

Análisis mutacional del gen AMEL en una familia con amelogenesis imperfecta

Mutational analysis in the AMEL gene a family with amelogenesis imperfecta

María Claudia Berrocal*
 Adriana Cavender**
 Lorenza Jaramillo* **
 Sandra Gutiérrez*
 Ignacio Briceño****
 Mónica Melo*
 Rena D'Souza*****

Univ Odontol 2006 Jun-Dic; 25(57):14-18

nesis Imperfecta (A.I). OBJECTIVES: Establish the mutations present in the AMEL gene and the means of inheritance in a Colombian family with A.I. MATERIALS AND METHODS: family pedigree, clinical evaluation and peripheral DNA genomic blood extraction was performed to each of the participating individuals. PCR was used to amplify the 7 exons of the amelogenine gene in the short arm of the X chromosome. SSCP analysis was carried out in the 5 and 6 exons. Gel electrophoresis with non denaturalizing 6% polyacrilamida were carried out to confirm the presence or absence of mutations in the AMEL gene, after which the sequencing of the 7 exon PCR products was performed. RESULTS: the pedigree analysis showed an X heritage linked mechanism. The dental phenotype observed in the proband corresponded to a hypoplastic type defect. There were no identified mutations at a molecular level in the 7 exons of the amelogenine gene. CONCLUSION: this condition has great genetic heterogeneity and possibly the phenotype found is more related with mutations in other genes linked to the formation of the dental enamel.

KEY WORDS

Amelogenesis imperfecta, AMEL gene, hypoplastic, X-linked.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las principales proteínas de la matriz orgánica del esmalte se encuentran la amelogenina, la enamelin, la ameloblastina y la tuftelina, las cuales participan en la formación del esmalte dental¹. Estas proteínas son secretadas por los ameloblastos y jue-

* Odontóloga, MSc. Centro de Investigaciones Odontológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

** Microbióloga, MSc, Universidad de Texas, Houston. Dental Branch.

*** Ingeniera química, MSc. Centro de Investigaciones Odontológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

**** Médico. PhD. Instituto de Genética Humana. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

***** Odontóloga, ortodoncista, PhD. Universidad de Texas, Houston. Dental Branch.

RESUMEN

Mutaciones en los genes que participan en el desarrollo del esmalte dental, como amelogenina (AMEL) y enamelin (ENAM) entre otras, causan amelogenesis imperfecta (AI). OBJETIVO: establecer las mutaciones presentes en el gen AMEL y el modo de herencia en una familia colombiana con AI. MATERIALES Y MÉTODOS: se realizó un pedigree de la familia, evaluación clínica y extracción del ADN de sangre periférica a los individuos participantes. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue usada para amplificar los 7 exones del gen AMEL en el brazo corto del cromosoma X y análisis de SSCP fueron realizados en los exones 5 y 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% no denaturantes fueron hechas. Para confirmar ausencia o presencia de mutaciones se hizo secuenciamiento de los productos de PCR de los 7 exones. RESULTADOS: el análisis del pedigree

mostró un mecanismo de herencia ligado a X y el fenotipo dental observado en los probandos, correspondió a un defecto de tipo hipoplásico. No se identificaron mutaciones en los siete exones del gen amelogenina. CONCLUSIÓN: esta condición tiene gran heterogeneidad genética y posiblemente el fenotipo encontrado esté más relacionado con mutaciones en otros genes concernientes a la formación del esmalte.

PALABRAS CLAVE

Amelogenesis imperfecta, gen AMEL, hipoplásico, ligada a X.

MUTATIONAL ANALYSIS IN A FAMILY WITH AMELOGENESIS IMPERFECTA

Mutations of the genes which participate in the enamel development such as amelogenine (AMEL) and enameline (ENAM) among others cause Ameloge-

gan un papel importante en la iniciación y crecimiento de los cristales del esmalte, es decir, el aumento gradual en su contenido mineral, lo cual es un proceso altamente controlado. La matriz orgánica del esmalte actúa en la modulación y crecimiento de este depósito mineral, pero las funciones específicas de cada una de las proteínas de la matriz en este proceso aún es incierto. Estudios han demostrado que mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas causan la amelogenesis imperfecta (AI) una condición clínica y genética que afecta el desarrollo del esmalte dental en ausencia de un compromiso sistémico². El tipo de defecto en el esmalte, puede ser de cantidad, estructura y/o composición. Actualmente la clasificación de estos desórdenes se basa en el aspecto clínico y el patrón de herencia. Según el aspecto clínico 14 subtipos distintos han sido considerados, los cuales abarcan desde el espesor reducido del esmalte, *hipoplasia*, pasando por el decrecimiento de su mineralización, *hipomineralización* hasta los subtipos de *hipomaduración*, e *hipocalcificación*, y con base en el patrón de herencia, se han clasificado en autosómico dominante, autosómico recesivo y ligado a X³.

Los tipos de AI estudiados hasta el momento de acuerdo a su forma de herencia y su número de identificación se encuentran en la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Tabla 1⁴.

La severidad de estos defectos del esmalte varía significativamente entre individuos en la misma familia, como también entre diferentes familias⁵. Se ha encontrado que tanto el fenotipo hipoplásico como el hipocalcificado pueden coexistir. La amelogenina que es la proteína más abundante en la matriz orgánica del esmalte, constituye cerca del 96% de ésta, aunque las funciones exactas de la amelogenina no han sido totalmente establecidas, es

Tabla 1

<i>Fenotipo</i>	<i>Gen</i>	<i>OMIM</i>
Amelogenesis imperfecta 1, ligada a X; AIH1	<i>AMELX</i> Xp22.3-p22.1	301200
Amelogenesis imperfecta 2, Autosómica dominante; AIH2	4 q 11-21 <i>ENAM</i> X q22-q28	104500 301201
Amelogenesis imperfecta 3, ligada a X; AIH3	<i>AMELX</i> X q22-q28	301201

Tipos de amelogenesis, encontrados en la base de OMIM. La AIH1 o amelogenesis imperfecta ligada a X se denomina así, porque el gen causante de la enfermedad se encuentra localizado en el cromosoma X, mientras que, la AIH2 toma su nombre porque el gen que causa la afección, la enamelina se encuentra localizado en el cromosoma 4. La AIH3 está ligada a una variante que se encuentra localizada en el mismo cromosoma X como la AIH1 pero en el brazo largo.

crítico su papel en el desarrollo del esmalte, lo cual ha sido verificado por la asociación de los defectos de esmalte con mutaciones en el gen que codifica para esta proteína (AMEL) en humanos⁶. El gen AMEL consta de siete exones y se encuentra localizado en el cromosoma X, región p21-p22. Hasta ahora se han encontrado 13 mutaciones reportadas en este gen las cuales van desde delecciones de 5KB hasta de una sola base y mutaciones nonsense que crean un corrimiento del marco de lectura e introducción de un codon stop, lo que resulta en cambios patológicos severos en la mineralización y maduración del esmalte. La amelogenesis imperfecta ligada a X es un defecto hereditario en el esmalte, y sólo el 5% de las familias afectadas con AI muestran este patrón, caracterizado por su variabilidad fenotípica los pacientes presentan defectos hipoplásicos, en el esmalte como fosas y ranuras y/o defectos en el contenido mineral como hipomaduración^{7, 8}. Un interesante factor en la AI ligada a X es la expresión variable que presenta tanto en dientes temporales como en permanentes. Como es un rasgo ligado a X los hom-

bres afectados no pueden pasar su condición a sus hijos, pero es transmitida a toda la generación femenina. El fenotipo depende altamente del sexo de la persona afectada. Las mujeres generalmente presentan ranuras verticales en el esmalte atribuidas a grupos de ameloblastos funcionando alternadamente bajo el control del gen amelogenina normal o mutante, un fenómeno llamado *lionización*^{9, 10}.

La identificación de los genes responsables para las formas de AI ligada a X y autosómica dominante han contribuido al mayor entendimiento de la patogénesis de la enfermedad; sin embargo, dadas las diversas manifestaciones clínicas, es importante encontrar la relación que puede existir entre el genotipo y fenotipo en esta entidad, lo cual nos pueden conducir a profundizar en el proceso que dirige el desarrollo anormal del esmalte dental. Por tanto, el propósito de esta investigación fue estudiar las mutaciones presentes en el gen AMEL, modo de herencia y fenotipo en una familia con amelogenesis imperfecta, mediante el uso de técnicas de genética molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

La población estuvo conformada por una familia que presentaba amelogenénesis imperfecta, residente en Bogotá D. C. y procedente de Monguí, Boyacá. Dicho grupo familiar estaba compuesto por 33 individuos de cuatro generaciones de los cuales 13 presentaban la anomalía. Se tomaron como muestra los individuos III7, IV6 y IV7, además de un individuo sano control. El árbol genealógico fue construido utilizando el programa Cyrillic 2.1. Previa firma del consentimiento informado por parte de los individuos participantes se les tomaron 10 ml de sangre periférica por venopunción, y posteriormente se les realizó la extracción del DNA genómico de leucocitos mediante el kit Wizard Genomic Purification System (Promega).

Amplificación por PCR

Una vez extraído el DNA se llevó a cabo la amplificación de los siete exones del gen de la amelogenina localizado en el brazo corto del cromosoma X, utilizando los primers diseñados mediante el programa Gene Fisher Program (Primers Profile-Data Shett) Tabla 2. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usó como template 1 ug de DNA genómico, 1 unit /ul de Amplitaq (Perkin Elmer) en buffer II 10X, 100 mM de cada primer, 100 mM de cada uno de los dideoxi, 25 mM de cloruro de magnesio (Gene Applied Biosystem) en un volumen de 25 ul, bajo las siguientes condiciones: una denaturación inicial a 94°C por 15 min, seguida por una denaturación de 94°C por 1 minuto, anillamiento a 60°C por 2 minutos y 72°C por 2 min durante 30 ciclos, seguido por una extensión final a 72°C por 7 min. La amplificación de los exones 4, 5 y 6 fue realizada por la técnica Nested PCR con el fin de evitar la amplificación de la región homóloga del cromosoma Y. La verificación de los

Tabla 2
Primers diseñados mediante el programa Gene Fisher Program (Primers Profile-Data Shett) para amplificación con PCR de los siete exones del gen amelogenina.

Exón	Secuencia (5' – 3')
Exón 1	F GCCTTATGTCTGATCATAGC R CTGTGAAATGTGGCCAA
Exón 2	FAAACAAATGGCTCCATCCTTC R CCTTTCAAGGGTCCCTTCCA
Exón 3	FTGGGATGCTGTCCAAAGATC R TAAACTGGGAAGCTGGTGGT
Exón 4+5 F	F ACAGCTGGTTGGAGTCACCTGAGCCAAT R TCGACTACCTTTGTAGCCTGGTTCAG
Exón 4+5 N	F ACACAGTGCCTGTACACAGGAAGCA R CGGCCTGCAGGGAATAAGGAACAAAATGTC
Exón 6 F	F ACAGCTGGTTGGAGTCACCTGAGCC R TCGACTACCTTTGTAGCCTGTTTCAG
Exón 6 N	F TTCTCTGGTTGGAGTCACCTGAGCCAA R GCACCATTTTCACAGGATTTGCATTG
Exón 7	F ACGGGAAATCTCTTCAAAAA R TTCCCCTCTCATCTTCTGAT

productos de PCR se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

Análisis SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)

Previos estudios reportan tres mutaciones puntuales mediante el análisis SSCP de los exones 5 y 6 del gen de la amelogenina⁵. Los productos de PCR del exon 6 del gen AMEL (539 pb) fueron reducidos de tamaño usando la enzima de restricción *Alu I*, (debido a la sensibilidad de la técnica se debe utilizar un producto máximo de 300 pb ya que ésta sólo detecta el 30% de las mutaciones), antes de realizar la electroforesis, en gel de poliacrilamida al 6% no denaturante, con los productos de PCR de los exones 5 y 6. Una cantidad de 2 ml de producto de PCR se adicionaron a 8 ml de Buffer SSCP. Las muestras fueron previamente denaturadas a 94°C por 5 min y enfria-

das en hielo inmediatamente. Posteriormente éstas fueron cargadas en cada uno de los pozos del gel en una cantidad de 5 ml y fueron corridas por 5 horas a 4°C. Luego el gel fue teñido según el protocolo del sistema de tinción con plata de BioRad Biosystems y fue secado al vacío, para posteriormente ser analizado.

SECUENCIAMIENTO

Para confirmar la ausencia o presencia de mutaciones en el gen AMEL, se realizó el secuenciamiento directo de los productos de PCR de los 7 exones previa purificación con ExoSAP-IT (USB Corporation), según las instrucciones del fabricante, utilizando secuenciador ABI PRISM 3100 sequencer, (Applied Biosystems Inc). Luego las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el sequencer Software versión 3.2. del mismo equipo. (La secuencia comple-

ta del gen amelogenina utilizada en este estudio se encuentra en el Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> No. de acceso AY040206).

RESULTADOS

El pedigree mostró un patrón de herencia ligado a X (figura 1). En esta familia conformada por 33 miembros, 6 estaban afectados por amelogénesis imperfecta. El fenotipo dental observado en los probandos individuos III-8, IV6 y IV7, corresponde a un defecto de tipo hipoplásico en el que se observan bandas amarillo-café, con un aspecto brillante y ligeras líneas verticales (figura 2). En el segmento posterior a nivel del tercio oclusal de todos los dientes, se observan bandas de color blanco tiza. En el paciente III 7 el tamaño y la morfología de los dientes observada son normales. En la figura 3 se muestra la verificación de la amplificación de cada exón de los individuos estudiados. No se identificaron mutaciones en los siete exones del gen amelogenina en ninguno de los pacientes estudiados. Estos exones fueron analizados mediante las técnicas de SSCP (figura 4) y secuenciamiento. El análisis de los electroesferogramas muestra que corresponden a la secuencia normal del gen amelogenina.

DISCUSIÓN

El énfasis de la mayoría de los estudios que se han realizado en AI ha sido identificar las mutaciones responsables que dan lugar a un fenotipo en particular, esto requiere entre otros, la secuenciación de un gen hasta que una mutación pueda ser identificada y caracterizada. Varios estudios realizados en familias con mutaciones en el gen amelogenina presentan un fenotipo ya sea hipoplásico o hipomineralizado¹¹. El análisis del pedigree en el presente estudio, muestra un mecanismo de herencia ligado a X. Sin embargo, los análisis moleculares realizados, no muestran mutaciones en ninguno de los

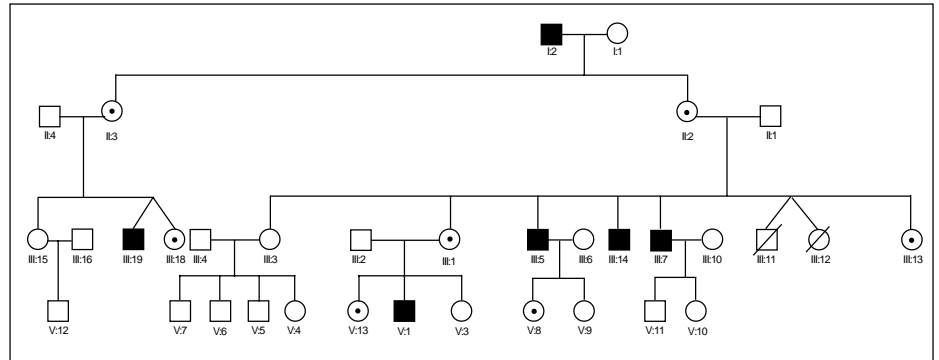


Figura 1. Árbol genealógico de la familia, el cual sugiere una herencia ligado a X. Los individuos afectados se presentan en color negro y los individuos sanos en color blanco.



Figura 2. Paciente afectado, que muestra bandas claras y oscuras de color amarillo, verticales, los dientes posteriores se presentan menos afectados con manchas más blanquecinas.

siete exones estudiados. Estos resultados confirman una vez más que la amelogénesis imperfecta (AI) es un grupo diverso de condiciones clínicas y genéticas que afectan el desarrollo del esmalte dental¹² y que dada la gran diversidad de manifestaciones clínicas y mutaciones a nivel del ADN se considera una condición con una gran heterogeneidad genética. Recientes resultados



Figura 3. Fotografía de los productos de PCR del exón del gen AMEL. La línea 1 corresponde al individuo III-8. La línea 2, individuo IV-6 y la línea 3, al individuo IV-7. Las líneas 4 y 5 a los individuos control. La línea 6 al marcador de peso molecular.

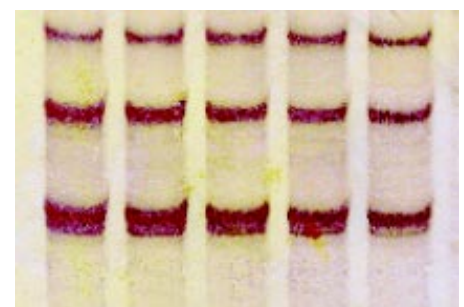


Figura 4. SSCP del exón 6.

de varios estudios, muestran como estas variaciones en el fenotipo se presentan entre diferentes miembros de una misma familia e inclusive entre cada diente en el mismo individuo.

En un reciente estudio Wrigth *et al.*, 2003¹³, hacen una correlación de genotipo-fenotipo en amelogénesis imperfecta, y describen diferentes fenotipos relacionados con diferentes mutaciones del gen AMEL, estos fenotipos varían considerablemente en sus factores primarios y severidad,

posiblemente debido a que los hombres afectados expresan sólo un alelo mutante mientras las mujeres muestran un patrón de mosaicismo por inactivación del cromosoma X (lionización). Los fenotipos entre hombres y mujeres varían marcadamente en apariencia. Las mujeres heterocigotas se muestran menos afectadas que los hombres, ellas exhiben bandas verticales alternadas de esmalte normal y anormal. En los hombres se encuentra un esmalte duro, glaseado con superficie lisa pero tan delgado que su superficie varía entre blanco amarillento a amarillo. En este estudio el fenotipo encontrado se presenta menos severo en los dientes posteriores. En contraste en los dientes anteriores se presentan bandas de color amarillo más marcadas, intercaladas con otras de color mucho más claro o de aspecto normal, coincidiendo con el efecto de lionización^{9, 10}. Aunque dentro de los fenotipos relacionados con mutaciones en el gen de la amelogenina, como se dijo anteriormente, se encuentra el hipoplásico, ha sido reportado también que diferentes mutaciones en el gen de la amelina producen amelogenesis de este tipo¹⁵⁻¹⁹, lo que cataloga a la amelogenesis imperfecta como una entidad genética compleja e indica claramente la necesidad de investigar su etiología a nivel molecular y la relación entre el fenotipo AI y mutaciones en los genes involucrados con la formación del esmalte.

Sin embargo, la demarcación entre fenotipos no siempre es exacta, existen algunos entrecruzamientos entre los tipos de defectos hipoplásico, hipomaturativo e hipomineralizado. El fenotipo descrito para los hombres de diferentes familias estudiadas es principalmente un tipo hipomineralizado/hipomaturativo con varios grados de hipoplasia. La presencia de un fenotipo hipoplásico ligeramente entremezclado con un fenotipo hipocalcificado, en el presente estudio, soporta y confirma los estudios de la importancia de

la amelogenina en el desarrollo de un espesor normal del esmalte¹⁹. Sin embargo, el hecho de no haber encontrado en este estudio algunas de las mutaciones reportadas en los 7 exones del gen amelogenina, sugiere que la causa posible de este fenotipo hipoplásico encontrado en esta familia puede ser debido a mutaciones en las secuencias intrónicas del gen AMEL, sus regiones promotoras o la señal peptídica, ya que de acuerdo a los últimos reportes, mutaciones intrónicas en este gen, están involucradas con los sitios en donde se lleva a cabo el splicing o maduración del RNA mensajero y posterior síntesis de la proteína, es decir, estos sitios podrían participar en el proceso.

La obtención de más individuos afectados de la familia y no afectados como controles permitirán llevar a cabo una genotipificación con otros marcadores en el cromosoma X, mediante lo cual se podría determinar si esta condición está asociada definitivamente a este cromosoma o no. Se recomienda adicionalmente hacer un análisis de ligamiento para otros genes tales como los genes que codifican para la ameloblastina, amelina o tuftelina. La elucidación de la correlación fenotipo-genotipo de la AF permitirá un mayor acercamiento al diagnóstico y futuro tratamiento de esta patología que cada vez es más frecuente en la población.

BIBLIOGRAFÍA

1. Uchida T, Tanabe Y, Fukae M, Shimizu M. Immunocytochemical and immunochemical detection of a 32 kDa nonamelogenin and related proteins in porcine tooth germs. *Arch Histol Cytol* 1991; 54: 527-38.
2. Robinson C, Shore RC, Kirkham J and Stonehouse NJ. Extracellular processing of enamel matrix proteins and the control of crystal growth. *J Biol Buccale* 1990; 18: 355-61.
3. Witkop CJ. *Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification*. *J Oral Pathol* 1989; 17: 547-53.
4. Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih/entrez/OMIM>.
5. Lench NJ, Brook AH. DNA Diagnosis of linked amelogenesis imperfecta (AIH). *Journal of Oral Pathology and Medicine* 1997; 26: 135-7.
6. Crawford PJM, Aldred MJ. *X-linked amelogenesis imperfecta. Presentation of two Kindreds and a review of the literature*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 445-9.
7. Hart PS, Hart TC, Simmer JP, Wright JT. *Establishment of a nomenclature for X-linked amelogenesis imperfecta*. *Arch Oral Biol* 2002; 9: 19-23.
8. Lagerstrom-Fermer M, Nilson M, Backman B et al. Amelogenin signal peptide mutation: Correlation between mutations in the amelogenin gene (AMGX) and manifestations of X-linked amelogenesis imperfecta. *Genomics* 1995; B26: B159-62.
9. Witkop CJ Jr. *Partial expression of sex-linked recessive amelogenesis imperfecta in females compatible with the lyon hypothesis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967; 23: 174-82.
10. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse *mus musculus* L. *Nature* 1961; 190: 372-3.
11. Hart PS, Hart TC, Gibson C, Wright JT. *Mutational analysis of X-linked amelogenesis imperfecta in multiple families*. *Arch Oral Biol* 2000; 47: 255-60.
12. Witkop CJ Jr. *Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification*. *J Oral Pathol* 1989; 17: 547-53.
13. Wright JT, Hart PS, Aldred MJ, Seow K, Crawford PJ, Hong SP et al. *Relationship of phenotype and genotype in X-linked amelogenesis imperfecta*. *Connect Tissue Res* 2003; 44: 72-8.
14. Ravassipour DB, Hart S, Hart TC, Ritter AV et al. *Unique enamel phenotype associated with amelogenin gene (AMELX) codon 41 point mutation*. *J Dent. Res* 2000; 79:1476-81.

CORRESPONDENCIA

Sandra Gutiérrez
Facultad de Odontología,
Centro de Investigaciones
Odontológicas.
Pontificia Universidad Javeriana,
Carrera 7ª # 40-62, edificio 26.
Teléfono: +57-1-3208320,
extensión 2901.
Bogotá, D. C., Colombia
Correo electrónico
s.gutierrez@javeriana.edu.co

Recibido para su publicación:
abril de 2006

Aceptado para su publicación:
junio de 2006