



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO
rs4904210 DEL GEN *PAX9* Y SU ASOCIACIÓN CON
AGENESIA DENTAL. UN ESTUDIOS DE CASOS Y
CONTROLES EN EL ESTADO DE YUCATÁN

Tesis presentada por:

FERDY GERMAN GALLEGOS LÓPEZ

En opción al Diploma de Especialización en:

ORTODONCIA

Directores:

M. C. O. JOSÉ RUBÉN HERRERA ATOCHE

DRA. LIZBETH JOSEFINA GONZÁLEZ HERRERA

Mérida, Yucatán, Junio 2019



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO
rs4904210 DEL GEN *PAX9* Y SU ASOCIACIÓN CON
AGENESIA DENTAL. UN ESTUDIOS DE CASOS Y
CONTROLES EN EL ESTADO DE YUCATÁN

Tesis presentada por:

FERDY GERMAN GALLEGOS LÓPEZ

En opción al Diploma de Especialización en:

ORTODONCIA

Directores:

M. C. O. JOSÉ RUBÉN HERRERA ATOCHE

DRA. LIZBETH JOSEFINA GONZÁLEZ HERRERA

Mérida, Yucatán, Junio 2019



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIDAD DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

Mérida, Yucatán, 13 de junio de 2019

C. FERDY GERMAN GALLEGOS LÓPEZ

Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisores, le informo que la Tesis titulada "**ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO rs4904210 DEL GEN PAX9 Y SU ASOCIACIÓN CON AGENESIA DENTAL. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES EN EL ESTADO DE YUCATÁN**", presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Diploma de la Especialización en Ortodoncia, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.

M. C. O. José Rubén Herrera Atoche
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación
y Director

Dra. Lizbeth Josefina González Herrera
Directora de Tesis

M. en Inv. en Salud Iván Daniel Zúñiga Herrera
Revisor de Tesis

Dr. Víctor Manuel Martínez Aguilar
Revisor de Tesis

Artículo 78 del reglamento interno de la
Facultad de Odontología de la
Universidad Autónoma de Yucatán.

Aunque una tesis hubiera servido para el examen profesional y hubiera sido aprobada por el sínodo, solo su autor o autores son responsables de las doctrinas en ella emitidas.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética del CIR Dr. Hideyo Noguchi y la Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del M.C.O. José Rubén Herrera Atoche y la Dra. Lizbeth González Herrera. Los resultados presentados, son parte del proyecto de investigación “ANALISIS DE LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO rs4904210 DEL GEN *PAX9* Y SU ASOCIACION CON AGENESIA DENTAL. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES EN EL ESTADO DE YUCATÁN.”

**ANALISIS DE LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO rs4904210 DEL GEN
PAX9 Y SU ASOCIACION CON AGENESIA DENTAL. UN ESTUDIO DE
CASOS Y CONTROLES EN EL ESTADO DE YUCATÁN.**

ÍNDICE

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS:	18
DISEÑO DEL ESTUDIO	18
VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
POBLACIÓN DE ESTUDIO	19
METODOLOGÍA	21
ASPECTOS ÉTICOS	25
ANALISIS DE DATOS	26
RESULTADOS	27
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	42
AGRADECIMIENTOS	43
BIBLIOGRAFIA	44
ANEXOS	51

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Gen <i>PAX9</i> .	7
FIGURA 2.- Número de casos con agenesia en arcada superior e inferior.	29
FIGURA 3.- Genotipificación de muestras para el polimorfismo rs4904210.	30
FIGURA 4.- Cuadro comparativo de frecuencias genotípicas y alélicas de la variante de riesgo del polimorfismo rs4904210 en la población estudiada y otras.	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4904210 del gen <i>PAX9</i> en distintas poblaciones.	11
Tabla 2.- Programa de amplificación para el polimorfismo rs4904210	24
Tabla 3.- Casos de hombres vs. Mujeres	28
Tabla 4.- Pacientes con hipodoncia u oligodoncia	30
Tabla 5.- Frecuencia genotípica y alélica en la población estudiada	32
Tabla 6.- Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4904210 en grupos de casos y controles del estado de Yucatán.	33
Tabla 7.- Órganos dentarios ausentes más frecuentes y su distribución en la cavidad bucal.	34
Tabla 8.- Análisis genotípico de diferencias significativas interpoblacionales de casos con agenesia con el polimorfismo rs4904210	36
Tabla 9.- Análisis alélico de diferencias significativas interpoblacionales de casos con agenesia con el polimorfismo rs4904210	37
Tabla 10.- Análisis genotípico de diferencias significativas interpoblacionales de pacientes sin agenesia con el polimorfismo rs4904210	38
Tabla 11.- Análisis alélico de diferencias significativas interpoblacionales De pacientes sin agenesia con el polimorfismo rs4904210	38

DEFINICION DEL PROBLEMA.

El desarrollo de los dientes es un fenómeno complejo el cual está controlado genéticamente y posee un intrincado mecanismo de regulación molecular durante sus diversas etapas. Una alteración en la función de los genes (*PAX9*, *MSXI*, *AXIN2*, *EDA*, *WNT10A*, *EDARADD*, *NEMO*, y *KRT17*) que controlan este proceso puede dar como consecuencia el desarrollo de anomalías dentales tales como la ausencia de dientes o agenesia, así como la reducción en el tamaño o microdoncia, entre otros(1,2).

Debido a los problemas estéticos y funcionales que produce la ausencia de dientes, la agenesia dental ha sido objeto de estudio desde hace mucho(3). Actualmente sigue siendo de importancia su estudio debido a los factores antes mencionados pero existe un factor adicional, se ha observado que la agenesia dental tiene un componente genético que se expresa en relación directa con otras anomalías del desarrollo dental como son dientes en clavija, dientes supernumerarios, dientes retenidos, entre otros (4–6). Existen genes asociados a la agenesia dental, entre ellos el *PAX9*, *MSXI*, los cuales, en estudios previos, han demostrado ser los de mayor importancia. La literatura señala que los individuos con dientes ausentes frecuentemente tienen asociado a ello otras anomalías dentales del desarrollo tales como: laterales en clavija, transposiciones, dientes supernumerarios, caninos retenidos, microdoncia, molares infantiles retenidos entre otros.(5–10).

Dada la prevalencia de pacientes reportados con agenesia dental en el sureste de México (5.8 %), la asociación de esta anomalía dental con otras y la falta de estudios sobre el gen *PAX9* asociado a este fenómeno en el sureste de México, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe asociación entre el polimorfismo rs4904210 del gen *PAX9* y la presencia de agenesia dental en pacientes de ortodoncia del sureste de México?

REVISION BIBLIOGRAFICA.

DEFINICION

La agenesia dental es una de las anomalías craneofaciales más comunes en el desarrollo humano(11). La agenesia dental puede ser definida como la ausencia congénita de un diente o germen dentario(12), lo que supone un importante problema para que, quienes la presentan, tengan una oclusión correcta de la boca. Se ha establecido para su estudio diversos términos, hipodoncia es la ausencia de menos de 6 dientes sin tomar en cuenta los terceros molares, oligodoncia es la ausencia de 6 o más dientes sin tomar en cuenta los terceros molares y anodoncia es la ausencia de todas las piezas dentales(13). Por otro lado, la agenesia dental se puede clasificar en sindrómica según esté asociada a otra condición de origen genético o no. A la forma esporádica también se le conoce como familiar o no-sindrómica(14).

Es considerada una condición de origen multifactorial influenciada por factores genéticos, ambientales, patológicos y evolutivos involucrados en los mecanismos normales de la odontogenesis.

La prevalencia es significativamente mayor en mujeres que en hombres (3:2 respectivamente) y en cuanto a la raza se observa una mayor afectación en individuos afroamericanos. (11)

EL PROCESO DE FORMACIÓN DENTAL.

La formación de los dientes temporales se inicia en la sexta semana de gestación, mientras que, la de los dientes permanentes o definitivos se produce a partir del quinto mes, aunque los primeros molares se empiezan a formar tres meses antes del parto y los segundos y terceros después del nacimiento. Asimismo, la maduración de los dientes temporales comienza en el tercer mes de vida intrauterina y la de los permanentes inmediatamente después de nacer (2).

El fenómeno de la formación de los dientes es un proceso complejo que es regulado por más de 200 genes, según se tiene conocimiento a la fecha(2,15).

El desarrollo dental está dividido en cuatro fases que son: iniciación, morfogénesis, diferenciación y erupción. Cada una de estas fases están subclasificadas en diferentes etapas(16)

Los dientes se desarrollan del epitelio oral embrionario y la mesénquima subyacente. Desde un punto de vista histológico, tanto los ameloblastos que producirán el esmalte como la vaina radicular epitelial de Hertwig que dará origen a las raíces dentales, tienen su origen en el epitelio oral. Por otro lado, del mesénquima se originan los cementoblastos (formadores de cemento), así como los odontoblastos (formadores de dentina), la pulpa dental y el hueso alveolar(17). Estas células migran del romboencéfalo así como del mesencéfalo hacia los arcos branquiales antes de dar inicio al proceso de formación dental(18,19).

Alrededor de la sexta semana embrionaria, los procesos maxilares, así como los nasales laterales se fusionan para formar la porción media de la cara. Derivado del primer arco branquial se forma el proceso mandibular que dará origen al maxilar inferior. Aproximadamente en este tiempo, se observa en el epitelio oral un espesamiento o condensación del mismo que da origen a la formación de la lámina dental(20), esta lámina dental es el primer signo morfológico de la formación de los dientes(21). Como es común para muchos órganos ectodérmicos, el desarrollo de los dientes inicia con la formación de placodas epiteliales en la lámina dental(22,23) durante la séptima semana de gestación(20). Paralelo a la formación de las placodas epiteliales, se inicia una condensación del tejido mesenquimatoso subyacente(24). El epitelio crece hacia la mesénquima dando inicio a la “etapa de yema o brote”. La punta de esta yema es conocida como nódulo del esmalte y permanece estable mientras el resto continúa creciendo hacia la mesénquima dando lugar a una estructura en forma de casquete. Durante la “etapa de casquete” (novena semana) se observa una estructura de dos capas de células epiteliales que rodean a un grupo de células mesenquimatosas llamadas papila dental que en un futuro formará la pulpa.

A partir de la decimocuarta y hasta la decimoctava semana de vida intrauterina, una intensa producción y migración de células del nódulo del esmalte produce una estructura llamada cordón del esmalte del cual derivarán los odontoblastos. Debido a la elongación del casquete a esta etapa se le conoce como de “campana”.

La última etapa es marcada por la separación del folículo dental del epitelio oral y se le conoce como de “folículo dental”. En esta, se observa esmalte maduro, dentina joven y la papila dental.

Finalmente, para el desarrollo de las raíces, la diferenciación del epitelio en ameloblastos cesa cuando el frente llega a la zona que en un futuro será la unión amelocementaria. En este punto el epitelio forma una estructura bi-laminar conocida como la vaina radicular epitelial de Hertwig, la cual continúa su crecimiento hacia el mesénquima subyacente(25). Al terminar este proceso, la vaina radicular epitelial de Hertwig se fragmenta y da origen a los restos epiteliales de Malassez.

CONTROL GENÉTICO DEL PROCESO DE FORMACIÓN DENTAL.

Todas las fases del proceso de formación dental se encuentran controladas genéticamente. Como ya se mencionó antes, se estima que más de 200 genes están involucrados en este proceso. Desde las etapas tempranas hasta la erupción dental, el epitelio y la mesénquima subyacente intercambian señales en ambos sentidos. Una vez formado el nódulo del esmalte, este se une a los dos antes mencionados y juntos dirigen señales a células tanto del epitelio como de la mesénquima. Este fenómeno incluye Factores de Crecimiento Transformante Beta (FCTB), la vía de señalización WNT (grupos de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de la superficie receptora de dicha célula hasta su interior) , Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FCF), Factores de Crecimiento Epidérmico (FCE), “*Sonic*

Hedgehog” (SHH por sus siglas en inglés) que juega un papel importante en la regulación de la organogénesis de los vertebrados, entre otras principales vías de señalización(16).

Presenta un patrón de herencia variable; frecuentemente se manifiesta como autosómico dominante y en menor grado autosómico recesivo o ligado al cromosoma X, penetrancia incompleta entre el 86%, y el 97% con expresividad variable. La cantidad, tipo, ubicación, severidad y simetría de los dientes afectados se observa con gran diversidad en un individuo y en los miembros de una misma familia (11)

IMPLICACIÓN DEL GEN *PAX9* EN LA FORMACIÓN DENTAL.

El gen *PAX9* (*pair box gene 9*) codifica proteínas que son factores de transcripción que tienen influencia en las cuatro fases de la formación dental(15,21,26). A diferencia de otros genes, está asociado a agenesia u oligodoncia no sindrómica(2,27). En animales de estudio de laboratorio (ratones), este gen es un marcador temprano del desarrollo dental que aparece incluso antes del espesamiento del tejido epitelial oral y previo a la expresión de otros genes asociados al desarrollo dental(21). Este gen (*PAX9*) fue inicialmente asociado a agenesia dental (28), por Stockton y col (2000); y a partir de este momento se ha estudiado ampliamente asociándolo fuertemente con la agenesia dental(14). Previo a esto, se identificó su rol en la formación dental en el modelo de ratón(21,29,30) y se determinó que se expresa en el mesénquima, inducido por el epitelio e involucrado en señales recíprocas entre ambos tejidos durante la formación dental(26,31). Este gen codifica para proteínas involucradas en la vía de señalización WNT así como para los FCF(14). También se ha determinado en modelos de ratones, que la mutación de dicho gen produce que se detenga el proceso de formación dental en la etapa de yema o brote(1). El gen *PAX9* presenta un mecanismo de retroalimentación que regula la expresión de la proteína 4 de morfogénesis ósea (BMP4 por sus siglas en inglés) en el mesénquima(21,32). Esto es de suma importancia dado que el BMP4 es clave en la formación del nódulo del

esmalte, estructura que dirige el proceso de cambio de fase de yema a casquete(1,21). En este sentido, también se ha determinado que esta transición es determinante en la arquitectura de la futura corona dental(13) por lo que es causa etiológica de algunas anomalías de forma dental entre ellas la microdoncia o los dientes en clavija.

Por lo general, las mutaciones de este gen afectan al desarrollo de dientes posteriores en particular a terceros molares(1,2,13,21,31). Sin embargo, se ha demostrado que también está asociado a agenesia de incisivos laterales superiores(1,31,33) así como de los incisivos inferiores(31). Finalmente, se sabe que los pacientes con mutaciones del gen *PAX9* presentan dientes de menor tamaño al promedio(34).

En humanos, el gen *PAX9* se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 (14q13.3). La estructura del gen consta de 5 exones (figura1). El primer exón representa sólo región 5-UTR mientras que los siguientes exones 2-5 contienen 1026 bases (incluyendo el codón “stop”, codón que no determina ningún aminoácido según el código genético) que codifican 341 aminoácidos que constituyen la proteína *PAX9* humana. El codón de iniciación y la primera base del segundo triplete son los únicos elementos de codificación del segundo exón. El resto del segundo exón es también una región UTR. El elemento de proteína más interesante - el dominio pareado - está codificado en el tercer exón. El resto de la secuencia codificante y la región 3-UTR se localizan en el cuarto y quinto exón(35)

Se caracterizan por poseer un dominio pareado (pair box) de unión al ADN, son reguladores importantes de la organogénesis, pueden actuar como desencadenantes de la diferenciación celular o mantenedores de la pluripotencia de las poblaciones de células madre durante el desarrollo(11,36), tiene un tamaño de 341 aminoácidos, una masa molecular de 36,310 Da, contiene 4 exones (37)

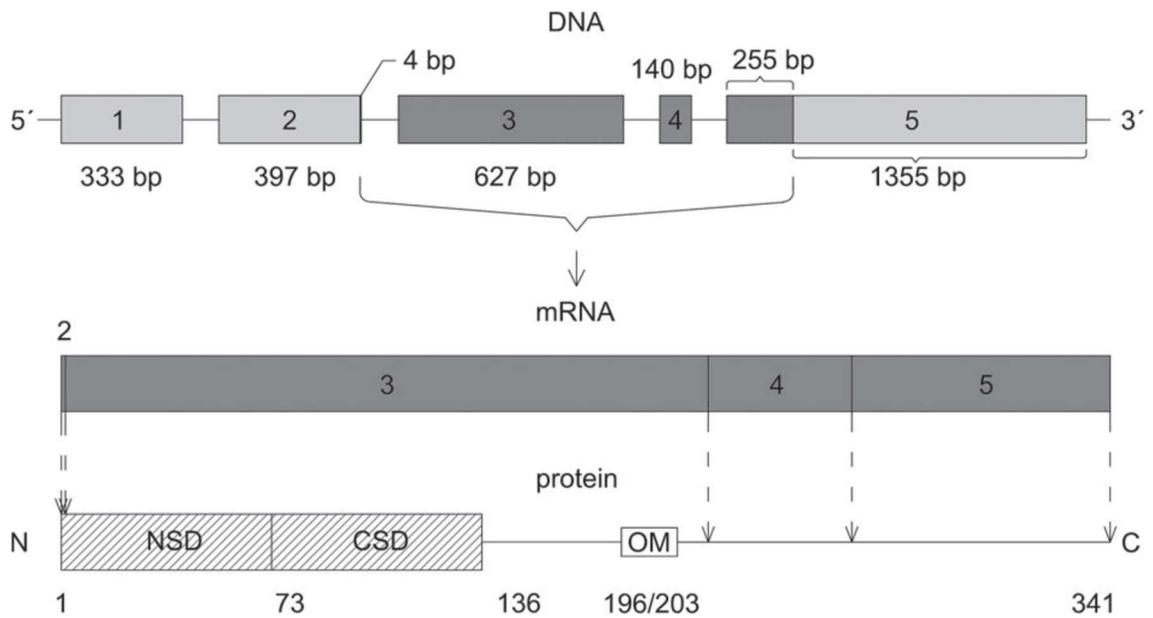


Figura 1.- descripción esquemática de la secuencia de nucleótidos, ARNm y estructura de proteínas del gen *PAX9*. En color gris claro se observa la región no traducida (UTR), en color gris oscuro se muestra la secuencia de codificación (CDS); NSD= subdominio N-terminal, CSD=subdomino C-terminal, OM= motivo octapeptido.

POLIMORFISMOS Y MUTACIONES DEL GEN *PAX9* IDENTIFICADOS CON ALTERACIONES DEL DESARROLLO DENTAL.

Zhang *et al* (2014), reportaron que los polimorfismos son “mecanismos por los cuales los individuos exhiben variaciones dentro del rango de lo que es considerado biológicamente normal”. La mayoría de ellos son variaciones de un solo nucleótido, son muy frecuentes y suelen afectar la cantidad de proteína producida más que la función que ejerce(26).

En este sentido, se ha identificado que las mutaciones del gen *PAX9* suelen reducir la cantidad de proteína producida por lo que se suele dar como explicación que su efecto en el desarrollo dental es resultado de haploinsuficiencia(1,15,31). Así mismo, en una revisión sistemática publicada por Sabine Ruf y cols (2013), reportaron 33 mutaciones del gen *PAX9*, identificadas en 93 pacientes con oligodoncia y los autores comentan que es el gen con el mayor número de mutaciones reportadas, por encima de *EDA*, *MSX1*, *AXIN2*, *EDARADD*, *NEMO*, y *KRT17*, los cuales también fueron investigados en su reporte(2).

La primera mutación descrita en el gen *PAX9* para una familia con oligodoncia, fue reportada por Stockton (2000) y consistía en la inserción de guanina en el nucleótido 219 del segundo exón del gen en el cromosoma 14(28). A partir de este momento se han incrementado los reportes de otros polimorfismos asociados a esta condición.

En la revisión de la literatura, destaca como uno de los polimorfismos más estudiados el rs4904210 (Ala240Pro) cuyo resultado es el reemplazo de Alanina por prolina en el codón 240, en donde se llegó al resultado de que este polimorfismo quizás este asociado a la oligodoncia esporádica, en la literatura se ha encontrado una amplia variación de órganos dentarios afectados, pero los más frecuentemente afectados son los segundos premolares, seguidos de los incisivos laterales maxilares y segundos premolares maxilares (38).

Ha sido asociado a agenesia en diversos tipos de dientes en poblaciones de países como Brasil, en donde no se encontró diferencias significativas entre la frecuencia alélica y genotípica entre casos y controles (35), Polonia donde se encontró que si hay influencia por parte de los polimorfismos del gen *PAX9* con la oligodoncia esporádica pero consideran que es necesario realizar estudios más adelante para poder establecer esa relación(38), China donde se encontró que los polimorfismos aislados no demuestran influencia en la presencia de agenesia dental esporádica, pero si hay una significancia cuando se hace una relación o cuando se presentan uno o varios polimorfismos en el mismo paciente(39). Sin embargo, también se ha reportado que a pesar de estar presente en una población afectada tanto con agenesia como con microdoncia (portugueses), al compararlo con los controles no se encontró una asociación significativa por lo que en esta población no se tomó como un factor de riesgo(40).

Con frecuencia se reportan nuevas mutaciones (polimorfismos) asociados al gen *PAX9* en diversos lugares del mundo. Durante el año 2005 se reportaron en pacientes brasileños con agenesia la presencia de los polimorfismos G-1031A y T-912C. En el año 2006, Kapadia y cols, publicaron que el polimorfismo A259T (cambio de adenina por timina en el nucleótido 259 del exón 2) en una familia de pacientes de Estados Unidos, se encontraba asociado a agenesia de molares(41). Al año siguiente se reportó la identificación del polimorfismo 175C>T en pacientes españoles con agenesia dental y otras anomalías dentales entre ellas microdoncia, el cual reemplaza arginina 59 por un codón de terminación(42). En 2009 se reportaron los polimorfismos gly6arg (G6R) y ser43lys (S43K) en pacientes chinos con agenesia dental y en el caso de S43K incluía también la presencia de incisivos laterales superiores en clavija. En este caso, los autores reportaron que la falta de acoplamiento del ADN es el mecanismo por el cual se produce la afectación(27). Durante el 2010, Pawlowska, publicó la asociación positiva entre pacientes polacos con oligodoncia y las mutaciones IVS2-54A>G, IVS2-109G>C, e IVS2-41A>G(38). Posteriormente, en el año 2011, Paixao-Cortes, estudiaron a un grupo de pacientes brasileños con agenesia que fueron

comparados con controles y los investigadores encontraron 6 polimorfismos del gen *PAX9* en esta población. Sin embargo al comparar los grupos no hubo asociación significativa, a pesar de esto los autores señalan que el polimorfismo rs4904210 debería ser investigado a mayor profundidad ya que podría estar asociado a agenesia de los terceros molares en esta población(35). Mu y cols (2013); identificaron 2 mutaciones puntuales en el gen *PAX9* en pacientes descendientes de mexicanos con oligodoncia en Estados Unidos, c.717C>T (H239H), y c.718G>C (Ala240Pro)(43), que junto con los reportes en pacientes brasileños representan los únicos estudios a latinoamericanos respecto al tema, según se desprende de esta revisión de literatura. De manera interesante resalta que tanto en el estudio de 2011 en Brasil como el del 2013 en mexicanos se encontró el polimorfismo rs4904210 asociado a agenesia(40,43). Recientemente Mitsui y cols (2014); reportaron en Japón dos polimorfismos (I25del y S49L) que consistían en la supresión de 3 bases nitrogenadas, lo que ellos reportan como inusual, ya que la mayoría consisten en la afectación de una sola base(44).

Algunos autores han investigado polimorfismos asociados a cierto tipo de diente en particular, es el caso de Alves-Ferreira y cols. quienes estudiaron a pacientes con agenesia de laterales superiores. En el año 2014 publicaron un estudio de 102 casos de pacientes portugueses con agenesia de estos dientes, los cuales fueron comparados con 204 individuos con agenesia de cualquier otro tipo de órgano dentario. Los autores reportaron que los polimorfismos rs7149262 y rs8004560 están asociados a un alto riesgo de agenesia de laterales superiores, y por lo tanto concluyeron que el gen *PAX9* está asociado a la formación de los mismos(33).

Dentro de esta amplia variedad de estudios que reportan asociaciones entre polimorfismos o mutaciones del gen *PAX9* y la presencia de agenesia dental, Zhang y cols. realizaron un meta-análisis en 2014 teniendo como criterio de inclusión entre otros, estudios realizados bajo el modelo de casos y controles. Ellos encontraron los siguientes polimorfismos como factor de riesgo para agenesia:

A1031G, C912T y rs12881240. De igual manera mencionaron a 718C, IVS2-109, rs4904210, y rs7143727 con poco factor de riesgo y concluyeron que el polimorfismo IVS2-54 es un factor protector para oligodoncia.

Se ha encontrado que esta mutación es polimórfica en muchas subpoblaciones africanas, americanas y europeas, y se puede especular que debido a que la prolina es un aminoácido que tiene una estructura única, su presencia en el gen *PAX9* mutada, puede afectar el desarrollo dental (38). En otras poblaciones se ha encontrado las siguientes frecuencias para el polimorfismo rs4904210:

Tabla 1.- frecuencias de alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4904210 del *PAX9* en distintas poblaciones (38).

polimorfismo rs4904210	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas		
	n (%)			n (%)		
	GG	CG	CC	G	C	
Afroamericanos	50 (0.86)	0 (0.00)	8 (0.14)	100 (0.86)	16 (0.14)	
Americanos nativos	52 (0.91)	5 (0.09)	0 (0.00)	109 (0.96)	5 (0.04)	
Asiáticos	11 (0.79)	2 (0.14)	1 (0.07)	24 (0.86)	4 (0.14)	
Europeos	10 (0.67)	3 (0.20)	2 (0.13)	23 (0.77)	7 (0.23)	
Rs4904210 (718 G>C)	Polacos con agenesia u oligodoncia	22 (0.42)	29 (0.56)	1 (0.02)	73 (0.70)	31 (0.30)
	Polacos sin agenesia	60 (0.42)	73 (0.51)	11 (0.07)	193 (0.67)	95 (0.33)
	Chinos sanos	35 (30.2)	52 (44.8)	29 (25.0)	122 (0.53)	110 (0.47)
	Chinos con agenesia u oligodoncia	35 (30.2)	52 (44.8)	29 (25.0)	122 (0.53)	110 (0.47)

En un meta-análisis por publicado por Mattheeuws (2004) (3), se analizó si se podía establecer un incremento en la prevalencia de la hipodoncia a través de los años. En este estudio se afirma que, a pesar de que en su análisis si encontraron una tendencia hacia el incremento con los años, no existen registros científicos con la suficiente antigüedad para afirmar esto como concluyente(3).

La agenesia dental ha sido estudiada en diversas poblaciones y los valores de prevalencia van desde el 2.4% hasta un 13.3% (terceras molares excluidas)(8,9,53,54,45–52). Polder y cols (2004), concluyó que la agenesia dental es más prevalente en Europa y Australia que en Norteamérica, y que en el género femenino la prevalencia es 1.37 veces mayor(55). En Portugal, Pinho y cols, realizaron un estudio hecho con los registros radiográficos de 16771 pacientes, se encontró que el 1.3% de los individuos estudiados presentaron agenesia del lateral superior, mientras que, en un estudio realizado en Turquía, en pacientes ortodónticos, se encontró un 2.6% de agenesia del incisivo lateral superior(12). Para la población de pacientes ortodónticos en Japón se encontró un 8.5% de agenesia excluyendo los terceros molares(49), cuando para la población ortodóntica brasileña un 6.3%(8). Algunos autores advierten que estos datos realizados en poblaciones de pacientes ortodónticos tienden a incrementar el porcentaje de prevalencia(12,49). Sin embargo, un estudio realizado para determinar si existía asociación entre la agenesia dental y algún tipo de maloclusión en específico no encontraron relación alguna(12).

Respecto a México, la prevalencia de agenesia dental va del al 25.97% al 33%(7,50,51,54), siendo el valor menor el encontrado en el sureste mexicano(7) y el mayor en el centro del país(54). Al excluir las terceras molares, la prevalencia se ubica del 2.7% al 5.82%(9,50,51,54), en este caso se invierte la severidad de resultados ya que el valor menor fue reportado en el centro del país(50) a la vez que el valor mayor corresponde al sureste(9). La diferencia entre estos valores podría tener una explicación en las diferencias genéticas entre subpoblaciones mexicanas(56). En el sureste de México, el diente que más frecuentemente está

ausente es el segundo premolar inferior, seguido por los incisivos laterales inferiores; en el arco superior el incisivo lateral es el más afectado, seguido por el segundo molar(9). Así mismo se reportó en esta población, una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de agenesia dental con dientes retenidos(7,9).

A pesar de que la agenesia dental en México presenta una alta prevalencia (24.3% en el centro y 25.97% en el sureste mexicano)(7,50), son pocos los estudios sobre identificación de factores genéticos asociados a agenesia en pacientes mexicanos. En la revisión de la literatura únicamente se encontró un artículo de identificación de genes en pacientes mexicanos, sin embargo es importante puntualizar que los sujetos eran pacientes del hospital de la Universidad de Texas en San Antonio y es un reporte de 2 familias con oligodoncia (pacientes con más de 6 dientes ausentes sin contar terceros molares(43), por lo que para los tipos más comunes de agenesia no hay antecedente en pacientes mexicanos o incluso de origen mexicano en otro país, por lo cual se infiere la importancia de realizar este estudio, con población específicamente, de la región, que pueda arrojar nuevos datos para correlacionar la frecuencia de estos polimorfismos y su injerencia en las agenesias dentales.

Todo lo anterior justifica la necesidad de hacer una identificación de los polimorfismos en pacientes con agenesia en la población mexicana y más específicamente en la población del sureste del país, ya que se ha demostrado que posee características específicas y no hay antecedentes disponibles. Ya que se han reportado polimorfismos del gen *PAX9* asociados con la agenesia dental, este gen es el ideal para realizar el estudio, que evalué la asociación de polimorfismos del gen *PAX6* con la agenesia dental en la población yucateca, pudiendo reflejar características propias debido al componente genético-ancestral de la población.

Adicionalmente, se ha establecido que la presencia de agenesia y/o microdoncia en sujetos mexicanos está asociada a otras anomalías dentales.

Particularmente en el caso de microdoncia, el número de anomalías asociadas es grande, y no solo incluye anomalías de forma (barril u clavija), sino también de erupción (dientes retenidos y dientes en trasposición)(9). La identificación de genes en estas dos anomalías puede ser el primer paso para comprender los mecanismos por los cuales se gestan otro tipo de anomalías aparentemente no relacionadas entre sí, lo que sería innovador en esta área a nivel mundial.

Con base a la revisión de la literatura, se sabe que el gen *PAX9* consta de 5 exones que codifican 341 aminoácidos que constituyen la proteína PAX9 humana, y entre los polimorfismos que presenta se ha identificado el siguiente polimorfismo como el más relevante para la presente investigación: rs4904210 (Ala240Pro; alelo de riesgo C) ya que se ha encontrado que la sustitución de nucleótidos G>C es lo que lleva a la introducción de una prolina por una alanina en la cadena peptídica, esta sustitución disminuye la acción la cantidad de proteína sintetizada, afectando de alguna manera el proceso de la organogénesis y podría ser una razón por el cambio estructural en la proteína *PAX9* con un efecto funcional correspondiente además de que también regula un mecanismo de retroalimentación que regula la expresión de la proteína 4 de morfogénesis ósea (BMP4) en el mesénquima, afectando de esta manera el proceso de formación dental, en este caso podría conferir una ventaja evolutiva al causar la ausencia congénita de terceros molares aunque también podría causar agenesia de otras piezas dentales(38), además de que también se encontró en familias de origen mexicano con agenesia(43), y ha sido ampliamente reportado en poblaciones de todo el mundo incluyendo Latinoamérica, por lo que este polimorfismo será evaluado en la presente investigación.

JUSTIFICACION.

De Coster *et al* (2009), Ruff *et al* (2013) y Vastardis (2000) reconocen que la agenesia es la anomalía dental más frecuente a nivel mundial(1,2,57). En México se ha reportado una prevalencia de hasta un 25.97%(7). Cuando son excluidos los terceros molares, su prevalencia va del 2.7 al 13.3% según diversas poblaciones(8,9,45–52). En el centro de México la prevalencia de agenesia dental se ha reportado de un 2.7 a un 4.5 % (50,51), y en el sureste de México en un 5.8% (9).

Se han reportado otras anomalías dentales relacionados a la agenesia, cuya presencia ha sido explicado mediante el fallo en algún punto del control, genético que existe sobre el proceso de formación y desarrollo de los dientes(4,7,9,10,58,59). En el caso del sureste de México, la anomalía más frecuentemente relacionada con la agenesia son las piezas dentales retenidas(7,9).

A partir de este hecho, se han tratado de identificar los genes que participan de manera directa en estos fenómenos. Ruff *et al* (2013) concluyeron que los genes *PAX9*, *MSXI*, *AXIN2*, *EDA*, *WNT10A*, *EDARADD*, *NEMO*, y *KRT17* tienen el potencial de causar agenesia dental no sindrómica. De los anteriores el gen *PAX9* y el gen *MSXI* son las más estudiados y de estos el gen *PAX9* presenta 33 polimorfismos reportados asociados a agenesia por 12 del *MSXI*(2). Ambos genes codifican proteínas que son factores de transcripción y tienen funciones importantes en el proceso de la formación y desarrollo dental (1,14,21). El gen *PAX9* se ha asociado fuertemente a agenesia de dientes posteriores (1,8,13,21), sin embargo también se ha reportado como causa etiológica en ausencia de incisivos(1,33,60), este fenómeno se explica dado a que ejerce su influencia a través de haploinsuficiencia lo que da una expresión variable(1). Adicionalmente, estos polimorfismos han sido identificados en pacientes con presencia de laterales superiores en clavija(14), los cuales suelen estar microdónticos(9). Existe la teoría de que algunos genes causantes de agenesia presentan penetrancia incompleta lo

que da como consecuencia una expresión variable de sus fenotipos. Así, los laterales en clavija podrían ser una expresión incompleta del mismo gen causante de agenesia dental (57,61)

Dada la prevalencia de pacientes reportados con agenesia dental en el sureste de México, la asociación de esta anomalía dental con otras anomalías (dientes en clavija, dientes microdónticos) y la falta de estudios sobre las bases genéticas de la agenesia dental, se hacen relevantes los estudios que contribuyan a la determinación de las variantes genéticas o polimorfismos de PAX9 implicados con el mayor riesgo genético a algún tipo de agenesia dental en pacientes odontológicos en el sureste de México.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la asociación del polimorfismo rs4904210 del gen *PAX9* para agenesia dental en pacientes odontológicos que acuden a la clínica de ortodoncia de la Facultad de Odontología de la UADY

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4904210 del gen *PAX9* en pacientes con agenesia y sin agenesia.
- Identificar la frecuencia del polimorfismo rs4904210 del gen *PAX9* en pacientes odontológicos con agenesia dental.
- Identificar la frecuencia del polimorfismo rs4904210 del gen *PAX9* en sujetos control sin agenesia.
- Evaluar determinar la asociación del polimorfismo rs4904210 con el riesgo genético a presentar agenesia relativo a la distribución del polimorfismo rs4904210 del gen *PAX9* en población de Yucatán
- Comparar la frecuencia obtenida con otras poblaciones

MATERIALES Y MÉTODOS.

DISEÑO DEL ESTUDIO.

El presente estudio fue prospectivo, transversal, observacional y analítico, y fue llevado a cabo bajo un diseño de estudio de asociación genética de casos y controles.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN.

Variable dependiente: Riesgo genético de presencia de agenesia. Variables independientes: frecuencia del polimorfismo rs4904210 del gen PAX9. Se identificarán 2 grupos en el estudio, el grupo A (casos) que incluirá a pacientes que presenten agenesia dental de otros dientes que no sean terceros molares; por otro lado, el grupo B o grupo control, serán pacientes con la cuenta dental completa. Los pacientes del grupo A se obtendrán de manera no probabilística por conveniencia, los individuos del grupo B serán escogidos por un método aleatorio simple y serán tomados de la revisión previa hecha a los registros de la clínica de Ortodoncia de la FOUADY.

Para establecer que un paciente presentaba agenesia dental se tomó como criterio la siguiente definición: “la ausencia de mineralización de la corona en radiografías panorámicas o periapicales, y que no exista evidencia de haber sido extraído”(49,51). Como establece la propia definición, se utilizaron las radiografías que se encontraban en el expediente de cada paciente, así como su historia clínica.

Finalmente, para la conformación del grupo B se descartó la ausencia de piezas dentales utilizando el criterio antes descrito.

UNIVERSO.

Los pacientes fueron seleccionados, previa revisión de los expedientes de los pacientes que acudieron a la clínica de especialización en ortodoncia (EO) de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (FOUADY) a partir de enero de 2015 y hasta junio de 2018, que presentaron agenesia dental (sin incluir terceros molares) con respecto a los casos y que no la presenten (incluyendo terceros molares) en el caso de los controles. Es importante mencionar que se seleccionaron estos pacientes debido a que, como parte de sus registros de rutina, cuentan con todos los estudios que se requieren por ser pacientes que se someterían a tratamiento de ortodoncia; estos estudios son: modelos dentales, radiografía panorámica, radiografía lateral de cráneo, así como de la toma de fotografías clínicas.

CÁLCULO DE LA MUESTRA.

El tamaño de muestra se ha estimado utilizando el paquete estadístico *Quanto*, considerando 5.82% (14) de prevalencia para la agenesia dental para la población de Yucatán y 18.6% de frecuencia del alelo de riesgo del polimorfismo estudiado del gen PAX9 en la población portuguesa (22), arrojando un tamaño de muestra de 81 sujetos con agenesia y 81 sujetos sin agenesia para alcanzar el 80% de poder esperado con un intervalo de confianza del 95% y una $p=0.05$.

CRITERIOS DE INCLUSION

- Pacientes que acudan a la clínica de especialización en ortodoncia de la facultad de odontología de Universidad Autónoma de Yucatán
- Pacientes que cuenten con todos los estudios de rutina requeridos por la clínica de especialización en ortodoncia.
- Pacientes que autoricen, mediante carta de consentimiento informado, su participación en este estudio.
- Pacientes que presentaran agenesia, sin incluir terceros molares, comprobado mediante la revisión bucal, historia e interrogatorio clínico (que no mencionen exodoncias, pérdidas accidentales o tratamientos ortodónticos previos) y la radiografía panorámica.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Pacientes que no sepan identificar si la ausencia de alguna pieza dental se debe a extracción o trauma.
- Pacientes que cuenten con otros familiares afectados también por agenesia dental.
- Pacientes que presenten agenesia dental asociada a algún síndrome o condición sistémica.
- Pacientes con labio y/o paladar hendido.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- Pacientes que soliciten darse de baja del estudio
- Muestras con poco material genético o de mala calidad.
- Muestras contaminadas.

ESTUDIOS DE LABORATORIO

GENOTIPICACION DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN PAX 9

Se obtuvo el material biológico, ADN, mediante la técnica con “hisopado bucal” de forma fácil e indolora, se froto el hisopo con firmeza en el interior de las mejillas, girándolo y moviéndolo para abarcar mayor superficie asegurándose que las células epiteliales de la boca queden adheridas al hisopo.

Protocolo:

EXTRACCION DE ADN

Protocolo de extracción de ADN mediante hisopado bucal.

Se utilizó el estuche comercial “DNA Extract All Lysis Reagents”

Protocolo breve:

Paso 1: lisis

- A. Antes de usar, se mezcló bien la solución de lisis, y se tuvo cuidado de evitar crear burbujas en exceso.
- B. Se agregó un volumen de solución de lisis (50 µl) al tubo o al pocillo que contenía la muestra.
- C. Se agito brevemente en el vortex o para mezclar las soluciones

Paso 2: incubación

- A. Se incubo a temperatura a 95 ° C durante 3 minutos de acuerdo al tipo de muestra.

Paso 3: agente estabilizador

- A. antes del uso, se mezcló bien la solución estabilizadora de ADN, teniendo cuidado de evitar la creación de burbujas en exceso.

- B. Se agregó un volumen de solución estabilizadora de ADN (50 μ l)
- C. Se agito brevemente el tubo para mezclar la solución.

GENOTIPIFICACION DEL POLIMORFISMO rs4904210 DEL GEN *PAX9*

Se utilizó un método de amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real por discriminación alélica con sondas taqman para el polimorfismo rs4904210.

PROCEDIMIENTO Taq MAN GTXpress MASTER MIX

Preparación:

1. Se mezcló completamente la mezcla maestra taqman gtxpress antes de usar, y se tuvo cuidado de evitar crear burbujas.
2. Se mezcló y centrifugo el ensayo de genotipado taqman
3. Se calculó el volumen de cada componente
 - a. taq MAN GTXpress Master mix 12.5 μ l (96 muestras)
 - b. taq MAN ensayo de genotipificación 1.25 μ l
 - c. modelo 5 μ l
 - d. agua sin nucleasas 6.25 μ l
 - e. volumen total 25 μ l
4. una vez creadas las mezclas de reacción, se taparon los tubos y se agitaron brevemente para mezclar las soluciones
5. se centrifugaron los tubos brevemente para reducir el contenido y eliminar las burbujas de aire de las soluciones

PREPARACION DE LA PLACA DE REACCION PARA LA PCR

1. se transfirió el volumen apropiado de mezcla de reacción a cada pozo de una placa.
2. Se selló y centrifugo la placa brevemente

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

El polimorfismo que se analizo fue:

- rs4904210 (PCR tiempo real) (C__25598581_10)
 - secuencia de la sonda [VIC/FAM]
CAACTTCCCCGCCGCCGCCCGCAC[G/C]CGGTGAACGGGTTG
GAGAAGGGAGC

Se utilizó el ensayo de discriminación alélica por RT-PCR, este es un proceso en donde se identifican dos variantes de la secuencia de un único nucleótido. Se realizó con el reactivo Taqman, en este caso las dos sondas Taqman presentes en el ensayo son cada una de ellas complementarias para cada uno de los SNPs. Cada una posee un fluorocromo diferente en el extremo 5' y un quencher en el extremo 3'. Durante la fase de extensión de la reacción de PCR el ADN polimerasa rompe la sonda/as hibridada con el ADN, separando el fluorocromo del quencher y detectándose emisión de fluorescencia de una de las sondas o de ambas.

En las sondas Taqman de Applied Biosystems la correlación sonda/secuencia es la siguiente:

- VIC = Homocigoto para el alelo X
- FAM = Homocigoto para el alelo Y
- Ambas = Heterocigoto

Se mezclaron de 2 a 20 ng de muestra de DNA purificada, con 0.25 µl de la mezcla de ensayo de discriminacion alelica (especifico para cada polimorfismo), Taqman master mix, y se colocaran ADN control para el alelo 1 y 2 para generar una señal.

El proceso de PCR se llevo a cabo en el termociclador One Step Plus.

Tabla 2.- programa de amplificacion para el polimorfismo rs4904210

Etapa 1		Etapa 2		Etapa 3
1 ciclo		40 ciclos		1 ciclo
52 ° C	95 ° C	95 ° C	60 °C	60 ° C
2 min	10 min	15 seg	1 min	30 seg

LINEAMIENTOS ETICOS

Todos los pacientes que son atendidos en la clínica de Ortodoncia de la UADY firmaron un consentimiento informado autorizando a la Facultad de Odontología a utilizar sus registros clínicos para fines de investigación, por lo cual, desde un punto de vista ético, no se afectó a los sujetos durante este estudio. Adicionalmente, a los pacientes que participaron en la investigación se les entregó un consentimiento informado, donde autorizaron un hisopado bucal, para la obtención de ADN.

De acuerdo a lineamientos de ética en investigación en salud para seres humanos establecidos en la ley general de salud que contempla los artículos 96 al 103 (Secretaría de Salud, 2007) y de acuerdo a la Declaración de Helsinki y por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la OMS sobre pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos (CIOMS, 2002). Se aceptó la participación voluntaria de menores de edad, cuando ellos manifestaron su consentimiento, independientemente del consentimiento informado del padre o tutor. Se mantiene la confidencialidad de los datos, así como el anonimato de los participantes. El proyecto fue sometido a evaluación ante el Comité de Ética en Investigación de la institución.

ANÁLISIS DE DATOS

Se determinaron las frecuencias alélicas, genotípicas por conteo simple y fueron comparadas entre los grupos estratificados de acuerdo al tipo de agenesia para evaluar asociación mediante χ^2 (ji cuadrada) por el método de Wolf. Se aplicó la ley de Hardy-Weinberg (HW) para determinar desviaciones al equilibrio en el grupo estudiado mediante χ^2 de Pearson, donde una $p > 0.05$ indica que la población se encuentra en equilibrio con respecto al gen de estudio. La evaluación del riesgo relativo se obtuvo en términos de la razón de momios (OR) y los intervalos de confianza (IC) 95% analizando mediante regresión logística, considerando un modelo aditivo. Los valores de significancia “p” se consideraron cuando $p < 0.05$. Se aplicó un análisis de correlación simple para determinar la relación entre frecuencia alélica, frecuencia genotípica, presencia y tipo de agenesia ajustándose por variables y tomando como referencia las frecuencias del alelo y genotipo silvestres. Todos los tratamientos estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SNPstats

RESULTADOS

El tipo de agenesia más común encontrado es la ausencia de uno o más dientes sin ninguna manifestación sistémica., en la cavidad oral se pueden observar espacios edentulos, en dentición decidua, se comienza a sospechar cuando ya ha pasado el periodo promedio de edad de erupción, y se comprueba mediante una radiografía. En personas adultas se observan esos mismos espacios edentulos, sin que el paciente manifieste haberse realizado alguna extracción o algún trauma, se pueden observar problemas de oclusión dependiendo del tiempo que haya permanecido con el espacio edentulo, inclinaciones dentarias, en el caso de oligodoncia (más de seis piezas dentales) y anodoncia, es más que evidente la ausencia de pieza y se comprueba de la misma manera con la radiografía panorámica y con la entrevista clínica. En pacientes en que la agenesia está relacionada con algún síndrome, se identifican primero las características clínicas del síndrome en cuestión y en la interconsulta se corrobora la anomalía dental.

Se estudiaron 164 individuos correspondiendo 83 muestras para sujetos con agenesia (50.61 %) y 81 para sujetos controles sin agenesia (49.39 %). 37.80% de la muestra global de sujetos, fueron masculinos y 62.20% femeninos. La agenesia mostró distribución similar de acuerdo al género en el grupo de casos, 37.34 % de sujetos masculinos y 62.65% de femeninos con agenesia. (tabla 3).

Sujetos estudiados

Tabla 3.- Casos de hombres vs mujeres; casos vs. Controles (n casos= 83; n controles= 81)

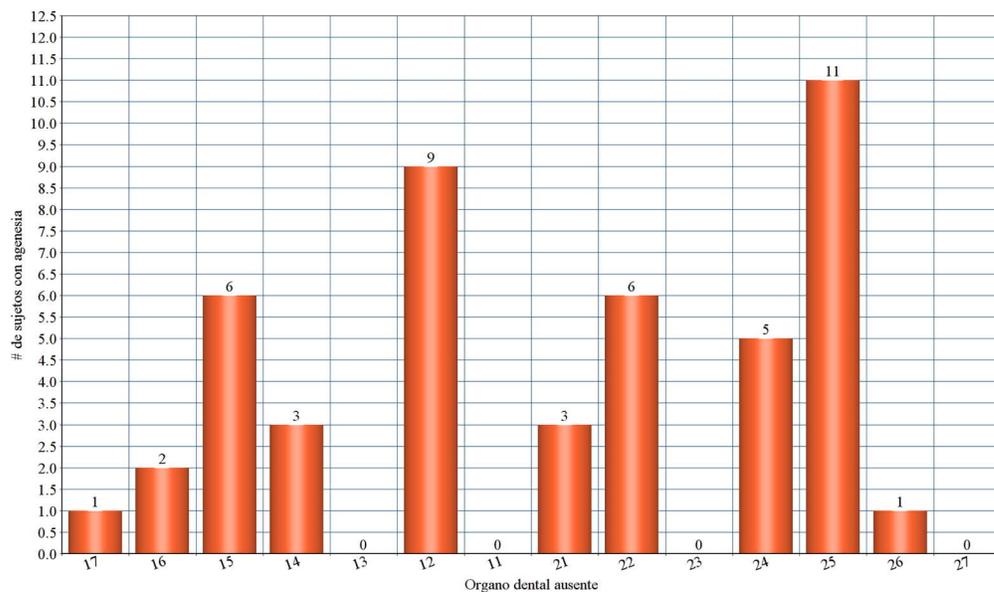
Hombres		Mujeres	
n (%)		n (%)	
Sujetos con agenesia	Sujetos sin agenesia	Sujetos con agenesia	Sujetos sin agenesia
31 (50%)	31 (50 %)	52(50.98%)	50 (49.02%)

El rango de edad de los individuos estudiados fue de 10 a 40 años, teniendo un promedio de edad de 22.15 años con una desviación estándar de 7.85 para los sujetos con agenesia y un promedio de edad de 20.62 con desviación estándar de 6.00 para los sujetos sin agenesia.

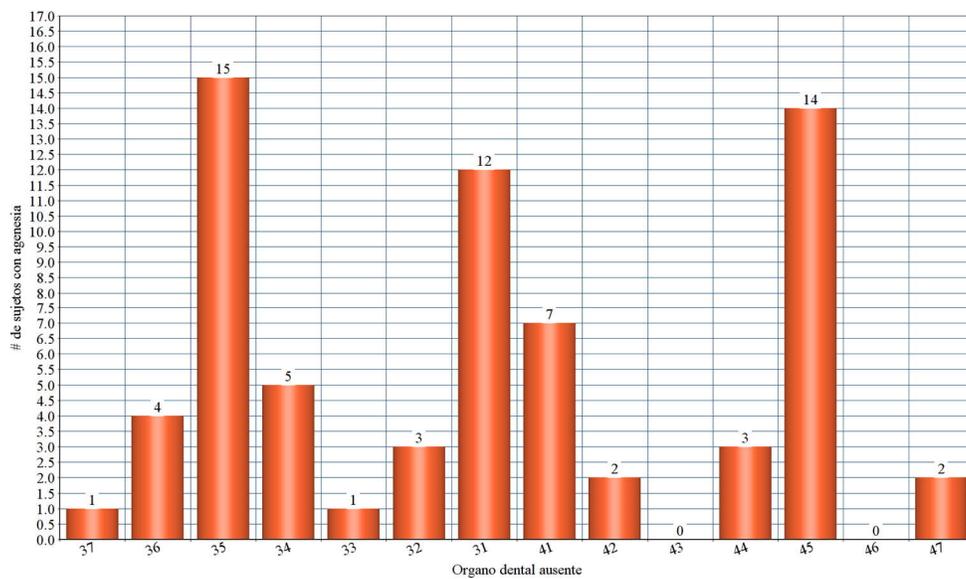
La frecuencia de agenesia en relación a la pieza dental perdida en arcada superior el órgano dental más ausente es el OD # 25 y en arcada inferior mostró que el más frecuente es el OD # (figura 1)

Figura 2.- Número de casos con agenesia en arcada superior e inferior.

datos clinicos de agenesia en arcada superior



datos clinicos de agenesia en arcada superior



En arcada superior el órgano dental ausente con mayor frecuencia es el # 25 y en la arcada inferior el órgano dental ausente con más frecuencia es el número 35 (figura 2)

La distribución de casos por tipo de agenesia mostró que la mayoría de los pacientes (96.40%) correspondían a agenesia de una sola pieza dental, 2.40% de oligodoncia y 1.20% de hipodoncia (tabla 4). Cabe destacar que los pocos casos de hipodoncia y oligodoncia (N=3), todos se presentaron en sujetos femeninos. En tanto que la presencia de agenesia de una sola pieza dental se presentó en 61.25% de pacientes femeninos, significativamente mayor al 38.75% de sujetos masculinos (p=0.0044).

En el grupo de pacientes con agenesia se encontró un paciente femenino con hipodoncia, y dos pacientes femeninas con oligodoncia y 81 sujetos sin agenesia (31 masculinos y 50 femeninos). (tabla 4)

Tabla 4.- Frecuencia de pacientes según el tipo de agenesia (hipodoncia u oligodoncia) N= 83

	hipodoncia n (%)	oligodoncia n (%)	Sujetos con agenesia de una pieza dental n (%)
Número de pacientes	1 (1.20%)	2 (2.40 %)	80 (96.40%)

A las 164 muestras se les determino el polimorfismo rs4904210 (figura 3) que corresponde a un cambio de una G por C en el gen PAX9 en la región 718. En la población estudiada total se encontró que el alelo más frecuente fue el alelo G (73%) y el genotipo más frecuente fue G/G (58%). (tabla5)

Figura 3.- genotipificación de muestras para el polimorfismo rs4904210

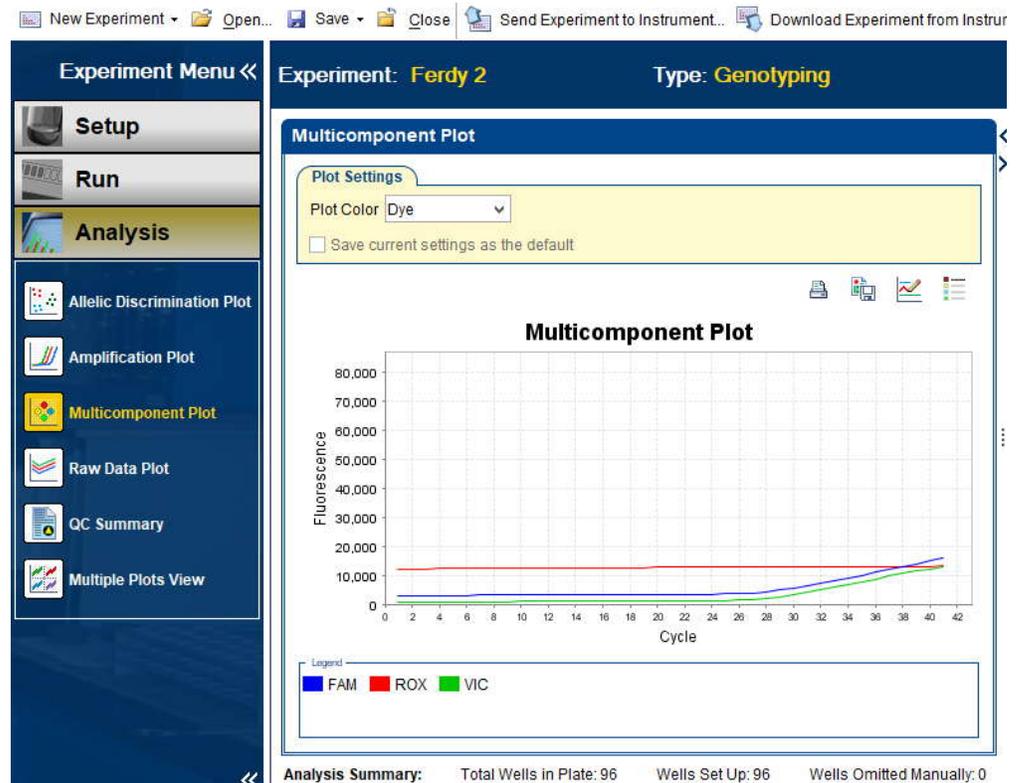


Tabla 5.- frecuencia genotípica y alélica en la población estudiada

Genotipo	n	%
C/C	19	11.6
G/C	50	30.5
G/G	95	57.9
Alelo	n	%
G	240	73.1
C	88	26.9

En sujetos con agenesia se determinó que la frecuencia del alelo de riesgo C es de 24% y 76% el alelo G. Las frecuencias genotípicas fueron de homocigoto G/G en 49 individuos (59%), genotipo heterocigoto G/C en 28 (34%) y el genotipo homocigoto C/C en 6 (7%).

En sujetos sin agenesia se determinó la frecuencia del alelo de riesgo C es de 30% y el alelo G es de 70 %, las frecuencias genotípicas de esta población fueron para homocigoto G/G en 46 (57%), genotipo heterocigoto G/C en 22 (27%) y genotipo homocigoto C/C en 13 (16%) (tabla 6).

Las frecuencias genotípicas en sujetos con y sin agenesia se distribuyeron de acuerdo al equilibrio de las poblaciones según Hardy-Weinberg ($p=0.55$). No se encontró diferencia significativa en la distribución de frecuencias de genotipo y alelos entre sujetos con y sin agenesia ($p>0.05$), que sugieren que el polimorfismo rs4904210 no se asocia con el riesgo genético para agenesia.

Tabla 6.- Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *PAX9* rs4904210 (G>C) en grupos de sujetos con agenesia (n= 83) y sujetos sin agenesia (n=81) de Yucatán.

	Genotipo	Casos	Controles	Análisis de asociación
		n (%)	n (%)	OR, (IC del 95%), <i>p</i>
<i>PAX9</i> rs4904210	GG	49 (59)	46 (57)	Referencia
	GC	28 (34)	22 (27)	1.19 (0.60-2,37) 0.72
	CC	6 (7)	13 (16)	0.43 (0.15-1.23) 0.13
	G	126 (76)	114 (70)	Referencia
	C	40 (24)	48 (30)	0.75 (0.46-1.23) 0.265
	EHW	0.55	0.0026	

Prueba exacta de Fischer a dos colas. OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza. En negritas valores de asociación significativos ($p < 0.05$).

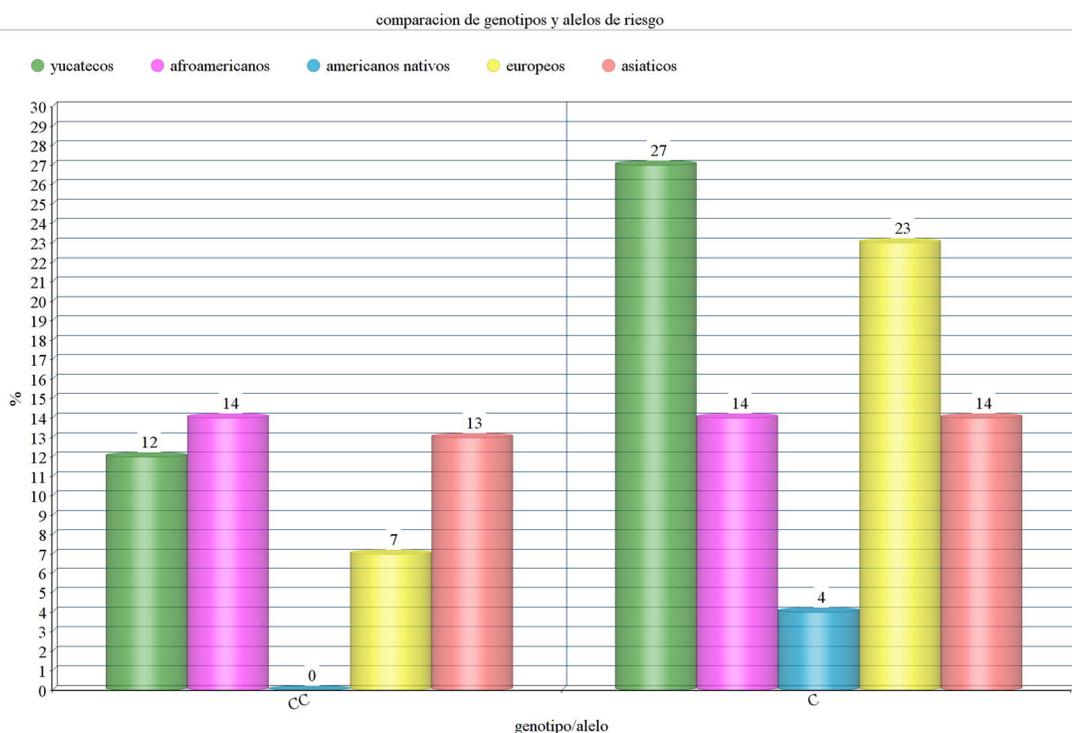
En comparación con los resultados obtenidos en otros estudios a nivel mundial se encontró que la población Yucateca presenta similitudes con la población asiática y europea (21) (figura 2)

Tabla 7.- Distribución de órganos dentarios ausentes en la cavidad bucal de acuerdo al genotipo

# órgano dental		7I	6I	5I	4I	3I	2I	1I	1D	2D	3D	4D	5D	6D	7D
GG	Sup	*	*	8	3	*	8	1	*	8	*	2	4	2	1
	Inf	*	2	11	4	1	1	6	3	1	*	4	7	1	*
GC	Sup	1	*	4	1	*	2	7	2	1	*	*	1	3	*
	Inf	1	*	4	1	*	2	7	2	1	*	*	4	*	*
CC	Sup	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	inf	*	*	1	*	*	1	3	*	1	*	*	1	*	*

Al momento de observar y categorizar los órganos dentales y su distribución en la cavidad bucal por genotipo para el polimorfismo rs4904210 se observa que la pieza dentaria ausente más común es el segundo premolar inferior izquierdo con el genotipo silvestre GG, mientras que con el genotipo mutado CC en la arcada superior no se observó a ningún paciente que presentara alguna agenesia y con los heterocigotos GC son los incisivos centrales izquierdos tanto en superior como inferior (tabla 7), en un estudio realizado en Brasil se obtiene de la misma manera que la agenesia mas frecuente son los segundos premolares sin indicar si son superiores o inferiores y derechos o izquierdos.(62)(63). Resultados de otros estudios previos demuestran que el genotipo mutado CC está relacionado con la agenesia de incisivos centrales inferiores(33)(60)(1) , es este estudio a pesar de que se obtuvieron pocos genotipos mutados, por la misma cantidad de muestra, llama la atención que el genotipo mutado y el genotipo heterocigoto son los que mayor presenta agenesia de incisivos centrales inferiores.

Figura 4.- cuadro comparativo de frecuencias genotípicas y alélicas de la variante de riesgo del polimorfismo rs4904210 en la población estudiada y otras poblaciones



Al tomar solo en cuenta el genotipo y el alelo de riesgo del polimorfismo rs4904210 de nuestra población y otras poblaciones se observa un porcentaje similar a la población asiática en cuanto al genotipo C/C y completamente diferente a los nativos americanos pero al realizar la comparación alélica nos encontramos que la población yucateca presenta mayor porcentaje del alelo de riesgo C que en las demás poblaciones, esto debido posiblemente a la alta frecuencia encontrada del genotipo heterocigoto G/C en esta población estudiada. (Figura 4)

tabla 8: análisis genotípico de diferencias significativas interpoblacionales de casos con agenesia con el polimorfismo rs4904210 (38)

rs 4904210	Población yucateca	Población afroamericana	Población Americana nativos	Población Asiática	Población Europea
Genotipo	Casos n (%)				
GG	49 (59)	50 (0.86)	52 (0.91)	11 (0.79)	10 (0.67)
GC	28 (34)	0 (0.00)	5 (0.09)	2 (0.14)	3 (0.20)
CC	6 (7)	8 (0.14)	0 (0.00)	1 (0.07)	2 (0.13)
		X ² = 24.6 gl= 2 p= 0.000	X ² = 17.9 gl= 2 p= 0.000	X ² = 2.20 gl= 2 p= 0.332	X ² = 1.46 gl= 2 p= 0.482

La comparación alélica de nuestra población con otras poblaciones (tabla 8) arrojo que tenemos frecuencias alélicas similares a la población asiática (n=24) y europea (n=23). (38)

Tabla 9: análisis alélico de diferencias significativas interpoblacionales de casos con agenesia con el polimorfismo rs4904210

rs 4904210	Población yucateca	Población afroamericana	Población Americana nativos	Población Asiática	Población Europea
alelo			n (%)		
G	126 (76)	100 (0.86)	109 (0.96)	24 (0.86)	23 (0.77)
C	40 (24)	16 (0.14)	5 (0.04)	4 (0.14)	7 (0.23)
		$X^2= 4.55$ gl=1 p= 0.033	$X^2= 19.5$ gl= 1 p= 0.000	$X^2= 1.31$ gl=1 p= 0.251	$X^2=$ 0.0081 gl= 1 p= 0.928

En la comparación genotípica y alélica de la población estudiada con otras poblaciones se obtuvieron los sgt resultados (cuadro 8 y 9 respectivamente).(38)

Tabla 10: análisis genotípico de diferencias significativas interpopulacionales de pacientes sin agenesia con el polimorfismo rs4904210

rs 4904210	Población yucateca (Controles)	Población polaca	Población china
Genotipo	Casos n (%)		
GG	46 (57)	60 (0.42)	35 (30.2)
GC	22 (27)	73 (0.51)	52 (44.8)
CC	13 (16)	11 (0.07)	29 (0.25)
		X ² = 12.8	X ² = 14.0
		gl= 2	gl= 2
		p= 0.002	p= 0.001

Al realizar el análisis genotípico de la población yucateca vemos que somos estadísticamente diferentes a la población polaca y china. (tabla 10)

Tabla 11: análisis alélico de diferencias significativas interpopulacionales de pacientes sin agenesia con el polimorfismo rs4904210

rs 4904210	Población yucateca	Población Polaca	Población China
alelo	n (%)		
G	114 (70)	193 (0.67)	122 (0.53)
C	48 (30)	95 (0.33)	110 (0.47)
		X ² = 0.539	X ² = 12.6
		gl= 1	gl= 1
		p= 0.463	p= 0.000

Al realizar el análisis alélico de diferencias significativas vemos que nuestra población es muy similar a la población polaca pero diferente a la población china. (tabla 11)

DISCUSIÓN

La agenesia dental se asocia a diversos factores como principales causas de la misma, entre ellos factores ambientales, genéticos, químicos (quimioterapia), sin embargo, el mecanismo exacto está lejos de ser encontrado. Entre todos estos factores se le ha dado mayor importancia a los factores genéticos como principal causante de la agenesia dental (64)

El gen *PAX9* resulta muy atractivo como posible causante de la agenesia debido a que en estudios con animales de laboratorio ha podido demostrar cierto nivel de correlación y también en estudios genéticos con humanos, además de que se ha demostrado que 14 mutaciones y 1 deleción se han asociado con agenesia dental.(64)

En estudios de laboratorio se encontró que el gen *PAX9* es causante de que animales de laboratorio muestren anodoncia como resultado de la detención de la odontogenesis en estado de yema y muestren una amplia variedad de defectos de desarrollo incluido el paladar hendido, de los polimorfismos que presenta este gen, en estudios previos, el polimorfismo rs4904210 es el que más ha sido relacionado con la agenesia de órganos dentales, en otras poblaciones de origen racial parecida a la nuestra.(64)(63)

No se encontraron diferencias significativas en la distribución de genotipos y alelos entre sujetos con y sin agenesia (alélica $p=0.258$, genotípica $p=0.185$) por lo que el SNP rs4904210 del gen *PAX9* no se encuentra asociado con el riesgo genético para desarrollar agenesia en la población estudiada con limitaciones en el tamaño de muestra. Ambas poblaciones son estadísticamente similares, tanto genotípica ($p=0.185$), $X^2= 3.37$; como alélica ($p=0.258$), $x^2= 1.28$.

Resultados de otros estudios previos demuestran que el genotipo mutado CC está relacionado con la agenesia de incisivos centrales inferiores(33)(60)(1) , es este estudio a pesar de que se obtuvieron pocos genotipos mutados, por la misma cantidad de muestra, llama la atención que el genotipo mutado y el

genotipo heterocigoto son los que mayor presenta agenesia de incisivos centrales inferiores.

Una de las posibles explicaciones por las cuales probablemente en este estudio no se encontró asociación es debido a la muestra pequeña con la que se trabajó y que únicamente se trabajó con un polimorfismo, tal vez de haberse asociado a algún otro polimorfismo de este mismo gen o incluso de otro gen, se hubiera encontrado evidencia de asociación.

En este estudio se encontró que la población control se desvió del equilibrio genético de Hardy Weinberg, lo que pudo ser ocasionado al tamaño de muestra menor de 100 personas lo que se le llama deriva genética, causando un cambio aleatorio en las frecuencias genotípicas. También puede deberse a la frecuencia de una posible migración de población que este alterando las frecuencias genotípicas en este estudio. Siendo aún contradictorio que la distribución alélica y genotípica en ambas poblaciones no tengan diferencias significativas. En genética poblacional, el principio de Hardy-Weinberg establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni algún otro factor y no se produzca ninguna mutación de *Novo*, es decir que la población es homogénea, o está en equilibrio genético, en nuestra población nuestros casos están dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = .055$) y en nuestra población control están fuera del equilibrio ($p = 0.026$).

A pesar de haberse encontrado una alta frecuencia del alelo C en la población yucateca en comparación a la población afroamericana, americanos nativos, asiática y europea no se encontró diferencia significativa entre ellas.

No se asoció los valores obtenidos con algún modelo estadístico establecido por el programa SNPstats.

Se recomienda hacer un estudio de haplotipos con otro polimorfismo del gen *PAX9* o con polimorfismos de otros genes entre los antes mencionados como

principales causantes de la agenesia, como pueden ser los genes *MSX1*, *AXIN2*, *EDA*, entre otros.

CONCLUSIONES

Se determinó que el polimorfismo rs4904210 no está asociado con el riesgo genético para agenesia en la población estudiada; sin embargo, se debe tener en cuenta la limitación en tamaño de la muestra. Adicionalmente, no se encontró riesgo observable (OR) en casos y controles tanto en alélica como genotípica.

Se estudiaron las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4904210 del gen PAX9 siendo más frecuente el genotipo G/G (57%) en los pacientes con agenesia y 59 % en los pacientes del grupo control. En la frecuencia de los alelos la más frecuente fue el alelo silvestre G (70%) para el grupo de casos y (76%) para el grupo control.

Estos resultados obtenidos, aunque nos dan una idea del panorama general del polimorfismo rs4904210 y su relación con la agenesia dental, tendríamos que ampliar el número de muestras y relacionarlo con otros polimorfismos para poder llegar a una conclusión más certera.

Se encontró que la pieza dentaria ausente más común es el segundo premolar inferior izquierdo con el genotipo silvestre GG, mientras que con el genotipo mutado CC es el incisivo inferior izquierdo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los sujetos de investigación por su participación en esta misma. También agradezco al Dr. José Rubén Herrera Atoche y a la Dra. Lizbeth González Herrera por su guía y apoyo para la realización de este trabajo. Este estudio se realizó con el apoyo financiero del departamento de investigación de la Facultad de Odontología y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt),

BIBLIOGRAFIA

1. De Coster PJ, Marks LA, Martens LC, Huysseune A. Dental agenesis: Genetic and clinical perspectives. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(1):1–17.
2. Ruf S, Klimas D, Hönemann M, Jabir S. Genetic background of nonsyndromic oligodontia: a systematic review and meta-analysis. *J Orofac Orthop.* 2013;74(4):295–308.
3. Mattheeuws N. Has hypodontia increased in Caucasians during the 20th century? A meta-analysis. *Eur J Orthod.* 2004 Feb 1;26(1):99–103.
4. Peck L, Peck S, Attia Y. Maxillary canine-first premolar transposition, associated dental anomalies and genetic basis. *Angle Orthod.* 1993;63(2):99–109.
5. Peck S, Peck L, Kataja M. Concomitant occurrence of canine malposition and tooth agenesis: Evidence of orofacial genetic fields. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2002;122(6):657–60.
6. Peck S, Peck L, Kataja M. Prevalence of tooth agenesis and peg-shaped maxillary lateral incisor associated with palatally displaced canine (PDC) anomaly. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2017 Apr 19;110(4):441–3.
7. Herrera-Atoche JR, E C-RG, Mauricio E-R. Agenesia de Terceros Molares , Prevalencia , Distribución y Asociación con otras Anomalías Dentales. *Int J Morphol.* 2013;31(4):1371–5.
8. Gomes RR, Da Fonseca JAC, Paula LM, Faber J, Acevedo AC. Prevalence of hypodontia in orthodontic patients in Brasilia, Brazil. *Eur J Orthod.* 2010;32(3):302–6.
9. Herrera-Atoche JR, Diaz-Morales SM, Colomé-Ruiz GE, Escoffié-Ramírez M, Orellana MF. Prevalence of dental anomalies in a Mexican population. 2014;2(1):1–5.
10. Baccetti T. A controlled study of associated dental anomalies.pdf. Vol. 68, *The Angle orthodontist.* 1998. p. 267–74.

11. Echeverri Escobar J, Restrepo Perdomo L, Pineda Trujillo N, Isaza Guzman D, Manco Guzman H, Marin Botero M. Agenesia dental: Epidemiología, clínica y genética en pacientes antioqueños. *Av Odontoestomatol*. 2013;29(3):119–30.
12. Uslu O, Akcam MO, Evirgen S, Cebeci I. Prevalence of dental anomalies in various malocclusions. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2009;135(3):328–35.
13. Cobourne MT, Sharpe PT. Diseases of the tooth: The genetic and molecular basis of inherited anomalies affecting the dentition. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013;2(2):183–212.
14. Chhabra N, Goswami M, Chhabra A. Genetic basis of dental agenesis - Molecular genetics patterning clinical dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19(2):112–9.
15. Ramos Boeira Junior B, Echeverrigaray S. Dentistry and Molecular Biology: A Promising Field for Tooth Agenesis Management. *Tohoku J Exp Med*. 2012;226:243–9.
16. Nieminen P. *Molecular Genetics of Tooth Agenesis*. 2007.
17. Lumsden AG. Pattern formation in the molar dentition of the mouse. *J Biol Buccale*. 1979;7(1):77–103.
18. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000;127(8):1671–9.
19. Nichols DH. Formation and distribution of neural crest mesenchyme to the first pharyngeal arch region of the mouse embryo. *Am J Anat*. 1986;176(2):221–31.
20. Development T. The Time-Structure Relationship of Tooth Development in. *JDent Res*. 2009;48:745–52.
21. Kapadia H, Mues G, D’Souza R. Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofacial Res*. 2007;10(4):237–44.

22. Pispá J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. Vol. 262, *Developmental Biology*. 2003. p. 195–205.
23. Mikkola ML, Millar SE. The mammary bud as a skin appendage: Unique and shared aspects of development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2006;11(3–4):187–203.
24. Cohn SA. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am J Anat*. 1957;101(2):295–319.
25. Nanci A. En cate: oral histology : development, structure and function. In: Nanci A, Ten Cate A Ten cate: oral histology : development, structure and function Missouri: Mosby; 2013. 2013. p. 122–64.
26. Zhang W, Qu HC, Zhang Y. PAX-9 polymorphism may be a risk factor for hypodontia: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2014;13(4):9997–10006.
27. Wang Y, Wu H, Wu J, Zhao H, Zhang X, Mues G, et al. Identification and functional analysis of two novel PAX9 mutations. *Cells Tissues Organs*. 2008;189(1–4):80–7.
28. Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D’Souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet*. 2000;24(1):18–9.
29. Peters H, Balling R. Where and how to make them. *Trends Genet*. 1999;15(98):59–65.
30. Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*. 1994;6(4):348–56.
31. Nieminen P. Genetic basis of Tooth agenesis. *J Exp Zool*. 2009;312B(4):320–42.
32. Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. Clinical Contribute to Tooth Agenesis. *J Dent*. 2004;83(9):723–7.
33. Alves-Ferreira M, Pinho T, Sousa A, Sequeiros J, Lemos C, Alonso I. Identification of genetic risk factors for maxillary lateral incisor agenesis. *J Dent*

Res. 2014;93(5):452–8.

34. Brook AH, Elcock C, Aggarwal M, Lath DL, Russell JM, Patel PI, et al. Tooth dimensions in hypodontia with a known PAX9 mutation. *Arch Oral Biol.* 2009;54(SUPPL. 1):57–62.
35. Paixão-Côrtés VR, Braga T, Salzano FM, Mundstock K, Mundstock CA, Bortolini MC. PAX9 and MSX1 transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. *Arch Oral Biol.* 2011;56(4):337–44.
36. Kolenc Fusé FJ. Agencias dentarias: En busca de las alteraciones genéticas responsables de la falta de desarrollo. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004;9(5):385–95.
37. PAX9 (paired box 9) (homo sapiens). PAX9 (paired box 9) (homo sapiens) [Internet]. 2017. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=5083
38. Pawlowska E, Janik-Papis K, Poplawski T, Blasiak J, Szczepanska J. Mutations in the PAX9 gene in sporadic oligodontia. *Orthod Craniofacial Res.* 2010;13(3):142–52.
39. Wang J, Xu Y, Chen J, Wang F, Huang R, Wu S, et al. PAX9 polymorphism and susceptibility to sporadic non-syndromic severe anodontia: a case-control study in southwest China. *J Appl oral Sci.* 2013;21(Omim 206780):256–64.
40. Pinho T, Silva-Fernandes A, Bousbaa H, MacIel P. Mutational analysis of MSX1 and PAX9 genes in Portuguese families with maxillary lateral incisor agenesis. *Eur J Orthod.* 2010;32(5):582–8.
41. Kapadia H, Frazier-Bowers S, Ogawa T, D’Souza RN. Molecular characterization of a novel PAX9 missense mutation causing posterior tooth agenesis. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(4):403–9.
42. Tallón-Walton V, Manzanares-Céspedes MC, Arte S, Carvalho-Lobato P,

- Valdivia-Gandur I, Garcia-Susperregui A, et al. Identification of a novel mutation in the PAX9 gene in a family affected by oligodontia and other dental anomalies. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(6):427–32.
43. Mu YD, Xu Z, Contreras CI, McDaniel JS, Donly KJ, Chen S. Mutational analysis of AXIN2, MSX1, and PAX9 in two Mexican oligodontia families. *Genet Mol Res.* 2013;12(4):4446–58.
44. Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Watanabe K, Horiuchi S, Imoto I, et al. Novel PAX9 mutations cause non-syndromic tooth agenesis. *J Dent Res.* 2014;93(3):245–9.
45. Thongudomporn U, Freer TJ. Prevalence of dental anomalies in orthodontic patients. *Aust Dent J.* 1998;43(6):395–8.
46. Spahic-Dizdarevic M, Deljo E, Ganibegovic-Selimovic M. Evaluation of the prevalence of dental anomalies in children in the canton of sarajevo. *Acta Stomatol Croat.* 2011;45(1):24–30.
47. Altug-Atac AT, Erdem D. Prevalence and distribution of dental anomalies in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(4):510–4.
48. Gupta SK, Saxena P, Jain S, Jain D. Prevalence and distribution of selected developmental dental anomalies in an Indian population. *J Oral Sci.* 2011;53(2):231–8.
49. Endo T, Ozoe R, Kubota M, Akiyama M, Shimooka S. A survey of hypodontia in Japanese orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2006;129(1):29–35.
50. Silva Meza R. Radiographic assessment of congenitally missing teeth in orthodontic patients. *Int J Paediatr Dent.* 2003;13(2):112–6.
51. Díaz Pérez R, Echaverry Nvarrete R. Agenesia en dentición permanente Agenesis in permanent dentition. *Rev salud pública.* 2009;11(6):961–9.
52. Maatouk F, Baaziz A, Ghnima S, Masmoudi F, Ghedira H. Survey on hypodontia

- in Sayada, Tunisia. *Quintessence Int.* 2008;39(3):e115-20.
53. Montasser MA, Taha M. Prevalence and distribution of dental anomalies in orthodontic patients. *Orthod.* 2012;13(1):52–9.
 54. Cuairan Ruidiaz, Vicente; Gaitán Cepeda, Luis Alberto; Hernández Morales A. Agnesia dental en una muestra de pacientes ortodónticos del Hospital Infantil de México. *Rev ADM.* 1996;LIII(4):211–5.
 55. Polder BJ, Van't Hof MA, Van Der Linden FPGM, Kuijpers-Jagtman AM. A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32(3):217–26.
 56. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8611–6.
 57. Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2000;117(6):650–6.
 58. Al-Nimri KS, Bsoul E. Maxillary palatal canine impaction displacement in subjects with congenitally missing maxillary lateral incisors. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2011;140(1):81–6.
 59. Becker A, Smith P, Behar R. The incidence of anomalous maxillary lateral incisors in relation to palatally-displaced cuspids. *Angle Orthod.* 1981;51(1):24–9.
 60. Kist R, Watson M, Wang X, Cairns P, Miles C, Reid DJ, et al. Reduction of Pax9 gene dosage in an allelic series of mouse mutants causes hypodontia and oligodontia. *Hum Mol Genet.* 2005;14(23):3605–17.
 61. Galluccio G, Pilotto a. Genetics of dental agenesis: anterior and posterior area of the arch. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2008;9(1):41–5.

62. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(5):299–305.
63. Vin G. Análise de mutações nos genes MSX1 e PAX9 em pacientes com agenesia dentária familiar não-sindrômica. 2017;
64. Pan Y, Wang L, Ma J, Zhang W, Wang M, Zhong W, et al. *PAX9* polymorphisms and susceptibility to sporadic tooth agenesis: a case–control study in southeast China. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 2008;116(2):98–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2007.00517.x><http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext?ID=119407570&PLACEBO=IE.pdf&mode=pdf>

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO.

ANALISIS DE LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO rs4904210 DEL GEN PAX9 Y SU ASOCIACION CON AGENESIA DENTAL. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES EN EL ESTADO DE YUCATÁN.

Mérida, Yucatán a _____ de _____ de _____

CD. Ferdy German Gallegos López

Facultad de Odontología UADY.

Nombre del paciente: _____

Se le invita a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender los siguientes apartados. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto y se le aclararán sus dudas al respecto. Una vez comprendido el estudio y si usted desea participar, firme esta forma al final de la hoja.

Justificación y objetivo del estudio: El fenómeno de la formación dental es un proceso regulado por más de 200 genes. La alteración en la función de los genes que controlan este proceso puede dar como consecuencia el desarrollo de anomalías dentales. La agenesia dental, definida como la ausencia congénita de un diente o germen dentario, es una de ellas. En caso se aceptar participar se le realizará una examinación bucal y facial indolora, posteriormente se le harán preguntas sobre usted, sus hábitos, antecedentes médicos y dentales. Dada la alta prevalencia de agenesia en México (24.3%) y específicamente en el sureste (25.97 %) y a los pocos estudios genéticos asociados a esta anomalía en pacientes mexicanos es importante realizar estudios que contribuyan con la base genética de anomalías dentales y factores genéticos de riesgo implicados en la población de Yucatán.

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio. No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- De acuerdo al artículo 17 de la Ley General de Salud en materia de Investigación, esta es una investigación sin riesgo, ya que no se realizará ninguna intervención física o psicológica en los individuos que participen en el estudio, solo se aplicarán instrumentos y exámenes bucales, así como un hisopado bucal para la obtención de la muestra a cada persona.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio “ANALISIS DE LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO rs4904210 DEL GEN *PAX9* Y SU ASOCIACION CON AGENESIA DENTAL. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES EN EL ESTADO DE YUCATÁN”.

Estoy consciente que los procedimientos consistirán en la aplicación de un cuestionario, una revisión intraoral y una muestra con hisopado bucal; y que los riesgos a mi persona serán nulos debido a que solo será observación y examinación clínica. Se me ha dado la seguridad de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

Firma del paciente, padre o tutor

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador