus dientes. La realización de este proyecto, en colaboración con otros expertos internacionales, podrá generar conocimiento y dar nuevas luces al odontólogo para consejo genético a las familias afectadas, así como permitirá la comprensión más acabada de los cambios del esmalte según el gen afectado, pudiendo durante la rehabilitación de estas piezas dentarias indicar los materiales dentales restauradores más indicados para una rehabilitación predecible y duradera. Respecto a la forma de reclutamiento y trato de las personas que participarán en esta investigación este comité ha considerado que no se vulnera la dignidad de los sujetos, no constituye una amenaza, ni causa daño emocional ni moral a los investigados. Se ha garantizado el derecho a la privacidad y al anonimato de los participantes y se ha definido con claridad la cadena de custodia de la información obtenida y las restricciones para su uso por terceros.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba por unanimidad de sus miembros el estudio: Proyecto "Mutational analysis of causal genes of amelogenesis imperfecta and a search for new genes involved in its etiology through techniques of exome capture and massive parallel sequencing". Versión Oficial 26-06-2013. Tres documentos de CI versión 19/06/2013 y un documento de AI versión 19/06/2013, bajo la supervisión de la Dra. Blanca Urzúa como Investigador Principal. Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si fuera necesario.



[Handwritten signature]
María Angélica Torres V.
DDS, MSc, PhD
Presidente del CEC

c/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.

ANEXO 2: Certificado Comité de Bioseguridad.



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

Santiago, 24 de Junio de 2013.

C E R T I F I C A D O

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

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

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

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



Dr. Mario Chiong
Secretario



Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 9781793-9781832, Fax: 9781748,
Santiago. <http://odontologia.uchile.cl>
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 9781792 Fax:
9781748, Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>