

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Programa Macro de Investigación

SEMINARIO DE GRADUACIÓN

Biología Molecular en Odontología: Manifestaciones orales de desórdenes multifactoriales del esmalte dental

Directora de Seminario:

Dra. Gina Murillo Knudsen

Profesora asociada:

Dra. Sandra Silva de la Fuente

Sustentantes:

Verónica Barrantes Hidalgo A60754

Mariana Bonilla Valverde B11079

Ericka Díaz Cubero B02106

Ericka Gutiérrez Centeno A73049

Fiorella Mora Piedra B14428

Baly Seo Park B16247

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio Brenes, Costa Rica

San José, Costa Rica

Año 2017

HOJA DE APROBACIÓN
MEMORIA
SEMINARIO DE GRADUACIÓN

“Seminario teórico- demostrativo: Biología Molecular en Odontología: Manifestaciones orales de desórdenes multifactoriales del esmalte dental”

Sustentantes:

Verónica Barrantes A60754

Mariana Bonilla B11079

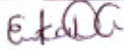
Ericka Díaz B02106

Ericka Gutiérrez

Fiorella Mora Piedra B14428

Baly Seo Park B16242

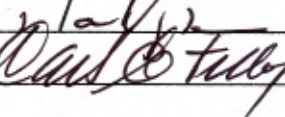
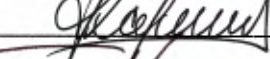
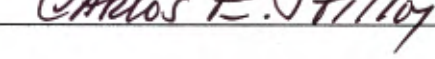
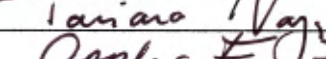
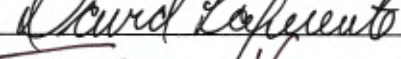
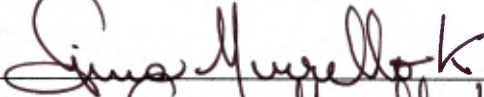
Fecha: _____



Miembros del Tribunal

Nombre:

Firma:



Teléfonos: 2511-8102/2511-8051/2511-5439

Sitio web: www.fodo.ucr.ac.cr

E-mail: macro.odontologia@ucr.ac.cr

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Vicerrectoría de Investigación
Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información (SIBDI)

Autorización para la digitalización, inclusión y publicación de trabajos finales de graduación (TFG) en el acervo digital del Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información de la Universidad de Costa Rica (SIBDI-UCR).

Los abajo firmantes, en su condición de autores del Trabajo Final de Graduación: Biología Molecular en Odontología: Manifestaciones orales de desórdenes multifactoriales del esmalte dental.

AUTORIZAMOS de forma gratuita al SIBDI-UCR, a digitalizar e incluir dicho TFG en el acervo digital del SIBDI-UCR y a publicarlo a través de la página web u otro medio electrónico, para ser accesado según lo que el SIBDI defina para su consulta o divulgación. Dicho texto se publicará en formato PDF, o en el formato que en su momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre y gratuito, permitiendo su consulta e impresión, pero no su modificación. Los autores del TFG, garantizan al SIBDI-UCR que la tesis es el trabajo original que sirvió para la obtención de su Título, que no infringe ni violenta ningún derecho de terceros.

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Para uso interno. Número de tesis: _____

DEDICATORIA

A Dios por permitirnos culminar nuestra formación académica, por ser nuestra guía, fortaleza, y brindarnos los medios para llevar a cabo este Seminario de Graduación.

A nuestros padres y familiares por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles.

RECONOCIMIENTOS

A la Dra. Gina Murillo Knudsen y a Dra. Sandra Silva de la Fuente por guiarnos de la mejor forma durante el desarrollo del Seminario de Graduación, por el profesionalismo demostrado a través de su conocimiento, experiencia y por su calidad humana.

San Pedro, 15 de noviembre de 2017

Señores
Programa Macro de Investigación
Universidad de Costa Rica

Estimados señores:

Yo, Carla Salguero Achí, cédula 3-441-459, profesional en Filología Española y miembro de la Asociación Costarricense de Filólogos, código n. ° 211, hago constar que he corregido filológicamente el siguiente trabajo final de graduación: *Biología Molecular en Odontología: Manifestaciones orales de desórdenes multifactoriales del esmalte dental*, cuyos sustentantes son:

Verónica Barrantes Hidalgo, carné A60754
Mariana Bonilla Valverde, carné B11079
Ericka Díaz Cubero, carné B02106
Ericka Gutiérrez Centeno, carné A73049
Fiorella Mora Piedra, carné B14428
Baly Seo Park, carné B16247

Asimismo, después de haber efectuado las correcciones y las sugerencias pertinentes para una mayor comprensión del texto, no me responsabilizo por la falta de acatamiento ni por las modificaciones que se le hayan realizado a esta tesis después de mi labor como filóloga.

Atentamente,



Carla Salguero Achí
Céd. 3-441-459
Filología Española
Código ACFIL n. ° 211

ÍNDICE GENERAL

Portada.....	i
Hoja de aprobación de memoria.....	ii
Hoja de autorización para la digitalización de TFG-SIBDI.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Reconocimientos.....	v
Hoja de revisión por el filólogo.....	vi
Índice general.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de abreviaturas.....	ix
Resumen.....	x
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	
Justificación.....	1
Planteamiento del problema.....	1
Objetivos del estudio.....	2
Antecedentes del problema.....	3
Capítulo 2. MARCO TEÓRICO	
Estructura y función de ácidos nucleicos.....	5
Genética Mendeliana.....	9
Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	15
Enfermedades hereditarias en odontología.....	23
Otras afecciones en la estructura dental	
Fluorosis dental.....	37
Hipoplasia incisivo-molar.....	51
Caries dental.....	55
Capítulo 3. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN.....	63
Capítulo 4. DESARROLLO	
Resultados.....	65
Discusión.....	77
Conclusiones.....	79
Recomendaciones.....	81
Capítulo 5. PARTE FINAL	
Cronograma de actividades.....	82
Factores facilitadores/ obstáculos y dificultades.....	84
Bibliografía.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía frontal extraoral e intraoral de amelogenesis imperfecta.....	65
Figura 2. Fotografías oclusales de la arcada superior e inferior.....	65
Figura 3. Firma de consentimiento informado y recolección de la muestra.....	66
Figura 4. Radiografía panorámica de amelogenesis imperfecta	66
Figura 5. Genograma del caso clínico	67
Figura 6. Toma de muestras: (A)para prueba de paternidad (B)para la extracción de ADN..	68
Figura 7. Materiales y muestras para la realización de extracción de ADN	68
Figura 8. Proceso de centrifugación y agitación.....	69
Figura 9. Colocación de Sucrosa 1X, cloroformo	69
Figura 10. Proceso de centrifugación.....	70
Figura 11. Separación de fases orgánica y acuosa.....	70
Figura 12. Marcadores genéticos	71
Figura 13. 2XMaster Mix	71
Figura 14. Preparación de las muestras.....	72
Figura 15. Equipo de PCR	72
Figura 16. Colocación de azul de bromofenol en las muestras de PCR	73
Figura 17. Minicentrífuga Labnet-PrismTM.....	73
Figura 18. Agarosa y molde para pozos.....	74
Figura 19. Equipo de desionizador de agua estéril	74
Figura 20. Colocación de las muestras en los pozos.	75
Figura 21. Equipo de electroforesis.....	75
Figura 22. Espectro con luz ultravioleta de los genes amplificados.....	76

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A: Adenosina

T: Timina

C: Citosina

U: Uracilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

mARN: Ácido ribonucleico mensajero

tARN: Ácido ribonucleico de transferencia

rARN: Ácido ribonucleico ribosómico

PGH: Proyecto de Genoma Humano

ELSI: Ethical, Legal and Social Implications

PCR: Técnica de Reacción de Cadena de la Polimerasa

DNTP: Desoxirribonucleotidos trifosfatados

EGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial

ENAM: Enamelina

FAM20C: Familia con similitud de secuencia 20-C

TUFT1: Tuftelina

AMBN: Ameloblastina

AMELX: Amelogenina

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

OPN: Osteopontin

AI: Amelogénesis imperfecta

DI: Dentinogénesis imperfecta

HIM: Hipomineralización Inciso-Molar

FPM: Primeros Molares Permanentes

PI: Incisivos Permanentes

AD: Autosómico dominante

AR: Autosómico recesivo

OMS: Organización Mundial de la Salud

CONAPROSAL: Cooperativa Nacional de Productos de Sal

COOPROSAL: Cooperativa de Productos de Sal

INCIENCISA: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

CPOD: Índice de Caries, Perdido, Obturado o Defecto estructural

EAPD (European Association of Pediatric Dentistry)

GTF: Glucosiltransferasas

FTF: Fructosiltransferasas

RESUMEN

Durante el siglo XIX y XX se dio el descubrimiento de los ácidos nucleicos mediante diversos estudios y análisis de células y sustancias como el pus. Se conoció que los ácidos nucleicos son polímeros lineales de nucleótidos y que sus funciones consisten en el almacenamiento, la expresión y la replicación de la información biológica. El ADN y ARN son los ácidos nucleicos que existen en los seres vivos; el ADN es la molécula que lleva codificada la información genética, la cual gobierna actividades celulares a través de la formación de mensajes de ARN. La información genética que se encuentra contenida en la molécula de ARN se traduce en proteínas. Las unidades hereditarias o genes se transmiten con toda la información y uno de los factores resulta dominante sobre el otro recesivo.

Se estudiaron las enfermedades hereditarias en odontología como la amelogénesis imperfecta: desorden genético que produce afectación en el desarrollo del esmalte. También se pueden mencionar la dentinogénesis imperfecta, la cual es un desorden que se da en la formación de la dentina, sigue un patrón de transmisión autosómico dominante. Otras enfermedades hereditarias son la fluorosis, el síndrome incisivo-molar y la caries dental.

La Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' → 3'. Esta técnica ha permitido una variedad de estudios en temas relacionados con la microbiología oral con objetivos en el área de endodoncia, periodoncia y quirúrgicos; también se ha utilizado en el estudio de virus, hongos y parásitos de difícil cultivo y en el área de diagnóstico de enfermedades y en oncología bucodental. Además, ha contribuido enormemente en el estudio de bacterias en la placa bacteriana e infecciones bucodentales.

INTRODUCCIÓN

Justificación

La ciencia en general está en un constante estado de actualización, en el cual teniendo la investigación como herramienta, se puede dar paso a una serie de descubrimientos que permitan comprender la complejidad de la vida humana desde diversas aristas.

La genética es una rama de gran amplitud que corresponde a un área donde regularmente se realizan numerosas investigaciones, que tal y como se mencionaba anteriormente, permiten un acercamiento a un mayor conocimiento. Desde la academia es importante incentivar una visión más amplia del trabajo que se puede realizar desde la Odontología, que permitan ir más allá de los horizontes marcados por un plan de estudios, que se basan en generalidades de la ciencia odontológica. Sin embargo, está claro que más allá de esos horizontes se encuentran áreas de gran importancia, que muchas veces puedan ser poco abordadas.

Una actualización del tema desde una posición de formación, permite integrar una serie de conocimientos desde un nivel más generalizado hacia especificidades que promuevan: conocimiento en el área, bases para futuras investigaciones, interés por temas similares y motivación hacia una actitud investigativa.

Planteamiento del problema

Basado en la evidencia que la práctica diaria del profesional en odontología demuestra, se han observado manifestaciones en el esmalte dental producto de desórdenes multifactoriales, por ende, el presente Seminario de Graduación pretende mediante una

demostración teórica, abordar el problema sobre los aspectos biomoleculares implicados en estos desórdenes que se han vuelto de gran relevancia para la Odontología.

Objetivos del estudio

General

- Abordar los mecanismos básicos de la Biología Molecular en la homeostasis del organismo humano para el entendimiento de algunas lesiones orales.

Específicos

- Promover la discusión y el conocimiento sobre la temática del esmalte normal, amelogénesis imperfecta, así como otras lesiones tanto congénitas como adquiridas del esmalte.
- Distinguir las mutaciones específicas presentes en las familias costarricenses afectadas con amelogénesis imperfecta.
- Indicar la forma en la cual el daño molecular afecta las condiciones analizadas en este Seminario de Graduación
- Conocer los mecanismos genéticos que presentan asociación con las lesiones estudiadas.

Antecedentes del problema

El siguiente Seminario de Graduación se deriva de la línea de investigación de Amelogénesis imperfecta en familias costarricenses y sus determinantes genéticos, cuyas investigadoras principales han sido la doctora Gina Murillo Knudsen y la doctora Sandra Silva de la Fuente.

Anteriormente en Costa Rica, la amelogénesis imperfecta era una enfermedad que no contaba con una línea de investigación real y consistente; por consiguiente, surge la

necesidad de estudiar la amelogenésis imperfecta en las familias costarricenses con un enfoque genético.

Esta línea de investigación ha permitido la recopilación y documentación de casos de amelogenésis imperfecta en las familias costarricenses, que han permitido un mayor conocimiento de la enfermedad tanto a nivel nacional e internacional con el fin de tener un mejor criterio diagnóstico, desarrollar un mejor plan de tratamiento y finalmente realizar el tratamiento más idóneo.

MARCO TEÓRICO

Ácidos Nucleicos

Historia del descubrimiento de los ácidos nucleicos:

La historia de los ácidos nucleicos dio inicio en el año 1869, con los estudios del bioquímico sueco Friedrich Miescher, a través de análisis de pus. Veinte años más tarde Richard Altmann obtuvo el primer material libre de proteína, al cual dio el nombre de ácido nucleico. Jules Piccard, compañero de Miescher hizo más estudios con la nucleína y encontró que también contenía guanina e hipoxantina ¹.

Albrecht Kossel y A. Neumann aislaron la adenina (A) y la timina (T) de la glándula del timo. Ascoli y Steudel descubrieron la citosina (C) y el uracilo (U). En 1909 y 1930 Levene aisló la ribosa y la desoxirribosa fueron aisladas, además determinó que en todos los nucleósidos la pentosa era una ribosa y nombró al ácido original como ácido ribonucleico (ARN) ¹.

Los nucleósidos fueron identificados como derivados de las bases A, C, G y U. En 1929, Levene identificó la desoxirribosa del ácido nucleico aislado del tejido de la pantorrilla y a este lo denominó ácido desoxirribonucleico (ADN)¹.

En 1953, James Watson y Francis Crick descifraron la estructura del ADN; Watson propuso que el número de nucleótidos en la célula unitaria favorecía una hélice de doble cadena. Crick dedujo de los datos del patrón de difracción que la estructura tiene una asimetría tal que las cadenas equivalentes corren en direcciones opuestas a lo largo del eje longitudinal ¹.

Watson manipuló modelos de las bases, apareando la A con la T y la G con la C y encontró una relación simple y convincente que involucraba dos puentes de hidrógeno para una pareja

A≡T y tres puentes de hidrógeno para una pareja G≡C. J. Gulland postuló que los puentes de hidrógeno que unían a los grupos hidroxilo de cada nucleótido, están unidos por un enlace fosfodiéster del hidroxilo 5´ al hidroxilo 3´ de su otro vecino¹.

Alexander Dounce, en 1950, postuló que el ARN era el templado que dirigía la síntesis de proteínas celulares y que una secuencia de tres nucleótidos especificaba solo un aminoácido.¹

El bioquímico Erwin Chargaff analizó la composición de los nucleótidos del ADN por medio de la cromatografía en papel, con lo cual mostró que los nucleótidos no se presentan en cantidades iguales y que las proporciones exactas de los cuatro nucleótidos podrían variar de una especie a otra. Gracias a estos hallazgos se conoce la posibilidad de que la organización precisa de los nucleótidos dentro de una molécula de ADN genere a ésta la especificidad genética ².

Con los experimentos de Chargaff se demostró que la cantidad de residuos de adenina en las muestras de ADN era igual a los residuos de timina, mientras que la cantidad de residuos de guanina era igual a la cantidad de residuos de citosina. La proporción de las purinas respecto a las pirimidinas era de alrededor de 1:1 ².

Las moléculas analizadas procedieron del ser humano, buey, salmón, gallina, trigo, levadura y ciertas bacterias. La información aportada por Erwin Chargaff se tornó obvia cuando se analizó seriamente la estructura tridimensional del ADN ².

Estructura y función de los ácidos nucleicos

El núcleo celular es un compartimiento limitado por una membrana que contiene el genoma en las células eucariotas, junto con la maquinaria para la duplicación del ADN y para la

transcripción y procesamiento del ARN. En el núcleo celular se encuentran los ácidos nucleicos que forman el ARN y ADN (3).

Los ácidos nucleicos son macromoléculas construidas con series de largas cadenas de monómeros llamados nucleótidos. Los ácidos nucleicos sirven sobre todo para el almacenamiento y la transmisión de información genética, aunque también pueden tener funciones estructurales o catalíticas. Existen dos tipos de ácidos nucleicos en los organismos vivos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). El primero es el material genético de todos los organismos celulares, aunque el segundo tiene esa función en muchos virus. En las células, la información almacenada en el ADN se usa para gobernar las actividades celulares a través de la formación de mensajes de ARN (4).

ADN

Está formado por dos cadenas de nucleótidos extremadamente largas que contienen las bases adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C). Las cadenas se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre las bases; la adenina se une con la timina y la guanina con la citosina. Esta asociación estable forma una estructura helicoidal doble. La estructura helicoidal doble del DNA se compacta en la célula por la asociación con histonas y se compacta aún más en los cromosomas.

Una célula diploide humana contiene 46 cromosomas. La unidad fundamental del ADN es un gen, que puede definirse como la secuencia de nucleótidos de ADN que contiene la información para la producción de una secuencia ordenada de aminoácidos para dar origen a una cadena polipeptídica. Las proteínas codificadas por un gen único pueden dividirse más tarde en varias proteínas con actividad fisiológica diferente. Se está acumulando información a tasas aceleradas con respecto a la estructura de los genes y de su regulación (5).

ARN

El ARN es un polinucleótido compuesto por ribonucleótidos de adenosina, guanina, citosina y uracilo. El ARN difiere del ADN porque es una molécula monocatenaria, tiene uracilo en lugar de timina y su fracción de carbohidrato es ribosa en lugar de 2'-desoxirribosa.

Su estructura primaria es una cadena de nucleótidos, sin embargo, puede que se enrolle en doble hélice para formar una estructura secundaria y su estructura terciaria se presenta cuando se asocia a proteínas. Su capacidad de enrollarse en sí mismo o formando lazos se debe a la secuencia de las bases nitrogenadas

La producción de ARN a partir de DNA se denomina transcripción. La transcripción puede conducir a la formación de varios tipos de ARN lo que incluye: ARN mensajero (mARN), ARN de transferencia (tARN), ARN ribosómico (rARN) y otros tipos de ARN. La transcripción es catalizada por varias formas de ARN polimerasa (5).

En todos los organismos procarióticos y eucarióticos, hay cuatro clases principales de moléculas de ARN: mensajero (mARN), de transferencia (tARN), ribosómico (rARN), y ARN pequeños. Cada uno difiere de los otros en su abundancia, tamaño, función y estabilidad general:

- ARN mensajero (mARN): Todos los miembros de la clase funcionan como mensajeros que transmiten la información en un gen hacia la maquinaria sintetizadora de proteína, donde cada mARN sirve como una plantilla para una secuencia específica de aminoácidos que se polimerizan para formar una molécula de proteína específica, llamado gen.

- ARN de transferencia (tARN): Las moléculas de tARN sirven como adaptadoras para la traducción de la información en la secuencia de nucleótidos del mRNA hacia aminoácidos específicos. Hay al menos 20 especies de moléculas de tARN en cada célula, y por lo menos una (y a menudo varias) corresponde a cada uno de los 20 aminoácidos requeridos para la síntesis de proteína.
- ARN ribosómico (rARN): Un ribosoma es una estructura nucleoproteínica citoplásmica que actúa como la maquinaria para la síntesis de proteínas a partir de las plantillas de mRNA. En los ribosomas, las moléculas de mRNA y tARN interactúan para traducir la información transcrita desde el gen durante la síntesis de mRNA hacia una proteína específica. Durante periodos de síntesis activa de proteína, muchos ribosomas pueden asociarse con cualquier molécula de mRNA para formar un montaje llamado el polisoma (6).

Síntesis de proteínas

Cuando el ADN ha de trasladar el mensaje necesario para que en el citoplasma se forme una proteína, las 2 cadenas del ADN se separan en la zona que codifica el tipo y orden de los aminoácidos de esa proteína. Ese mensaje va codificado en una de las dos cadenas, y ese mensaje se va a transcribir al ARNm, que lo trasladará al citoplasma para formar la proteína que codifica ese gen (7).

El primer paso en la síntesis de proteínas es la síntesis de una molécula de ARN usando como molde un segmento de una de las cadenas del ADN. Este proceso está mediado por la enzima ARN polimerasa y siempre ocurre en la dirección 5' a 3' (7).

En las células procariotas las moléculas de ARN que se transcriben de los genes son inmediatamente traducidas a nivel de los ribosomas para sintetizar las proteínas, mientras que en los eucariontes, los ARN transcritos son transportados del núcleo al citoplasma, a

través de la membrana nuclear. La molécula de ARN se procesa para dar lugar al ARNm maduro que se exporta del núcleo de la célula al citoplasma y donde luego se traduce en proteína.

La información genética contenida en cada molécula de ARNm se traduce en proteínas a través de un proceso enzimático que se realiza en los ribosomas. En la traducción participan el ARNr que como se ha mencionado produce ribosomas con varias proteínas; el ARN mensajero acarrea la información genética contenida en genes específicos del ADN y los ARN de transferencia, estos últimos sirven como adaptadores específicos para cada aminoácido durante el ordenamiento lineal de éstos en la síntesis de proteínas, conforme la secuencia del ARN mensajero (7).

La síntesis de proteínas es la traducción de la secuencia de nucleótidos presentes en el ARNm, donde su secuencia es la responsable de realizar la codificación en forma de tripletes de bases de acuerdo con el código genético, incorporando en cada paso de lectura un aminoácido de la proteína. Cada ARNt tiene una secuencia complementaria o anticodón para el codón del aminoácido, que le permite reconocer el codón correcto sobre el mRNA.

Genética Mendeliana

Los principios fundamentales de la genética fueron descubiertos por Gregorio Mendel, quien inició sus investigaciones hacia el año de 1856 utilizando el guisante (*Pisum sativum*) con la finalidad de observar cómo los caracteres individuales eran heredados (8).

Mendel pensaba que con el control del tipo de cruzas entre los diferentes individuos, se podría rastrear la herencia de ciertas características durante varias generaciones y, con esto, establecer los principios que explican su herencia o transmisión. Eligió deliberadamente características simples con formas claramente perceptibles y no intermedias, por ejemplo:

forma, coloración del albumen de la semilla, coloración de tegumento asociado al color de la flor, la forma de la vaina madura, color de la vaina madura, posición de las flores y longitud del tallo (8).

Para cada uno de los caracteres escogidos, Mendel obtuvo líneas de plantas que había cultivado durante dos años, para asegurar que fueran líneas puras. Una línea pura es una población que produce descendencia homogénea para el carácter particular en estudio (10).

Estos experimentos causaron un gran impacto en la comunidad científica, y le permitieron deducir que las características del organismo están determinadas por un par de factores, aportados por cada progenitor. Estas “unidades hereditarias” (genes) no se mezclan sino que se transmiten con toda la información, y uno de los factores resulta dominante sobre el otro recesivo, lo que da origen a la formulación de las leyes fundamentales de la herencia (11).

Es importante destacar que los genes son unidades de información sobre rasgos específicos, estos se transmiten de los progenitores a todos los descendientes; cada gen tiene una localización específica en un cromosoma, lo cual se denomina locus.

Las distintas formas moleculares de un mismo gen se conocen como alelos. Si los alelos de un par son idénticos se conocen como homocigotos y si son diferentes se habla de una condición heterocigota (12-13).

Los alelos, pueden presentarse como unidades dominantes (A) o recesivos (a), de modo que cuando se unen 2 alelos se define el genotipo, y se pueden encontrar 3 diferentes combinaciones (CAM): AA (homocigoto dominante), Aa (heterocigoto) y aa (homocigoto recesivo). Los rasgos estudiados en los experimentos de Mendel dejaban ver que uno de los dos alelos era dominante con respecto al otro. Si ambos aparecían juntos en la misma planta, el alelo dominante enmascaraba la existencia del recesivo (14).

Las Leyes de la herencia son tres que se pueden resumir de la siguiente manera: “Primera ley de Mendel o de la uniformidad” dice: si se cruzan dos razas puras para un carácter determinado, los descendientes de la primera generación son todos iguales entre sí; igual fenotipo, igual genotipo; e iguales, en fenotipo, a uno de los progenitores. Esta primera ley de Mendel escrita de otra forma puede esclarecer su significado: “los individuos son portadores de un par de alelos para cada gen. Los mismos se separan durante la formación de gametos (meiosis); con la fecundación, el nuevo individuo heredará un alelo de cada progenitor” (15-16).

“Segunda ley de Mendel o de la segregación.” Los caracteres recesivos, al cruzar dos razas puras, quedan ocultos en la primera generación, reaparecen en la segunda generación en proporción de 1:3 respecto a los caracteres dominantes. Los individuos de la segunda generación que resultan de los híbridos de la primera generación son diferentes fenotípicamente unos de otros, esta variación se explica por la segregación de los alelos responsables de estos caracteres, que en un primer momento se encuentran juntos en el híbrido y que luego se separan entre los distintos gametos.

“Tercera ley de Mendel o ley de la independencia de caracteres.” Los caracteres son independientes y se combinan al azar. En la transmisión de dos o más caracteres, cada par de alelos que controla un carácter se transmite de manera independiente de cualquier otro par de alelos que controlen otro carácter en la segunda generación, combinándose de todos los modos posibles (15).

Aplicación de las leyes de Mendel a la herencia humana

Se dice que la teoría de la segregación de Mendel es válida en la actualidad, sin embargo, la teoría de la asociación no es aplicable para todas las combinaciones de genes. Mendel

estudió rasgos con formas dominantes o recesivas; pero la expresión de otro tipo de rasgos no es tan sencilla (17).

Un alelo del par puede no ser totalmente dominante sobre su compañero, por lo cual el fenotipo del heterocigoto es de tipo intermedio entre los fenotipos de los dos homocigotos; esto se conoce con el nombre de dominancia incompleta. Además un alelo puede ser codominante y esto implica que un par de alelos no idénticos especifica dos fenotipos y se expresan de manera simultánea en los heterocigotos (11-17).

De acuerdo a las leyes de Mendel, los rasgos dominantes se expresan tanto en individuos heterocigotos como en homocigotos. En la herencia autosómico dominante tiene lugar cuando un gen anormal de uno de los padres es capaz de causar enfermedad, aunque el gen compatible del otro padre sea normal. El gen anormal domina el resultado del par de genes y origina la alteración, este es un gen autosómico dominante. Las enfermedades autosómico dominantes se presentan en heterocigotos, por lo que al menos uno de los padres debe tener la enfermedad. Puede afectar tanto a hombres como a mujeres y ambos padres pueden transmitir el defecto genético. La probabilidad de que uno de los hijos de la pareja padezca la enfermedad es de 50% (19).

La herencia autosómica recesiva requiere que el gen esté presente en uno de los autosomas, o pares de cromosomas 1 a 22. Afecta a hombres y mujeres por igual. En esta condición son necesarias dos copias del gen para que se presente una característica determinada, uno heredado de la madre y el otro del padre. Cuando una persona tiene sólo un gen recesivo es “portadora” del rasgo o enfermedad; sin embargo, el hecho de “portar” una copia del gen no le ocasiona padecer la enfermedad (15).

Las enfermedades ligadas al sexo se heredan a través de uno de los cromosomas sexuales (el cromosoma X o Y). Para un trastorno dominante ligado al cromosoma X: si el padre porta

el gen anormal X, todas sus hijas heredarán la enfermedad y ninguno de sus hijos varones la padecerá. Si la madre porta el gen anormal X, la mitad de sus hijos, masculinos o femeninos, heredará la tendencia a la enfermedad.

En otras palabras, si hay cuatro hijos (dos varones y dos mujeres) y la madre está afectada (un X anormal y tiene la enfermedad), pero el padre no, la expectativa estadística es de:

- Dos hijos (una mujer y un varón) con la enfermedad.
- Dos hijos (una mujer y un varón) sin la enfermedad.

Si hay cuatro hijos (dos mujeres y dos varones) y el padre está afectado (un X anormal y tiene la enfermedad), pero la madre no, la expectativa estadística es de:

- Dos niñas con la enfermedad.
- Dos niños sin la enfermedad.

En general, el término “recesivo ligado al sexo” se refiere al caso más específico de recesivo ligado al cromosoma X. Las enfermedades ligadas al cromosoma X se presentan por lo general en hombres. Éstos sólo tienen un cromosoma X, por lo que un solo gen recesivo en el mencionado cromosoma causará la enfermedad. Aunque el cromosoma Y es la otra mitad del par de genes XY del hombre, el cromosoma Y no contiene la mayoría de los genes del cromosoma X y, por tanto, no protege al hombre. Lo anterior se observa en enfermedades como la hemofilia y la distrofia muscular de Duchenne (15).

Proyecto del Genoma Humano

En 1983 el conocimiento del genoma humano era tan escaso que resultaba imposible en la práctica establecer un diagnóstico genético. Pronto surgió el proyecto del genoma humano, cuyo principal objetivo era obtener un mapa físico de nuestro genoma y conocer su

secuencia. En 1984 se iniciaron los contactos, pero hasta 1990 no se lanza el Proyecto Genoma Humano (PGH). Paralelamente se promueve también el programa ELSI para analizar las implicaciones éticas, sociales y legales del PGH. Como resultado de este programa se prohíbe la discriminación por razones genéticas y la propiedad privada de la información derivada del PGH. En febrero del 2001 se publica de forma independiente el primer gran borrador del genoma humano, resultado de la actividad de una empresa privada, el grupo Celera Genomics, dirigido por Craig Venter, y el consorcio público (HGP) liderado, entre otros, por Francis Collins. Los resultados de este proyecto tuvieron una gran repercusión en la opinión pública mundial. No obstante, aún falta mucho para que la información obtenida del PGH se “digiera” por completo. Hasta la fecha está secuenciado el 92% del total del genoma; el 8% sin secuenciar, corresponde a regiones de heterocromatina. Todos los cromosomas han sido ya secuenciados.

El genoma humano consta aproximadamente de 3 000 millones de pares de bases (pb); se calcula que existen entre 20 000 y 30 000 genes, aunque el número sigue oscilando y será necesario esperar bastante tiempo hasta llegar a una cifra definitiva (probablemente el número de proteínas de nuestro organismo duplique o triplique el número de genes, debido a que un gen puede dar lugar a diferentes proteínas mediante mecanismos tales como el splicing alternativo, que permite obtener, a partir de un mismo gen, diferentes ARNm y, por tanto, diferentes proteínas). Hoy son muchas las especies cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, lo que permite compararlos con el del hombre.

El genoma humano es mucho más complejo de lo que se podía prever pero, paradójicamente, su grado de complejidad no afecta a la parte del genoma que en principio se pensó que debía ser la más compleja: los genes que codifican proteínas. Así, la hipótesis de que a mayor complejidad de un organismo mayor sería el número de genes codificantes,

resultó ser falsa. Por ejemplo, el protozoo *Trichomonas vaginalis*, responsable de la tricomoniasis, tiene cerca de 60 000 genes, casi tres veces más que el hombre (15).

Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa

En Abril de 1983, Kary Mullis dio a conocer la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, que es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de ADN (20).

La PCR emula en un tubo de ensayo el proceso de síntesis de ADN, que tiene lugar en la naturaleza amplificando fragmentos de ácidos nucleicos de forma exponencial en horas, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines (21).

La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5´-> 3´ usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers) (20).

La técnica de PCR los elementos importantes en la reacción son: el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg +), una solución amortiguadora o buffer y H₂O: (22)

- El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Se debe recordar que las bases nitrogenadas son complementarias de tal forma que el ADN se estructura en una doble hélice. En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde

para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés.

- La ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. También hay otras enzimas que se utilizan como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTPs, Mg +, buffer y H₂O.
- Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente). Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los primers.

- Los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, comúnmente se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM.
- El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado.
- El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM.
- El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos (22).

Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR:

1. Desnaturalización: la muestra de ADN se calienta a 95-98° C durante 30-90 segundos, de tal modo que por la sensibilidad del ADN a temperaturas elevadas se rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras del ADN y éstas se separan. La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya. (reacción en cadena, fundamentos).
2. Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras: los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65° C).
3. Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa: se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la

complementariedad) en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (20).

Pasos del proceso de la PCR:

Inicio de la desnaturalización

Es necesaria una temperatura de 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de DNA, en el caso del DNA genómico, o el rompimiento de estructuras secundarias, en el cDNA. Esta temperatura se mantiene por 5 min al inicio de la PCR (23).

Ciclos de amplificación:

Un ciclo típico de PCR convencional consta de las tres temperaturas siguientes:

- 95°C: desnaturalización por unos 30 segundos.
- 55 a 60°C: alineación por 30 a 40 segundos.
- 72°C extensión, según la longitud del producto que se va amplificar, considerando la adición de 1 000 nucleótidos en 60 segundos.

Este ciclaje de temperatura se repite de forma continua por 30 a 35 ocasiones. Cada temperatura cumple con una función específica (23).

Desnaturalización

Se realiza a 95°C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de DNA, lo que permite el acceso de los *primers* a la cadena molde en sus secuencias complementarias. Esta temperatura se mantiene por 30 segundos (23).

Alineación

En esta fase, la temperatura se encuentra en un rango entre 55 y 65°C, en el cual la mayoría de los iniciadores hibridan; así, se genera la energía cinética necesaria para que los iniciadores busquen en las cadenas de DNA su secuencia complementaria y formen los puentes de hidrógeno con la cadena molde, dejando el extremo 3'OH disponible y listo para la adición de los nucleótidos consecutivos por la DNA polimerasa (23).

Extensión

Se produce a la temperatura óptima para el funcionamiento de la DNA polimerasa empleada, por lo que la temperatura para la PCR dependerá de la enzima a utilizar. En el caso de la Taq polimerasa, la temperatura óptima es de 72°C (23).

Amplificación final

Una vez terminados los ciclos designados para la PCR, la reacción se somete a un ciclo más de temperatura de extensión (72°C) y se mantiene por 5 min, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos de PCR que quedaron incompletos (23).

Almacenamiento temporal

Durante la programación de los ciclos de la PCR se programa también un ciclo final de 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR a baja temperatura hasta que se retiren los tubos de reacción del equipo evitando así su posible degradación (23).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para

corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados a través de una electroforesis en geles de agarosa (23). La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. Otro ingrediente que se agrega al gel es el bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz ultravioleta emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz ultravioleta adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas. La combinación adecuada de todos los elementos químicos mencionados hacen posible la síntesis in vitro del ADN utilizando la PCR (22).

Existen distintas variantes de la PCR tales como:

- PCR convencional o PCR en punto final: Se basa en la detección del producto de

amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. El producto amplificado se visualiza mediante una banda. El análisis de imagen de la banda del producto de PCR permite medir su intensidad mediante programas de cómputo y realizar una medición semicuantitativa de las bandas de los productos de PCR obtenidos en diversas muestras (23).

- PCR semicuantitativa: Permite conocer los niveles de expresión de un gen (mRNA) en particular (4), esto permite su comparación con otras muestras analizadas.
- PCR cualitativa: Esta modalidad de PCR permite detectar la presencia o ausencia de un fragmento de DNA determinado; es decir, sólo informa si una muestra es positiva o negativa ante la presencia de un determinado DNA. Se emplea para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y sólo permite confirmar la presencia o ausencia de un determinado agente patógeno, esto es, si una persona está o no infectada (23).
- PCR cuantitativa: En esta modalidad de PCR, el producto obtenido es cuantificable, lo que permite notificar en números absolutos la cantidad de un microorganismo o de un gen en una muestra.
- PCR selectiva: Para la PCR selectiva se pueden detectar genes con una mutación.
- PCR in situ: Se realiza en una muestra de tejido embebida en parafina (laminilla) o congelada y cortada en criostato. No requiere extracción del DNA del tejido. Esta modalidad de PCR permite saber qué tipo celular presente en un tejido expresa un determinado gen o cuál célula está infectada por un patógeno (23).
- PCR anidada (nested-PCR): Proporciona mayor sensibilidad a la técnica, al amplificar las secuencias de DNA en dos rondas de amplificación (23).
- PCR en tiempo real: Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy

pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (22).

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser iniciadores marcados por fluoróforos (primers LUX, light upon-extension), sondas específicas marcadas con fluorocromos o bien agentes intercalantes fluorescentes (23).

Aplicaciones de la técnica PCR en el área de odontología

La Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa ha revolucionado la investigación científica, desde sus inicios, y en el área de odontología no es la excepción. Ha permitido una variedad de estudios en temas relacionados con la microbiología oral con objetivos en el área de endodoncia, periodoncia y quirúrgicos; también se ha utilizado en el estudio de virus, hongos y parásitos de difícil cultivo y en el área de diagnóstico de enfermedades y en oncología bucodental.

A nivel de microbiología oral, la técnica de PCR ha contribuido enormemente en el estudio de bacterias en la placa bacteriana e infecciones bucodentales; puesto que, es una técnica de bajo costo, rápida, confiable y permite la reproducibilidad en comparación con otras técnicas. Por ejemplo, se ha utilizado para detección de bacterias de difícil cultivo en cavidad oral, como por ejemplo, la técnica AP-PCR se ha utilizado en diversos estudios para tipificar bacterias como *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella pneumophila*, entre otras (24). También se utiliza en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos.

En el área de diagnóstico de enfermedades se ha empleado la técnica del PCR para la evaluación del riesgo de padecer trastornos autoinmunes, tales como diabetes de tipo I, pénfigo vulgaris, miastenia gravis y esclerosis múltiple. También para el diagnóstico de

enfermedades hereditarias como hemoglobinopatías (talasemias y anemia falciforme), la fenilcetonuria, las hemofilias A y B, la deficiencia de alfa 1 antitripsina, la distrofia muscular y la fibrosis quística. Y finalmente se ha empleado para el diagnóstico de agentes infecciosos como los virus de las hepatitis B y C, del papiloma humano, de Epstein Barr y citomegálico. En el área de oncología se ha utilizado el PCR para poder subclasificar tumores orales identificados histológicamente. Chung et al, describieron un subtipo de Cáncer Oral de Células Escamosas asociado al EGFR (receptor del factor de crecimiento endotelial), otro con un mesénquima enriquecido, un tercer tipo similar al epitelio normal y un último subclasificado en base a sus altos niveles de enzimas antioxidantes. Estos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de supervivencia sin recurrencia del tumor, y una exactitud del 80% en la predicción de metástasis linfáticas (25). Además se ha utilizado el PCR como herramienta para el diagnóstico y pronóstico molecular del cáncer.

Enfermedades hereditarias en odontología

Amelogénesis

El esmalte dentario es un tejido de origen ectodérmico y es la estructura más mineralizada en el cuerpo humano; pero este no sufre los procesos de reabsorción y remodelación. El esmalte dental está conformado por cristales altamente organizados de hidroxapatita que ocupan el 95% del volumen de la matriz (26). Es sintetizado en el período de odontogénesis, durante la sexta semana de gestación y continúa por años después del nacimiento (27).

La Odontogénesis es el crecimiento, desarrollo y proceso de erupción de cada diente; es decir, es el proceso desde que se está formando a nivel intrauterino hasta que el diente termine su erupción.

Las etapas de la Odontogénesis son cuatro: crecimiento, calcificación, erupción y atrición. La primera etapa se divide en iniciación, proliferación, histodiferenciación, morfodiferenciación y aposición. Se destaca que en la fase de histodiferenciación se inician las alteraciones de amelogénesis imperfecta y dentinogénesis imperfecta; y en la fase de aposición se inician las alteraciones como hipoplasias del esmalte e hipomineralización incisivo-molar. Y en la fase de calcificación se dan los problemas que van a dar lugar a las hipocalcificaciones, hipercementosis, concrecencias y dislaceraciones.

Cerca de las seis semanas de gestación, la capa basal del epitelio bucal del feto presenta zonas de mayor actividad y agrandamientos en las regiones de los arcos dentales futuros. Se destaca que el ectodermo se encarga de formar el futuro esmalte, mientras que el mesodermo de la formación de la pulpa y la dentina. El germen es la causa del desarrollo de los tres tejidos de formación: órgano dental, papila dental y saco dental (28).

La formación del esmalte comienza a partir de células que se derivan del epitelio interno del órgano del esmalte después del inicio de la dentinogénesis.

La formación del esmalte está controlada por los ameloblastos y su interacción con proteínas de matriz orgánica que juegan un papel esencial en el modulado, depósito mineral y crecimiento; las principales proteínas involucradas en la formación del esmalte son la amelogenina, enamelina y ameloblastina (29).

Los ameloblastos controlan la secreción, la formación y la maduración de la matriz del esmalte usando moléculas de matriz tales como se ha mencionado, la amelogenina, ameloblastina, y además, la tuftelina, amelotina, sialofoproteína dentinaria. Asimismo utiliza enzimas matriciales tales como calicreína-4 y metaloproteinasa de matriz. Los ameloblastos secretan proteínas matriciales y son responsables de crear y mantener un ambiente extracelular favorable para la deposición del mineral.

El proceso por el cual se forma el esmalte mediante la secreción inicial de la fase orgánica de la matriz extracelular y su mineralización a través del depósito de calcio y fosfato se conoce como amelogénesis (27). Cuando el esmalte se forma, en primera instancia, únicamente se mineraliza parcialmente (aproximadamente un 30%). Subsecuentemente, cuando la matriz orgánica se rompe y es removida, los cristales crecen más anchos y de mayor espesor. El proceso en el cual la matriz orgánica y el agua se pierden y el mineral es añadido se acentúa después de que se forma todo el espesor de la capa de esmalte, para llegar a más de 96% de contenido mineral.

La amelogénesis se ha descrito en hasta seis etapas, pero generalmente se subdivide en tres etapas funcionales: presecretoria, secretoria y de maduración. La amelogénesis tiene tres etapas de desarrollo contiguas que finalmente resultan en el tejido de mamífero más altamente mineralizado, con estructura distintiva, alta resistencia mecánica y la capacidad de mantener la función durante toda la vida sin reparación celular. Estas etapas son: la secreción de una matriz extracelular por ameloblastos, la mineralización de la matriz y la remoción de la matriz y maduración del esmalte o crecimiento de los cristales.

Durante la etapa presecretoria, los ameloblastos adquieren su fenotipo, cambian su polaridad y desarrollan un extensivo aparato de proteína sintética. Además, se preparan para secretar la matriz orgánica de esmalte.

Durante la etapa secretora, una matriz extracelular proteinácea, se deposita de forma incremental por ameloblastos derivados epitelialmente a través de extensiones celulares especializadas denominadas procesos de Tomes. Esta matriz se mineraliza parcialmente para delinear la arquitectura del esmalte que se caracteriza por haces de cristales de esmalte (prismas o varillas de esmalte) entrecruzados con cristales de esmalte interprismáticos. En esta etapa los cristales de hidroxiapatita se separan por contenido orgánico y agua. Es decir,

en la etapa secretoria o formativa, los ameloblastos elaboran y organizan la totalidad del espesor del esmalte, resultando en la formación de un tejido muy ordenado.

A medida que la capa de esmalte se aproxima al espesor total, el proceso de Tomes se retrae y la capa final de esmalte exterior es aprismática. Los ameloblastos entran entonces en la etapa de transición, caracterizada por una secreción reducida de la proteína de la matriz y una reorganización interna.

Las células entran entonces en la etapa de maduración y comienzan a secretar la proteasa de serina KLK4 que degrada completamente la matriz proteica, dejando los cristales de esmalte inmaduros bañados en fluido de tejido de esmalte.

Concomitantemente, las células de la etapa de maduración circulan entre los llamados ameloblastos rugosos y de terminación lisa; el primero asociado con la acidificación del microambiente del esmalte y el transporte activo masivo de iones minerales al esmalte y el segundo asociado con la alcalinización del microambiente del esmalte y la reabsorción de la proteína. El aumento significativo del transporte activo de iones minerales en la matriz durante esta etapa acelera el crecimiento del cristal de esmalte tanto en anchura como en espesor hasta que el volumen de tejido es finalmente ocluido por el mineral (30).

Los ameloblastos permiten que los iones inorgánicos sean secretados e intercambiados por el agua y los contenidos orgánicos, lo que genera un aumento del contenido inorgánico, tanto de la longitud como de la anchura de los prismas de esmalte (26). Por último, los ameloblastos se reducen, sufren apoptosis y en la erupción de los dientes, se pierden por completo (30).

Cuando se dan mutaciones específicas en los genes que codifican a las proteínas mencionadas, se da la aparición de diferentes alteraciones en el esmalte, condición conocida

como Amelogénesis Imperfecta. J. P. Weinmann lo definió en 1945 como una anomalía de desarrollo del esmalte dental de origen ectodérmico (31).

Amelogénesis imperfecta

La Amelogénesis imperfecta es el término empleado para describir un grupo de trastornos hereditarios que afectan el desarrollo del esmalte de tal forma que se ve comprometida su cantidad (macro-estructura anatómica) y calidad (micro-estructura histológica) debido a agenesia, hipoplasia o hipocalcificación del mismo, afectando el aspecto clínico de todos o casi todos los dientes, tanto temporales como permanentes, de forma irregular.

La Amelogénesis Imperfecta ha sido descrita como una alteración dominante o recesiva, tanto autosómica como ligada al cromosoma X, por lo que es considerada como un trastorno genético heterogéneo, en el que están envueltas diferentes mutaciones en uno o en diferentes genes.

Investigaciones indican además, que los defectos en la amelogénesis pueden estar asociados con defectos de desarrollo o anomalías en otros componentes del diente en desarrollo, así como en el desarrollo dental y esquelético; por ejemplo: taurodontismo, agenesia de los dientes, erupción retardada y mordida abierta frontal (32).

Estudios han reportado que las mutaciones en el gen AMELX, en los exones 1-7 causan Amelogénesis Imperfecta ligada al cromosoma X, mientras que mutaciones en el gen de enamulina (ENAM) provocan Amelogénesis Imperfecta autosómica dominante, de tipo hipoplásico (31).

Igualmente se ha conocido que las mutaciones en el gen FAM83H pueden asociarse con genes autosómicos dominante hipo-calcificados. De los genes descubiertos, FAM83H ha sido asociado con la más alta prevalencia de enfermedad y de alteración más severa de esmalte.

La mayoría de estas mutaciones resulta en involucrar sobre toda la corona, donde se pueden generar áreas de hipocalcificación que localizan en la mitad cervical de la corona.

Otro de los genes involucrados es el WDR72, el cual presenta una función desconocida pero se cree que es una matriz para interacciones proteína-proteína, y las mutaciones en este gen han sido asociadas con patrones autosómicos recesivos de hipomaduración.

El gen C4orf26, codifica una matriz de proteína extracelular en el órgano del esmalte y ha sido asociado con patrones autosómico recesivo de AI hipomineralizada. La mutación fue descubierta inicialmente en una familia Omani y esto promovió a que los investigadores secuenciaran 57 individuos no relacionados quienes presentaron patrones recesivos de AI.

El gen DLX3 pertenece a un grupo de genes que codifican por un número de proteínas que son críticos para el desarrollo craneofacial, dental, cerebral y neural. Las mutaciones de este gen han sido ligadas con variantes hipoplásico-hipomadurados de la amelogénesis imperfecta con taurodontismo. Algunos investigadores han removido el gen de la lista de los que están asociados a amelogénesis imperfecta, esto debido a la creencia de que este patrón es una variante del síndrome tricho-dento-óseo, mientras que otros investigadores han documentado patrones idénticos de esmalte anormal en pacientes con una mutación DLX3, pero no otras características del síndrome tricho-dento-óseo (33).

Asimismo se ha mencionado que la Amelogénesis Imperfecta autosómica recesiva se da por una alteración que se produce en el gen de la Enamelisina, en la MMP20, que es una proteasa que participa con la Amelogenina en la etapa secretora y en la etapa temprana de maduración. También se puede dar una mutación en el gen de la Calicreina KLK4, el cual es el responsable de eliminar proteínas de la matriz para permitir el crecimiento final de los cristales en la maduración (27).

La Amelogénesis Imperfecta también puede estar ligada a las mutaciones de estos genes: C4orf26, SLG24A4, ITGB6, LAMB3, LAMA3, COL17A1, DLX3, STIM1, entre otros. Dependiendo de los genes afectados se ha logrado correlacionar algunas manifestaciones a nivel de síndrome como por ejemplo, la afectación en CNNM4 tiene el síndrome de Jalili, afectación en el gen ROGDI se presenta el síndrome de Kohlschutter-Tonz y entre otras afectaciones (34).

Cabe mencionar que se pensaba que esta anomalía no estaba asociada a desórdenes morfológicos o metabólicos en otros tejidos del organismo, ya que involucra la mutación de genes específicos que sólo regulan la formación del esmalte. Sin embargo, actualmente se considera que puede estar asociada a alteraciones en la cavidad bucal como mordida abierta, agenesias o supernumerarios, o en otras partes del cuerpo como nefrocalcinosis o epidermolisis bulosa entre otras.

La clasificación más comúnmente aceptada es la que está siendo propuesta por Carl Witkop 1988 que clasificó AI principalmente 4 tipos, es decir, hipoplásicos, hipomaturativos y tipo hipocalcificado basado en etapas de desarrollo de esmalte e hipoplásico-hipomaturación con taurodontismo; el mismo considera el fenotipo, mecanismo de desarrollo y la forma de herencia (27).

Amelogénesis Imperfecta Hipoplásica, la cual es la más frecuente, se basa en un defecto cuantitativo del esmalte pues resulta de una falla en la etapa secretora durante la formación de la matriz del esmalte.

La AI hipoplásica se produce por defecto en la deposición de la matriz del esmalte, es decir, la primera etapa de formación de esmalte, la etapa secretora. Se genera una disminución local o generalizada del espesor del esmalte, este es delgado, hay espacios interdientales; por lo general los individuos afectados presentan sensibilidad ante los cambios térmicos y se

da un aumento en la tendencia a la mordida abierta anterior (35). Clínicamente el paciente presenta un esmalte delgado o que no alcanza su espesor completo, color pardo amarillento, puede tener una superficie lisa o rugosa con áreas hipoplásicas; sin embargo, la superficie rugosa es la más común; y generalmente hay una erupción retardada. Las superficies oclusales de los dientes posteriores son planas debido al desgaste, y con/sin ranuras y pitting.

A nivel radiográfico se observa un esmalte fino o delgado, pero con la radiodensidad normal y un buen contraste de esmalte y de dentina (36).

A continuación tiene las siguientes variaciones

- IA: es autosómico dominante
- IB: es autosómico dominante
- IC: es autosómico recesivo
- ID: es autosómico dominante
- IE: es gen dominante ligado al cromosoma X
- IF: es autosómico dominante
- IG: es autosómico recesivo

La Amelogénesis Imperfecta de tipo Hipocalcificada es un defecto cualitativo del esmalte, por consiguiente, hay una cantidad normal de esmalte; pero con baja inclusión de minerales. Esta es causada por un defecto en la incorporación inicial de los cristalitos quedando el espesor normal previo a la erupción, pero este es perdido rápidamente después de la erupción, hay un contenido mineral deficiente; esto forma un esmalte débil, muy suave, friable, con baja resistencia al desgaste y decolorado.

Clínicamente se observa con una apariencia moteada similar a la fluorosis, puede ser de color marrón amarillento o naranja, pero a menudo se tiñe de marrón a negro con deposición

de cálculo. Con el tiempo, el esmalte coronal se deshace más que una porción cervical. Radiográficamente puede haber contraste entre esmalte y dentina, porque el esmalte no se va a ver tan radiopaco por la menor cantidad de minerales. Presenta las siguientes variaciones

- IIIA: es autosómico dominante
- IIIB: es autosómico recesivo

En la Amelogénesis Imperfecta de tipo Hipomaduración se da una alteración en el estado de maduración; esto se refleja en un esmalte de grosor y dureza normal, con manchas opacas de color amarillo-café o rojo-café. El esmalte no posee la maduración adecuada por lo que la atrición prolongada puede generar fracturas localizadas.

En el esmalte hipomaduro, la proteína de la matriz es normal, pero hay un defecto en el proceso de maduración de la estructura cristalina del esmalte, se da una alteración en la remoción de la proteína extracelular, hay una disminución de la deposición de minerales; por lo que la matriz del esmalte es inmadura. Al no poseer la maduración adecuada se puede observar que la atrición prolongada puede generar fracturas localizadas.

Se puede observar marrón amarillento moteado clínicamente con una corona opaca descolorida / coloreada en nieve, pero normal en tamaño y forma de la corona con esmalte suave, mal mineralizado y descolorido que es fácil de penetrar por la sonda dental. El espesor del esmalte puede ser normal, pero la radiodensidad es menor que la de la dentina radiográficamente. Las alteraciones microscópicas en las estructuras de la varilla del esmalte y de la vaina del vástago serán de color marrón a negro con la deposición del cálculo. Con el tiempo, el esmalte coronal se deshace más que una porción cervical (34).

Tiene las siguientes variaciones

- IIA: es autosómico recesivo.

- IIB: es gen dominante ligado al cromosoma X.
- IIC: es un gen recesivo/dominante ligado al cromosoma X
- IID: es autosómico dominante.

De los tipos anteriores se ha conocido que de la autosómica dominante (AD) y autosoma recesivo (AR), la de mayor gravedad puede presentarse en la Autosómica Recesiva. Radiográficamente es menos radiopaca que la dentina.

En la hipoplasica-hipomaduración con taurodontismo, el esmalte es delgado, moteado de amarillo a marrón, los molares muestran taurodontismo y otros dientes tienen las cámaras pulpares grandes. Tiene dos variaciones:

- IVA: es autosómico dominante. La hipomaduración tiene mayor defecto que la hipoplasia, es decir, el esmalte tiene una radiodensidad similar a la dentina y hay presencia de piezas con taurodontismo o cámaras pulpares amplias.
- IVB: es autosómico dominante. La hipoplasia se caracteriza más en esta variante; por consiguiente disminuye la capa de esmalte (37).

Dentinogénesis:

La dentina contiene gran cantidad de túbulos en su interior alberga unas fibras nerviosas capaces de transferir sensaciones. Posee dos proteínas en su composición, la dentinofosfoproteína y la dentinasialoproteína. La primera de estas es expresada algunos tejidos como el hueso, riñón, glándulas salivares, pulmones pero su expresión en la dentina es cien veces más alto (38).

Durante la formación de la dentina primaria, se da el retiro de los odontoblastos desde el frente de la mineralización, dejando los procesos que permanecen atrapados en los túbulos dentinarios. Los odontoblastos activos están bajo regulación hormonal.

Se ha reportado que los odontoblastos revelan la expresión de genes relacionados con la mineralización, incluyendo la sialofosfoproteína de dentina y la proteína de la matriz de los odontoblastos se dividen en el diente permanente alargado hasta el cierre del ápice de la raíz.

Los odontoblastos se dividen en el diente permanente alargado hasta el cierre del ápice de la raíz. Después del cierre apical, los odontoblastos o odontocitos antiguos continúan manteniendo sus funciones vitales durante la dentinogénesis secundaria, lo que mantiene el papel de mecano-modulador en la dentina adulta con una tasa muy baja de formación de dentina pero contraria al hueso, sin resorción dentinaria.

En los dientes humanos adultos la división celular de los odontoblastos o odontocitos antiguos es cero y su actividad secretora es limitada, dando lugar a una formación de dentina secundaria que es muy lenta en comparación con la de la aposición dentinaria primaria.

Los odontoblastos comienzan como células poligonales que dejan atrás procesos en la matriz dentinaria con numerosas ramas. Los cuerpos celulares migran de forma centrípeta y el proceso muestra una longitud creciente. Las ramas se reducen cerca de la unión dentina-esmalte. No son una reminiscencia de numerosas ramas laterales de los osteocitos dentro de la matriz ósea (39).

Dentinogénesis Imperfeta

La Dentinogénesis Imperfecta es uno de los desórdenes hereditarios más comunes que se dan en la formación de la dentina. Este sigue un patrón de transmisión autosómico dominante que afecta la formación y la mineralización de la dentina; se puede dar en denticiones temporales y permanentes, de manera localizada o generalizada.

Es una displasia localizada en el mesodermo que se caracteriza por la presencia de dentina formada irregularmente y desmineralizada la cual es opalescente, hay una coloración de gris a azul- café en el diente. Tiene una prevalencia de 1 en 1800 personas, fue reconocida por Barret en 1882 (32).

Clínicamente las coronas presenta forma bulbosa, estas se deterioran rápidamente, presentan un excesivo desgaste. Es importante destacar que una estructura anormal de dentina puede ser la primera razón de las fracturas del esmalte. Radiográficamente los dientes poseen un espesor y densidad normal del esmalte, se aprecia obliteración de la cámara pulpar y conductos pequeños (40). Ocurre igualmente en ambos sexos y puede afectar tanto la dentición primaria como permanente. La incidencia de la enfermedad es de 1: 8000.

La dentinogénesis imperfecta tipo I es una forma sindrómica clasificada osteogénesis imperfecta. Se recuerda que la osteogénesis imperfecta es una condición autosómica dominante que suele ser el resultado de mutaciones erróneas que afectan a cualquiera de los dos genes que codifican el colágeno tipo I (COL1A1 y COL1A2) y muchas veces la dentinogénesis imperfecta es la característica más penetrante en esta condición.

La dentinogénesis imperfecta tipo II no presenta osteogénesis imperfecta, sin embargo, sus características clínicamente se parecen a la dentinogénesis imperfecta tipo I. Se caracteriza por las coronas con estreñimiento cervical marcado y nunca presenta dientes sin la patología. Se ha reportado que algunos pacientes manifiestan una pérdida auditiva sensorineural (41).

Clínicamente, en DI, los dientes son de tamaño normal, pero las coronas tienen forma de bulbo. Cuando el esmalte no tiene suficiente soporte, se rompe y se quita fácilmente, y los dientes aparecen opalescentes, cambiando en color de marrón a azul y a veces ámbar o gris.

Radiográficamente, las cámaras de pulpa y los conductos radiculares están estrechados o completamente mineralizados. Las raíces pueden ser más cortas que de costumbre. El esmalte es normal o más delgado de lo normal. Hay defectos hipoplásticos o hipocalcíficos en el esmalte en un tercio de los pacientes con DI (42).

La dentinogénesis imperfecta tipo III solo se ha observado en una población en específico: triracial de Maryland y Washington DC conocida como el aislamiento de Brandywine. Las características clínicas son variables y se asemejan a las observadas en DGI-I y II, pero los dientes primarios muestran múltiples exposiciones de pulpa y radiográficamente, se pueden ver coronas bulbosas cortas y estrechas, y las cámaras pulpares pueden ser inicialmente anormalmente grandes, formando "dientes de la cáscara", dientes que parecen huecos debido a la hipotrofia de la dentina (41).

El sistema del conducto radicular se obstruye con el tiempo. Aunque la estructura del esmalte es histológicamente normal, tiende a romperse.

La unión dentina-esmalte no está entrelazada a la extensión normal. Aunque la estructura de la dentina del manto es normal en la mayoría de los casos, los túbulos dentinarios ambientales son irregulares y disminuyen en número. La mineralización intertubular de la dentina y el número de odontoblastos disminuyen. Existe un trastorno de colágeno de la dentina y defectos primarios en la matriz calcificada. El cemento, la membrana periodontal y el hueso de soporte son normales en apariencia. (42)

Familia con similitud de secuencia 20-C (FAM20C) es una molécula evolutivamente conservada altamente expresada en osteoblastos / osteocitos, ameloblastos y odontoblastos. Estudios previos demostraron que la inactivación omnipresente de FAM20C en ratones condujo a severos defectos de dentina y esmalte y raquitismo hipofosfatemico.

Se identificaron defectos similares en algunos pacientes humanos con mutaciones de pérdida de función en FAM20C, mientras que la mayoría de los pacientes presentaron displasia ósea osteosclerótica. A pesar del mecanismo elusivo subyacente a estos defectos controvertidos, los hallazgos genéticos pusieron de relieve el papel crucial de FAM20C en los tejidos mineralizados.

Estos hallazgos sugieren que los defectos del tejido mineralizado en los sujetos deficientes en FAM20C pueden estar asociados con el fallo de fosforilación de las proteínas SCLP.

El desarrollo del diente se rige por las interacciones entre el epitelio dental y el mesénquima dental. Así, la interrupción de la señalización en un tejido puede causar anomalías en el otro. El análisis de nuestros datos anteriores indicó que FAM20C se expresa tanto en ameloblastos como en odontoblastos (43).

Tal como se ha hecho mención, un individuo con Amelogénesis Imperfecta puede mostrar en el esmalte de sus dientes decoloración, disminución del espesor normal y desintegración pre, peri o post-eruptiva, lo que predispone a una mayor retención de placa y por ende a una mayor susceptibilidad al desarrollo de caries. Estos pacientes se perciben con una estética deficiente, sensibilidad excesiva, extenso desgaste dentario, caries secundaria, decoloración dentaria, maloclusión, pues se puede dar pérdida de la dimensión vertical por desgaste de los dientes, por la destrucción de las cúspides y molestias periodontales e incluso problemas de tipo psicosocial en pacientes jóvenes afectados por fenotipos más severos (44).

Radiográficamente, en los casos de Amelogénesis Imperfecta con alteraciones del tipo hipoplasia e hipocalcificación, no se observa la banda radiopaca de esmalte en la superficie de la dentina, y cuando esta se presenta, se observa discontinua y falta de contraste respecto a la dentina subyacente. Del mismo modo pueden observarse las cámaras y los conductos pulpares amplios, y el cierre apical tardío en la mayoría de los casos. No obstante,

todas las características, tanto radiográficas como histológicas del esmalte, dependen del tipo de amelogenénesis que se diagnostique (31).

Otras afecciones en la estructura dental

Fluorosis dental

La fluorosis dental es una hipomineralización (anomalía cualitativa) del esmalte producida como respuesta a la ingesta de flúor por un período prolongado de tiempo durante la formación del mismo, provocando una alta porosidad en su estructura (45).

Afecta a la población infantil y adolescente causando afectaciones irreversibles de la estructura dentaria a lo largo de su vida; de acuerdo a la severidad de la fluorosis, ocasiona pérdida de estructura dentaria, mayor susceptibilidad a la caries dental y afectación de la apariencia estética de la sonrisa; esta alteración se puede observar desde manchas que van de un color blanquecino hasta manchas de color café oscuro y en casos graves existe pérdida del esmalte dentario (45).

La fluorosis dental es la única manifestación visible del resultado de una exposición crónica al flúor que no se puede limitar solamente al componente estético, sino también a los efectos sistémicos como debilitamiento de los huesos, problemas renales, cáncer de los huesos, problemas de desarrollo mental, infertilidad, fatiga crónica, disminución en la función tiroidea, además de problemas de neurotoxicidad, incluyendo la función glandular general y sus respectivas hormonas (45).

Afecta en mayor medida a los dientes permanentes en comparación a dentición decidua, ya que la mayor mineralización en la dentición temporal se lleva a cabo durante la gestación, donde la barrera placentaria juega un importante papel (46).

El riesgo de fluorosis del esmalte incrementa cuando la exposición al flúor se produce en las etapas de secreción y de maduración; y disminuye cuando la exposición tiene lugar únicamente en la fase secretora.

Existen reportes de este defecto de desarrollo del esmalte desde principios del siglo XX, sin embargo no hay acuerdo internacional sobre los niveles de ingestión que ocasionan esta patología, pero sí hay acuerdo en que el incremento y la variabilidad en la severidad de la fluorosis en una población se explica por la condición de dosis-respuesta, es decir, por la edad durante la cual ocurre la ingestión, la duración de la misma, la etapa de desarrollo del diente y la susceptibilidad individual (48).

La fluorosis dental es frecuente en dientes que calcifican despacio: caninos, premolares, segundos y terceros molares. Es poco frecuente en los incisivos, pero normalmente es visto en seis u ocho dientes homólogos; sumamente raro en dientes deciduos pero cuando se presenta es severa.

En un estudio realizado en la población costarricense se reportó que las piezas con mayor prevalencia son los segundos molares derechos, seguidos de los izquierdos, luego las segundas premolares derechas después las izquierdas, y por último las primeras premolares (54).

La severidad varía de un grupo dentario a otro, según investigaciones los premolares son los más afectados, seguidos de los segundos molares, incisivos maxilares, caninos y primeras molares. Los incisivos mandibulares son los menos afectados (46).

Los aspectos clínicos de la fluorosis varían dependiendo del grado de exposición al flúor como se ha mencionado. El grado más leve de esta anomalía del desarrollo puede incluso pasar inadvertida y presentar un color blanco mate que afecta los bordes incisales o las

cúspides de los molares y premolares conocido como casquete de nieve; estas porciones blancas pueden ser desde unas pequeñas nubes hasta verdaderas manchas dispersas.

En el caso moderado el color de las manchas varía en tonos desde café hasta casi negro. En los grados severos, pueden presentarse fositas de 1 a 2mm, que a veces confluyen entre ellas. En los casos más graves, las superficies se encuentran picadas, lo cual resulta en una mayor dificultad en la higienización y posteriormente la posibilidad de formación de caries (48).

Dentro de las características más importantes de la fluorosis dental encontramos:

- En la fluorosis leve se presentan pequeñas nubes blanquecinas (como veteado)
- Las líneas incrementales de crecimiento del diente (estrías de retzius o periquimatas) son visibles a lo ancho de la pieza dental, especialmente en los incisivos superiores.
- Las puntas de las cúspides, bordes incisales y rebordes marginales pueden verse de color blanco opaco (snowcap).
- Las líneas y manchas se unen y forman masas más densas fácilmente diagnosticadas.
- Se unen las manchas blancas y aparece toda la superficie del esmalte de color blanco tiza.
- Presenta pequeñas fositas, zonas desmoronadas.
- Se unen las fositas y forman bandas sin esmalte.
- Los pigmentos de las comidas son fácilmente absorbidos por las proteínas del esmalte poroso y aparecen manchas en diferentes tonos. Es una captación posteruptiva de colorantes exógenos.
- En los bordes de los dientes o en oclusal se inicia la pérdida de esmalte. Puede llegar a haber una pérdida total del esmalte del diente.

- Por causa de las fracturas, puede haber pérdida de la forma del diente.
- El esmalte del cuello del diente puede aparecer más opaco.
- La parte incisal o ángulo mesio-incisal puede aparecer color café claro, causado por el aire que se respira por la boca (48).

Una de las características más relevantes de esta condición es que hay distribución simétrica y bilateral, esto se debe a que el desarrollo de los dientes homólogos se produce al mismo tiempo, y que la presencia de fluoruro sistémico es igual para todas las piezas dentales en formación. Conjuntamente la fluorosis tiende a presentar un patrón estriado de una parte a otra del diente y todos los dientes se afectan por igual (49).

Diagnóstico diferencial

Es esencial realizar un buen diagnóstico diferencial, en especial si se decide realizar tratamientos dentales para que éstos sean los más óptimos. Es importante aclarar que las opacidades no fluoróticas del esmalte incluyen todas las categorías de opacidades no definidas como fluorosis (50).

Asimismo a nivel dental se pueden encontrar varias alteraciones que ocurren en distintas etapas de formación y que se deben distinguir de la fluorosis tales como: la amelogenénesis imperfecta que ocurre durante la etapa de histodiferenciación; la hipoplasia que suscita en etapa de aposición y por último la hipocalcificación que se da en la etapa de calcificación del esmalte (51).

Cuadro N°1. Diagnóstico diferencial entre fluorosis y otras opacidades del esmalte

Fluorosis dental	Opacidades no fluoróticas
Se presenta en mayor frecuencia en	Más frecuente en incisivos inferiores

incisivos superiores, poco en inferiores	
En bordes incisales, cúspides y rebordes de molares y premolares	Caras labiales en el centro
Líneas horizontales incrementales (sigue perequimates)	Manchas bien definidas.
Manchas blanquecinas	Manchas más amarillentas.
Bordes indefinidos con límites imperceptibles	Bordes bien delimitados.
Manchas e formas de nubes	Manchas ovals o redondas.
En dientes homólogos	Rara vez son simétricas
Manchas que se ven bien con la luz no muy fuerte en forma tangencial.	Se ven bien de frente con luz brillante.
En sus formas leves solo afecta caras externas	Fuertes y profundas que penetran en esmalte

Fuente: González L, Bolaños V. Prevalencia y Severidad de la Fluorosis Dental. Odovtos. 2003;1(5):48-53.

La caries dental es una enfermedad en la cual hay una desmineralización del esmalte a causa del efecto del medio ácido producido por bacterias. En sus estadios iniciales se observa una lesión de mancha blanca que a diferencia de la fluorosis dental se presenta generalmente en las caras oclusales en fosas y fisuras, además se toma en cuenta la trayectoria de la pieza dental, el estado general del paciente así como restauraciones e higiene. En superficies vestibulares la mancha blanca de la lesión cariosa sigue el contorno de la encía, y al mover la encía, vemos como la lesión no se extiende hasta el fondo del

surco. La fluorosis presenta manchas blanco tiza en superficies lisas, abarcando hasta el fondo del surco gingival, en cúspides y superficies lisas, formando estrías debido a las líneas del desarrollo (52).

La amelogénesis imperfecta representa un conjunto de afecciones de origen genómico que afectan la estructura y el aspecto clínico del esmalte de todos o casi todos los dientes de una manera más o menos igual y que puede estar asociada con cambios morfológicos o bioquímicos en otras partes del cuerpo. La amelogénesis imperfecta es una condición de desarrollo del esmalte dental (caracterizado por hipoplasia y / o hipomineralización) que muestra patrones de herencia autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al sexo y esporádica, así como casos esporádicos (53).

Fuentes y dosis de flúor.

Se puede encontrar altas concentraciones de flúor en el agua de consumo humano, la sal, algunos alimentos como el arroz, maíz y plátano, el uso de agroquímicos fluorados, la ingesta de crema dental, aplicaciones profesionales de flúor entre otros.

El flúor se puede administrar a las personas en diferentes formas, ya sean tópicos, o sistémicos pero se ha demostrado que la segunda es la más efectiva y dentro de ellas la fluoración del agua y de la sal por ser más masivas en su cobertura y más eficientes.

La ingesta excesiva de flúor puede provenir de una sola fuente con altas concentraciones del ion o de múltiples fuentes con concentraciones medias o bajas pero que al sumarse exceden los niveles hasta ahora considerados aceptables (0,05 a 0,07 mg/kg de peso corporal). Por esta razón, cuando se evalúa la seguridad de los niveles de ingestión de flúor es importante considerar las diferentes fuentes a las que accede la población, se debe suponer que la

concentración de fluoruro natural presente en la dieta también puede constituirse en un riesgo de fluorosis en niños pequeños.

En este contexto se debe considerar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere una dosis máxima de flúor en el agua en un rango de 0.5-1ppm, mientras que en la sal fluorada el rango es de 180-220ppm (51).

Efecto del fluoruro en diferentes etapas de la Amelogénesis.

-Proliferación y diferenciación de ameloblastos: No hay evidencia que la exposición de piezas dentales en desarrollo a niveles de fluoruro fisiológicos in vivo y en el cultivo de órganos, afecte la morfología dental, proliferación celular o la diferenciación de ameloblastos, aun en piezas altamente fluoradas, el tamaño y forma del diente no cambian.

Según estudios realizados, a nivel de laboratorio la exposición de las células primarias del órgano del esmalte a niveles de fluoruro en concentración de 5 $\mu\text{mol/L}$ reducen la expresión de MMP-20 enamelisina, pero esto no se da in vivo ya que estos niveles son altos comparados con el fluoruro en plasma.

SV40 no mostró efectos en la proliferación celular, pero a niveles altos se observó que causaba una respuesta al estrés en retículo endoplásmico.

Ameloblastos presecretores: Pruebas desarrolladas en laboratorio, al hacer inyección de dosis moderadas de flúor (3-7 mg F/kg), se puede ver la afectación de la estructura celular de los ameloblastos pre-secretorios, por otro lado, también se observa la reducción de la síntesis de proteínas transitoriamente.

De igual forma, una dosis de flúor única (9 mg F/kg) en ameloblastos pre secretorios en el asa cervical, induce la formación cística en dientes en desarrollo de hamsters, lo que, además, afecta la estructura de estos ameloblastos. El esmalte aprismático que producen es

altamente hipermineralizado. La matriz del esmalte secretada durante la exposición al fluoruro falla al mineralizar.

Lo mismo se observa en cultivos de órganos dentales expuestos a fluoruro, in vitro estos efectos son más severos cuando los niveles de calcio son bajos. A niveles altos de calcio los efectos del fluoruro en la matriz y en la estructura celular son mucho más bajos o ausentes. Se puede sugerir que en condiciones in vivo, la caída de la concentración de calcio plasmática, asociada con altas dosis de fluoruro podría aumentar la severidad de lesiones fluoróticas.

En este mismo estudio, en un ambiente in vitro se puede observar las lesiones en esmalte erupcionado en piezas expuestas al fluoruro, ya sea en niveles bajos pero crónicos durante la amelogénesis, o niveles altos agudos durante etapas pre eruptivas del desarrollo dental. En este último caso, las lesiones más severas pueden ser fosas de tipo superficial hipoplásicas, también se encuentran defectos cervicales como zonas opacas color blanco tiza.

Ameloblastos secretores: Los ameloblastos secretores son relativamente resistentes a los efectos de la exposición aguda del fluoruro en comparación con las células pre secretora y post secretoras, y los cambios celulares en ameloblastos secretores in vivo sólo se han reportado después de exposición a altos niveles de fluoruro.

Ameloblastos transitorios: En esta etapa de la amelogénesis, las células parecen ser más sensibles a los niveles máximos de flúor que los ameloblastos pre secretores y secretores. No todos los ameloblastos transitorios son sensibles en el mismo grado, aparentemente solo algunos grupos aislados son afectados (55).

Ameloblastos de maduración: La etapa de maduración del esmalte parece ser la más sensible al flúor, sin embargo, hay muy pocos cambios estructurales en los ameloblastos de

maduración expuestos al fluoruro. Según estudios realizados, no hay cambios estructurales importantes que se hayan encontrado en ameloblastos de maduración de gérmenes de piezas dentales después de una exposición de una dosis alta única de flúor, que tiene a dañar severamente a ameloblastos pre secretores y transitorios en los mismos dientes (56).

Según estudios realizados en piezas dentarias de ratas, incisivos particularmente, sólo con la entrada constante de fluoruro durante varios días, se puede cambiar significativamente la estructura de ameloblastos de maduración (57).

Otros resultados sugieren que la exposición crónica al fluoruro reduce o suprime la típica pigmentación naranja, disminuye ligeramente el número de lisosomas y fagosomas, reduce la actividad lisosomal e induce la expresión de proteínas de estrés del retículo endoplásmico en incisivos de ratón. Esto sugiere que los cambios celulares en la etapa de maduración son graduales, y la actividad de las células en general está disminuida en presencia de fluoruro, lo que sugiere un efecto tóxico general del fluoruro. También se encuentra que el fluoruro interrumpe la modulación de la maduración ameloblastos.

Se pueden encontrar defectos de la mineralización del esmalte durante la etapa de maduración, con una exposición prolongada a agua fluorada, incluso a niveles bajos de fluoruro de 9-10 ppm, y se caracterizan por el desarrollo de una superficie porosa hipomineralizada generalizada a lo largo de todo esmalte de la corona.

Este tipo de defecto se relaciona con las opacidades blancas y porosas que se pueden observar clínicamente. Con un aumento a la exposición de fluoruro, la extensión y el grado de la zona hipomineralizada aumentan desde la parte más interna hacia la unión esmalte-dentina, particularmente en la porción cervical de los dientes.

Algunos de estos defectos producidos por el flúor son resultado probable de los efectos en ameloblastos previamente afectados. Por otro lado, la hipomineralización de la sub superficie inducida por el flúor, puede ocurrir independientemente, en la etapa de maduración.

En condiciones normales, se sabe que la matriz de esmalte controla el tamaño y la forma de los cristales durante la mineralización.

Está comprobado que el flúor causa defectos de mineralización y disminuye la dureza del esmalte. Esto sugiere que el fluoruro puede cambiar el tamaño de los cristales, número, forma o calidad al interferir con su formación (58). Pero los estudios presentados no son suficientes para comprobar esta hipótesis (55).

Se destacan diversos mecanismos de la acción del fluoruro en la formación de esmalte:

-Composición de la matriz: Durante mucho tiempo se ha asumido que el fluoruro altera la composición de la matriz del esmalte, dando por resultado una alteración en el desarrollo de los cristales. La matriz secretada después de la exposición de flúor aparece más amorfa y punteada, con cristales distribuidos escasamente y un aumento de espacios de inter cristalinos, en comparación con la matriz de esmalte normal, según estudios realizados.

Los análisis bioquímicos en la matriz del esmalte no han identificado cambios en la composición o calidad de la matriz proteica bajo la exposición al flúor. Por otro lado, estudios han demostrado que el flúor no se enlaza directamente a la amelogenina, pero que el fluoruro probablemente está enlazado al calcio contenido dentro de la matriz proteica.

-Degradación de la matriz: La ingestión crónica de flúor produce mayores efectos durante la etapa de maduración, dando como resultado un esmalte sub superficial hipomineralizado, que contiene menos minerales y conserva la matriz. Muchos estudios han propuesto que el flúor impide la degradación de las proteínas de la matriz, con una inhibición resultante del crecimiento cristalino (55).

En resumen se propone:

1. El flúor reduce la degradación de las proteínas de la matriz reduciendo la producción de proteasas por los ameloblastos (54).
2. También se propone que actúa directamente sobre la actividad de las proteasas de la matriz extracelular e inhibe la degradación de la matriz (55). Algunos estudios no muestran ningún efecto (56).
3. Se dice que el flúor cambia las características de adsorción, área superficial o propiedades de superficie de los cristales de esmalte a la cual se adhieren las proteínas de la matriz. Esto podría influir en su degradación proteolítica y causar retención de matriz (58).
4. Reduce el calcio en la matriz del esmalte necesario para la actividad de la proteasa (62).
5. Deteriora la endocitosis y la degradación intracelular de la matriz por la modulación de los ameloblastos.
6. Aumenta la apoptosis o estimula a algunos de los ameloblastos de maduración para migrar desde la capa ameloblastica. (63).

Las capas hipermineralizadas podrían actuar como una barrera física, afectando el suministro de iones minerales a capas más profundas del esmalte. La capa externa de la superficie del esmalte fluorotico aprismático acumula flúor y se hipermineraliza durante la etapa de maduración, mientras que la superficie se vuelve porosa. Tal vez la hipermineralización de la capa superficial que se forma en presencia de flúor, especialmente en lugares donde se forman los quistes, impide la transferencia de iones minerales y proteasas en la sub superficie del esmalte y previene que las proteínas de la matriz de esmalte dejen el compartimiento de esmalte (55).

El análisis de estos datos sugiere que el calcio actúa en los ameloblastos secretores de dos maneras:

1. Por medio de la modulación de la síntesis y secreción de amelogéninas por los ameloblastos, hay una correlación entre el aumento de síntesis de amelogénina con altas concentraciones de calcio.

2. El calcio también mejora la afluencia del calcio trans celular, para proporcionar iones minerales para el crecimiento de cristales en la capa que se deposita.

Con base en esto, podemos inferir que la amelogénina protege contra la formación de matriz fluorotica no mineralizante, de modo que permite la mineralización en la matriz, incluso en presencia de fluoruro. Estas observaciones sugieren que el calcio y su efecto sobre los ameloblastos, incluyendo la secreción de matriz, pueden ser un factor que influye en los efectos del flúor, y además, la relación entre calcio, flúor y amelogénina parece ser clave en la formación de esmalte fluorado (55).

Fluoración del agua

Es la adición de algún compuesto que tenga flúor, según los reglamentos estatales, los cuales tienen el objetivo de prevención de caries. La medida se puso en práctica en Estados Unidos y Canadá a partir de 1945, con el pasar de los años muchos países la han implementado. Entre los compuestos más utilizados están (64):

- Fluoruro de sodio (NaF)
- Fluorsilicato de Sodio
- Silicofluoruro de Sodio (Na₂SiF₆)
- Ácido Fluorsilícico (H₂SiF₆)

La selección del compuesto depende del costo, siendo los más utilizados los dos últimos, ya que el Fluorsilicato de sodio posee un alto costo.

Para analizar las concentraciones del ion presentes en el agua se emplean los métodos del electrodo específico y colorímetro spands. El primer método consiste en una medición instrumental en que el ión F⁻ es medido potenciométricamente, haciendo uso de un sensor del ión, el segundo consiste en una reacción de los iones y una laca coloreada de circonio, se disocian en un complejo incoloro (64).

En Costa Rica, la fluoración del agua se implementó en 1975 en el área metropolitana, sin embargo, fue descontinuada en 1980, durante este tiempo se pudo alcanzar una disminución del 60% en la prevalencia de caries dental a los 12 años, lo que se traduce en una deducción del CPOD de 9,2 a 6,0 (64).

En Costa Rica, la fluoración de la sal ha sido un éxito desde que se implementó en 1987, con la iniciativa y dirección del Dr. Ricardo González, con el Ministerio de Salud y el apoyo de la fundación W.K. Kellogg. Costa Rica fue el primer país de Latinoamérica en implementar la medida. Ya antes se había intentado la fluoración del agua en 1975 y 1980, pero hubo problemas económicos, técnico y de operación. La cantidad utilizada fue de 250mg/kg (64).

Para lograr una efectividad en la fluoración de la sal, se deben conocer los hábitos de la población y fijar estrategias (64).

En un estudio de 1985, se midió la concentración de flúor en la orina de colegiales y en el agua que ellos consumían, observando una concentración de 0.34 mgF/L y 0.2 mgF/L, respectivamente, con esto se concluyó que la fluoración de la sal era un programa adecuado.

En otras zonas, se observaron concentraciones de flúor mayores en condiciones normales, por lo que se optó por sacarlas del programa y dejar el consumo de sal normal.

Toda la sal debe pasar por un proceso de purificación, ya que esta viene con otros minerales, tierra, bacterias y residuos vegetales. Las primeras compañías en unirse al programa fueron (64):

-Cooperativa Nacional de Productos de Sal (CONAPROSAL)

-Cooperativa de Productos de Sal (COOPROSAL)

-Sal Diamante S.A.

Tras el estudio, se determinó que la fluoración se haría con fluoruro de potasio, adicionándolo directamente a la sal seca.

Tras la etapa de investigación, el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), la Organización Panamericana de la Salud y Fundación W.K. Kellogg, en conjunto con el Ministerio de Salud, iniciaron el proyecto. En 1989, se definió la dosis de flúor. Se estudió la cantidad de flúor en el agua, la orina y el consumo de sal por persona y se obtuvo que el fluoreto de sodio era la opción más eficaz, viable y con una mejoría notable para la fluoración (64).

En 1994, por referencia del INCIENSA, se realizó un estudio de fluorosis en Jaco y en San Ramón, por los resultados obtenidos que mostraban la incidencia de de fluorosis en niveles de moderados a severo, se decidió disminuir la dosis a 200mg/kg (65).

Después de seis años de implementar el programa, se dio el primer estudio de evaluación del proyecto, Encuesta Nacional de Salud Oral: fluorosis de esmalte, 1999, obteniendo resultados muy favorables. Se obtuvo una reducción en la caries dental de los niños de 3 y 5 años, de un 48% y 36%, respectivamente. El éxito motivó a usar la fluorización de la sal en Brasil, Colombia, Francia, Jamaica, México y Uruguay (64).

La sal que se utiliza en Costa Rica se obtiene por evaporación del agua de mar y se somete a procesos para purificarla y para conseguir los niveles de yodo y flúor especificados por las normas. Según la OMS la concentración de fluoruro óptima normalmente estará dentro del rango 0.5-1.0 mg/l. Dado que en Costa Rica se adiciona flúor a la sal, se considera que el

contenido de flúor natural del agua debe ser menor a 0,7 mg/l, para reducir la probabilidad de aparición de fluorosis.

El Centro Nacional de Referencia de Bromatología monitorea los procesos de fluoración y yoduración de la sal en Costa Rica (64).

Hipoplasia incisivo-molar

La hipomineralización del esmalte es un defecto cualitativo del esmalte debido a la pobre mineralización del esmalte en desarrollo, identificado visualmente como una opacidad cremosa de color blanco / amarillento / marrón amarillento con / sin ruptura post-eruptiva. La hipomineralización incisivo molar (MIH) es un tipo de hipomineralización del esmalte, definida como hipomineralización de uno o más primeros molares permanentes (FPMs) y frecuentemente con incisivos permanentes (PIs) (66).

Por lo general, la hipomineralización está relacionada con la deficiencia en la calidad del esmalte o de todo el espesor del esmalte, la mayoría de las veces se produce con frecuencia en la fase de maduración del desarrollo del diente.

En el síndrome de hipomineralización del Incisivo Molar, las lesiones dentales son en la mayoría de los casos ásperas y retienen la placa, el riesgo de desarrollo rápido de la caries es alto, así como el riesgo de ruptura post-eruptiva de las estructuras dentales y la instalación de hipersensibilidad (67).

MIH a veces se puede confundir con fluorosis o amelogenesis imperfecta. Puede diferenciarse de la fluorosis ya que sus opacidades están demarcadas, a diferencia de las opacidades difusas que son típicas de la fluorosis y de la estructura del esmalte (la fluorosis es resistente a caries y MIH es propensa a las caries). La causa de la fluorosis puede, en su

mayoría, estar directamente relacionada con el período en que la ingesta de flúor fue demasiado alta.

La elección entre la amelogénesis imperfecta (AI) y el MIH como diagnóstico parece una definición básica: hay que resaltar que, sólo en casos muy severos de MIH, los molares están igualmente afectados e imitan la aparición de la AI.

Sobre todo en MIH, la aparición de los defectos será más asimétrica tanto en los molares como en los incisivos. En AI, los molares también pueden aparecer taurodont en la radiografía y hay a menudo una historia de inicio de la familia (68).

Los factores etiológicos no están completamente esclarecidos, y es evidente la dificultad de identificar los diferentes factores que sensibilizan a los ameloblastos desde el período prenatal hasta los primeros 3 años de vida del niño, período durante el cual la mineralización ocurre en los primeros molares.

Los factores más frecuentemente reportados en la literatura están relacionados con cambios ambientales, enfermedades respiratorias, enfermedades infantiles con fiebre alta y uso frecuente de antibióticos (69).

Los dientes permanentes inician su calcificación en el momento del nacimiento, siendo los primeros molares en iniciar su calcificación para continuar, a los pocos meses de vida con los incisivos centrales superiores e inferiores, a la vez que ambos caninos.

Los ameloblastos son capaces de elaborar una matriz orgánica pero el depósito de minerales en la fase de maduración está afectado. La ocurrencia de un disturbio durante esta etapa de la amelogénesis va a manifestarse clínicamente como una opacidad. Esta situación puede darse por un disturbio en los ameloblastos, lo que da lugar a una deficiente reabsorción de la matriz orgánica con una consecuente falta de espacio para la deposición de los minerales, o debido a una deficiencia en el aporte de calcio y fosfatos. La primera situación puede ser

explicada por una disminución del aporte normal de oxígeno a los ameloblastos, lo que puede ocurrir por complicaciones durante el parto o por enfermedades respiratorias. La segunda situación puede ser provocada por problemas renales, intestinales, fiebres altas o mala nutrición (73).

Fenotipos

Se recomendó recientemente en el documento de política de EAPD (European Association of Pediatric Dentistry) el registro de la hipomineralización del esmalte en todos los dientes en futuros estudios para evaluar si los dientes distintos de los molares permanentes y los incisivos están involucrados en el MIH:

- Hipomineralización del esmalte en al menos una permanente ($HT \setminus \theta 1$) y en al menos un diente primario ($ht \setminus \beta 1$).
- Hipomineralización del esmalte en al menos un primer molar permanente (MIH).
- Hipomineralización del esmalte en al menos un primer molar permanente e incisivo permanente (M + IH).
- Hipomineralización del esmalte en al menos un segundo molar primario ($ht \setminus \Delta 1$ en los segundos molares primarios = DMH).
- Hipomineralización del esmalte en al menos un primer molar primario ($ht \setminus \beta 1$ en los primeros molares primarios) (70).

El tamaño simple limitado y la falta de una muestra de replicación independiente, el gen SCUBE1 se identificó como un locus genético potencial para MIH que desempeña un papel biológico plausible durante el desarrollo del diente. Sin embargo, se recomienda fuertemente la investigación futura para replicar los análisis en (una) cohorte independiente. Además, se

necesitan estudios a gran escala y bien basados en la población para investigar los posibles factores genéticos en relación con factores sistémicos o ambientales relevantes. (71)

Criterios de Diagnóstico

El examen de dientes HIM debe ser efectuado en dientes húmedos post-profilaxis. La edad considerada la más adecuada para evaluar esta situación son los ocho años, ya que en esta edad los niños ya suelen tener los cuatro molares permanentes erupcionados, así como la mayoría de los incisivos permanentes en erupción.

La EAPD desarrolló una serie de criterios:

1er criterio. Opacidades delimitadas. Alteraciones en la translucidez del esmalte de espesor normal, bien delimitadas, variables en grado, de superficie lisa, pudiendo el color variar entre blanco, amarillo o marrón.

2º criterio. Fracturas del esmalte post-erupción. Pérdida de la superficie del esmalte inicialmente formada, después de la erupción. La pérdida del esmalte está frecuentemente asociada a una opacidad delimitada preexistente.

3º criterio. Restauraciones atípicas. El tamaño y la forma de las restauraciones de uno o más primeros molares no sigue el patrón de caries de las restauraciones del individuo. Normalmente son restauraciones amplias que invaden las cúspides. Pueden verse opacidades en el contorno de las restauraciones. Restauraciones en la cara vestibular de los incisivos no relacionadas con traumatismos.

4º criterio. Exodoncia de primeros molares permanentes debido a HIM. Ausencia de un primer molar permanente por exodoncia, asociada a opacidades o restauraciones atípicas en los restantes primeros molares o incisivos. Ausencia de todos los primeros molares

permanentes y una dentición saludable, con opacidades bien delimitadas en los incisivos. No es probable que los incisivos sean extraídos por HIM.

5° criterio. Diente no erupcionado. Primer molar o incisivo permanente para ser examinado que no está erupcionado (72).

Caries dental

El paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial de la bacteria a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la interacción de cargas electrostáticas entre las proteínas de los microorganismos y la estructura dental; puesto que, la carga eléctrica de las proteínas se relaciona con la presencia de grupos ionizables en sus aminoácidos constituyentes (73). La adhesión también está mediada por la acción de moléculas de naturaleza proteica en la superficie de las bacterias, denominadas adhesinas, que se unen a las proteínas salivales las cuales actúan como receptores y facilitan la adherencia bacteriana.

También la adhesión bacteriana está mediada por la síntesis de glucano y fructanos; en donde algunas bacterias, como los estreptococos, secretan glucosiltransferasas (GTF) y fructosiltransferasas (FTF) que catalizan la sacarosa y forman los glucanos extracelulares que se involucran en el proceso de adherencia bacteriana y en el proceso de fuente de energía bacteriana a través de las glucanohidrolasas.

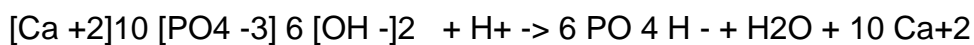
Teorías de mecanismos de acción de la caries dental

1. Teoría acidófila de Miller

Se basa en el concepto que en la cavidad oral existen bacterias capaces de producir ácidos, especialmente el láctico, mediante la vía glucolítica anaerobia, a partir de los azúcares. Y

como el esmalte dental está compuesto, en su mayor parte, por sales de calcio, las cuales, se pueden disolver por la acción de los ácidos orgánicos. Es decir, después de ingerir glúcidos, la placa dental forma ácido, por consiguiente el pH desciende por debajo de 5,5 (pH crítico), en zonas limitadas de la superficie del esmalte se da inicio la descalcificación (73).

En la cavidad oral existen bacterias capaces de producir ácidos, que liberan gran cantidad de H⁺, lo cual hace descender el pH por debajo del pH crítico; entonces las altas concentraciones de iones H⁺ provocan la solubilización de la hidroxiapatita y la desmineralización. Ecuación de la solubilización en medio ácido (73)



En la condición de neutralidad, las especies iónicas predominantes en la solución son los fosfatos primarios y secundarios. La forma terciaria sólo existe en cantidades muy reducidas. A un pH de 7,16 el 50% será H₂PO₄⁻ y el 50% HPO₄⁻². El hecho de que los cristales del hueso y el diente se compongan de fosfatos terciarios (HPO₄⁻³) indica una gran afinidad del calcio por ese ión. A medida que consume el fosfato terciario en la formación de Hidroxiapatita, los niveles se recuperan por disociación del fosfato secundario. En soluciones de bajo pH casi todos los fosfatos se encuentran en la forma de ácido fosfórico debido a la alta concentración de protones.

Por tanto, en condiciones de bajos valores de pH, las concentraciones del fosfato secundario en la solución son muy bajas. A un pH de 2,16 solo 50 % del total de fosfato es H₂PO₄ (fosfato primario), especie química precursora del HPO₄⁻² (fosfato secundario).

Con esto queda claro por qué en bajos valores de pH los niveles de iones HPO₄⁻³ en solución son casi cero, falta un factor del producto iónico HPO₄⁻³, y como la concentración de OH⁻ es muy reducida, el bajo pH causa disolución de la Hidroxiapatita.

Sin embargo, a esta teoría se le critica el proceso de erosión, puesto que cuando los ácidos disuelven el diente provocan erosión, en vez de caries dental. Además experimentalmente pueden producirse caries, en condiciones de baja acidez bucal.

2. Teoría de la proteólisis-quelación de Schatz y Martín

Se basa en dos reacciones interrelacionadas que ocurren simultáneamente:

- Destrucción microbiana de la matriz orgánica del diente mayormente proteínica.
- Disolución de los cristales de apatita por la acción de los agentes de quelación orgánicos (ácidos, aminoácidos, aminos, péptidos y glúcidos), algunos de los cuales se originan como producto de la descomposición de la matriz, otros están presentes en los alimentos, la saliva y en la costra que puede recubrir los dientes o sarro dentario (73).

Sin embargo, a esta teoría se pone en duda la existencia de la acción proteolítica, pues se considera que al ser la proteína del esmalte una escleroproteína del grupo de las queratinas, estas son muy resistentes a la acción de las enzimas proteolíticas.

El efecto de los fluoruros en el tratamiento de la caries dental se basa en la formación de fluorapatita, lo cual realiza cambios en la carga superficial del diente que impide la formación de la película adquirida y disminuyen la solubilidad del esmalte a los ácidos. Además los fluoruros potencian la precipitación de Ca y PO₄ (presentes en saliva) en el esmalte, para reemplazar las sales solubles de manganeso y carbonato pérdidas durante la desmineralización inducida por las bacterias de la placa; por consiguiente promueve la remineralización dental. En los últimos años se ha analizado el efecto antibacteriano del flúor al inhibir la glucosil transferasa, lo cual impide la formación de polisacáridos extracelulares a partir de la glucanos y se reduce de este modo la adhesión bacteriana. Además de inhibir la formación de polisacáridos intracelulares que limita el metabolismo bacteriano entre las comidas.

Histología de la caries dental

Las zonas histológicas de la desmineralización se describen a continuación:

- Zona traslúcida. Es el frente de avance de la lesión, separándola del esmalte normal, situada por debajo de la zona oscura. El esmalte se observa menos estructurado y tiene 1.2% de pérdida mineral por unidad de volumen; indicando la presencia del 1% de espacios en lugar del 0.1% en el esmalte intacto. Las principales diferencias con el esmalte normal son aumento en la concentración de flúor, disminución promedio de 12% en magnesio y una pérdida más variable de carbonato (74).
- Zona oscura. Aparece como una banda, extendiéndose sobre toda la superficie profunda del cuerpo de la lesión, en forma de una zona opaca y densa en la cual se observa poca estructura, en ocasiones se identifica dentro de la superficie del esmalte normalmente transparente. Se crean del 2 al 4% de espacios o poros, observándose una disolución por los ácidos en los cristales; con una pérdida mineral del 6% por unidad de volumen y una zona positivamente birrefringente a la luz polarizada (74).
- Cuerpo de la lesión. Es la zona de mayor desmineralización y destrucción cristalina, hay una pérdida mineral por unidad de volumen del 24%, con aumento de la cantidad de materia orgánica, es negativamente birrefringente. Los prismas del esmalte aparecen estriados y las estrías de Retzius están incrementadas, así como los espacios intercrystalinos, espacios interprismáticos donde los cristales aumentan su tamaño, son más electrodensos y porosos en la superficie (75).
- Capa superficial. Aparece cubierta con una multitud de agujeros diminutos como un panal de abejas. Tiene un espesor aproximado de 30 micras sobre un área radiolúcida creciente, los agentes desmineralizadores se difunden a través de una capa externa de

menor solubilidad, en uno o más puntos microscópicos de entrada. Se ha sugerido que son rupturas en la cutícula del esmalte, intersticios entre los tubos del esmalte y estrías no selladas de Retzius. La pérdida de mineral es de 9.9% por unidad de volumen, pues existe una reprecipitación del material disuelto en una etapa temprana de la misma lesión (75).

- Defecto cavitario. Cuando la capa superficial del esmalte se fractura microscópicamente, se produce una cavitación; con diferente extensión, grosor y profundidad. Por lo que las bacterias con la saliva se introducen al esmalte y dentina, alterando la estructura cristalina, pero no son detectables clínicamente sino por medio radiográfico (75).

Relación de las caries dentales con la genética

Prieto et al. (76) han mostrado que dentro de los factores de riesgo que predisponen a sufrir de caries se encuentran la variación en la calidad del esmalte dental, tanto en la porosidad como en la mineralización del mismo. La prolongada exposición del diente a los ácidos segregados por las bacterias como el *Streptococcus mutans*, es otro de los factores de riesgo, en el cual se han detectado diferentes variantes genéticas, que producen la descalcificación del diente, así como la composición de la saliva.

Otro factor importante en la genética es la asociación de la genética con la resistencia o la susceptibilidad a la caries se ha dado por la existencia de individuos que muestran una menor tendencia a desarrollar lesiones cariosas con respecto a otros encontrándose en igualdad de condiciones; por lo que ha surgido el interés por estudiar árboles genealógicos o gemelos en búsqueda de responsabilidades genéticas en la susceptibilidad a la caries, lo que ha llevado a estimar que la contribución genética a la caries es de aproximadamente 40% (77).

Se ha hablado del efecto de un gen mayor, que es causante de la caries, pero hay varios genes que pueden dar susceptibilidad al huésped para que este desarrolle la caries:

Genes que codifican para proteínas del esmalte:

La alteración de los tejidos duros del diente como la dentina y el esmalte, sirven como nichos adecuados para el desarrollo de las bacterias causantes de la caries dental. La complejidad de la naturaleza de la caries dental hace evidente que la enfermedad no esté asociada a un solo gen, sino a una interacción gen-medioambiente.

Se puede mencionar el gen de la tufelina (TUFT1), el cual tiene algunos genotipos que interactúan con altas concentraciones de *S. mutans* en niños con caries temprana y esta variación, junto con algunos genotipos de la ameloblastina (AMBN), ha sido asociada con una alta incidencia de caries en niños (76).

La variación genética en el gen de la amelogenina (AMELX) ha mostrado estar asociada con una alta experiencia en caries en adultos; esto puede deberse a que la amelogenina controla la formación jerárquica de los cristales y es crucial para promover la mineralización (76).

Además se ha mostrado que el gen que codifica para la metaloproteinasa 20 (MMP-20) desempeña un papel muy importante en el desarrollo inicial del esmalte y, por lo tanto, puede llegar a estar involucrado también en el desarrollo de la caries. Se ha visto en la población africana que al presentar una alta frecuencia del alelo T en el gen MMP-20 se da una menor incidencia de caries, es posible que este alelo cumpla una función protectora (76).

Genes del antígeno leucocitario humano: Un factor coadyuvante es la respuesta inmune del huésped a la caries, donde el complejo genético, conocido como el antígeno leucocitario humano (HLA) o complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) desempeña un importante papel en la interacción con los péptidos antigénicos. De acuerdo con esta interacción, se

produce la cantidad y la especificidad de los anticuerpos necesaria para lograr una respuesta protectora contra los microorganismos causantes de la caries.

El HLA es un conjunto de genes ubicados en el cromosoma 6, cuyo fin principal es el de codificar glicoproteínas presentes en las membranas de células nucleadas. Es la región genómica más vital con respecto a enfermedades infecciosas. Así mismo, se ha asociado con alteraciones en el desarrollo del esmalte, con el aumento del riesgo y predisposición a las infecciones cariogénicas donde el factor preponderante y que dispara esta respuesta es el *S. mutans* (76).

Otros autores han sugerido una significativa e importante asociación entre los genes HLA-II, proteínas HLA-II y los antígenos I/II, que son inmunodominantes, es decir, generan una alta respuesta de anticuerpos. Se ha encontrado que los pacientes que expresaron los genes HLA-DR4 tienden a ser susceptibles a la caries, porque fallan en montar una reacción inmune si no se presentan altas concentraciones de los antígenos I/II y porque las concentraciones de *S. mutans* son bastante altas; mientras que los individuos que expresaron los genes HLA DR1, DR2, DR3 y DRw6 mostraron una alta reacción inmune con bajas concentraciones de estos antígenos (76).

Rezende (75), Bathial y Gupta (78) han dado a conocer que se han desarrollado estudios con gemelos, los cuales han mostrado evidencia de la influencia genética en la presencia de caries. Se han analizado muchas variables relacionadas con la experiencia de caries como el número de dientes presentes, los dientes restaurados, dientes cariados; y se ha encontrado una concordancia significativa en los gemelos idénticos, no así en los gemelos no idénticos. Se ha visto que en el locus de los cromosomas 1, 2, 7, 8 y 17 puede haber mayores genes responsables de la regulación de la susceptibilidad a la caries.

Además, se ha detectado una relación entre la baja susceptibilidad de caries y el locus de los cromosomas 5q13.3, 14q11.2, and Xq27; y los genes con una alta susceptibilidad de caries se han identificado en el locus de los cromosomas 13q31.1 and 14q24.3.

El gen osteopontin (OPN) juega un papel muy importante en la mineralización; este gen se ha asociado con incidencias de hipoplasia en el esmalte de la dentición temporal; por lo que ha habido asociación entre la susceptibilidad de la caries en este tipo de dentición y dicho gen.

Existen muchos otros posibles genes que contribuyen al proceso, tales como los que codifican: la topografía oclusal, la profundidad de las fisuras y la inclinación de las paredes de estas; sin embargo, aún no han sido identificados dichos genes.

MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

El presente Seminario de Investigación consiste en una investigación teórico demostrativo, la cual, abarcará una investigación cualitativa y descriptiva sobre las implicaciones de la Biología Molecular en la Amelogénesis Imperfecta y otras condiciones bucodentales como la fluorosis, caries dentales e hipomineralización incisivo-molar.

Respecto a la parte de la investigación demostrativa, se realizaron una serie de prácticas de laboratorio cuyas metodologías se explican a continuación:

Prueba de identificación humana

Se realiza una punción en el dedo de los sujetos a analizar, se espera a que se forme una gota y se coloca en una hoja de papel de filtro secante. Se procede a analizar la información con el equipo.

Extracción de ADN

Lo primero que se realiza es recolección de la muestra de sangre mediante la venopunción, se requiere al menos 5 ml de sangre. Posteriormente en tubos tipo Falcón de 50 ml, se coloca la muestra de sangre y punto 9 volúmenes del total de Sucrosa 2X. Después se utiliza Sucrosa 1X hasta 50 ml que es la capacidad del tubo de ensayo. Las muestras se llevan a la centrífuga marca Eppendorf 5804R y se centrifugan 15 minutos a 4000 rpm. Se desecha el sobrenadante con cuidado de que el botón de núcleos celulares no se descarte. Se realiza otro lavado con Sucrosa 1X. Se repite la centrifugación y se descarta todo el sobrenadante. Después se agrega buffer de lisis y proteinasa K. Y se incuba toda la noche a 56°C. Luego se agrega NaCl 3 M, y el doble de volumen de cloroformo:alcohol isomílico. Se procede a agitar de 3 a 5 minutos con el equipo Vortex Mixer VM3000. Se realiza una centrifugación de

15 minutos a 4000 rpm. Se forman dos fases, una acuosa y otra orgánica y se procede cuidadosamente a tomar la fase acuosa con una pipeta plástica desechable y se traslada a un tubo de ensayo tipo Falcón de 15 ml y finalmente se coloca 2,5 volúmenes de etanol de 95° para la precipitación del ADN. Se recupera el ADN precipitado, se lava con etanol 70° y se centrifuga para recuperar el botón de ADN; se deja secar y se suspende en buffer TE.

PCR

El procedimiento requiere la extracción de ADN, 2X Master Mix y primers.

Electroforesis

La electroforesis se realiza utilizando un gel sumergido de agarosa al 2% en buffer de TBE. A las muestras amplificadas por PCR, se agrega 3 ul de azul de bromofenol usando una micropipeta de 5 ul-10 ul, después se centrifuga por unos segundos en la centrifuga Labnet-Prism™. Posteriormente, se cargan los pozos con las muestras con cuidado de no derramar para evitar que se mezclen entre sí. Se recomienda dejar un pozo vacío como separador de las diferentes muestras. Y en un pozo se coloca siempre un marcador de tamaño de fragmentos de ADN (escalera de 100 pbs de Thermo Scientific).

Después se procede a conectar los electrodos negativo y positivo, se corre a 100 V constantes por 20 a 30 minutos. Luego del procedimiento, se procede a visualizar el producto amplificado con un transiluminador de luz ultravioleta y se toma una fotografía de los resultados.

DESARROLLO

RESULTADOS

Caso clínico



Figura 1. Fotografía frontal extraoral e intraoral de amelogenesis imperfecta



Figura 2. Fotografías oclusales de la arcada superior e inferior

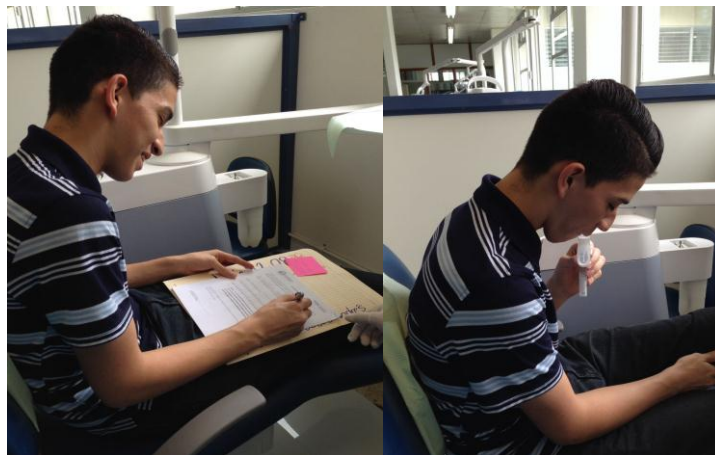


Figura 3. Firma de consentimiento informado y recolección de la muestra

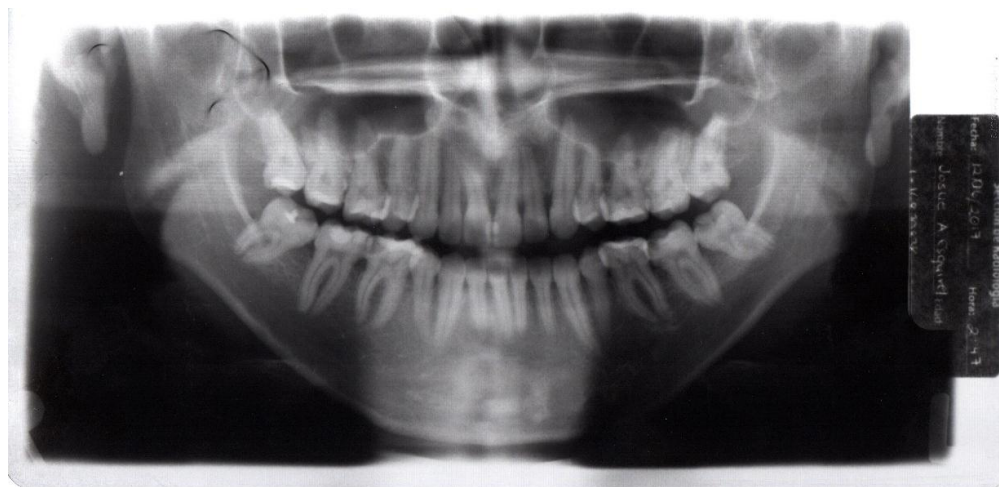


Figura 4. Radiografía panorámica de amelogenesis imperfecta

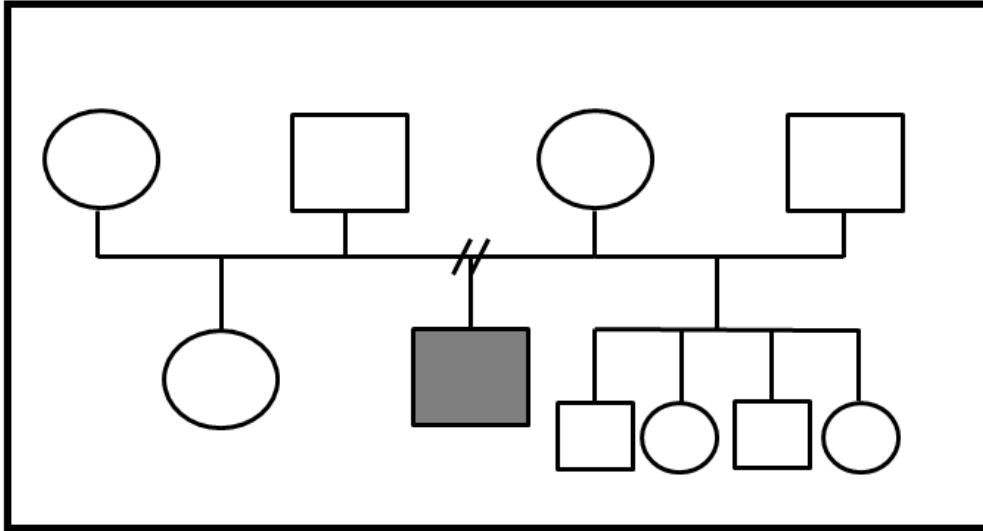


Figura 5. Genograma del caso clínico

Paciente afectado de Amelogenesis Imperfecta Hipomineralizada, según el análisis clínico y radiográfico.

Patrón de herencia: desconocido.

Núcleo familiar conformado por madre e hijo. La madre tiene dos hijas y dos hijos de otra relación. El padre tiene una hija de otra relación.

No se refieren antecedentes de Amelogenesis Imperfecta en la familia materna ni paterna.

No se refieren antecedentes sistémicos relevantes de ninguna condición de salud.

Laboratorio:

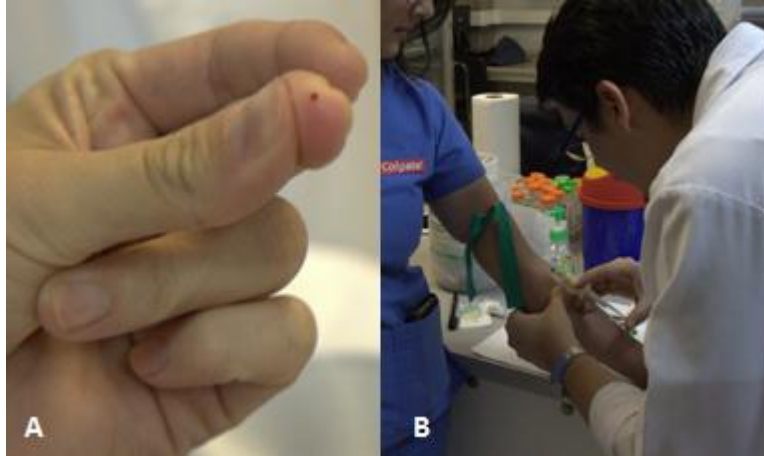


Figura 6. Toma de muestras: (A) para Prueba de Paternidad (B) para la extracción de ADN.

Procedimiento de extracción de ADN

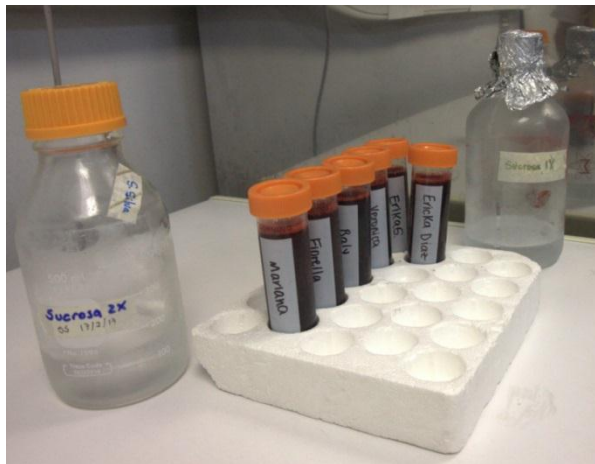


Figura 7. Materiales y muestras para la realización de extracción de ADN

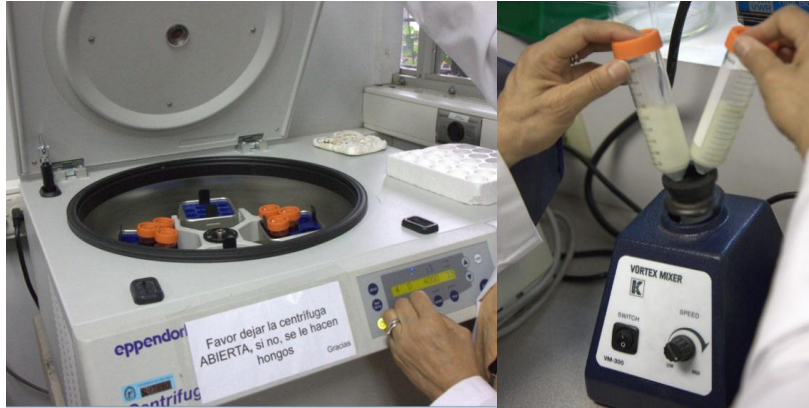


Figura 8. Proceso de centrifugación y agitación



Figura 9. Colocación de Sucrosa 1X, cloroformo



Figura 10. Proceso de centrifugación



Figura 11. Separación de fases orgánica y acuosa.

Prueba de identificación humana

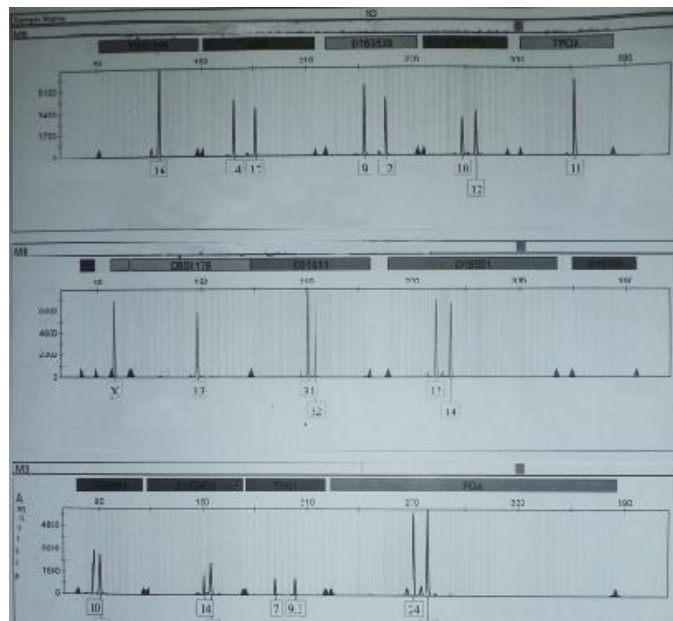


Figura 12. Marcadores genéticos

PCR



Figura 13. 2XMaster Mix



Figura 14. Preparación de las muestras



Figura 15. Equipo de PCR

Electroforesis



Figura 16. Colocación de azul de bromofenol en las muestras de PCR



Figura 17. Minicentrífuga Labnet-PrismTM

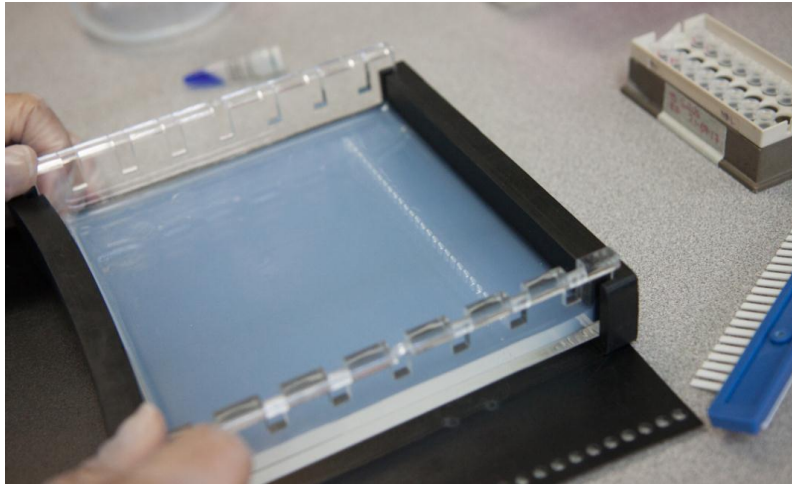


Figura 18. Agarosa y molde para pozos

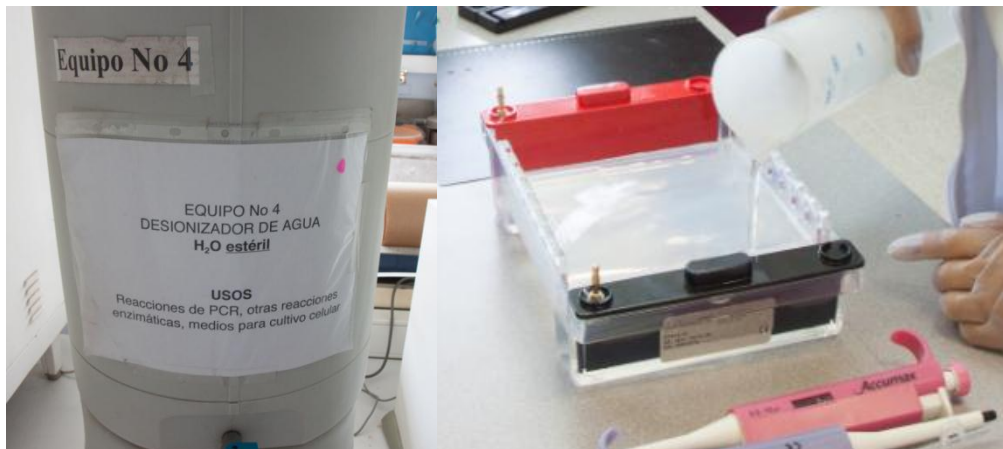


Figura 19. Equipo de desionizador de agua estéril



Figura 20. Colocación de las muestras en los pozos.

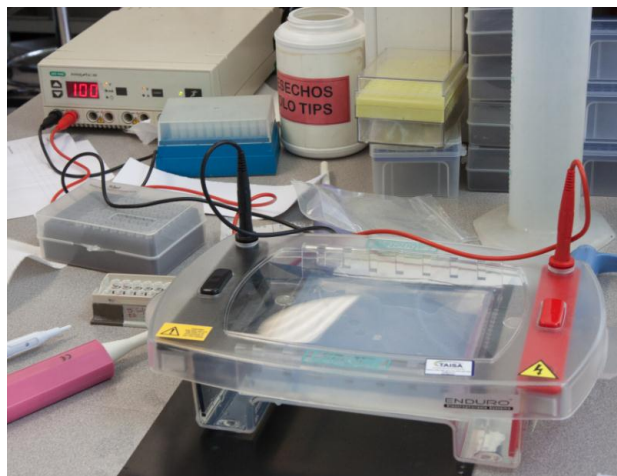


Figura 21. Equipo de electroforesis



Figura 22. Espectro con luz ultravioleta de los genes amplificados

DISCUSIÓN

La biología molecular es conocida como tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética. Esta es una subdisciplina de la biología que estudia a nivel molecular los diversos procesos que ocurren en los seres vivos. Se considera como una ciencia que permite la comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética que determinan la estructura y función celular.

Los expertos destacan que en biología molecular existen sucesos muy importantes como el descubrimiento del ADN y el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) que sentaron las bases para el desarrollo del Proyecto Genoma Humano, y posteriormente al conocimiento genético de las enfermedades.

Es importante destacar que el dogma central de la biología molecular describe el proceso en dos pasos (transcripción y traducción) como la información genética lleva a la producción de proteínas, esto a través de los ácidos nucleótidos (ADN y ARN).

Por medio del desarrollo de la técnica del PCR se puede obtener una síntesis de secuencias específicas de ADN, por medio de la electroforesis se da la separación de fragmentos del ADN para una mejor evaluación del mismo.

Estas investigaciones han dado sustento a la biología molecular y por medio de ella se ha logrado además de los aportes mencionados aislar fragmentos de DNA de interés, unirlos en nuevas combinaciones e introducir el nuevo DNA (recombinado) en un organismo vivo.

El Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, ubicado en la Universidad de Costa Rica, realiza investigación básica y aplicada utilizando herramientas de la biología celular y molecular. Existe un área de genética y patología humana, donde se pueden investigar diversas enfermedades, sus mutaciones, sus variantes genéticas en proteínas. Se pueden utilizar servicios de electroforesis, secuenciación de ADN, técnica de PCR.

En esta investigación se realizó el estudio y análisis de condiciones que afectan el esmalte de distintas formas. La caries dental produce una desmineralización del esmalte a partir de

un proceso del ácido producido por las bacterias. En la hipoplasia incisivo-molar se manifiesta una hipomineralización a nivel de las molares y/o los incisivos con signos claros de afectación del esmalte.

En la fluorosis hay presencia de una hipomineralización del esmalte, manifestándose con manchas blancas o cafés de una forma generalizada. En la amelogenénesis imperfecta, se presenta la afectación del esmalte en cuanto a cantidad y calidad del esmalte. Desde un punto de vista clínico, es posible que estas afectaciones del esmalte se puedan confundir uno del otro por su similitud en sus manifestaciones.

La amelogenénesis imperfecta se define como un desorden genético que produce afectación en el desarrollo del esmalte y puede aparecer en un individuo por diferentes patrones de herencia que incluye: herencia autosómica recesiva, autosómica dominante, por mutación espontánea en genes o ligado al cromosoma X. Es importante conocer estas variabilidades en cuanto a aparición de la enfermedad para así tener una mayor comprensión de la enfermedad y poder realizar diagnóstico certero y posterior tratamiento.

Por ende, el análisis y el estudio de estas patologías del esmalte permiten conocer cada una de las condiciones. De esta manera, se identifican las características de cada una, permitiendo un diagnóstico diferencial o definitivo de la condición presente en algún paciente. Desarrollar el análisis y estudios científicos de mecanismos que afectan la cavidad oral, es indispensable, principalmente cuando se ve afectado el esmalte, ya que enfermedades tan destacadas como la amelogenénesis imperfecta, influyen notablemente en la vida de las personas, desde su confianza personal hasta la función de las piezas dentales. Tener en cuenta que el estudio de las enfermedades debe dirigirse hacia mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Conclusiones

1. La biología molecular como disciplina que estudia los procesos vitales que ocurren en los seres vivos, nos permite comprender mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética, así como, esta información contenida en los genes determina la función, respuesta y estructura de las células.
2. La biología molecular a través de complejos enlaces y mecanismos por los cuales el ADN codifica, busca comprender la vida a través de la expresión de las proteínas apropiadas en cantidad y tipos celulares específicos para definir un fenotipo.
3. Los fenómenos biológicos se comprenden a través de la descripción de los mismos que otorga la biología molecular, en la expresión de genes individuales y la organización de un conjunto de genes o genoma y sus variaciones.
4. La biología molecular es de gran importancia para comprender las interacciones en las poblaciones de organismos y el ambiente que los afecta.
5. La aplicación de la biología molecular a la profesión odontológica ha ayudado a conseguir diagnósticos más precisos y tratamientos más adecuados. Estos avances no se limitan únicamente al campo curativo, sino a la prevención y tratamientos.
6. Considerando la cantidad de eventos moleculares que ocurren en la cavidad bucal, la biología molecular contribuye a explicar y comprender los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética, desde condiciones como Amelogénesis imperfecta, bacterias comensales del biofilme dental, remodelado óseo y células reparadoras de la mucosa y gingiva entre otros.
7. El diagnóstico de muchas condiciones de salud, se ha desarrollado gracias al diagnóstico molecular el cual ha revolucionado el diagnóstico clínico.

8. La cuantificación y detección específica de material genético de una muestra biológica ha impactado significativamente el diagnóstico de enfermedades infecciosas, condiciones hereditarias y enfermedades de gran importancia como el cáncer.
9. Las tecnologías que acompañan a la biología molecular, más rápidas y precisas, son herramienta clave para el equipo clínico tratante o investigador con un beneficio directo al paciente.
10. En el desarrollo de la ingeniería tisular en odontología para la reparación de tejidos se basa en el aporte de la biología molecular y la biotecnología.
11. Todo este desarrollo tecnológico de la Biología molecular está dirigido a impactar los antiguos paradigmas en todas las ciencias médicas, para lograr un gran avance en el diagnóstico y en la calidad de vida de los seres humanos.
12. Las bases en el conocimiento de la biología molecular y su aplicación en el estudio de patologías de la cavidad oral, como la amelogénesis imperfecta, son fundamentales para realizar un diagnóstico acertado y determinar el mejor tratamiento para los individuos afectados.

Recomendaciones

Se recomienda continuar con este Seminario de Graduación sobre la biología molecular y sus implicaciones en condiciones bucodentales; como es en el caso de la amelogénesis imperfecta con el fin de informar a los futuros profesionales de odontología, odontólogos y a la población en general, la importancia de la biología molecular para una mayor comprensión de la enfermedad.

Por motivos de tiempo, no se pudieron obtener los resultados de las muestras de células de la mucosa oral; por consiguiente, se debe continuar con el caso clínico presentado con el objetivo de averiguar el tipo de afectación genética, la conformación de la proteína afectada y la morfología del esmalte dental de las terceras molares.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Fecha	Actividad	Recursos	Responsables
31-3-2017	Inducción	Recurso humano Sala de sesiones	Dra. Gina Murillo Dra. Sandra Silva
21-4-2017	Clase 1. Estructura y función de los ácidos nucleicos Entrega 1er tarea	Recurso humano Sala de sesiones	Dra. Gina Murillo Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario
28-4-2017	Clase 2. Genoma Humano Entrega tarea 2	Recurso humano Sala de Sesiones	Dra. Gina Murillo Dra. Sandra Silva Estudiantes Seminario
12-5-2017	Continuación Clase 2. Extracción ADN	Laboratorio de Genética Molecular CIBCM	Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario
26-5-2017	Evaluación de resultados de muestras de ADN Entrega tarea 3	Laboratorio de Genética Molecular CIBCM	Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario
9-6-2017	Clase 3. Genética Básica Amelogénesis Imperfecta	Recurso Humano Sala de Sesiones	Dra. Gina Murillo Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario
23-6-2017	Presentación de temas en parejas Continuación clase 3	Recurso Humano Sala de Sesiones	Dra. Gina Murillo Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario
26-7-2017	Recolección de datos y muestras de saliva paciente con amelogénesis	Clínica de Integral Facultad de Odontología	Dra. Gina Murillo Estudiantes de Seminario
7-8-2017	Reunión para valorar avances	Recurso Humano Sala de Sesiones	Dra. Gina Murillo Estudiantes de Seminario
22-9-2017	Entrega documento descripción de PCR. Elaboración PCR	Laboratorio de Genética Molecular CIBCM	Dra. Gina Murillo Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario
29-9-2017	Clase 4 PCR Resultados de PCR	Laboratorio de Genética Molecular CIBCM	Dra. Gina Murillo Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario
4-10-2017	Cirugía de extracción de cordales paciente con amelogenesis	Clínica de Exodoncia y Cirugía Facultad de Odontología	Dra. Gina Murillo Fiorella Mora Piedra

27-10-2017	Elaboración de Presentación	Recurso Humano Sala de Sesiones	Dra. Gina Murillo Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario
3-11-2017	Práctica Exposición	Recurso Humano Sala de Sesiones	Dra. Sandra Silva Estudiantes de Seminario

Factores facilitadores

- La participación activa de los sustentantes del proyecto de graduación: constituyó el núcleo del proyecto, asimismo fue fundamental el apoyo de todos los estudiantes para el desarrollo óptimo del tema.
- La experiencia previa de las directoras del proyecto en el tema desarrollado: fue de suma importancia porque ya participan en otros proyectos relacionados con el tema y aportaron todo el conocimiento para el adecuado diseño y ejecución del proyecto.
- El apoyo técnico del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM): fue determinante para realizar las pruebas y demostraciones respectivas relacionadas con el tema seleccionado.

Factores obstaculizadores

- La recopilación de datos y clasificación de información útil: por la complejidad del tema, para hacer un correcto diagnóstico de la enfermedad se deben realizar múltiples pruebas que no son accesibles para muchos de los afectados.
- El área de investigación desconocida por los estudiantes: además de la falta de experiencia en la realización de investigaciones de esta índole.
- El tema que se investiga es muy extenso y complejo: por lo que abordarlo completamente se dificulta a lo largo de la investigación.

Bibliografía

1. Rosalia De Necochea, Juan Carlos Canul. Métodos Físicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de Ácidos Nucleicos. UNAM. 2004 Junio; 45p.
2. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Biología Molecular del gen. España: Editorial Médica Panamericana, 2008.
3. Ross, M; Pawlina, W (2010) Histología: texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. 5° edición. España, Madrid Editorial Médica Panamericana.
4. Karp, G. Bases Químicas de la vida : Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos., New York, Estados Unidos: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2014
5. Barrett K., Barman S., Boitano S. & Brooks H. Ganong: Fisiología médica. New York, Estados Unidos: McGraw-Hill, 2016.
6. Weil, A. Bioquímica ilustrada: Estructura y función del ácido nucleico. New York, Estados Unidos: McGraw-Hill, 2016.
7. Rosalia De Necochea, Juan Carlos Canul. Métodos Físicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de Ácidos Nucleicos. UNAM. 2004 Junio; 45p.
8. Cienfuegos Rivas, Eugenia Guadalupe, López Santillán, José Alberto, and Castro Nava, Sergio. Genética General. México, D.F., MX: Plaza y Valdés, S.A. de C.V., 2011. ProQuest ebrary. Web. 3 May 2017. Copyright © 2011. Plaza y Valdés, S.A. de C.V.. All rights reserved.
9. Barahona Echeverría, Ana, and Piñero, Daniel. Genética: la continuidad de la vida. México, D.F., MX: FCE - Fondo de Cultura Económica, 2010. ProQuest ebrary. Web. 3 May 2017. Copyright © 2010. FCE - Fondo de Cultura Económica. All rights reserved.
10. Martínez. M & Sáenz. C. (2003). Principios de GENÉTICA MENDELIANA. Recuperado de <https://ecofisiologia.files.wordpress.com/2009/08/genmendeliana-apuntesene2004.pdf>
11. "Áreas básicas." Guía Nacional para el examen de Residencias Médicas, 2eEds. José Francisco González Martínez, et al. New York, NY: McGraw-Hill, 2013.
12. Cecie Starr, Ralph Taggart, Christine Evers, Lisa Starr. 2016. Biología: La unidad y diversidad de la Vida, 14 (1): 176-183
13. Patricia Silva. 2009. Genética Mendeliana. Facultad de Ciencias Médicas, UNRosario. 11pp
14. Naturaleza de los genes y el genoma. In: Karp G. eds. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos, 7e New York, NY: McGraw-Hill; . <http://accessmedicina.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=2036§ionid=153037054>. Accessed mayo 04, 2017.

15. Diazconti, Mario Perezpeña, and Pedro F. Valencia Mayoral.. "Enfermedades genéticas y del desarrollo." Patología Eds. Pedro Francisco Valencia Mayoral, and Jesús Ancer Rodríguez. New York, NY: McGraw-Hill, 2014.
16. Aljanati, D. (2004). Biología III. Los códigos de la vida. recuperado de https://books.google.co.cr/books?id=8uPwQblZsylC&pg=PA121&dq=leyes+de+mendel&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=leyes%20de%20mendel&f=false
17. Anthony J. Griffiths, Susan Wessler, Sean Carroll, John Doebley. 2015. Introduction to genetic analysis. 11 (23): 868
18. William Klug, Michael Cummings, Charlotte Spencer. 2014. Conceptos de Genética. Pearson. 8va Ed.
19. Domínguez F., Loidi L., Vidal A., & Barros F. Tratado de endocrinología pediátrica: Fundamentos De Genética, Genómica, Proteómica y Bioinformática. New York, Estados Unidos: McGraw-Hil, 2009
20. Lozada Méndez, Margarita. Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa. Córdoba, AR: El Cid Editor 2009.
21. Diazaraque R, Pacheco R, Roiz JC. Polymerase chain reaction. Basis and application in internal medicine. Rev Clin Esp [Internet]. 2002;202(5):272–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2565\(02\)71050-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2565(02)71050-3)
22. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2013;2(5):70–8. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
23. Rodríguez A, Ríos A, Mosqueda J. Reacción en cadena de la polimerasa. In: Montes A, Rodríguez A, Borunda J. eds. Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud, 2e New York, NY: McGraw-Hill <http://accessmedicina.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=1803§ionid=124156025>. Accessed septiembre 17, 2017.
24. Fernández-Cuenca, F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 2004;22(6):355-360. Obtenido en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-aplicaciones-las-tecnicas-pcr-epidemiologia-S0213005X04731080>
25. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. Cancer Cell. 2004;5 (5):489-500. Obtenido en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610804001126>

26. Gadhia K, McDonald S, Arkutu N, Malik K. Amelogenesis imperfecta: an introduction. *British Dental Journal*. 2012; 212: 377-379.
27. Jans G, Sandoval P, Díaz J, Vergara C, Zaror C, Acevedo C. AMELOGÉNESIS IMPERFECTA. A PROPOSITO DE UN CASO. *Acta Odontológica Venezolana*. 2013; 51 (1): 1-10.
28. Gonzales-pinedo, C; Perona, G (2009) Amelogenesis imperfecta: Criterios de clasificación y aspectos genéticos. Departamento Académico de Estomatología del Niño y Adolescente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. *Revista Estomatol Herediana*. Obtenido el día 24 de mayo, 2017 Disponible en: <https://upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/viewFile/1818/1828>
29. Gopinatha V, Yoongb T, Yeanc C, Ravichandra M. Identifying polymorphism in enamel gene in amelogenesis imperfecta (AI). *Archives of oral biology*. 2008; 53: 937-94
30. Smith C, Murillo G, Brookes S, Poulter J, Silva S, Kirkham J, Inglehearn C, Mighell A; Deletion of amelotin exons 3-6 is associated with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 2016; 25 (16): 3578-3587.
31. Hurtado P, Tobar F, Osorio J, Orozco L, Moreno F. Amelogénesis imperfecta: Revisión de la literatura. *Rev. estomatol*. 2015; 23(1):32-41.
32. Gjørup H, Haubek D, Hintze H, Haukali G, Løvschall H, Hertz J, Poulsen S; Hypocalcified type of amelogenesis imperfecta in a large family: clinical, radiographic, and histological findings, associated dento-facial anomalies, and resulting treatment load. *Acta Odontologica Scandinavica* 2009 67(4): 240-247.
33. Neville, B. (2016). *Abnormalities of Teeth. Oral and Maxillofacial Pathology*. 4th edition, 2, pags; 49-110.
34. Prasad, Laouina and Alloussi (2016). Amelogenesis imperfecta. *JouARNI of Dental Research*, volume 95. Obtenido el día 24 de mayo, 2017 Disponible en: <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/ehost/detail/detail?sid=8a00d650-17a7-4ecd-a9c8-f8d47ac258a%40sessionmgr101&vid=0&hid=130&bdata=JnNpdGU9ZWwhvc3QtbGl2ZSZzY29wZT1zaXRI#AN=119599614&db=ddh>
35. Shivhare P, ShankaARNrayan L, Gupta A, Sushma P. Amelogenesis Imperfecta: A Review. *JouARNI Of Advanced Oral Research*. (2016, Jan), [cited May 24, 2017]; 7(1): 1-6.
36. Shivhare, P., ShankaARNrayan, L., Gupta, A. and Sushma, P. (2016). Amelogenesis Imperfecta: A Review. *JouARNI of Advanced Oral Research*, volume 7, número 1. Obtenido el día 24 de mayo, 2017 Disponible en: <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=b013bbd7-16f5-4abf-a1b5953b9686ddb6%40sessionmgr120&vid=0&hid=130>

37. Cortés, M (2011) Maduración y desarrollo de los dientes permanentes en niños de la comunidad de Madrid: aplicación de la edad dentaria. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Odontología. Obtenido el día 24 de mayo, 2017. Disponible en: https://eprints.ucm.es/Marta_Paz_Cort%C3%A9strabajoc%investigacion/pdfviewer
38. Loster J, Wiczorek A. Ultrastructural view of dental surface in Dentinogenesis imperfecta type II in a Young Adult. J Stoma Polish Dental Society 2013; 66, (4): 476-484
39. Larmas M, Sándor G. Enzymes, Dentinogenesis and Dental Caries: a Literature Review. JouARNI Of Oral & Maxillofacial Research. (2014, Oct), [cited May 24, 2017]; 5(4): 1-12
40. Sinha R , Sarkar S , Khaitan T , Kabiraj A, Ghanta S , Ramani D. Dentinogenesis imperfecta: case report and review of literatura. JouARNI of Oral Medicine. 2016; 2(3):156-158
41. Barron, M., McDonnell, S.T., MacKie, I. & Dixon, M.J. (2008). Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfect and dentine dysplasia. Orphanet JouARNI of Rare Diseases. Obtenido el día 24 de mayo, 2017 Disponible en: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-3-31>
42. Güven S, Demirci F, Tanik A, Koparal M. Prosthetic treatment in dentinogenesis imperfecta type II: a case report. Acta Odontologica Turcica. (2016, May), [cited May 24, 2017]; 33(2): 86-90.
43. Wang X, Wang J, Liu Y, Yuan B, Ruest L, Qin C, et al. The Specific Role of FAM20C in Dentinogenesis. JouARNI Of Dental Research. (2015, Feb), [cited May 24, 2017]; 94(2): 330-336
44. Crawford P et al. Amelogenesis imperfecta: A review. Orphanet JouARNI of Rare Diseases. 2007; 2(17): 1-11.
45. Posada G, Restrepo A. Factores de riesgo ambientales y alimentarios para la fluorosis dental, Andes, Antioquia, 2015. Rev. Fac. Nac. Salud Pública [internet]. 2017. [consultado el 18 de Jun 2017]; 35(1):79-90. Disponible revistasalupublica@udea.edu.co
46. Sánchez EP. Relación entre la prevalencia de Fluorosis dental y factores asociados en escolares de 9 años en Distrito de Victor Larco Herrera – 2010. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2010.
47. Ramírez B et al. Fluorosis dental en escolares y exploración de factores de riesgo. Municipio de Frontino, 2003. Rev Fac Odont Univ Ant, 2006; 17 (2): 26-33.
48. González L, Bolaños V. Prevalencia y Severidad de la Fluorosis Dental. Odovtos. 2003;1(5):48-53.

49. Uzcátegui J, Pachas R. AlteARNtiva conservadora para el tratamiento de la Fluorosis dental de severidad moderada; presentación de un caso. *Revista Odontológica de los Andes*. 2012; 7(1): 54-61.
50. Abanto, J et al. Dental Fluorosis: Exposure, prevention and management. *JouARNI Section: Clinical and Experimental Dentistry*. 14(2): 103-106.
51. Montaña MA. Guía de fluorosis dental Normas técnicas de la fluorosis dental. Colombia: Secretaría de Salud Departamental, Gobernación de Huila. 2008. Disponible en http://huila.gov.co/documentos/G/guia_fluorosis_dental_huila.pdf
52. Mattos M, Melgar R. Riesgo de Caries Dental. *Rev Estomatol. Herediana*. 2004; 14 (1-2): 101-106.
53. Crawford P, Aldred M, Bloch-Zupan A. Review Amelogenesis imperfecta. *Orphanet JouARNI of Rare Diseases*. [Internet]. 2007. [Consultado el 18 Jun 2017]; 2 (17): 1-11. Disponible <http://www.OJRD.com/content/2/1/17>
54. González L, Bolaños V, Acuña G. Fluorosis dental en niños costarricenses de 12 años: 10 años de seguimiento. *Odovtos*. 2007; 1(9).
55. Bronckers A.L.J.J. , Lyaruu D.M., and DenBesten P.K. (2009). The Impact of Fluoride on Ameloblasts and the Mechanisms of Enamel Fluorosis. *J Dent Res* 88:877-891.
56. Lyaruu DM, Bervoets TJ, Bronckers AL (2006). Short exposure to high levels of fluoride induces stage-dependent structural changes in ameloblasts and enamel mineralization. *Eur J Oral Sci* 114(Suppl 1):111-115.
57. Walton RE, Eisenmann DR (1975). Ultrastructural examination of dentine formation in rat incisors following multiple fluoride injections. *Arch Oral Biol* 20:485-488.
58. Eanes ED, Hailer AW (1998). The effect of fluoride on the size and morphology of apatite crystals grown from physiologic solutions. *Calcif Tissue Int* 63:250-257.
59. Tanimoto K, Le T, Zhu L, Chen J, Featherstone JD, Li W, et al. (2008). Effects of fluoride on the interactions between amelogenin and apatite crystals. *J Dent Res* 87:39-44.
60. DenBesten PK, Yan Y, Featherstone JD, Hilton JF, Smith CE, Li W (2002). Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol* 47:763-770.
61. Gerlach RF, de Souza AP, Cury JA, Line SR (2000). Fluoride effect on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *Eur J Oral Sci* 108:48-53; erratum in *Eur J Oral Sci* 108:464, 2000.

62. Crenshaw MA, Bawden JW (1984). Proteolytic activity in embryonic bovine secretory enamel. In: Tooth enamel IV. Fearnhead RW, Suga S, editors. Amsterdam: Elsevier Science, pp. 109-113.
63. Nishikawa S, Josephsen K (1987). Cyclic localization of actin and its relationship to junctional complexes in maturation ameloblasts of the rat incisor. *Anat Rec* 219:21-31.
64. Araya, W. Murillo, A. (2014). Seminario de Graduacion: Fluorosis dental. Universidad de Costa Rica. 3-9
65. Salas M, Chavarria R, Solorzano I, Carvajal, D. (2002) Encuesta Nacional de Salud Oral: Fluorosis del esmalte, 1999. Series de documentos técnicos del INCIENSA n7. Tres Rios, Costa Rica.
66. Mittal N. Phenotypes of Enamel Hypomineralization and Molar Incisor Hypomineralization in Permanent Dentition: Identification, Quantification and Proposal for Classification. *JouARNI Of Clinical Pediatric Dentistry* [serial on the Internet]. (2016, Nov), [cited June 22, 2017]; 40(5): 367-374. Available from: Dentistry & Oral Sciences Source
67. Savin c, bălan a, gavrilă I, mihalaş e, petcu a, toma v. molar incisor hypomineralisation syndrome (mih). *InteARNtional JouARNI Of Medical Dentistry* [serial on the Internet]. (2016, Oct), [cited June 22, 2017]; 6(4): 284-287. Available from: Dentistry & Oral Sciences Source.
68. Arora B, Singh Arora A, Singh Khinda V, Kallar S. Molar Incisor Hypomineralization (MIH) - A Lesion Or A Disease?. *Indian JouARNI Of Dental Sciences* [serial on the Internet]. (2013, Dec), [cited June 23, 2017]; 5(5): 41-45. Available from: Dentistry & Oral Sciences Source.
69. De Oliveira D, Favretto C, Cunha R. Molar incisor hypomineralization: Considerations about treatment in a controlled longitudinal case. *JouARNI Of The Indian Society Of Pedodontics & Preventive Dentistry* [serial on the Internet]. (2015, Apr), [cited June 22, 2017]; 33(2): 152-155. Available from: Dentistry & Oral Sciences Source
70. Kühnisch J, Heitmüller D, Thiering E, Brockow I, Hoffmann U, Heinrich J, et al. Proportion and extent of manifestation of molar-incisor-hypomineralizations according to different phenotypes. *JouARNI Of Public Health Dentistry* [serial on the Internet]. (2014, Winter2014), [cited June 23, 2017]; 74(1): 42-49. Available from: Dentistry & Oral Sciences Source.
71. Kühnisch J, Thiering E, Heitmüller D, Tiesler C, Grallert H, Heinrich J, et al. Genome-wide association study (GWAS) for molar-incisor hypomineralization (MIH). *Clinical Oral Investigations* [serial on the Internet]. (2014, Mar), [cited June 23, 2017]; 18(2): 677-682. Available from: Dentistry & Oral Sciences Source.
72. Ferreira I, Paiva E, Ríos H, Boj J, Espasa E, Planells P. Hipomineralización incisivo molar: su importancia en Odontopediatría. *Odontología Pediátrica*. 2005; 13 (2): 54-59.

73. Núñez, D; García L (2010) Bioquímica de la caries dental. Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Instituto de Ciencias Básicas y preclínicas Victoria de Girón. Obtenido en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000200004
74. Nishikawa, A; Yoshida, A (2003) Histological Aspects of Human Enamel Fissure Caries studied by CLSMT. Dept of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Univ of Sydney, Australia. Obtenido en: http://www.microscopy-analysis.com/sites/default/files/magazine_pdfs/mag%20147_2003_Jan_Nishikawa_1.pdf
75. Balda, R; Solórzano A; Gonzalez, O (2000) Lesión inicial de Caries. Parte I: Características macroscópicas y microscópicas. Obtenido en: http://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/3/lesion_inicial_caries.asp
76. Prieto S, García D, Santacoloma S, Mejía J. Caries dental: ¿influyen la genética y la epigenética en su etiología? Revisión de la literatura. 2013; 32 (69): 83-92. <http://www.redalyc.org/pdf/2312/231240434007.pdf>
77. Iguarán I. Factores biológicos asociados a la caries dental. Universidad de Guayaquil 2012. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/reduq/2766/1/FACTORES%20BIOLOGICOS%20ASOCIADOS%20A%20LA%20CARIES%20DENTAL.pdf>
78. Rezende A. Genetics and Caries- Prospects. Cariology. 2012; 26 (1): 7-9. <http://www.scielo.br/pdf/bor/v26nspe1/a02.pdf>
79. Bathial S, Gupta N. Role of Genetics in Dental Caries. 2017; 2 (1): 342- 346 <file:///E:/Dr%20Sonal%20caries%20genes.pdf>