

VARIACIONES PATOGENICAS Y NO PATOGENICAS DE GENES *PAX9* Y *MSX1* EN PACIENTES YUCATECOS CON AGENESIA DENTALGonzález-Pérez¹, Nayelli Anaí; Herrera-Atoche¹, José Rubén; López-González², Paola y González-Herrera^{2,3}, Lizbeth¹Facultad de Odontología UADY²DIMYGEN Laboratorio SCP.³Centro de Investigaciones Regionales Unidad Biomédicas, UADY

Auto de correspondencia: glez_anai@hotmail.com

Recibido: 31/agosto/2018

Aceptado: 30/septiembre/2018

Publicado: 31/octubre/2018

RESUMEN

La agenesia dental es una anomalía del desarrollo de la lámina dental, impidiendo la formación del germen. La prevalencia en Yucatán se registra en 5.8%. Como causa genética de la agenesia dental se han demostrado variaciones genéticas en factores de transcripción, de los genes *PAX9* y *MSX1*. Se incluyeron 6 familias con agenesia dental confirmada mediante anamnesis y ortopantomografía; a partir de exudado bucal se realizó extracción y amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación tipo Sanger de la región codificante de ambos genes. El análisis de las secuencias se realizó en la base de datos www.ncbi.nlm.nih.gov. Se encontraron 9 variantes genéticas, 2 de las cuales no han sido reportadas en la base de datos de NCBI; en el gen *MSX1* se identificó la variante g.8485C>T, en el gen *PAX9* se identificó la variante g.10621G>C en el exón 2 de 2 pacientes g.13980C>T y g.13981G>C en el exón 3, g.23695_23696insT, g.23811_23812insT en el exón 4 previamente descritas y g.13729A>G en el intrón 2, g.23836T>C en el exón 4 que al no estar reportadas en la base de datos de NCBI sugiere una nueva variante de significado incierto. Se demuestra la presencia de variaciones genéticas patogénicas y no patogénicas en pacientes con agenesia dental familiar y se corrobora la aparición de 2 variantes genéticas en el gen *PAX9* posiblemente nuevas dadas que no se han descrito en las bases de datos del genoma humano.

Palabras clave: Agenesia dental / odontogénesis / *PAX9* / *MSX1* / variación genética.

ABSTRACT

Dental agenesis is an anomaly of the development of the dental lamina, preventing the formation of the germ. The prevalence in Yucatan is recorded at 5.8%. The genetic cause of dental agenesis has been greatly improved in the transcription factors of the *PAX9* and *MSX1* genes. Six families with dental agenesis confirmed by anamnesis and orthopantomography were included; The extraction and amplification of the DNA is carried out from the buccal exudate by the reaction in the polymerase chain (PCR) and the Sanger-type sequencing of the coding region of both genes. The analysis of the sequences was done in the database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Nine genetic variants have been found, 2 of which have not been reported in the NCBI database; in the gene *MSX1* the variant g.8485C> T is identified, in the gene *PAX9* the variant g.10621G> C was identified in exon 2 of 2 patients g.13980C> T and g.13981G> C in exon 3, g.23695_23696insT, g.23811_23812insT in exon 4 previously described and g.13729A> G in intron 2, g.23836T> C in exon 4 that are not informed in the NCBI database a new variant of uncertain significance. The presence of pathogenic and nonpathogenic genetic variations in patients with familial dental agenesis has been demonstrated and corroborated in the appearance of 2 genetic variants in the *PAX9* gene possibly in the human genome databases.

Key words: Dental agenesis / odontogenesis / *PAX9* / *MSX1* / genetic mutation.

INTRODUCCION

La agenesia dental es una anomalía de desarrollo resultado de un trastorno de la lámina dental, que impide la formación del germen dentario, esta formación es también conocida como odontogénesis, mecanismo en el cual se encuentran involucrados aproximadamente 300 genes, entre los que destacan algunos homeobox, específicamente el *MSX1*, *MSX24* y *PAX9* (Shahid et al. 2016) ya que intervienen en el proceso de diferenciación celular dando como resultado la inhibición de la odontogénesis en la etapa del brote. Se reporta una prevalencia del 5.8% en el estado de Yucatán, excluyendo terceras molares (Herrera et al. 2014). Por su

etiología puede clasificarse en sindrómica y no sindrómica, por su tipo de herencia en esporádica o familiar, Como causa genética de la agenesia dental se han demostrado defectos genéticos en factores de transcripción, de los que destaca el gen *PAX9* (Chhabra et al. 2014).

En un estudio realizado en pacientes de Arabia Saudita con agenesia dental en donde se estudiaron variaciones en los genes *MSX1*, *PAX9* y *MMP20*, se reportaron cinco nuevas mutaciones que incluyen cuatro en *MSX1*, uno en *PAX9* y un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la mayoría de los pacientes en el gen *MMP20* (Shahid et al. 2016).

Debido a la alta prevalencia de agenesias dentales reportadas en Yucatán, donde se han observado familias con varios miembros afectados, que sugieren que esta anomalía dental sea de causa genética, así como la falta de información sobre las bases genómicas de la agenesia en la población estudiada, motivaron a realizar este estudio para determinar las variaciones genéticas *PAX9* y *MSX1* como causa de agenesia dental en el estado de Yucatán, con el fin de contribuir al conocimiento de los genes que participan en el proceso de formación dental y con el desarrollo de la agenesia en población de Yucatán.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 6 pacientes propósito con agenesia dental en cuyas familias tenga 2 o más miembros afectados con esta condición, se realizó anamnesis y ortopantomografía para confirmar la ausencia del diente y se procedió a la toma de muestra partir de exudado bucal para extraer el ADN

Extracción ADN

Obtención de material genético: Por medio de un hisopo estéril *Omniswab* se realizó un hisopado bucal durante 30 seg. en ambos carrillos y en piso lingual.

Extracción de ADN: Se aisló ADN genómico utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification de Promega REF A1120, de acuerdo con el protocolo descrito por el proveedor.

Amplificación por reaccion en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron los fragmentos de los exones 2-4 del gen *PAX9* y el exón 2 del gen *MSX1*, se utilizó la siguiente secuencia de nucleótidos propuestos por el autor Mundstock et al.

Tabla 1. Primers utilizados en la reacción de amplificación (PCR)

Primers	Secuencia	Tamaño (bp)
<i>PAX9</i> - Exon 3	Forward 5'-GTGGGTCAGAGAATTTGGAA-3' Reverse 5'-CACGAAGGATCTGGCTCGT-3'	589
<i>PAX9</i> - Exon 2	Forward 5'-CCAGCCTTCGGGGAGGTGAA-3' Reverse 5'-GACGCTGCACATCCACACG-3'	640
<i>PAX9</i> - Exon 4	Forward 5'-AGGCACCAAATGGTCTCCCAGCTG-3' Reverse 5'-GAAGCCGTGACAGAATGACTA-3'	247
<i>MSX1</i> - Exon 2	Forward 5'-AAGTCCGCCAGAAGCAGTA-3' Reverse 5'-ACATCTGTGTTTTCCCTGCC-3'	698

Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla para las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 15.0 µl. Para los Exones 2 y 3 de *PAX9* y exón 2 de *MSX1* constituido por los componentes: 7.5 µl DreamTaq DNA polymerase (solución premezclada que contiene buffer de reacción pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP y 3 µM de MgCl₂), 1 µl de DNA, 2 µl de primer Reverse, 2 µl de primer Forward y 2.5 µl de agua libre de nucleasas. Para el exón 4 de *PAX9* constituido por los componentes: 7.5 µl DreamTaq DNA polymerase (solución premezclada que contiene buffer de reacción pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP y 3 µM de MgCl₂). 1 µl de DNA, 1 µl de primer Reverse, 1 µl de primer Forward y 4.5 µl de agua libre de nucleasas.

Para los exones del gen *PAX9*, las condiciones para PCR fueron 95°C por 2min; 35 ciclos a 95°C durante 30seg, las temperaturas de alineación a 57.3°C (exón 2), 49.7°C (exón 3) y 51.8°C (exón 4) por 45 seg. y 72°C por 1 min seguido de la extensión final a 72°C por 5 min. Para el exón del gen *MSX1*, las condiciones para PCR fueron 95°C por 2min; 35 ciclos a 95°C durante 30seg, las temperaturas de alineación a 52.9°C (exón 2) por 45 seg. y 72°C por 1 min seguido de la extensión final a 72°C por 5 min.

Electroforesis por medio de gel de agarosa

Los productos amplificados se verán por electroforesis con geles de agarosa al 2% utilizando 4 µL de Bromuro de etidio como colorante a 100 voltios, durante 60 min aproximadamente, utilizando un marcador de peso molecular de 100pb como referencia.

Purificacion de fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando kit comercial *CleanSweep™ PCR Purification* de Thermofisher.

Cuantificación de los productos amplificados

Los amplicones purificados se cuantificaron con el Fluorómetro *Quantus®* de Promega mediante el sistema *QuantiFluor® One dsDNA*. Adicionalmente, la calidad de los productos amplificados se ha comprobado con la corrida de genes constitutivos (Factor V) en geles de agarosa al 2%.

Secuenciación

Estandarizacion de ciclo secuenciacion

Se realizó la ciclosecuenciación de los fragmentos propios para los exones 2, 3 y 4 del gen *PAX9* y el exón 2 para el gen *MSX1* utilizando el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* y termociclador Arktik Termal Cyler de Thermo Scientific, bajo las siguientes condiciones: 96°C por 1 min; 25 ciclos a 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg y 60°C durante 4 min.

Purificación de fragmentos

Se purificaron las muestras de los fragmentos 2, 3 y 4 del gen *PAX9* y el exón 2 del gen *MSX1* para eliminar de los dideoxinucleótidos (terminadores) marcados excedentes, mediante el kit de purificación *BigDye® X Terminator™*.

Electroforesis capilar

A través del Analizador Genético ABI PRISM 310 mediante electroforesis capilar se secuenciaron los fragmentos de cada una de las muestras en sentido F y contrasentido R para los exones 2, 3 y 4 del gen *PAX9* y el exón 2 del gen *MSX1*. El ABI PRISM 310 es un equipo automatizado de electroforesis que posee un capilar (61 cm, 50-µm diámetro interno) el cual se rellena con un polímero hidrofílico (POP-6). Los productos amplificados migran por acción del campo eléctrico de 12.2 kV a 60 °C a través del capilar en función de su tamaño, y al pasar por la ventana de lectura el láser excita los fluorocromos unidos a uno de los extremos 5' de los cebadores (*forward* o *reverse*) que emiten una fluorescencia al ser excitados, y en función del máximo de longitud de onda pueden ser diferenciados.

Análisis de datos

Las secuencias obtenidas se procesaron en el software *Sequencing Analysis V.6* de *Applied Biosystem* y analizaron en el programa BLAST/BLAT Genomic Sequence de la base de datos del sitio web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> para confirmar la presencia de alguna variante. En los casos en los que se identificaron variantes no descritas, patogénica o de significado incierto se confirmaron la presencia/ausencia de dicha variante en los progenitores con el fin de confirmar su causalidad y tipo de herencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuencias con variantes genéticas, encontradas en el caso índice (paciente propósito) para las 6 familias con agenesia de Yucatán se describen en el Tabla 2.

Tabla 2. Variantes genéticas encontradas en 6 familias con agenesia de Yucatán

P	GEN				
	<i>PAX9</i>		EXON 3	EXON 4	<i>MSX1</i> EXON 2
EXON 2	INTRON 2	EXON 3			
1	Alelo silvestre				
2	Alelo silvestre			Alelo mutado	Alelo silvestre
3	Alelo mutado	Alelo mutado	Alelo silvestre		Alelo mutado
4	Alelo silvestre			Alelo mutado	
5	Alelo silvestre		Alelo mutado	Alelo silvestre	
6	Alelo mutado		Alelo silvestre		

*No reportada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

*P, pacientes 1 hasta el 6.

Se encontraron 9 variantes genéticas, 2 de las cuales no han sido reportadas en la base de datos de NCBI, como se observa a continuación.

En el paciente propósito de la familia #2, se identificó en el exón 4 del gen *PAX9* la variación genética previamente descrita que corresponde a una Inserción heterocigoto g.23695_23696 insT (Fig. 1) y una variante no reportada en la base de datos NCBI que corresponde a g.23836T>C (Fig.2) en un paciente que presenta agenesia en el órgano dental 1.2 y microdoncia en el 2.2. El hallazgo de una variante genética no descrita o de significado incierto, sugiere una probable mutación nueva. La genealogía de la familia analizada sugiere un tipo de herencia autosómico dominante.

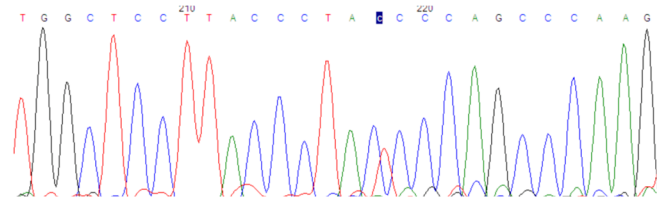


Figura 1 inserción heterocigota g.23695_23696 insT, exón 4 del gen *PAX9*

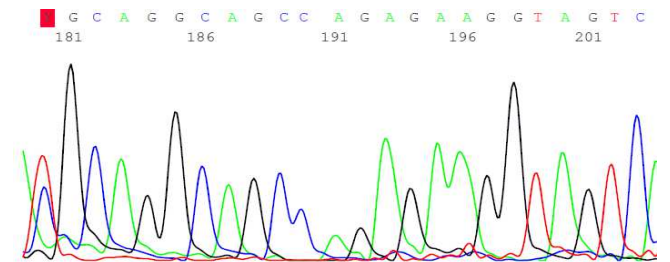


Figura 2. g.23836T>C exón 4 del gen *PAX9*

En el paciente propósito de la familia #3, se identificó en el exón 2 del gen *PAX9* la variación genética previamente descrita que corresponde a homocigoto g.10621G>C (Fig. 3 a), en el intrón 2 del mismo gen una variante no reportada en la base de datos NCBI que corresponde a g.13729A>G (Fig.3 b), y en el exón 2 del gen *MSX1* una variante g.8485C>T (Fig.3 c); en un paciente que presenta agenesia en el órgano dental 4.5 y lateral en barril (peg shaped). La genealogía de la familia analizada sugiere un tipo de herencia autosómico recesivo.

En el paciente propósito de la familia #4, se identificó en el exón 4 del gen *PAX9* la variación genética previamente descrita que corresponde a inserción heterocigoto g.23811_23812insT, en un paciente que presenta agenesia en el órgano dental 3.5 y 4.5. La genealogía de la familia analizada-sugiere un tipo de herencia autosómico recesivo.

En el paciente propósito de la familia #5, se identificó en el exón 3 del gen *PAX9* la variación genética previamente descrita que corresponde a g.13980C>T genotipo heterocigoto C/T y g.13981G>C genotipo heterocigoto G/C, en un paciente que presenta agenesia en el órgano dental 4.1.

La genealogía de la familia analizada sugiere un tipo de herencia autosómico dominante.

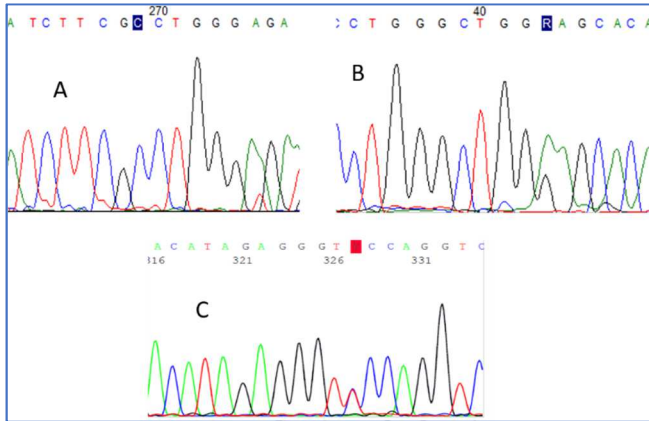


Figura 3. (A) homocigoto g.10621G>C, exón 2 del gen PAX9. (B) g.13729A>G, intrón 2 del gen PAX9. (C) g.8485C>T, exón 2 del gen MSX1

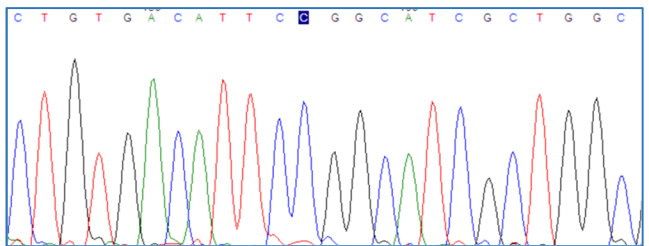


Figura 4. Inserción heterocigoto g.23811_23812insT, exón 4 del gen PAX9

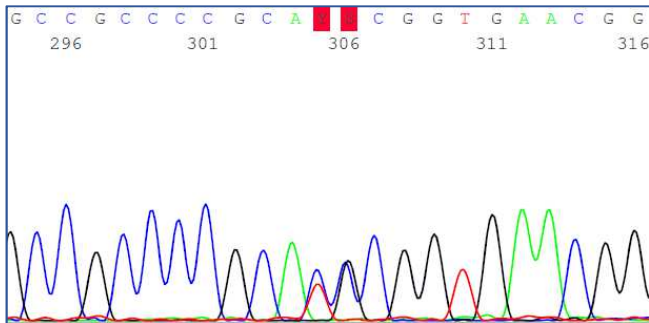


Figura 5. g.13980C>T genotipo heterocigoto C/T y g.13981G>C genotipo heterocigoto G/C, exón 3 del gen PAX9

En el paciente propósito de la familia #6, se identificó en el exón 2 del gen *PAX9* la variación genética previamente descrita que corresponde a homocigoto g.10621G>C en un paciente con agenesia en el órgano dental 1.5 y 2.5. La genealogía e la familia sugiere un tipo de herencia dominante.

CONCLUSIONES

En este estudio se hallaron 6 familias con agenesia con al menos 2 miembros afectados, de los cuales 5 familias presentan hipodoncia (de 1 a 6 ausencias dentales) y solo 1 presentó oligodoncia (más de 6 dientes ausentes). Tal como se menciona en la literatura, los dientes con mayor número de ausencias fueron los segundos premolares inferiores e

incisivo lateral superior y con más prevalencia en mujeres que hombres. En cada paciente propósito estudiado se encontró variación genética de *PAX9* que confirma lo reportado en la literatura como causa de agenesia dental, sin embargo, la misma reporta que en el exón 2 de *PAX9* se ha encontrado el mayor número de variaciones genéticas. En este estudio el mayor número de variantes se hallaron en el exón 4 del gen *PAX9*, así como también se encontraron 2 variantes de significado incierto, que sugieren variantes nuevas, deberán ser corroboradas con los progenitores para poder ser reportadas. En el exón 2 de *MSX1* se ha hallado hasta ahora 1 variante genética que describe la ausencia de un segundo premolar inferior y coincide con el reporte de la literatura para variantes de dicho gen, este estudio pretende continuar hallando variantes en genes *MSX1* para completar los resultados, de tal manera que puedan ser comparables con otras poblaciones a nivel mundial, ya que con los resultados hasta ahora obtenidos del gen *PAX9* notamos diferencia con los hallazgos en poblaciones europeas.

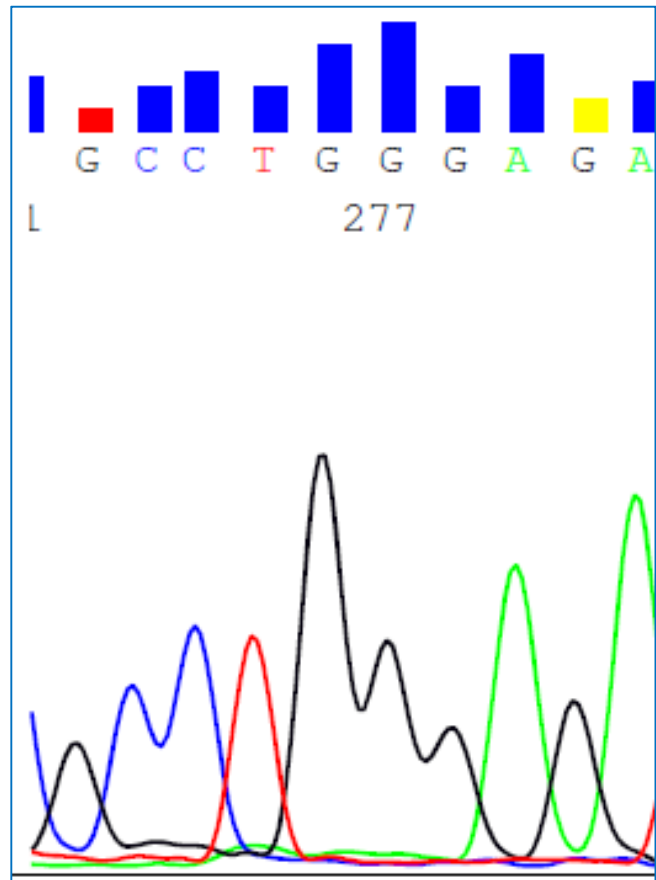


Figura 6 g.10621G>C en el exón 2 del gen PAX9

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Shahid M, Balto HA, Al-Hammad N, Joshi S, Khalil HS, Somily AM (2016) Mutations in *MSX1*, *PAX9* and *MMP20* genes in Saudi Arabian patients with tooth agenesia. *Eur J Med Genet.* 59:377–85.

- Herrera JR, Morales S, Colome G, Escoffie M, Orellana M (2014). Prevalence of dental anomalies in a Mexican population. *Dent* 300. 2:1–5.
- Chhabra N, Goswami M, Chhabra A (2014). Genetic basis of dental agenesis - Molecular genetics patterning clinical dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 19:112–9.
- Lopez S, Mundstock K, Paixao-Cortes V, Schüler-Faccin L, Mundstock C, Catira Bortolini M, Salzano F (2013). *MSX1* and *PAX9* investigation in monozygotic twins with variable expression of tooth agenesis. *Twin Research and Human Genetics*. 16: 1112–1116