



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

ESTUDIO FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DE LAS  
AMELOGENINAS: PROTEÍNAS DE MATRIZ  
EXTRACELULAR.

**T E S I N A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

ADOLFO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

TUTORA: Dra. LUISA ALVARINA ALBA LOIS

ASESORA: Dra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mí Padre, Madre y Hermano, por toda su ayuda.*

A la Universidad Nacional Autónoma de México, le agradezco de sobre manera todo lo que aprendí en sus instalaciones.

A la Facultad de Ciencias de la UNAM, por el apoyo y acogimiento de sus profesores.

A mi directora, la Dra. Luisa Alvarina Alba Lois, por su comprensión y ayuda.

Agradezco a la Técnico Académica Titular A de TC, la profesora Beatriz Rodarte Murguía, quien me enseñó e introdujo en las técnicas de biología molecular presentadas en este trabajo, gracias por todo su apoyo y comprensión.

Agradezco a la Mtra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky, su apoyo y comprensión.

Agradezco el apoyo de la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, gracias.

.

## Índice.

	Página
Introducción	6
Objetivo	7
1. Historia del descubrimiento del DNA	8
1.1 Gregor Mendel	11
1.2 Friedrich Miescher	13
1.3 Theodor Boveri y Walter Sutton	16
1.4 Thomas Hunt Morgan	16
1.5 Rosalind Franklin y Maurice Wilkins	17
1.6 James Watson y Francis Crick	19
1.7 Arthur Kornberg	24
2. El dogma central de la biología molecular	25
2.1 Componentes fundamentales de los ácidos nucleicos	28
2.1.1 Componente ácido: Fosfato	29
2.1.2 Componente neutro: Azúcar	29
2.1.3 Componente básico: Bases nitrogenadas	29
2.2 Replicación	33
2.2.1 Replicación en eucariontes	40
2.3 Transcripción	43
2.3.1 Transcripción en eucariontes	48
2.4 Traducción	53
2.4.1 Traducción en procariontes	54
2.4.2 Iniciación	54
2.4.3 Elongación	55
2.4.4 Terminación	56
2.5 Importancia del código genético, en la Traducción	56
2.6 Traducción en Eucariontes	58
2.6.1 Iniciación	59
2.6.2 Elongación y terminación	59
3. Empalme alternativo de genes	60

4. Revisión de la odontogénesis	67
5. Que son las amelogeninas	70
6. El gen de la amelogenina	73
Antecedentes	77
7. Evolución del gen de amelogenina	77
7.1.1 Desde las escamas de peces hasta la evolución de la amelogenina	78
7.1.2 Evolución en euterios	78
7.1.3 Evolución de la amelogenina en tetrápodos	79
7.2 Empalme alternativo del gen de amelogenina	79
8. ¿El gen de amelogenina restringido a ameloblastos?	81
8.1. Cementogénesis	82
9. Expresión de mRNA de amelogenina involucrados en el complejo craneofacial de ratón	83
9.1 Expresión de amelogeninas en el desarrollo del ojo	83
9.2 Expresión de amelogeninas en el desarrollo del cerebro	84
9.3 Expresión de amelogeninas en el desarrollo de los ganglios y de la medula espinal	85
10. Morfología de los cristales de amelogenina	88
11. El diente y sus tejidos	90
12. Estructura del periodonto	91
13. Encía	91
13.1 Cresta de la papila interdental	91
13.2 Epitelio de Unión	92
13.3 Adherencia epitelial	92
13.4 Sulcus	92
13.5 Estructuras de fijación del tejido	

conjuntivo	92
13.5.1 Haces fibrosos gingivales	92
13.5.2 Ligamento periodontal	93
13.6 Cemento radicular	93
13.7 Hueso alveolar	94
13.8 Vascularización e inervación	94
14. Enfermedades periodontales	95
14.1 Recesión gingival	95
14.2 Gingivitis	96
14.3 Periodontitis	96
15. Alteraciones de la estructura del esmalte	96
15.1.1 Hipoplasia del esmalte	97
15.1.2 Hipoplasia focal del esmalte	97
15.1.3 Hipoplasia general del esmalte	97
16. Amelogenesis imperfecta	98
16.1 Tipo Hipoplásico	99
16.2 Tipo Hipocalcificado	99
16.3 Tipo Hipomaduración	100
Material y Método	100
1. Técnicas de aislamiento y análisis de DNA	100
2. Técnicas de aislamiento y análisis de RNA	103
3. Técnica de PCR y análisis	108
4. Técnica de RT-PCR	110
5. Diseño de primers para amelogenina	111
Reporte y resultados	112
1. Geles de DNA	112
2. Geles de RNA	113
3. Geles de PCR	114
Conclusiones	116
Bibliografía	117

## Introducción.

El estudio de la medicina odontológica y estomatológica, está íntimamente relacionado con los avances y técnicas de la ciencia básica, en particular, con la biología celular y molecular.

En las últimas décadas, los aporte hechos a la medicina en general y a la odontología en particular, se deben en gran medida a los adelantos científico-tecnológicos que la biología celular y molecular han aportado y los cuales han permitido profundizar y entender procesos de importancia médica y de la salud pública.

Dentro del estudio de la odontogénesis las amelogeninas, proteínas encargadas de la producción del esmalte dental, constituyen un tema de gran interés dentro del campo y la práctica odontológica.

El desarrollo de la biología molecular en los últimos 80 años, ha abierto un campo de estudio en investigación básica, que para el caso de las amelogeninas, resulta relevante. Dicha rama de la biología, nos lleva a entender procesos básicos como la estructura de los genes, su duplicación y la síntesis de proteínas, lo cual constituye la expresión de los genes y su comportamiento como proteínas recién sintetizadas.

Hoy en día la biología celular contiene tanto el conocimiento de la bioquímica, como de la biología molecular, la línea de separación entre ambas es muy sutil y difícil de trazar, por lo tanto un trabajo sólido debe de contemplar todos los aspectos relacionados con las células y su entorno.

Por otro lado, las técnicas de la biología molecular nos acercan a un entendimiento básico de los procesos celulares y más aún, nos permite trabajar experimentalmente con moléculas, genes, proteínas, por mencionar algunos, y llevar a cabo experimentos que nos conduzcan hacia el entendimiento más básico de la vida.

Hoy en día la biología celular y molecular son ramas de la ciencia básica que no deben estar alejadas del conocimiento y desarrollo de práctica médica, sino por el contrario, conocer a fondo los procesos celulares y moleculares es indispensable en el siglo XXI, para aplicarlos a áreas de la salud como la odontología y la estomatología, lo cual conlleva a un avance más rápido y sólido, que redundará en beneficio en la práctica clínica.



## Objetivo:

Como se mencionó anteriormente, es indiscutible la importancia de la ciencia básica para un mejor entendimiento de los procesos biológicos de la vida. Por lo tanto uno de los objetivos principales de este trabajo, es el adentrarse en aspectos generales de biología celular y molecular y una vez entendidos los procesos de la biosíntesis de proteínas y la expresión génica, se propuso trabajar con el gen de la amelogenina humana, para lo cual se llevaron a cabo diferentes protocolos de investigación, los cuales se mencionan a continuación:

1. Extracción de DNA genómico de sangre y pulpa dental humana.
2. Extracción de RNA total de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y pulpa dental humana.
3. Síntesis de cDNA genómico de pulpa dental humana.
4. Identificación del sexo en muestras de pulpas dentales y sangre humana.
5. Diseño de oligonucleótidos (primers) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
6. Reacción en cadena de la polimerasa para pulpa dental humana.

## 1. Historia del descubrimiento del DNA.

El año 2003 al cumplirse 50 años de la histórica caracterización del DNA, con un artículo publicado en la revista Nature el 25 de abril del 53, escrito por James Watson y Francis Crick se reveló la estructura del DNA. Este descubrimiento fue la culminación de una década de intensa investigación después de los trabajos preliminares de Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty quienes demostraron que es el DNA, y no las proteínas, como se pensaba hasta entonces, la molécula encargada de la herencia. Puede pensarse que la historia del DNA comenzó con estos fundamentales descubrimientos, sin embargo, la descripción de los ácidos nucleicos comenzó hace 143 años, con los trabajos de Friedrich Miescher, quien fue el primer individuo que aisló el material hereditario en 1869 [1].

Desde el comienzo de la historia de la humanidad, la gente se ha preguntado como los rasgos físicos son heredados de una generación a otra. Por ejemplo los niños obtienen parecidos físicos más a un padre que a otro, la descendencia siempre parece ser la mezcla de las características de ambos padres, pero no es así. Cientos de años en propagación de plantas domesticas han demostrado que rasgos útiles como grandes cultivos, producción de frutas y mejoramiento de especies pueden ser acentuadas controlando el apareamiento de cada especie, así como la propagación de rasgos útiles como la velocidad de caballos o la fuerza en los bueyes para cultivos. Sin embargo no era posible predecir de una manera científica el resultado de la cruce entre dos diferentes progenitores [2].

Los experimentos realizados por, Louis Pasteur y Rudolph Virchow en el siglo XIX, demostraron que las nuevas células solo pueden provenir de otras células, refutando la noción de la generación espontánea, que había prevalecido desde décadas atrás [1].

Con el avance de la ciencia y la tecnología y la interdisciplina científica se llegó a proponer el Dogma Central de la Biología Molecular en 1953, lo cual fue la culminación de un trabajo arduo de gran número de científicos de la Física y la Biológica. Haciendo historia entre 1868 y 1869 Friedrich Miescher (1844-1895) denominó *nucleína* a las sustancias ricas en fósforo localizadas *exclusivamente en el núcleo celular de leucocitos humanos*, presentes en el pus de los vendajes frescos de enfermos, en una clínica de Tübingen, Alemania [3].



Figura 1. Castillo de Tübingen. (A) Fotografía histórica de castillo Tübingen. (B) Castillo de Tübingen hoy en día. (Referencia 1).

A continuación se relatará un bosquejo de los experimentos más relevantes que condujeron a la propuesta del modelo del DNA, por Watson y Crick.

Línea del tiempo del DNA. (Cuadro referencia 1).

1865: Gregorio Mendel descubre a través de los experimentos con chicharos de cría que se heredan los rasgos basados en leyes específicas (que más tarde se denominan leyes de Mendel).

1866: Ernst Haeckel propone que los núcleos contienen los factores responsables de la transmisión de los rasgos hereditarios.

1869: Friedrich Miescher aísla el DNA por primera vez.

1871: Las primeras publicaciones que describen el DNA (nucleína) por Friedrich Miescher, Felix Hoppe Seyler y P. Plósz son imprimidos.

1882: Walther Flemming describe y examina los cromosomas y su comportamiento durante la división celular.

1884-1885: Oscar Hertwig, Albrecht von Kölliker, Eduard Strasburger y Weismann independientemente demuestran que los núcleos celulares contienen las bases de la herencia.

1889: Richard Altmann cambia el nombre a nucleína a ácido nucleico.

1900: Carl Correns, Hugo de Vries y Erich von Tschermak redescubrir las leyes de Mendel.

1902: Theodor Boveri y Sutton Walter postulado de que las unidades de la herencia (llamado genes partir de 1909) se encuentran en los cromosomas.

1902-1909: Archibald Garrod propone que los defectos genéticos y enfermedades metabólicas hereditarias resultan de la pérdida de las enzimas.

1909: Wilhelm Johannsen utiliza el la palabra gene para describir las unidades de la herencia.

1910: Thomas Hunt Morgan utiliza moscas de la fruta (*Drosophila*) como modelo para estudiar la herencia y encuentra la primera mutante (blanco) con los ojos blancos.

1913: Alfred Sturtevant y Thomas Hunt Morgan elaborar el primer mapa de ligamiento genético (por la mosca de la fruta *Drosophila*).

1928: Frederick Griffith postula que un principio transformante permite que las propiedades de un tipo de bacteria (*Streptococcus pneumoniae* virulenta se inactivada por calor) se transforma en otra (no virulentas vivas *Streptococcus pneumoniae*).

1929: Phoebus Levene identifica los componentes básicos del ADN, incluido el cuatro bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T).

1941: George Beadle y Edward Tatum demuestran que cada gen es responsable de la producción de una enzima.

1944: Oswald T. Avery, Colin MacLeod y McCarty Maclyn demostrar que principio transformador de Griffith no es la proteína, sino mas bien el DNA, lo que sugiere que el DNA puede funcionar como el material genético.

1949: Colette y Roger Vendrely y André Boivin, descubrir que los núcleos de las células germinales contienen la mitad la cantidad de DNA que se encuentra en las células somáticas. Esto es paralelo a la reducción del número de cromosomas durante la gametogénesis y proporciona más evidencia por el hecho de que el DNA es el material genético.

1949-1950: Erwin Chargaff considera que la composición de bases del DNA varía entre las especies y determina que dentro de una especie las bases en el DNA siempre están presentes en proporciones fijas: el mismo número de A como T y el mismo número de C como G.

1952: Alfred Hershey y Martha Chase utilizan el virus (T2 bacteriófagos) para confirmar que el DNA es el material genético mediante la demostración de que el DNA durante la infección viral entra en la bacteria, mientras que las proteínas virales no lo hacen y que este DNA se pueden encontrar en la progenie de las partículas de los virus.

1953: Rosalind Franklin y Maurice Wilkins analiza el uso de rayos X para demostrar que el DNA tiene una forma regular helicoidales.

1953: James Watson y Francis Crick descubren la estructura molecular del DNA: una doble hélice en la que A siempre se empareja con T y C en todo momento con G.

1956: Arthur Kornberg descubre el ADN polimerasa, es una enzima que replica el DNA.

1957: Francis Crick propone el dogma central (la información en el DNA se traduce en proteínas a través de ARN) y especula que tres bases en el DNA siempre especifican un aminoácido en una proteína.

1958: Matthew Meselson y Franklin Stahl describen cómo el DNA se replica (replicación semiconservativa).

1961-1966: Robert W. Holley, Har Gobind Khorana, Heinrich Matthaei, Marshall Nirenberg y sus colegas descifran el código genético.

1968-1970: Werner Arber, Hamilton Smith y Daniel Nathans utilizar las enzimas de restricción para cortar DNA en lugares específicos por vez primera.

1972: Paul Berg utiliza enzimas de restricción para crear la primera pieza de ADN recombinante.

1977: Frederick Sanger, Allan Maxam y Walter Gilbert desarrollar métodos para la secuencia del DNA.

1982: El primer medicamento (insulina humana), basado en el DNA recombinante, aparece en el mercado.

1983: Kary Mullis inventa la PCR como método para la amplificación del DNA in vitro.

1990: La secuenciación del genoma humano comienza.

1995: Primera secuencia completa del genoma de un organismo vivo (la bacteria *Haemophilus influenzae*) se publica.

1996: La secuencia completa del genoma del primer organismo eucarionte la levadura *S. cerevisiae*, se publica.

1998: La secuencia completa del genoma de los primeros organismos multicelulares el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*, se publica.

1999: La secuencia del primer cromosoma humano (22) se publica.

2000: Las secuencias completas de los genomas de la mosca de la fruta *Drosophila* y la primera planta de *Arabidopsis* son publicados.

2001: La secuencia completa del genoma humano se publica.

2002: La secuencia completa del genoma de los primeros organismos mamíferos ratón se publica.

## 1.1 Gregor Mendel.

Gregor Mendel (1822-1884) nació en Brno (actual república Checa), y sus trabajos sobre cruces de chícharos en 1865 lo llevaron a postular la existencia “*de entes de naturaleza desconocida e inmutable*” (los genes), como responsables de la transmisión de los caracteres hereditarios. Mendel publica estos hallazgos en una revista de escasa difusión el *Journal of Brno Society of Natural Science* [4], con un enfoque riguroso transformó el mejoramiento de la agricultura de un arte, en una ciencia.

Pero no será sino hasta el XX, con los trabajos del holandés Hugo de Vries (1848-1935), del alemán Karl Correns (1849-1933) y del austriaco Erich von Tschermak-Seysenegg

(1871-1962), que utilizaron, los hallazgos de Mendel y asociaron los factores genéticos a los cromosomas [4].

Mendel trabajó en el chícharo (*Pisum sativum*) [3], comenzó con los modelos de origen conocido y con las cruzas resultantes comparó los patrones de la herencia en la descendencia resultante. Estudió cuidadosamente el número de individuos observando los diferentes caracteres en las generaciones sucesivas de descendientes [2].

Desde el nacimiento de las ciencias naturales hasta el establecimiento de las distintas disciplinas a finales del XIX, la vida se concibe desde un punto de vista mecanicista, reduciendo a la célula a sus partes constitutivas. Esta visión es favorecida por los estudios de la herencia y la bioquímica de finales del siglo XIX y principios del XX [3].

Cabe señalar que Aristóteles A.C., ya había señalado que la transferencia de caracteres y rasgos implicaba alguna forma de transmisión de padres a hijos [3].

Con respecto a esto es curioso cómo los biólogos celulares del siglo XIX, como Edmund Becher Wilson (1856-1939) y Nettie Maria Stevens (1861-1912) analizaron de forma individual los cromosomas sexuales y en 1905 analizaron la mitosis, observando que había una segregación de los cromosomas igual a la predicha por Mendel [4].

Cabe destacar que las publicaciones de Charles R. Darwin y Alfred R. Wallace sobre la teoría de la Evolución y la Selección Natural (1858), un año después aparece el famoso libro de Darwin "*The Origin of the Species by Means of Natural Selection*". Es curioso que 1865, Gregor Mendel descubre las leyes de la herencia a través de sus experimentos con chícharos [1], (*Pisum sativum*) [3], y tan solo 7 años antes Darwin y Wallace habían propuesto la teoría de la evolución.



Figura 2. El monje agustino Gregor Johann Mendel (1822- 1884). [3].

## 1.2 Friedrich Miescher.

Johann Friedrich Miescher (Fig. 3A) nació en Basel, Suiza el 13 de agosto de 1844, en el seno de una familia de científicos. Su padre, Johann F. Miescher y en particular su tío, Wilhelm His (Fig. 3B), fue un renombrado médico y profesor de anatomía y fisiología en la Universidad de Basel, Miescher se especializa como otólogo después de terminar su formación básica en medicina [1].

El joven Miescher se traslada a Tübingen, Alemania para estudiar histoquímica, inspirado por su tío, donde comenzó a desarrollar ideas de que los tejidos solo podría ser entendidos sobre la base de la química [1].



Figura 3 .Friedrich Miescher y sus mentores. (A)\* Friedrich Miescher (1844-1895). (B)\* Wilhelm His (1831-1904). (C)\* Felix Hoppe-Seyler (1825-1895). (D)\* Adolf Strecker (1822-1871). (E)\* Carl Ludwig (1816-1895) [1].

Friedrich Miescher, habiendo terminado su formación como médico, se traslada a Tübingen y trabaja en el laboratorio del bioquímico Hoppe-Seyler, donde su objetivo era aclarar los elementos básicos de la vida. Eligiendo los leucocitos, como su material de estudio, investigó las principales proteínas presente en estas células; sin embargo, observó una sustancia con propiedades diferentes a las proteínas, a la que él denominó nucleína por ser una sustancia rica en fósforo localizada exclusivamente en el núcleo celular. En 1889 Richart Altman denominó a esta sustancia *ácido nucleótido*, decía que, la nucleína son sustancias ricas en fósforo localizadas exclusivamente en el núcleo celular [4].

Durante su carrera científica, que se extendió casi 30 años, Miescher publicó 9 artículos científicos y un puñado de manuscritos de sus conferencias fueron impresos. Gran parte de sus resultados y de sus ideas se han conocido a través de las cartas que escribía a sus colegas y amigos. Miescher poseía el instinto de poder elaborar las preguntas clave y luego elegir los objetos de estudio apropiado para hacerles frente y obtener respuestas, aunque no difundía adecuadamente sus resultados y le faltaba comunicación con otros científicos [1]. En sus primeros trabajos Miescher, aisló células de ganglios linfáticos, lo

cual era difícil y obtenía pocas cantidades de linfocitos para su análisis. En Hoppe-Seyler dio un cambio a sus experimentos obteniendo los leucocitos del pus de vendajes frescos quirúrgicos que recogió de la clínica de Tübingen. En el pus identificó el material ideal para sus análisis, con gran pureza histológica, lo que le permitió un estudio más completo de los elementos químicos que constituyen a las células [1].

Con estos estudios Miescher identificó diferentes tipos de proteínas que se sintetizan en los leucocitos, esto fue un gran avance ya que estas células se consideraban el objetivo más prometedor para la comprensión de cómo funcionan las células. Miescher mostró que las proteínas y algunos lípidos, eran los componentes principales del citoplasma celular, describió sus principales propiedades con cierto detalle, e intentó clasificarlos [1]. Estos trabajos preliminares sobre el contenido celular llevaron a Miescher a analizar una sustancia precipitada al agregar ácido a la solución celular, la cual se disolvió de nuevo al añadir álcali. Miescher había obtenido por primera vez un precipitado crudo de DNA. Con estos hallazgos el científico se decidió a examinar los núcleos celulares más a fondo, de los cuales se conocía poco hasta este momento [1].



Fig. 4. El laboratorio en la antigua cocina del castillo de Tübingen, como lo era en 1879, fue la sala donde Miescher descubrió el DNA 10 años antes [1].

Al trabajar sobre las condiciones de aislamiento, Miescher se dio cuenta de que a pesar de tener propiedades similares a las proteínas, la nueva sustancia del núcleo no era una proteína. En febrero 1869, el reporta, en una carta a Wilhelm His, el descubrimiento de una sustancia: *“En mis experimentos con líquidos con bajo contenido alcalino, se formaron precipitados en las soluciones después de la neutralización, que no podía ser disuelto en agua, ácido acético, ácido clorhídrico muy diluido o en una solución salina, por lo que no pertenece a ningún tipo conocido de proteínas”*. Debido a su presencia en los núcleos, Miescher denomina al compuesto como *“nucleína”*. Estudiando el precipitado confirma la presencia de varios elementos orgánicos comunes como, carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, por medio de reacciones químicas específicas. Estos datos mostraron que la nucleína, a diferencia de las proteínas, carece de azufre, pero que contenía gran cantidad de fósforo, la cual él ya había observado tiempo atrás [1].



En 1871, Miescher regresa a su natal Basel y se prepara para su estancia como profesor. Inspirado por Hoppe-Seyler y su pasaje por el laboratorio de Ludwig, elige la fisiología de la respiración como su tema docente. Así mismo Miescher reanuda su trabajo en la *nucleína*, que había abandonado durante su estancia Leipzig. Sin embargo su progreso fue lento, al principio, pero perseverando describió que las células de esperma de salmón constituían una fuente ideal para el aislamiento de grandes cantidades de *nucleína*. Así elige estas debido a su simple composición ya que la cabeza es exclusivamente compuesta por un núcleo, de tal suerte que obtiene suficientes cantidades de *nucleína* para realizar los experimentos que desde el inicio tenía en mente [1].

Debido a la ubicación en Basel sobre el río Rin, con su migración anual de salmón agua arriba, a sus lugares de desove, tiene a su disposición gran cantidad de salmón recién capturados por Miescher. Así, en otoño de 1871, comienza el trabajo sobre el esperma de salmón desarrollando numerosos y sofisticados protocolos para el aislamiento de la *nucleína*. Repite análisis iniciales y confirma que la ésta contenía C, N, H y carece de azufre, pero tiene gran cantidad de fósforo [1].

Alcanza una alta calidad en la *nucleína* aislada y señala que los fósforos contenidos en ella están presentes en forma de ácido fosfórico. Análisis más detallados de esperma del salmón confirman sus propiedades ácidas y muestra que debe de ser un ácido multibase, con al menos “tres ácidos básicos” y eventualmente “cuatro ácidos básicos”. Miescher también observó que la *nucleína* no difunde bien y concluye que es una molécula de alto peso molecular, dándole más adelante un peso atómico de 5- 600kDa y postuló varias aproximaciones a una fórmula atómica, incluyendo las formulas de  $C_{22}H_{32}N_6P_2O_{16}$  y  $C_{29}H_{49}N_9P_3O_{22}$ . En la primavera de 1872, Miescher presentó estos resultados en la *Naturalist Society* en Basel [1].



Figura 5. Vial de vidrio que muestra la *nucleína* aislada de esperma de salmón aislada por Friedrich Miescher mientras trabajaba en la Universidad de Basel. La etiqueta dice: *nuclein from sperm, F. Miescher*. Posesión del instituto Interfakultäres für Biochemie. Universidad de Tübingen, Alemania; fotografía de Alfons Renz, Universidad de Tübingen, Alemania. (Imagen referencia 1).

En 1888 el bioquímico alemán Albrecht Kossel (1853-1927) demuestra que la *nucleína* de Miescher contenía proteínas y mostró que una parte no proteica de ésta contenía sustancias básicas ricas en nitrógeno, identificando las cinco bases nitrogenadas que hoy conocemos (A, T, C, G). Kossel demuestra también la presencia de un azúcar de cinco carbonos, lo que le confiere en 1910 el premio Nobel. Más tarde, el químico rusoestadounidense Phoebus Aaron Theodor Levene (1869-1940), comprueba que la *nucleína* se encuentra en todos los tipos de células animales analizadas. En 1909, mientras estudiaba los experimentos de Kossel, pone de manifiesto que los ácidos nucleicos están compuestos por ácido fosfórico, una pentosa y una de las cinco bases nitrogenadas y demostró que la pentosa era *d-ribosa*, fue hasta 1929 que se identificó a la pentosa aislada del timo de animales como una desoxirribosa, dando lugar así a la molécula de DNA [4].

### 1.3 Theodor Boveri y Walter Sutton.

Fue hasta 1902 en que Walter S. Sutton (1877-1916) realiza una serie de experimentos que le permite proponer que los genes de Mendel son unidades físicas que se localizan en los cromosomas. Parte del trabajo le permite a Sutton proponer un modelo que tiene como base su descubrimiento de la meiosis que realizó en colaboración con Theodor Boveri (1862-1915) [4].

### 1.4 Thomas Hunt Morgan.

A su vez, Thomas Hunt Morgan (1866-1945) en la Universidad de Columbia (1909) realiza los experimentos sobre los caracteres genéticos ligados al sexo, lo que le valió el Nobel en 1933. Por aquellos años se descubre que algunas enfermedades, como la alcaptonuria, tienen su origen en una enzima defectuosa, fenómeno ya descrito por el físico inglés Archibald Garrod en 1909. En 1913, Calvin Brindges (1889-1938) demuestra que los genes están en los cromosomas, a la vez que Alfred Henry Sturtevant (1881-1970), alumno de Morgan, demuestra que algunos de los genes tienden a heredarse juntos, por lo que se deduce que se colocan de forma lineal sobre el cromosoma y elabora el primer *mapa genético* de un organismo la mosca de la fruta: *Drosophila melanogaster*. En 1915 quedan establecidas las bases fundamentales de la herencia fenotípica al aparecer el libro *El mecanismo de la herencia mendeliana*, escrito por Thomas H. Morgan, Alfred Sturtevant, Hermann Muller y Calvin Brindges, con este hallazgo proponen la *teoría de la herencia cromosómica* [4].



Figura 6. Thomas Hunt Morgan (1866-1945) [4].

### 1.5 Rosalind E. Franklin y Maurice Wilkins.

A comienzos de los años 50, la físico- química Rosalind Elsie Franklin (1920-1958), abrió una línea de investigación en el laboratorio de Sir John Turton Randall (1905-1948), en el King College de Gran Bretaña, sobre la estructura del DNA utilizando difracción de rayos X. Así encontró que el DNA podía hallarse en dos formas helicoidales distintas de polinucleótidos con los fosfatos hacia el exterior (DNA-A y DNA-B). Simultáneamente Linus Pauling propuso un modelo de triple hélice con los fosfatos hacia el interior y las bases hacia afuera; clara herencia del tetranucleótido de Levene [4].



Figura. 7 y 8. Elsie Franklin (1920-1958) y Maurice H. F. Wilkins (1916 - 2004) [4].

El 25 de abril de 1953 en el volumen 171, de la revista *Nature* paginas 738-740, aparece el artículo titulado: “*Estructura molecular del ácido nucleico desoxipentosa*” en el que Maurice Wilkins da a conocer los trabajos realizados sobre la difracción de rayos X: “*Mientras que las propiedades biológicas del ácido nucleico desoxipentosa sugieren que la estructura molecular contiene gran complejidad, estudios con la difracción de rayos X, en él descritos, muestran que la configuración molecular básica tiene gran simplicidad*” [5].

El artículo también expone que la estructura del ácido nucleico desoxipentosa es la misma en todas las especies a pesar de que las relaciones de las bases se altera

considerablemente en nucleoproteínas extraídas o en las células intactas y en purificaciones de núcleos de diversos organismos. Estas cadenas de polinucleótidos pueden empaquetarse de diferentes maneras para dar lugar a materiales cristalinos, semicristalinos y paracristalinos, citando a Astbury y a trabajos anteriores de él y de Gosling [5].

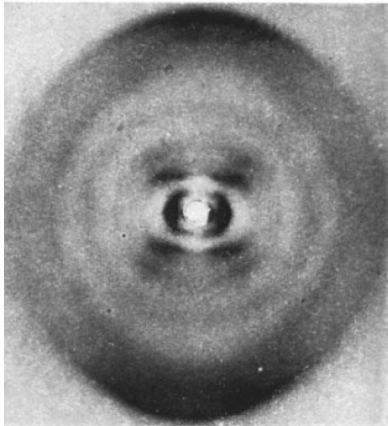


Figura 9. Diagrama de la fibra del ácido nucleico desoxipentosa forma DNA-B. Eje de la fibra vertical [5].

Así mismo, en el artículo se describen brevemente, en términos físicos, algunos de los efectos de la forma y tamaño de los nucleótidos en los patrones de difracción de rayos X. Describiendo primero, si el nucleótido consiste en una unidad de simetría circular alrededor de un eje paralelo al eje de la hélice, la totalidad de todos los patrones de difracción son modificados por un factor la forma del nucleótido. Segundo, si el nucleótido consta de una serie de puntos en un radio en ángulo recto al eje de la hélice, las fases de la radiación por la hélice de diferente diámetro que pasa por cada punto son los mismos [5].

Por último, en el artículo se señala la estructura *in vivo* y se dan a conocer análisis de la estructura en sistemas vivos y menciona el significado biológico de las dos cadenas de ácido nucleico (DNA). Dando evidencia de que la estructura helicoidal discutida, existe en sistemas biológicos.

De la misma manera se pudo demostrar que la intensidad de los espectros de rayos X, utilizando cabezas de espermatozoides cristalizadas, tiene la misma forma y función helicoidal que la observada en la forma DNA-B. Realizando trabajos en esperma de trucha, se observan los mismos patrones que las cabezas de espermatozoides usadas anteriormente, en el *Bacteriófago T2*, se realizan ensayos y estos dieron los mismos patrones de difracción y contenían las principales características del paracristalino nucleato de sodio, así como distintas formas de la nucleoproteína cristalina [5].

Cabe resaltar que en ese mismo volumen de la revista *Nature* (1953), paginas 740-741 Rosalind Franklin, presenta un artículo titulado “*Configuración molecular del timonucleato de sodio*”. En el que expone sus estudios sobre difracción aseverando que “*Las fibras del timonucleato de sodio tienen dos distintos tipos de diagramas de rayos X*”. *El primero corresponde a la forma cristalina de la estructura DNA-A, obtenida con un 75 porciento de humedad*” [6]

Señala también, que a altas humedades se obtiene una estructura diferente, denominándola la estructura del DNA-B, ésta muestra un grado de menor orden, la cual se conforma y persiste con un alto rango de humedad ambiental. El cambio de la forma DNA- A a la B es reversible. Por otra parte, algunas fibras nunca presentan la estructura A y la estructura B se obtiene fácilmente y con un menor contenido de agua.

Los diagramas de la estructura B (Fig. 10 ) muestran, de manera sorprendente los rasgos de una estructura helicoidal donde los trabajos en el laboratorio de King’s College de Stokes y Crick, donde Cochran y Vand, Stokes y Wilkins fueron los primeros en proponer estas estructuras para los ácidos nucleicos como resultado directo de los estudios sobre las fibras de ácidos nucleicos cristalizadas; cabe resaltar que la estructura helicoidal fue previamente sugerida por Furberg (“Londres tesis doctoral 1949”), en base de los estudios en rayos X de nucleósidos y nucleótidos [6].

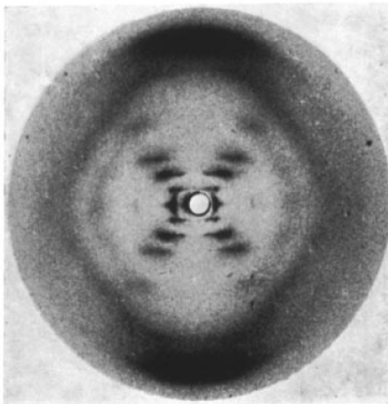


Figura 10. Timonucleato de sodio de timo de ternera. Estructura DNA-B [6].

## 1.6 James Watson Y Francis Crick.

La clave de la doble hélice del DNA la pusieron el bioquímico-genetista norteamericano James Dewey Watson (1928-\*) y el biofísico inglés Francis Harry Compton Crick (1916-2004), quienes trabajaron en la Universidad de Cambridge, en el Reino Unido. Mediante la recopilación de los resultados dispersos que sobre ácidos nucleicos existían y reuniendo información no publicada del laboratorio de Randall. Inicialmente propusieron

un modelo parecido al de Pauling, pero después, gracias a la visión de las reglas de Chargaff y a las confidencias del neozelandés Maurice Wilkins, elaboraron el modelo de la doble hélice del DNA [4].



Figura. 11 Francis Crick y James Watson [4].

Una vez publicado el modelo de la doble hélice propuesto por Watson y Crick, Chargaff se incomoda, por no recibir el reconocimiento necesario por su participación en el trabajo. Cabe señalar que Chargaff no era estructuralista, que fue la técnica que usaron Watson y Crick para proponer la estructura de doble hélice del DNA [4].

El artículo de James Watson y de Francis Harry Compton Crick aparece en la revista *Nature* el 25 de abril de 1953 en el volumen 171, páginas 737-738 titulado: “*Estructura molecular de los ácidos nucleicos*”, en el mismo año y volumen que los artículos de Rosalind Franklin y Maurice Frederick Wilkins, solo que en páginas anteriores el de Watson y Crick [7].

En el artículo Watson y Crick sugieren una estructura para la sal del ácido desoxirribonucleico (DNA), dicha estructura tiene características nuevas, que la hacen muy interesante desde el punto de vista biológico, ya que el modelo predice la replicación de la molécula.

Cabe mencionar que Pauling y Corey, además de la estructura del enlace péptico, también proponen una estructura para los ácidos nucleicos y la comparten con Watson y Crick antes de su publicación. Este modelo consiste en tres cadenas entrelazadas de polinucleotidos, con los fosfatos en eje de la fibra y las bases hacia el exterior. [7].

Así mismo tres estructuras más para el DNA fueron sugeridas por Fraser, donde los fosfatos están en el exterior y las bases nitrogenadas unidas entre sí por puentes de hidrógeno, en concordancia a la idea propuesta por Watson y Crick.

En su artículo mencionan: “*Queremos aclarar y presentar una estructura radicalmente diferente de la sal ácida desoxirribonucleica*”. *Esta estructura tiene dos cadenas helicoidales enrolladas alrededor del mismo eje. Hemos hecho las suposiciones químicas*

usuales, a saber, que cada cadena consiste en grupos diésterfosfato unidos a residuos de  $\beta$ -D-deoxirribofuranosa con enlaces 3', 5'. Las dos cadenas (pero no sus bases) están relacionadas por una pareja perpendicular al eje de la fibra. Ambas cadenas siguen hélices dextrógiras, pero debido a las parejas las secuencias de átomos en las cadenas corren en direcciones opuestas. Resumiendo las bases nitrogenadas están hacia el interior de la hélice y los azúcares y grupos fosfato se proyectan al exterior antiparalelamente por puentes de hidrógeno y los azúcares y grupos fosfato se proyectan hacia el exterior de la molécula. Cada residuo de nucleótido presenta una distancia de 3.4 Å, midiendo un ángulo de 36° entre los residuos adyacentes en la misma cadena, por lo tanto la estructura se repite cada 10 residuos en cada cadena, que es de 34 Å, los grupos fosfato se exponen hacia afuera de la molécula dándole una carga parcial negativa" [7].

El hallazgo y propuesta del modelo de la doble hélice de Watson y Crick, propone lo siguiente: es una estructura formada por dos cadenas de polinucleótidos en arreglo helicoidal enrolladas alrededor de un eje imaginario. Con grupos fosfodiéster unidos a los residuos de una  $\beta$ -deoxirribofuranosa en los carbonos 3' y 5', un grupo fosfato el carbono 3' y otro igual pero en el carbono 5'. Las dos cadenas de fosfato y azúcar están perpendiculares al eje de la fibra, con las bases nitrogenadas al interior ambas cadenas siguen patrones dextrógiros, pero debido a las parejas de las secuencias. Las cadenas corren en direcciones opuestas [5-7]

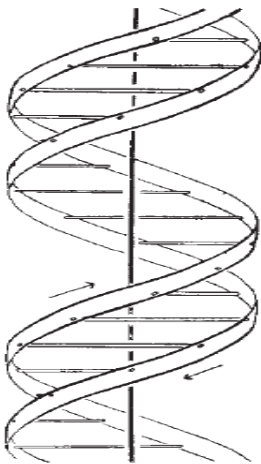


Figura 12. Las dos cintas simbolizan las dos cadenas de fosfato y azúcar y las barras horizontales los pares de bases uniendo las dos cadenas. La línea vertical marca el eje de la fibra [7].

En el modelo se deduce una característica novedosa y es que la cadena se encuentra unida por las bases, (purinas y las pirimidinas). Los planos de estas bases son perpendiculares al eje de la fibra que se enlazan siempre una base púrica a una pirimídica. Los enlaces de hidrógeno dan estabilidad a la hélice.

Las bases únicamente pueden formarse en la forma tautomérica más plausible, esto es, dando únicamente pares de bases que pueden unirse, siendo adenina con timina (A=T) y guanina con citosina (G≡C) [7].

La elucidación de la estructura de la doble hélice del DNA es uno de los descubrimientos más importantes para la biología en general y para la biología molecular en particular durante el siglo pasado. De tal suerte que Watson, Crick, Wilkins y Franklin, quien recibió el premio Nobel post mortem, fueron galardonados con el Nobel en ciencia en el año 1962. Gran controversia envolvió el este galardón dado a Watson y Crick, ya que utilizaron y recopilaron gran cantidad de datos de otros investigadores, pero a su favor está que el modelo de la a doble hélice abrió un nuevo camino no sólo para conocer más acerca de aspectos de la biología molecular, sino a toda la biología y a la ciencia en general. Su modelo ha sido confirmado plenamente por otros investigadores que han trabajado desde entonces [4].

Por su lado Francis Crick, gran científico que propuso el dogma central de la biología molecular, trabajó a lo largo de su vida acerca de ideas e interpretaciones sobre la transferencia del material genético [7].

Seis días después de la publicación de Watson y Crick en la revista *Nature*, se publica el artículo: *"Implicaciones genéticas de la estructura del ácido desoxirribonucleico"*, el cual señala la importancia del ácido desoxirribonucleico (DNA) en las células vivas, mencionando que se encuentra en todas las células en división en la zona nuclear para procariontes y en núcleo para eucariontes, siendo el componente esencial de los cromosomas; demostrando que el DNA es la molécula portadora de la especificidad genética de los cromosomas y por lo tanto del propio gen.

De esta manera se establece la estructura química del ácido desoxirribonucleico (Fig. 13). Y continúan describiendo que la molécula es una larga cadena, la columna vertebral de la cual consiste es una regular alternación de los azúcares y los grupos fosfatos, como se muestra en la figura 14. Cada azúcar se adjunta a una base nitrogenada, que puede ser de cuatro tipos diferentes (hemos considerado 5-metil citosina como equivalente a citosina, ya que puede encajar bien en nuestra estructura. Las dos posibles bases adenina y guanina son purinas y las otras dos timina y citosina son pirimidinas. Hasta el momento se conoce que la secuencia de las bases a lo largo de la cadena es irregular. La unidad monomérica, consiste en los fosfatos, azúcares y bases, que son conocidos como nucleótidos [8].



Mencionan que una cadena es complemento de la otra y esta función sugiere como la molécula del ácido desoxirribonucleico puede autoduplicarse, por duplicación de la molécula, involucrando el concepto de un templado o molde. Este templado es copiado a sí mismo directamente por producto de un “negativo”, que a su vez actúa como un templado y produce el original “positivo” [8].

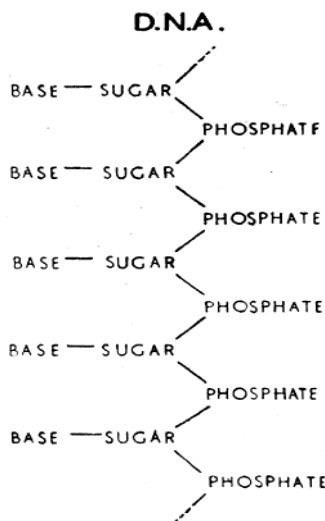


Figura 13 Estructura de una sola cadena del ácido desoxirribonucleico [8].

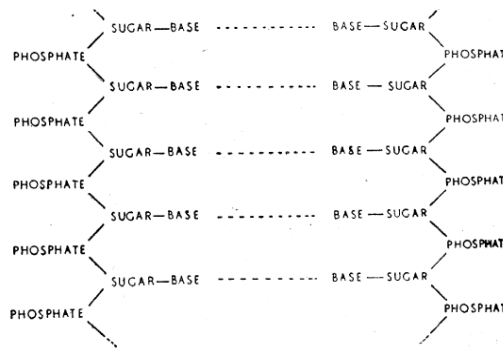


Figura 14. Par de cadenas de ácido desoxirribonucleico. Los puentes de hidrogeno son simbolizados por líneas punteadas [8].

También propuso la existencia de la *tautomería* y la *replicación semiconservativa* del DNA; en 1955 Crick propuso que para que el RNA sintetice proteínas debe existir una molécula acopladora de los aminoácidos a la secuencia de ácidos nucleicos, lo que Paul Berg (1926- \*) observó que era el tRNA, un RNA que transfería el aminoácido correcto y de ahí propone el nombre de RNA de transferencia [4]. Más tarde en 1956 Crick, propuso el dogma central de la Biología Molecular: “*el DNA dirige su propia replicación y su transcripción para formar RNA complementario a su secuencia*”; “*el RNA es traducido a aminoácidos para formar una proteína*”; en 1957 propone que el código genético ha de leerse en tripletes que no se solapan ni puntúan (lo que demostró en 1961, junto a Sidney Brenner); y en 1966 propone la hipótesis del bamboleo (wobble) del tRNA al leer el mRNA. Como vemos, son toda una serie de hipótesis que se han validado posteriormente. La replicación semiconservativa del DNA propuesta por Watson y Crick es confirmada experimentalmente por Mathew Stanley Meselson (1930-\*) y Franklin Stahl (1910-\*) en Caltech [4].

## 1.7 Arthur Kornberg.

Arthur Kornberg nació en Brooklyn, New York en 1918 y fue educado en escuelas públicas. Él se recibió como licenciado en ciencias en el City College de New York en 1937 y grado de M.D. en la universidad de Rochester en 1941. Después de su internado en medicina interna, se desempeñó como oficial comisionado en el servicio de salud pública en los Estados Unidos.

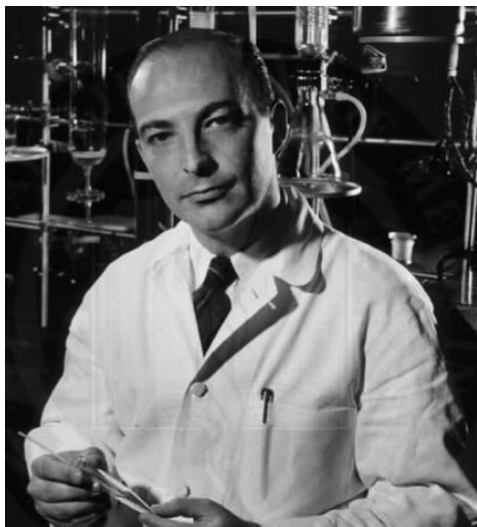


Figura 15. Arthur Kornberg [9].

Fue asignado en la Armada como médico de un barco y luego como investigador en el *National Institutes of Health* (NIH) en Bethesda, Maryland U.S.A de 1942 a 1953. Él obtuvo formación en enzimología con Severo Ochoa en la Universidad de New York en la Escuela de Medicina en 1946 y con Carl Cori en la Escuela de Medicina de la Washington University en 1947. Los dos, Ochoa y Cori fueron los creadores *del Journal of Biological Chemistry (JBC)* [9]. Desde sus primeros estudios en los mecanismo de la síntesis enzimática de coenzimas y el pirofosfato inorgánico, Kornberg expresó su interés en la biosíntesis de los ácidos nucleicos, en especial del DNA, después de aclarar los pasos clave en las vías de la síntesis de pirimidinas y purinas, incluyendo el descubrimiento del 5'-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), encontró la enzima que ensambla los elemento básicos en el DNA, llamándola DNA polimerasa [9]. En 1957, en la Washington University, Arthur Kornberg (1918-2007) purificó y caracterizó la DNA polimerasa de *Escherichia coli*. Compartió con Ochoa el Nobel en 1959 por descubrir las enzimas que rigen la síntesis de los ácidos nucleicos. Sus estudios demostraron que la investigación enzimológica podía aplicarse al estudio de los genes y el importante papel que la bioquímica puede desempeñar en la biología molecular [4].

Continuando con sus trabajos sobre la síntesis del DNA, Kornberg fue capaz de obtener la DNA polimerasa para ensamblar 5,000 nucleótidos en una cadena de DNA con idéntica forma, composición y actividad genética, como el DNA de un virus natural. Esta síntesis exitosa de la actividad del virus  $\Phi X174$  en 1967 fue la primera vez que se produjera un virus activo en un laboratorio. Los trabajos sobre la síntesis del DNA incluía la elucidación de pruebas y edición de funciones de la DNA polimerasa y el descubrimiento de las proteínas de unión a una sola cadena de DNA, la primasa y la holoenzima DNA polimerasa III. Después, cambio su enfoque de la replicación del DNA a polifosfato inorgánico (poly P), un polímero de fosfato que probablemente participó en la evolución prebiótica y ahora es encontrado en todas las bacterias, plantas y células animales.

En 1983 Kary Banks Mullis (1944-\*) describe una técnica que va a revolucionar la investigación en biología molecular, se trata de la reacción en cadena de la polimerasa PCR. En 1993 fue premiado con el Nobel [4].

## 2. El dogma central de la biología molecular.

A comienzos de la década de 1940, ya no quedaba duda de la existencia de los genes, ni sobre que estos constituyen los cromosomas; el momento crucial ocurrió cuando los científicos se concentraron en la pregunta: cómo era posible que esos “*grumos de materia*”, los cromosomas, fueran portadores de información extremadamente compleja; ligado a estas interrogantes surgieron otras: ¿cómo están codificadas las instrucciones en la molécula del DNA y como se traducen? [13]. El núcleo interfásico eucarionte está delimitado por una envoltura nuclear constituida por una membrana doble que se continúa con el retículo endoplásmico rugoso. Desde el punto de vista de su ultraestructura, hay varias regiones: lámina nuclear, poros nucleares, cromatina no nucleolar, cromatina nucleolar (nucléolo), nucleoplasma, matriz nuclear y ribonucleoproteínas (RNPs) [3, 11].

CONTENIDO Y FUNCION	REGIONES O ESTRUCTURAS
DNA + proteínas	
DNA + proteínas histonas y no histonas	Cromatina
DNA codificante + proteínas no histonas	Eucromatina (E)
DNA no codificante facultativo + proteínas histonas (el cromosoma X inactivado)	Heterocromatina facultativa (HF)
DNA no codificante constitutivo + proteínas histonas (centrómero y regiones heterocromatinicas)	Heterocromatina constitutiva (HC)
RNPs extranucleolares	
Síntesis de preRNAm y RNAhn (transcritos nacientes)	Fibras pericromatinianas (FPC)
Almacén de enzimas del "corte y empalme de preRNAm (2 a 5mm de diámetro) y posiblemente maduración del preRNAt	Gránulos intercromatinianos (GIC)
mRNA maduro, rodeado por un halo claro (40nm de diámetro)	Gránulos pericromatinianos (GPC)

Tabla 1. Los ácidos nucleicos interactúan con múltiples proteínas y forman regiones o estructuras que son identificadas, con microscopio de transmisión de electrones (TEM), en el interior de núcleo interfásico [3].

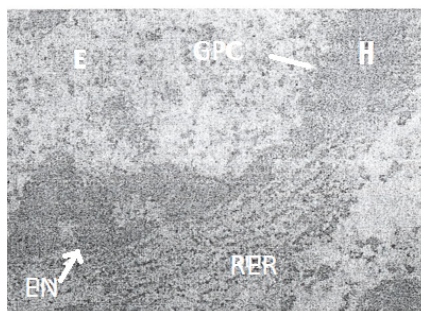


Figura 16. Morfología electrónica del núcleo de un hepatocito. Se muestran las cisternas del retículo endoplásmico rugoso (RER), la envoltura nuclear (EN), la heterocromatina (H), adyacentes a la envoltura nuclear y algunos gránulos pericromatinianos [3].

Los cromosomas, al igual que todos los componentes celulares de una célula viva, están formados por átomos organizados en moléculas. Los primeros análisis químicos del material genético hereditario mostraron que el cromosoma eucariónte está formado por ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas, en cantidades aproximadamente iguales. Por consiguiente ambos, son candidatos para desempeñar el papel del material genético; las proteínas son polímeros de aminoácidos, de las que existen 20 tipos diferentes en las células vivas y en contraste el DNA solo está formado por cuatro tipos diferentes de nucleótidos [13].

Se ha demostrado que en el núcleo interfásico el DNA está arreglado en forma de bucles de unos 50 a 100 Kb. Los cromosomas (moléculas de DNA + proteínas histonas y no histonas) se distribuyen en zonas específicas o territorios, con sus centrómeros y telómeros en posición central o en una distribución radial. Los genes activos (eucromatina) están en la periferia del territorio cromosómico, que parte del centro del núcleo hacia la envoltura nuclear y adyacentes a intersecciones entre ellos, están los “dominios cromosómicos”. El DNA inactivo (heterocromatina) se observa como zonas más oscuras irregulares y adosadas a la lámina nuclear [3].

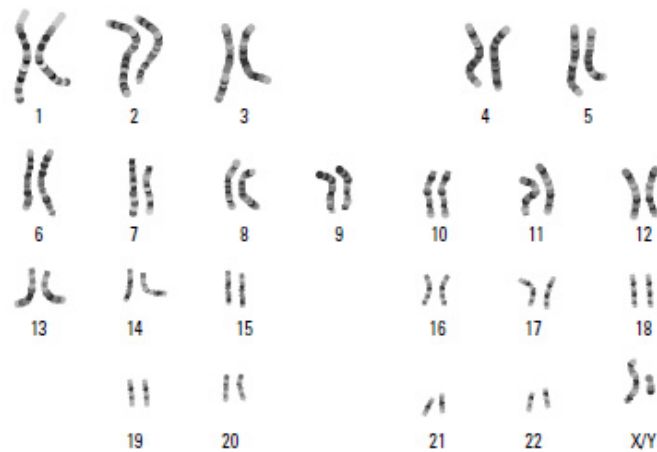


Figura 17. Cariotipo humano normal 46 cromosomas en pares [11].

Ya que el DNA es el material genético, ¿de qué manera está contenida la información en él? Y esta respuesta la da la estructura del DNA de J. Watson y F. Crick [7]. Para desempeñar su función biológica, el material genético debe satisfacer, por lo menos, cuatro requisitos.

1.- Llevar la información genética de una célula madre a una hija y de generación en generación.

2.- Contener información para producir una copia de sí mismo, dado que se copia en cada división celular y con gran precisión. Ser químicamente estable, de otro modo no podría llevar información idéntica de generación en generación.

3.- Por otra parte ser capaz de mutar. Cuando un gene cambia, o sea cuando se comete un error, ese error debe ser copiado tan fielmente como el original. Esta propiedad da la variación genética y por ello hay evolución natural [13].

4.- El DNA se pliega, se compacta adentro del núcleo y para ellos es auxiliado por proteínas. El número mínimo de moléculas de DNA en eucariontes por regla general es de dos (condición diploide) y, como ya se ha descrito arriba, cada molécula se relaciona íntimamente con proteínas estructurales del tipo histonas y no histonas formando un cromosoma eucariónte [3].

## 2.1 Componentes fundamentales de los ácidos nucleicos.

El DNA está unido a proteínas forma la cromatina, que es 80 a 90% del contenido total y está contenida en el nucleoplasma. La cromatina está formada por una unión del DNA con histonas y no histonas (como las protaminas que son proteínas ricas en arginina o poliaminas, ambas presentes en espermatozoides). Dicha unión forma bucles de DNA, que se fijan en una matriz proteínica de cohesinas por “segmentos de unión”, constituyendo el cromosoma eucariónte [3]. Los ácidos nucleicos (DNA y RNA) están constituidos por la unión de numerosos nucleótidos, de cuatro tipos. Como introducción a su estudio, se consideran algunos aspectos de interés para cada uno de los componentes estructurales de dichas unidades, los nucleótidos [12].

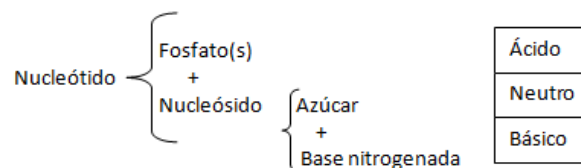


Figura 18. Componentes de los ácidos nucleicos [12].



Figura 19. Un nucleótido está constituido por tres componentes fundamentales; una base nitrogenada, un azúcar y un fosfato [10].

### 2.1.1 Componente ácido: Fosfato.

El *fosfato inorgánico* (*Pi*), mezcla de las especies químicas resultantes de la disociación de la molécula de ácido fosfórico, aparece como anión a pH ácido, como dianión a pH fisiológico y como trianión a pH alcalino. En la célula, es fosfato se encuentra en forma libre (*Pi*) o formando parte de números compuestos (*R-P*). Pueden distinguirse cinco tipos de enlace fosfato que van a formar parte de los nucleótidos difosfatados y trifosfatados: solo con enlace éster, fosfoéster (fosfomonoéster, fosfato, monofosfato un éster en una posición de la molécula), fosfodiéster (un éster doble con dos moléculas diferentes), bis-fosfato (dos fosfomonoésteres en sitios diferentes de una misma molécula); con enlaces éster y anhídrido difosfato (pirofosfato, difosfoanhídrido) y trifosfato (trifosfoanhídrido) [12].

### 2.1.2 Componente neutro: Azúcar.

El azúcar siempre es una pentosa (5 átomos de carbono) bien la D-ribosa o la D-desoxirribosa. La ribosa interviene en los nucleósidos y bajo su forma más estable  $\beta$ -D-ribofuranosa [12].

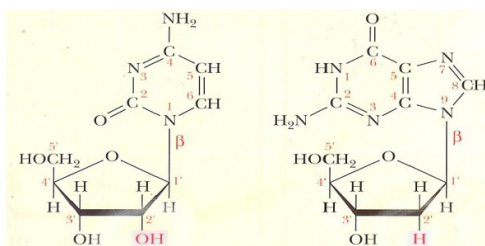


Figura 20. Estructura de un ribonucleósido y un desoxirribonucleósido. Citidina (ribonucleósido) y Desoxiguanosina (desoxirribonucleósido) [13].

### 2.1.3 Componente básico: Bases nitrogenadas.

Son moléculas heterocíclicas, con más de un átomo de nitrógeno, formadas por un anillo único (pirimidinas) o por dos anillos condensados (purinas).

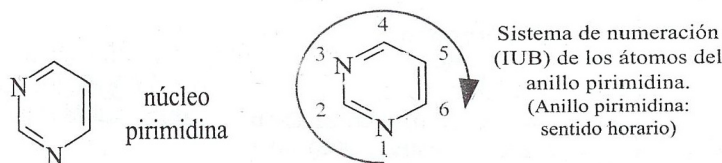


Figura 21. Fórmula y nomenclatura de las bases pirimidínicas [12].

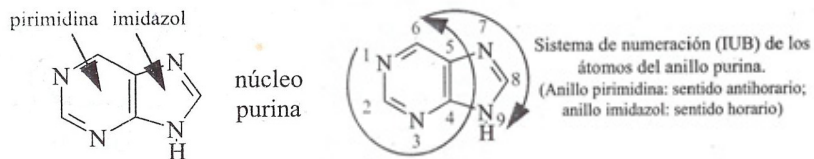


Figura 22. Fórmula y nomenclatura de las bases purínicas o púricas [12].

La *estructura primaria* de los ácidos nucleicos es el orden de las bases en su secuencia de nucleótidos, la *estructura secundaria* es la conformación tridimensional del esqueleto de las bases nucleotídicas y la *estructura terciaria* es el superenrollamiento de la molécula [13].

Las bases de los ácidos nucleicos son de dos tipos: pirimidinas y purinas. Las bases pirimidínicas, compuestas por un solo anillo aromático, más comunes son tres: *citocina*, *timina* y *uracilo*, que ocurren de manera común. La citocina se encuentra tanto en el DNA como el RNA. El uracilo solo se encuentra en el RNA, el uracilo substituye a la timina; la timina está presente en baja proporción en algunas formas de RNA. Las bases purínicas, compuestas por dos anillos aromáticos, comunes son: *adenina* y *guanina* y ambas están presentes en el DNA como en el RNA. Además de estas cinco bases comunes, hay bases “raras”, con pequeñas diferencias en su estructura, que se encuentran principalmente, aunque no en forma exclusiva en el RNA de transferencia, en muchos casos las bases se modifican por metilación, desaminación o reducción [13].

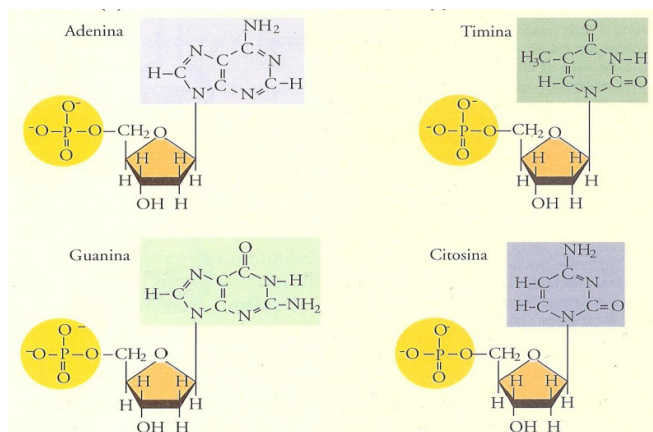


Figura 23. Representaciones esquemáticas de los cuatro tipos de nucleótidos [13].

Si se tomase una escalera y se la torciera para formar una hélice, manteniendo los peldaños perpendiculares, se tendría un modelo de la estructura del DNA. Los lados de la escalera están constituidos por moléculas de azúcar y fosfato alternadas. Los peldaños perpendiculares de la escalera están formados por las bases nitrogenadas adenina,



timina, guanina y citosina. Cada peldaño está formado por dos bases y cada base está unida covalentemente a una unidad azúcar fosfato. En la doble hélice, las bases enfrentadas se aparean y permanecen unidas por puentes de hidrogeno. [10].

El esqueleto azúcar fosfato es la parte externa de la hélice. Las cadenas corren en direcciones antiparalelas, una de 3' a 5' y la otra de 5' a 3'. El apareamiento de bases es *complementario*, o sea que la timina se aparea con la adenina y la guanina con la citosina [13].

El diámetro interior del esqueleto azúcar-fosfato de la doble hélice mide aproximadamente 11 Å (1.1nm), la distancia entre los puntos de enlace de las bases a las dos cadenas del esqueleto es la misma que la de las dos pares de bases, aproximadamente 11 Å (1.1nm), así que tienen el tamaño correcto para formar la doble hélice. El diámetro exterior de la hélice es de 20 Å (2nm), la longitud de una vuelta completa de la hélice en torno a su eje es de 34 Å (3.4nm) y contiene 10 pares de bases, los átomos que constituyen las dos cadenas de polinucleótidos de la doble hélice no llenan en su totalidad un cilindro imaginario en torno a la doble hélice; dejan huecos llamados surcos. Hay un *surco mayor* y un *surco menor* más pequeño en la doble hélice, ambos pueden ser sitios de unión del DNA a fármacos o a polipéptidos. A pH fisiológico, cada grupo fosfato del esqueleto tiene una carga negativa, los iones con carga positiva como Na<sup>+</sup> o Mg<sup>2+</sup> y polipéptidos con cadenas laterales de carga positiva suelen asociarse con el DNA como resultado de la atracción electrostática; el DNA eucariote, por ejemplo se asocia con histonas que son proteínas con carga positiva [13].

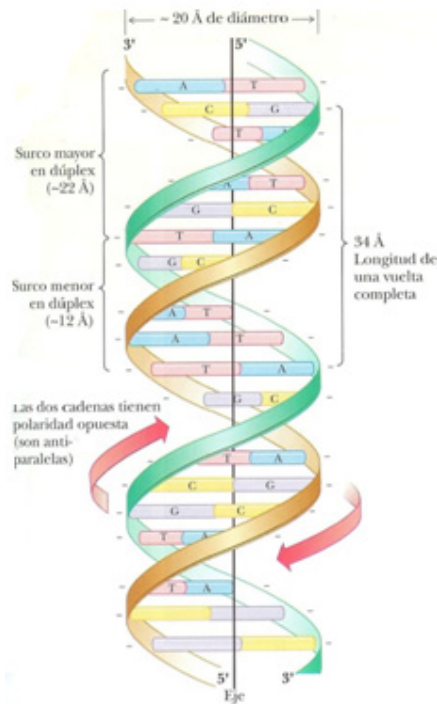


Figura 24. Estructura de la doble hélice [13].

En la mayoría de los textos se representa al dogma central de la biología molecular con los procesos generales de replicación (1), transcripción (2), traducción (3) y la (4) retrotranscripción [3]. En la mayor parte de los textos actuales se representa al dogma central de la biología molecular con los procesos generales de replicación, transcripción y traducción, figura 25. Así contemplan que la información del DNA sirve de molde para replicarse a sí misma (replicación), para transferir la información hacia la síntesis del RNA (transcripción) y de esta molécula se transfiere la información que determina la secuencia de los aminoácidos de las proteínas (traducción). Incluye la acción de la transcriptasa reversa que va de RNA a DNA, pero no describe los procesos especiales de auto replicación del RNA y mucho menos que en condiciones muy especiales el DNA desnaturalizado puede servir de template directo para la síntesis de proteínas [13].

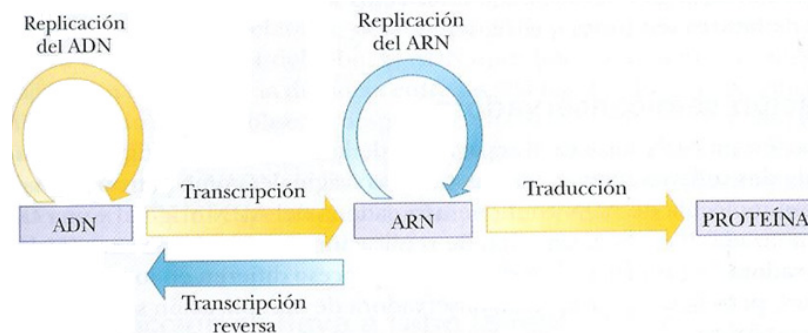


Figura 25. Mecanismo para la transferencia de información en la célula. Las flechas amarillas representan los casos generales y las flechas azules los casos especiales (en su mayor parte en los virus de RNA) [13].

## 2.2 Replicación.

Un prerrequisito crucial para las anotaciones de los genomas eucariontes es la definición de que constituye un gen. Este asunto está dirigido a la luz de las novedosas y sorprendentes características que recientemente han emergido a gran escala de los análisis genómicos y transcritómicos. Una definición operacional actualizada es: “*un gen es una discreta región genómica cuya transcripción está dada por uno o más promotores y los elementos de regulación distales que contienen la información para la síntesis de proteínas funcionales así mismo los RNAs no codificantes, relacionados con el intercambio de una porción de información genética a nivel de sus productos (proteínas o RNAs)*” [14]. El orden de las bases de los ácidos nucleótidos del DNA contiene la información necesaria para producir la secuencia correcta de aminoácidos en las proteínas de la célula [13]. La replicación es el proceso, conceptualmente sencillo pero molecularmente complejo, mediante el cual a partir de una molécula de *DNA progenitora* o *parental* se sintetiza una nueva, originándose así dos moléculas de *DNA hijas*, de secuencia idéntica a la del DNA original. Esto permite el paso de la información genética a la descendencia, tanto de una célula como del individuo [12]. La secuencia de bases del DNA codifica la información genética. La duplicación del DNA, que da lugar a una nueva molécula de DNA con la misma secuencia de bases que el original es necesaria cada vez que una célula se divide para dar origen a células hijas, este proceso de duplicación se llama *replicación*. En casi todos los organismos el flujo de la información genética es el siguiente: DNA a RNA y RNA a proteína [13]. Casi todos los pormenores del proceso fueron primeramente investigados en procariontes, como *Escherichia coli*. La célula se enfrenta a tres retos importantes al efectuar los pasos necesarios para replicarse. El primero es cómo *separar las dos cadenas de DNA*, estas cadenas se encuentran enrolladas una en torno a la otra, de modo que es preciso desenrollarlas para poder separarlas. Además de lograr un desenrollamiento continuo de la doble hélice, la célula debe proteger los segmentos de DNA desenrollados de la acción de las *nucleasas* que atacan de forma preferente al DNA de cadena sencilla. La segunda tarea implica *la síntesis de DNA en dirección del extremo 5' al extremo 3'*, dos cadenas antiparalelas deben ser sintetizadas en la misma dirección a partir de moldes antiparalelos. La última tarea consiste en *evitar errores de replicación*, cuidando que se agreguen las bases correctas a la cadena de polinucleótidos en crecimiento [13]. La replicación del DNA ocurre de manera semiconservativa; es decir las dos hebras de DNA sirven de molde para la síntesis de sus respectivas hebras complementarias. Cada DNA hijo está formado por una hebra *progenitora* y otra *hija* (recién sintetizada). El nombre alude a que siempre

se conserva la mitad de la molécula original [11, 12]. A medida que las dos cadenas se separan, actúan como moldes o guías; cada una dirige la síntesis de una nueva cadena complementaria a lo largo de toda su extensión [13].

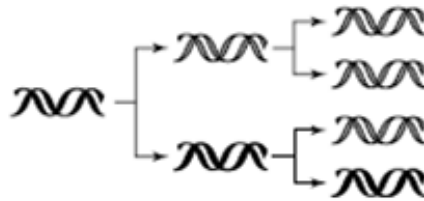


Figura 26. Replicación conservativa [11].

Durante la replicación, la doble hélice del DNA se desenrolla en un punto específico llamado *origen de replicación* (OriC en *E. coli*). Las nuevas cadenas de polinucleótidos se sintetizan utilizando cada una de las cadenas expuestas como un molde. Se ha establecido que la síntesis del DNA es bidireccional en la mayor parte de los organismos, con excepción de algunos virus y plásmidos. Por cada origen de replicación hay dos puntos (*horquillas de replicación*) en los que se forman nuevas cadenas de polinucleótidos. El avance de las dos horquillas de replicación en direcciones opuestas se manifiesta a través de la formación de una “burbuja” de DNA recién sintetizado entre regiones del DNA original. Esta característica se llama también estructura  $\theta$  por su parecido con la letra griega *theta*. Una de estas burbujas (y un origen de replicación) se forma en el DNA circular de los procariontes, en los eucariontes por otra parte, hay varios orígenes de replicación y por lo tanto, varias horquillas. Las burbujas crecen más grandes y a la larga se fusionan y dan origen a dos DNA hijos completos [13].

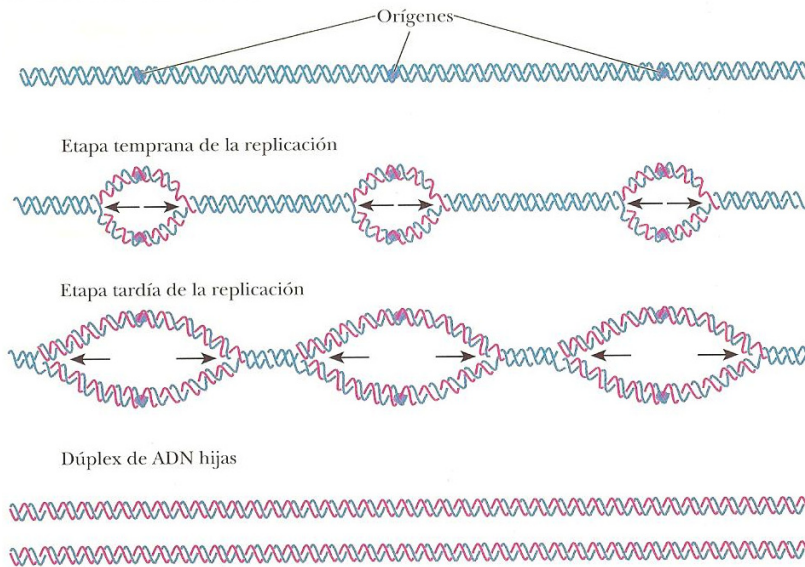


Figura 27. Replicación de un cromosoma eucariótico. Hay varios orígenes de replicación y dos horquillas de replicación por cada origen, las "burbujas" que surgen se fusionan [13].

Todas las síntesis de nucleótidos ocurren en la dirección 5'-3' desde la perspectiva de la cadena que se está sintetizando. El último nucleótido agregado a la cadena creciente tiene un OH-3' libre en el azúcar. El último nucleótido entrante tiene un 5'trifosfato en el extremo del azúcar. El grupo OH-3' libre, ataca el fosforo adyacente al azúcar del nuevo nucleótido que se agrega a la cadena en crecimiento, lo que conduce a la eliminación del pirofosfato y a la formación de un nuevo enlace fosfodiéster. Esta forma universal de síntesis presenta un problema para la célula porque al proceder la formación del DNA a lo largo de una horquilla de replicación, las dos cadenas se desplazan en direcciones opuestas [13].

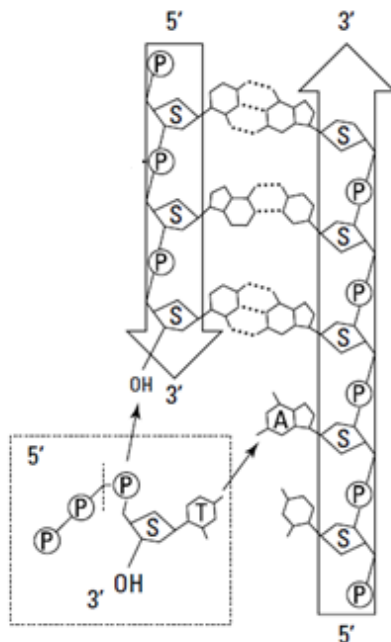


Figura 28. Esquematización de la unión de los nucleótidos [10].

La replicación del DNA es un proceso que ocurre sólo una vez en cada generación celular y resulta esencial en la duplicación de los cromosomas. En la mayoría de las células eucarióntes, la replicación del DNA se lleva a cabo durante la fase S del ciclo celular, conduce finalmente a la mitosis y en espermatoцитos y ovocitos primarios a la meiosis; en los humanos y otros mamíferos la velocidad de la síntesis del DNA es aproximadamente de 50 nucleótidos/segundo y en procariotas es aun más rápida 500 nucleótidos/segundo [13].

¿Cómo puede proceder la replicación a lo largo del DNA si las dos cadenas se desplazan en direcciones opuestas? El problema se resuelve porque la célula utiliza distintos tipos de polimerización para las dos cadenas en crecimiento. Una de las cadenas recién formada (la cadena líder) se sintetiza continuamente de su extremo 5' a su extremo 3' en la horquilla de replicación, utilizando a la cadena molde expuesta que tiene la dirección 3' a 5'. La otra cadena (cadena rezagada) se forma de manera semidiscontinua, esto es, en fragmentos pequeños (entre 1 000 a 2 000 nucleótidos de longitud), conocidos como fragmentos de Okazaki, el extremo 5' de cada uno de estos fragmentos está más próximo a la horquilla que el extremo 3', los fragmentos de la cadena rezagada son ligados por la enzima llama *DNA ligasa* [11, 12, 13].

La primera DNA polimerasa se descubrió y purificó en 1957, trabajando en *E. coli*. Al menos cinco DNA polimerasas se han caracterizado en *E. coli*, tres de ellas han sido estudiadas exhaustivamente, la DNA polimerasa I (Pol I) se descubrió primero, seguida de la polimerasa II (Pol II) y III (Pol III). La polimerasa I consta de una sola cadena polipeptídica, pero las polimerasas II y III son proteínas con múltiples subunidades aunque tienen algunas subunidades en común. La polimerasa II, no es necesaria para la replicación; es estrictamente una enzima de reparación. Hace poco se descubrieron otras dos polimerasas, Pol IV y V, que igualmente son enzimas de reparación [13]. La polimerasa III consta de una enzima "core" (núcleo) encargada de la polimerización y de la actividad exonucleasa 3'-5' (que consiste en subunidades  $\alpha$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$ ) y otras subunidades, incluyendo un dímero de subunidades  $\alpha$  encargada del ligamiento al DNA y el complejo- $\gamma$ , que consiste de subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\delta'$ ,  $\chi$  y subunidad  $\psi$ , que permite a la subunidad  $\beta$  formar una abrazadera que rodea el DNA, deslizándose la enzima sobre él a medida que avanza la polimerización. Las tres requieren la presencia de un *cebador* (*primer*), un oligonucleótido corto al cual se une de forma covalente la cadena de polinucleótidos en crecimiento durante las primeras etapas de la replicación, en esencia las DNA polimerasas necesitan un polinucleótido preformado (cebador o primer) con un hidroxilo-3' libre y en posición para poderle añadir el primero de los nucleótidos como

parte de la cadena en crecimiento, este cebador o primer es de RNA por poder proveer un extremo OH-3' libre, así la DNA polimerasa es proporcionada de un extremo OH-3' libre [10].

La reacción de la DNA polimerasa requiere los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatos: *dTTP*, *dATP*, *dGTP* y *dCTP*,  $Mg^{+2}$  y el DNA molde. Debido al requerimiento de un cebador de RNA, también se requieren los cuatro ribonucleósidos trifosfatos, ATP, UTP, GTP y CTP; estos se incorporan al cebador. El cebador (RNA) se une por puentes de hidrogeno al DNA molde; el cebador proporciona una estructura estable sobre la cual puede empezar a crecer la cadena naciente. La cadena de DNA recién sintetizada comienza a crecer al formarse un enlace covalente con el grupo hidroxilo-3' libre del cebador. Ahora se sabe que la DNA polimerasa I, durante la replicación tiene una función especializada de reparar y "remendar" el DNA y que la DNA polimerasa III es la enzima primordialmente encargada de llevar a cabo la polimerización de la cadena de DNA recién formada; la función principal de las DNA polimerasas II, IV y V, es la reparación. La actividad de exonucleasa 3'-5', que las tres polimerasas poseen es parte de la función de *corrección*; los nucleótidos incorrectos son removidos durante el curso de la replicación y son sustituidos por los correctos. La función de corrección repara solamente un nucleótido cada vez, mientras que la actividad exonucleasa 5'-3' elimina fragmentos cortos de nucleótidos durante la *reparación*, en la cual generalmente son eliminados varios nucleótidos a la vez. A través de la función de reparación también se remueven los cebadores de RNA [10].

Surgen dos preguntas en cuanto a la separación de las dos cadenas del DNA original para poder replicarlo; la primera es como lograr un continuo desenrollamiento de la doble hélice. Esto es algo complicado por el hecho de que el DNA procarionte existe en una forma circular superenrollado, la segunda pregunta está relacionada con cómo proteger los tramos de DNA de cadena sencilla que quedan expuestos a la acción de las nucleasas intracelulares conforme se produce el desenrollamiento de la doble hélice. Una enzima llamada *DNA girasa* (topoisomerasa clase II), cataliza la conversión de DNA circular relajado, con una "*mella*" (rotura de un enlace fosfodiéster entre nucleótidos vecinos) en una de las hebras o cadenas de DNA, a la forma superenrollado y con la mella reparada como se encuentra naturalmente el DNA procarióticos. Un ligero desenrollamiento de la hélice antes que la mella sea sellada introduce un superenrollamiento. La energía requerida para este proceso es suministrada por la hidrólisis de ATP. Hay evidencias de que la DNA girasa causa un rompimiento de la doble cadena de DNA durante el proceso de convertir la forma circular relajada, a la forma,

circular superenrollado [13]. En la replicación el papel de la girasa es un poco diferente. El DNA procariótico está negativamente superenrollado en su estado natural; sin embargo, la apertura de su hélice durante su replicación debería introducir superenrollamientos positivos delante de la horquilla de replicación. Si la horquilla de replicación siguiera avanzando llegaría un momento en que la tensión producida por la torsión de los superenrollamientos positivos, harían imposible continuar la replicación. Una proteína desestabilizadora de la hélice, llamada *helicasa* promueve el desenrollamiento o separación de las dos hebras ligándose a la horquilla de replicación. Se conocen varias helicasas, como la *proteína DnaB* y la *proteína rep*. ¿Cómo se protege el DNA de cadena sencilla el tiempo suficiente para la replicación? Las regiones de DNA de cadena sencilla son muy susceptibles a la degradación por nucleasas. Otra proteína, llamada *proteína de unión a cadena sencilla (SSB, single-stranded binding protein)*, estabiliza las regiones de cadena sencilla uniéndose fuertemente a esos segmentos de la molécula. La presencia de esta proteína SSB figura 29, protege las regiones de cadena sencilla evitando su hidrólisis por efecto de nucleasas [13].

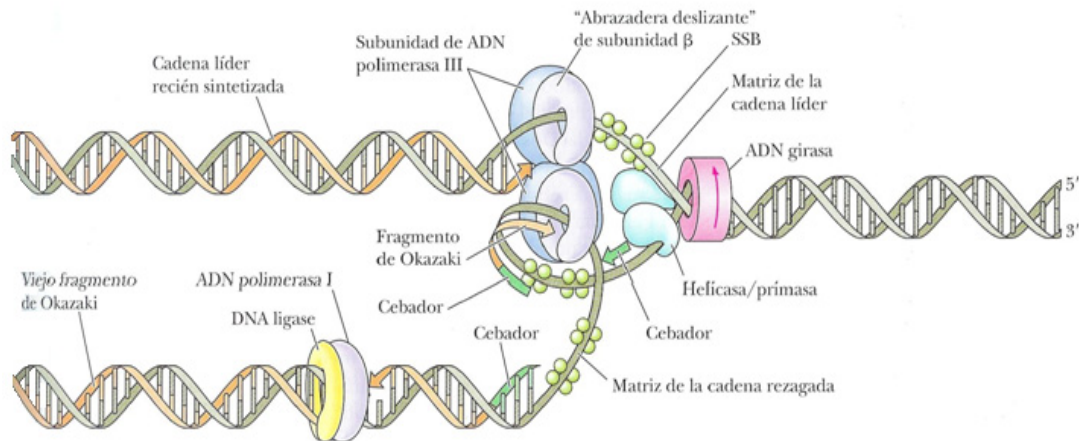


Figura 29. Características generales de una horquilla de replicación [13].

Una de las grandes sorpresas en el estudio de la replicación del DNA fue el descubrimiento de que el *RNA actúa como cebador (primer) en la replicación del DNA*. El RNA se puede formar *de novo*, sin cebador, aunque la síntesis de DNA requiere un cebador. Este hallazgo refuerza las teorías sobre el origen de la vida según las cuales el RNA y no el DNA, fue el material genético original. Un cebador para la replicación del DNA debe tener un extremo hidroxilo 3' libre al cual se pueda unir la cadena creciente y tanto el RNA como el DNA pueden proporcionar este grupo. Una enzima distinta, llamada *primasa* se encarga de copiar un fragmento corto de la cadena de DNA molde para producir la secuencia del cebador de RNA. El cebador y las moléculas de proteína en la



horquilla de replicación constituyen el *primosoma*. Las características generales de la replicación del DNA incluido el uso de un cebador de RNA, parecen ser comunes a todos los procariontes [13].

La DNA polimerasa III inicia la síntesis de dos nuevas cadenas de DNA. Entonces, el desoxinucleótido correspondiente se une al hidroxilo 3' del cebador de RNA y la síntesis procede en dirección 5'-3', tanto en la cadena líder como en la rezagada. Dos moléculas Pol III, una para la cadena líder y una para la cadena rezagada, están unidas físicamente al *primosoma*. El complejo multiproteínico resultante se llama *replisoma*. A medida que se aleja de la horquilla de replicación la polimerasa I elimina el cebador de RNA ejerciendo su actividad de exonucleasa 3'-5'. El cebador es sustituido por desoxinucleótidos, también por la acción de la DNA polimerasa I, usando ahora su actividad de polimerasa. La DNA ligasa es la enzima que se encarga del enlace final de la nueva cadena. La replicación del DNA se lleva a cabo solamente una vez por generación en cada célula, a diferencia de otros procesos como la síntesis de RNA y la de proteínas, que ocurren varias veces. Los errores en la replicación ocurren de manera espontánea, se conciben cada  $10^9$  a  $10^{10}$  pares de bases. La *corrección y reparación* se refiere a la eliminación de los nucleótidos incorrectos inmediatamente después que se agregan al DNA en crecimiento durante el proceso de replicación. La DNA polimerasa I tiene tres sitios activos y puede separarse en dos fragmentos principales. Uno de ellos (el fragmento Klenow) contiene la actividad polimerasa y la actividad de corrección. El otro fragmento contiene la actividad de reparación 5'-3' exonucleasa. Los errores en el establecimiento de los puentes de hidrogeno entre las bases, a veces causan la incorporación de un nucleótido incorrecto en una cadena de DNA en crecimiento, este error sucede con la probabilidad de una vez por cada  $10^4$  a  $10^5$  pares de bases, la DNA polimerasa I emplea su actividad 3'exonucleasa para retirar el nucleótido incorrecto, la replicación se reanuda cuando la DNA polimerasa I agrega el nucleótido correcto. La fidelidad de replicación mejora las actividades de corrección y reparación [13].

Durante la replicación se lleva a cabo un *proceso de cortar y reparar* catalizado por la polimerasa I, el corte es la remoción del cebador de RNA por la función de exonucleasa 5'-3' de la polimerasa y reparar es la función de "rellenar" el espacio dejado por el cebador con la incorporación de los desoxinucleótidos, también realizada por la actividad de polimerasa de la misma enzima. Obsérvese que esta parte del proceso tiene lugar después de que la polimerasa III ha producido la nueva cadena de nucleótidos. Si una o más bases se dañan por un agente externo o si falta un apareamiento por la actividad de corrección, la DNA polimerasa I es capaz de usar su actividad exonucleasa 5'-3' para remover los cebadores de RNA o los errores en el DNA, conforme se desplaza a lo largo

del DNA, este proceso se llama *transducción* o *corrimiento de la mella* (de *nick-translation*), se refiere a que la mella o abertura en el DNA se corre o cambia de lugar al final de la reparación realizada por la DNA polimerasa. Los organismo frecuentemente se exponen a los agentes *mutágenos*, los cuales incluyen la luz ultravioleta, la radiación ionizante (radiactividad) y diferentes agentes químicos, los cuales conducen a cambios en el DNA. El efecto más común de la luz ultravioleta es la creación de dímeros de pirimidina. Los electrones  $\pi$  de los dos carbonos de cada una de las dos pirimidinas forman un anillo de ciclobutilo, el cual distorsiona la forma normal del DNA e interfiere con la replicación y la transcripción; los daños químicos, a menudo son causados por los radicales libres, que pueden conducir a una rotura en el esqueleto fosfodiéster de la cadena de DNA. Esta es una de las razones primordiales por la que los antioxidantes sean tan populares como complementos dietéticos en la actualidad [13].

### 2.2.1 Replicación en eucariontes.

Con respecto a los procariontes, nuestro conocimiento de la replicación en eucariontes es limitado debido a muchas complejidades y dificultades para estudiar los procesos. Aunque muchos de los mismos principios son aplicables, la replicación en eucariontes es más compleja desde 3 aspectos fundamentales: 1) Hay orígenes múltiples de replicación, el tiempo debe ser controlado para que corresponda a las divisiones celulares y participan más proteínas y enzimas. 2) En las células humanas, varios miles de millones de pares de bases de DNA deben replicarse una vez y sólo una por ciclo celular. 3) El desarrollo y la división celular se dividen en las fases M, G1, S y G2; la replicación tiene lugar durante la fase S (Fig. 30) y existen varias vías para asegurarse que el DNA es replicado sólo una vez por ciclo. En los cromosomas eucariontes se lleva a cabo la síntesis de DNA, lo que permite que la replicación se inicie en orígenes múltiples de replicación llamados *replicadores*; estas son secuencias específicas de DNA que generalmente se encuentran entre secuencias de genes; un cromosoma humano promedio puede tener varios cientos de replicadores, las zonas donde se lleva a cabo la replicación se llaman *replicones* y el tamaño de éstos varía según la especie; en los mamíferos superiores los replicones pueden abarcan de 500 a 50 000 pares de bases [13].

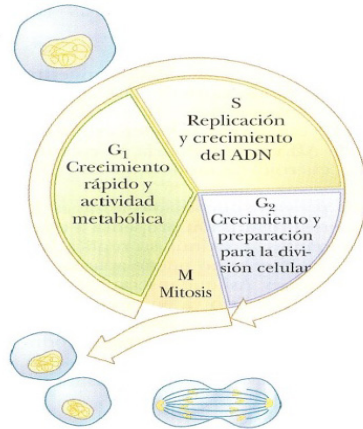


Figura 30. El ciclo de la célula eucarionte [13].

El modelo de control de la replicación mejor comprendido en eucariontes proviene de estudios de levaduras. Solo los cromosomas de las células que han alcanzado la fase G<sub>1</sub> pueden iniciar la replicación del DNA. La replicación se inicia con una proteína de varias subunidades llamada *complejo de reconocimiento del origen ORC*, la cual se liga con el origen de la replicación. Este complejo proteínico parece estar unido al DNA durante todo el ciclo celular, sirviendo como sitio de enlace para diversas proteínas que ayudan al control de la replicación. La siguiente proteína en unirse al complejo es un factor de activación llamado *proteína activadora de la replicación (RAP)*; después de que esta proteína se une, los *factores de licencia de replicación (RLF)* pueden ligarse. Una de las claves para relacionar la replicación con la división celular es que se ha encontrado que algunas de las proteínas *RLF* son citosólicas; así tienen acceso al cromosoma sólo cuando la membrana nuclear se disuelve durante la mitosis; después de que las *RFL* se ligan, el DNA queda listo para la replicación. La combinación del *DNA*, *ORC*, *RAP* y *RLF*, constituye el *complejo de prerreplicación (pre-RC)*. Enseguida participan otras proteínas y cinasas, cuando estas ciclinas se combinan con el factor *CDK*, pueden activar la replicación del DNA y también bloquear el reensamblaje de un *pre-RC* después de la iniciación. Los complejos de la *ciclina-CDK* fosforilan sitios sobre el *RAP*, los *RLF* y el propio *ORC*. Una vez fosforilado el *RAP* se disocia del *pre-RC*, al igual que los *RLF*; una vez fosforilados y liberados, los *RAP* y los *RFL* se degradan (Fig. 31) [13].

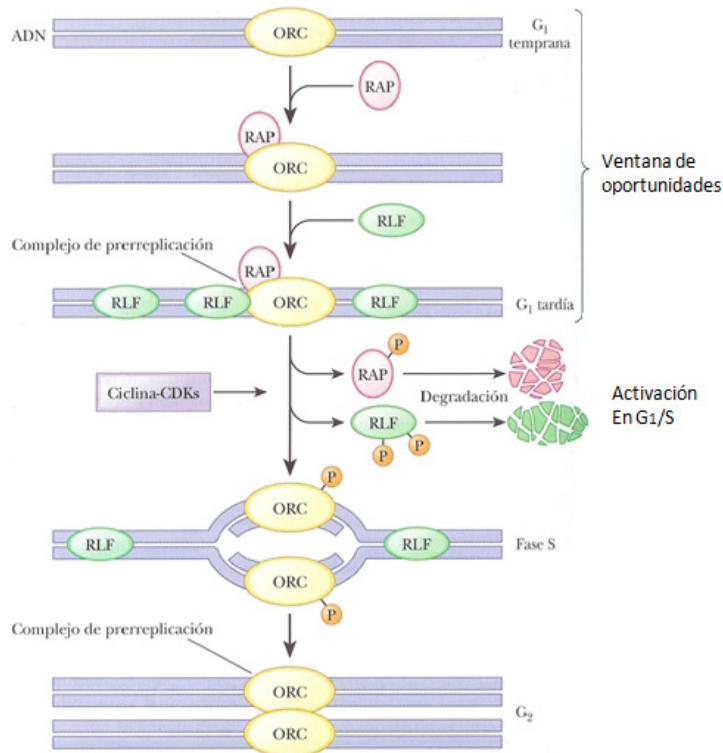


Figura 31. Modelo de iniciación del ciclo de replicación del DNA en eucariontes [13].

Cuando menos 15 polimerasas diferentes están presentes en la replicación de los eucariontes, de las cuales cinco han sido estudiadas de manera exhaustiva; el uso de animales en vez de plantas para este estudio, evita la complicación de cualquier síntesis de DNA en los cloroplastos. Las cinco polimerasas que mejor han sido estudiadas se conocen como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ; las enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  se encuentran en el núcleo, la  $\gamma$  está en la mitocondria. La polimerasa  $\alpha$  fue la primera en descubrirse y tiene el mayor número de subunidades, también tiene la capacidad de fabricar cebadores, pero carece de actividad de corrección 3'-5' y posee baja procesividad. Después de fabricar el cebador de RNA, la Pol  $\alpha$  agrega aproximadamente 20 nucleótidos y entonces es substituida por Pol  $\delta$  y  $\epsilon$ . La polimerasa  $\delta$  es la principal DNA polimerasa en los eucariontes; interactúa con una proteína especial llamada *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*, antígeno nuclear de proliferación celular). *PCNA* es el equivalente eucariótico a Pol III de procariontes, que funciona como una abrazadera deslizable ( $\beta$ ); es un trímero de tres proteínas idénticas que rodean el DNA. La DNA polimerasa  $\beta$  parece ser una enzima reparadora y la DNA polimerasa  $\gamma$  lleva a cabo la replicación del DNA mitocondrial. Varias de las DNA polimerasas aisladas de animales carecen de actividad exonucleasa (enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ ). Las características generales de replicación del DNA en los eucariontes son similares a la de los procariontes; por ejemplo el DNA en los eucariontes se replica de manera semiconservativa. Existe una cadena líder con síntesis continua en

la dirección 5'-3' y una cadena retrasada con síntesis discontinua en la dirección 5'-3'. Se forma un cebador de RNA por una enzima específica de la replicación del DNA en eucariontes, como es el caso con los procariontes, aunque la actividad de la primasa se asocia con Pol  $\alpha$ . La formación de los fragmentos de Okazaki típicamente de 150 a 200 nucleótidos de largo, es iniciada por la Pol  $\alpha$ . Una vez producido el cebador de RNA y que la Pol  $\alpha$  ha agregado los nucleótidos, la polimerasa se disocia y es reemplazada por la Pol  $\delta$  y su proteína *PCNA* adherida; otra proteína llamada *RFC* (*replication factor C*) participa en la adhesión de *PCNA* a la Pol  $\delta$ . El cebador de RNA es degradado después, pero en el caso de los eucariontes, las polimerasas no tienen la actividad exonucleasa 5'-3' para hacerlo, en vez de esto, dos enzimas independientes, *FEN-1* y *RNasa H1*, degradan al RNA; el movimiento continuo de la Pol  $\delta$  llena el hueco dejado por el cebador. Al igual que con la replicación procariontíca, las topoisomerasas alivian la torsión tensional creada por el desenrollamiento de la hélice y una proteína de unión a cadena sencilla *RPA*, protege el DNA de la degradación. Finalmente la DNA ligasa sella las mellas que separan los fragmentos. Otra diferencia importante entre la replicación del DNA en procariontes y en eucariontes es que el DNA de procariontes no se acompleja con histonas, como lo hace el DNA en eucariontes, la biosíntesis de las histonas ocurre al mismo tiempo y a la misma velocidad que la biosíntesis del DNA. En la replicación de eucariontes, las histonas están asociadas con el DNA a medida que se van formando (Fig. 32) [13].

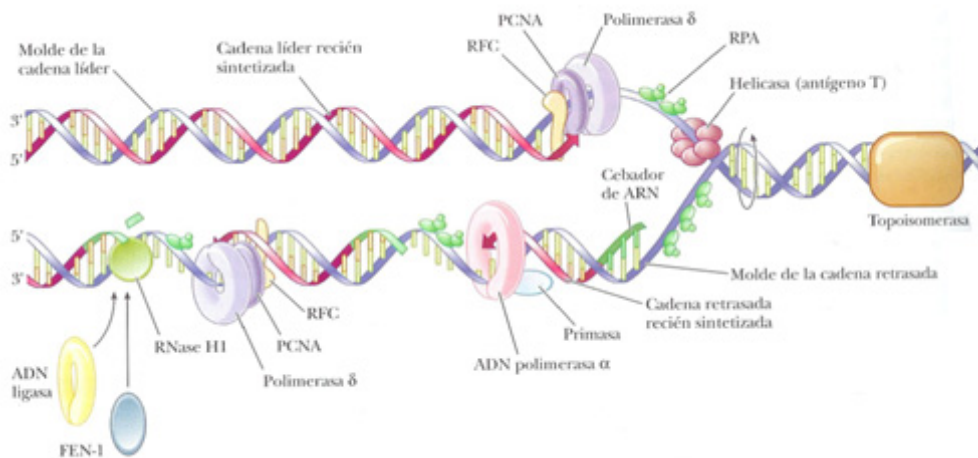


Figura 32. Fundamentos básicos de la horquilla de replicación en los eucariontes [13].

### 2.3 Transcripción.

El proceso de síntesis de RNA a partir de un DNA se llama *transcripción* y es el principal punto de control en la expresión de los genes y de la producción de proteínas. Una de las

hebras de la molécula de DNA de doble cadena se transcribe a una secuencia complementaria de RNA. De todo el DNA en una célula, únicamente se transcriben los genes y regiones reguladoras. La transcripción produce todos los tipos de RNA: mRNA (RNA mitocondrial), tRNA (RNA de transferencia), rRNA (RNA ribosomal), snRNA (RNA nuclear pequeño), miRNA (micro RNA) y siRNA (RNA de interferencia pequeño). En procariontes la mayor parte de la investigación se ha llevado a cabo en *E. coli*, aunque algunas características generales se encuentran en todos los organismos, excepto en el caso de las células infectados por un virus de RNA. . En procariontes la mayor parte de la investigación se ha llevado a cabo en *E. coli*, aunque algunas características generales se encuentran en todos los organismos, excepto en el caso de las células infectados por un virus de RNA. Los detalles de la transcripción del RNA difieren en algo entre los procariontes y los eucariontes, donde el proceso es más complicado en los eucariontes, donde un gran número de factores de transcripción participan [13].

- 1.- El RNA es sintetizado usando una DNA molde en el proceso llamado transcripción: la enzima que cataliza el proceso es la RNA polimerasa dependiente de DNA.
- 2.- Se requieren de los cuatro ribonucleicos trifosfatos (ATP, GTP, CTP y UTP), así como  $Mg^{+2}$ .
- 3.- No se necesita un cebador en la síntesis de RNA, pero sí se requiere del DNA cebador.
- 4.- La cadena de RNA crece del extremo 5'-3'. El nucleótido en la cadena 5' retiene el grupo trifosfato (ppp-nucleósido).
- 5.- La secuencia básica el DNA contiene señales para la iniciación y terminación de la síntesis de RNA. La enzima se une a la cadena molde y se desplaza en la dirección 3'-5. El molde no cambia [3, 10-13].

La transcripción en procariontes se da gracias a la enzima que sintetiza RNA llamada *RNA polimerasa*. El peso molecular de esta enzima es de alrededor de 470 000 kDa y está compuesta por varias subunidades que se designan como:  $\alpha$ ,  $\omega$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\sigma$ . La proporción real de la enzima es  $\alpha_2\omega\beta\beta'\sigma$ , la subunidad  $\sigma$  está unida de manera laxa con el resto de la enzima, la cual es llamada *núcleo enzimático*, la *holoenzima* consta de todas las subunidades, incluida  $\sigma$ . La subunidad  $\sigma$  participa en el reconocimiento de los promotores específicos mientras que las subunidades  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\alpha$  y  $\omega$  se combinan para formar el sitio activo de la polimerización. De las dos hebras de DNA una es el molde para la síntesis del RNA, esta cadena tiene varios nombres y el más común es *cadena molde*, porque es la cadena que dirige la síntesis de RNA, también se le llama *cadena antisentido*, porque su código es el complemento del RNA que es producido. La otra

cadena se llama *cadena de codificación* porque su secuencia de DNA será la misma que la secuencia del RNA que es producido (con la excepción de que U sustituye a T), también se llama *cadena sentido* porque la secuencia de RNA es la que se usa para determinar que nucleótidos son insertados en el caso del mRNA. El núcleo enzimático de la RNA polimerasa es catalíticamente activo pero carece de especificidad. La holoenzima de la RNA polimerasa se une a las secuencias de DNA específicas y transcribe sólo la cadena correcta. El papel esencial de la subunidad- $\sigma$  es reconocer el *locus del promotor*, una secuencia de DNA que señale el inicio de la transcripción de RNA. La subunidad  $\sigma$  unida laxamente es liberada después de que se inicia la transcripción y de que se han agregado cerca de 10 nucleótidos a la cadena de RNA (Fig. 33) [13].

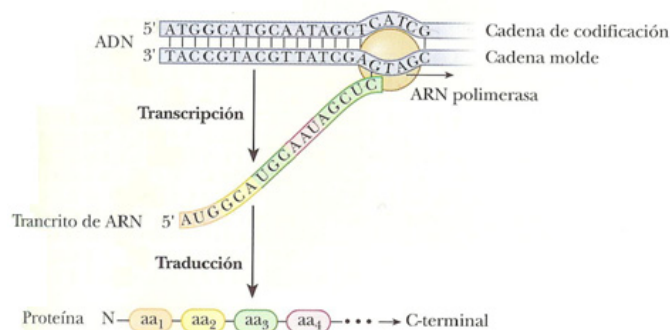


Figura 33. Fundamentos básicos de la transcripción [13].

Las RNA polimerasa debe tener una señal para saber cuál de las dos hebras de DNA molde, debe transcribir y de dónde está ubicado el primer nucleótido del gene que se va a transcribir. Los promotores son secuencias de DNA que dirigen a la RNA polimerasa, la región promotora con la que se une la RNA polimerasa está más cercana al extremo 3' de la cadena molde que lo que está el gene real para la cual el RNA es sintetizado. El RNA se forma del extremo 5' hacia el extremo 3' de modo que la polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena molde del extremo 3' al 5'. Sin embargo, por convención todas las secuencias control se dan para la cadena de codificación, la cual va de 5' a 3'. Se dice que el sitio de enlace para la polimerasa se encuentra *río arriba* con respecto al inicio de la transcripción, el cual se encuentra más lejos hacia el extremo 5' de la cadena de codificadora. Los promotores van *río arriba*, lo cual significa que se localizan antes del sitio 5' de la cadena codificadora y cerca del sitio 3' de la cadena molde. El componente más cercano al primer nucleótido que se incorpora, se encuentra a una distancia de aproximadamente 10 pares de bases *río arriba*, la primera base que se incorpora en la cadena de RNA naciente se dice que se encuentra en la posición +1 y se llama *sitio de inicio de la transcripción (TSS)*, todos los nucleótidos río arriba del sitio de inicio se marcan con números negativos. Como el primer elemento promotor se encuentra

alrededor de 10 bases más arriba de la cadena, se denomina -10, pero también se llama *caja Pribnow*. Después de la *caja Pribnow* hay de 16 a 18 bases que son del todo variables, el siguiente elemento promotor se encuentra cerca de 35 bases río arriba del TSS y se llama *región -35* o *elemento -35*, el término elemento se da para una secuencia de DNA que es de algún modo importante en el control de la transcripción, el área desde el elemento -35 hasta el TSS se llama *promotor interno*, río arriba del promotor interno puede estar un *elemento UP*, que potencia la unión de la RNA polimerasa. Los elementos UP en general se extienden desde -40 a -60, la región desde el extremo del elemento UP hasta el sitio de inicio de la transcripción se conoce como *promotor extenso*. La secuencia de bases de las regiones promotoras, tiene una característica notable y es que contienen diversas bases en común, las cuales se llaman *secuencias consenso*. Las regiones promotoras son ricas en A-T, que tienen dos puentes de hidrogeno por cada par de bases y por esta razón se desenrollan más fácilmente. Además de dirigir la RNA polimerasa para el gene a traducir, la secuencia promotora de bases controla la frecuencia con la cual se transcribe el gene [13].

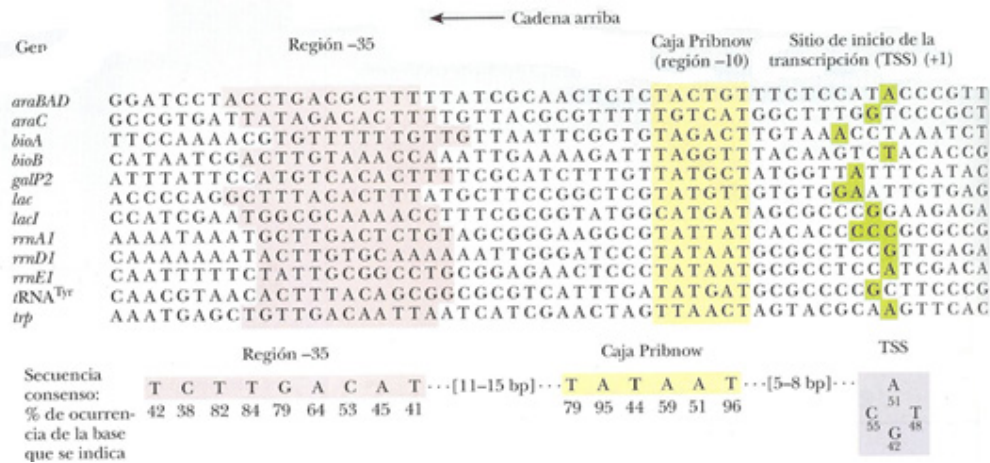


Figura 34. Secuencias de los promotores representativos de *E. coli* [13].

La primera fase de la transcripción se llama *iniciación de la cadena*, comienza cuando la RNA polimerasa (RNA pol) se une al promotor y forma lo que se llama *el complejo cerrado*. La subunidad  $\sigma$  dirige la polimerasa hacia el promotor. Tiende un puente entre las regiones -10 y -35 del promotor hacia el núcleo de la RNA polimerasa a través de la subunidad  $\sigma$ . Los núcleos enzimáticos que carecen de subunidad  $\sigma$ , se unen áreas de DNA que carecen de promotores. La holoenzima podría unirse a un DNA sin promotores se disociaría sin realizar ninguna transcripción. Para la iniciación de la cadena se requiere la formación del *complejo abierto*; estudios recientes han demostrado que una porción de las subunidades  $\beta'$  y  $\sigma$  inician la separación de las cadenas, desenrollando un segmento de aproximadamente 14 pares de bases que rodean al sitio de inicio de la transcripción.



Una purina ribonucleósido trifosfato es el primer nucleotio en el RNA y se une a su base de DNA complementaria en la posición +1. De las purinas, la A tiende a aparecer con mayor frecuencia que la G. Este primer residuo retiene su grupo 5'-trifosfato [13].

Después de que se han separado las cadenas una burbuja de transcripción de cerca de 17 pares de bases recorre la secuencia de DNA que se va a transcribir y la RNA polimerasa cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster entre los ribonucleótidos incorporados. Una vez incorporados aproximadamente 10 nucleótidos la subunidad  $\sigma$  se disocia. Las topoisomerasas relajan los superenrollamientos de DNA por enfrente y por detrás mientras avanza la burbuja de transcripción. La RNA polimerasa se desplaza rápidamente a través de algunas regiones del DNA y lentamente en otras. En vez de avanzar hasta terminar la cadena de RNA, la RNA polimerasa se disocia del DNA, después de ensamblar de 5 a 10 nucleótidos. Para que ocurra el alargamiento de la cadena, la RNA polimerasa debe ser capaz de despegar a la subunidad  $\sigma$  del promotor, debido a la fuerte unión entre la subunidad  $\sigma$  y el promotor, se requiere de considerable cantidad de energía para que se disocié [13].

La terminación de la transcripción del RNA también incluye secuencias específicas  *río abajo*, del gene estructural para el cual se va a transcribir el RNA. Hay dos tipos de mecanismos de terminación: el primero se denomina  *terminación intrínseca*  y es controlado por secuencias específicas llamadas  *sitios de terminación* , las cuales se caracterizan por dos repeticiones invertidas espaciadas por algunas otras bases. Las repeticiones invertidas son secuencias de bases complementarias, de modo que pueden formar una horquilla entre sí. De manera simultánea, la presencia de uracilos ocasiona una serie de pares de bases A-U, entre la cadena cebador y el RNA naciente: los pares A-U, forman puentes de hidrogeno débiles en comparación con los pares G-C y el RNA se disocia de la burbuja de transcripción terminando así la transcripción. El otro tipo de terminación incluye una proteína especial llamada  *rho*  ( $\rho$ ). Las secuencias de terminación que dependen de rho también provocan que se forme una horquilla. En este caso la proteína rho se une al RNA y persigue a la polimerasa. Cuando la polimerasa llega al sitio de terminación y transcribe el RNA que forma la horquilla se detiene y permite que la proteína rho tenga oportunidad de alcanzarla, esta facilita la disociación de la maquinaria de transcripción. Tanto el movimiento de la proteína rho como la disociación requieren de energía proporcionada por la hidrólisis del ATP [10, 13].

En los procariontes, el control de la transcripción es por mucho el encargado de controlar el grado de producción de proteínas. De hecho muchos equiparan el control de

transcripción con la expresión genética. En los procariontes, la transcripción es controlada en cuatro formas principales: factores sigma alternativos, potenciadores, operones y atenuadores de la transcripción. Los factores  $\sigma$  alternativos, los virus y bacterias pueden ejercer algún control sobre los genes que son expresados y producir diferentes subunidades  $\sigma$  que dirigen la RNA polimerasa hacia diferentes genes. En ciertos genes de *E. coli* hay secuencias río arriba de regiones promotoras extensas. Los genes que codifican para la producción de RNA ribosomal tiene tres sitios río arriba, llamados *sitios Fis*, porque son sitios de unión a una proteína llamada Fis. Estos sitios se extienden a partir del extremo del elemento UP río arriba -60 o -150 y son ejemplos de una clase de secuencias de DNA llamadas *potenciadores*, que son secuencias que pueden unirse con proteínas conocidas como *factores de transcripción* (Fig. 35) [13].

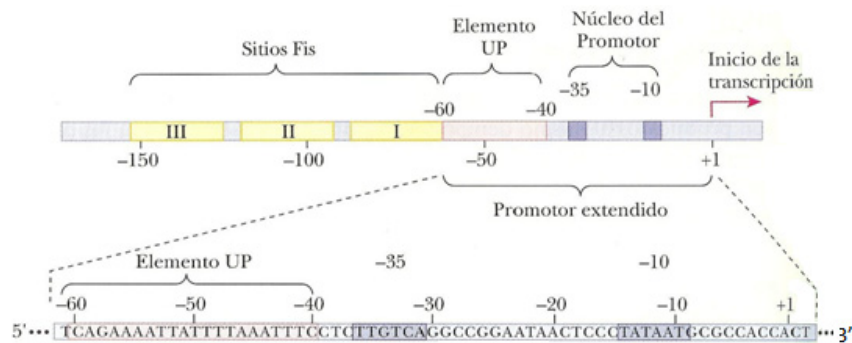


Figura 35. Elementos de un promotor bacteriano [10].

Cuando una secuencia de DNA tiene secuencia como promotor, ello significa que la RNA polimerasa se une a esta región de DNA. Un potenciador, por otro lado, es una secuencia de DNA que usualmente se localiza río arriba del promotor. La polimerasa no se une a los potenciadores. Si la unión del factor de transcripción aumenta el nivel de transcripción, se dice que el elemento es un *potenciador*. Cuando la unión del factor disminuye el nivel de transcripción, se dice que el elemento es un *silenciador*. En los procariontes los genes que codifican las enzimas de ciertas vías metabólicas a menudo son controlados como grupo y los genes que codifican a las proteínas de la vía se encuentran cercanos y están bajo el control de un único promotor. Un grupo de genes de este tipo se llama *operón*. Usualmente estos genes estructurales no son transcritos todo el tiempo, más bien la producción de estas proteínas puede ser desencadenada por la presencia de una sustancia adecuada llamada *inductor*, el fenómeno se llama *inducción*. Un ejemplo particularmente estudiado de una proteína inducible es la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. El operón puede ser controlado por medio de mecanismos positivos o negativos, se clasifican también en *inducibles*, *represibles* o *de ambos tipos* dependiendo de cómo responden ante las moléculas que controlan su expresión. Los procariontes no hacen

ninguna separación entre los procesos de transcripción y de traducción como lo hacen los eucariontes, de modo que los ribosomas se unen al mRNA mientras este es transcrito, esto es que en procariontes la transcripción y la traducción son simultáneas [13].

### 2.3.1 Transcripción en eucariontes.

El proceso de la transcripción es, más complejo en los eucariontes que en los procariontes, se sabe que en ellos existen tres RNA polimerasas con diferentes actividades. Cada una transcribe un grupo distinto de genes y reconoce un conjunto diferente de promotores. La RNA polimerasa I se encuentra en el núcleo y sintetiza precursores de la mayor parte de los RNA ribosómicos, aunque no en todos ellos. La RNA polimerasa II se encuentra en el nucleoplasma y sintetiza precursores de mRNA. La polimerasa III se encuentra en el nucleoplasma y sintetiza los tRNA precursores de RNA ribosomal 5S y otras pequeñas moléculas de RNA que participan en el procesamiento de mRNA y el transporte proteico [13].

Las tres RNA polimerasas eucarióticas son de gran tamaño (500-700kDa); son proteínas complejas que constan de 10 a más subunidades. Sus estructuras generales difieren, pero todas tienen algunas subunidades en común. No hay subunidades  $\sigma$  para dirigir las polimerasas de la RNA polimerasa hacia los promotores. La detección del gene que se transcribe se logra de distinto modo en los eucariontes y la presencia de factores de transcripción que existen por cientos, desempeñan un papel preponderante. De las tres RNA polimerasas, la RNA polimerasa II es la más estudiada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la RNA polimerasa II consta de 12 subunidades, las subunidades se llaman RPB1 a la RPB12. Las siglas RPB se refiere a *RNA polimerasa B*. Las subunidades del núcleo enzimático RPB1 a la RPB3 parecen desempeñar un papel similar a sus homólogos en las RNA polimerasas procarióticas. Hay cinco de ellas presentes en las tres RNA polimerasas, la RPB1 tiene secuencias repetidas en el *dominio C-terminal (CTD)* que, como lo indica su nombre, se encuentran en la región C-terminal de la proteína. La treonina, serina y tirosina son sustratos para la fosforilación, lo cual es importante en el control de la iniciación de la transcripción. Existe una amplia homología entre las regiones nucleares de las RNA polimerasas de bacterias, levaduras y humanos, que han conducido a los investigadores a especular que las RNA polimerasas evolucionaron hace mucho tiempo, el que solo los procariontes existían, a medida que se fueron desarrollando seres más complejos, se agregaron capas de otras subunidades a la polimerasa interna [13].

¿Cómo reconoce Pol II el DNA correcto que debe transcribir? Los promotores de DNA para la RNA Pol II tienen cuatro elementos, el primero incluye diversos *elementos río arriba*, que actúan como *potenciadores* y *silenciadores*, las proteínas de enlace específicas activan la transcripción por encima de los niveles basales en el caso de los potenciadores o la suprimen en el caso de los silenciadores. Dos elementos comunes están cercanos al promotor interno y son la caja GC (-40), que tiene una secuencia consenso GGGCGG y la caja CAAT que se extiende hasta -10, que tiene una secuencia consenso GGCCAATCT. El segundo elemento, que se encuentra en la posición -25, es la *caja TATA* tiene una secuencia consenso TATAA (T/A). El tercer elemento incluye un sitio de inicio de transcripción en la posición +1 pero en el caso de los eucariontes está rodeado por una secuencia llamada *el elemento iniciador (Inr)*. El cuarto elemento es un posible regulador río abajo, aunque éstos son más raros que los reguladores río arriba. Muchos promotores naturales carecen de por lo menos uno de los cuatro elementos. Muchos promotores naturales carecen de por lo menos uno de los cuatro elementos (Fig. 36) [13].

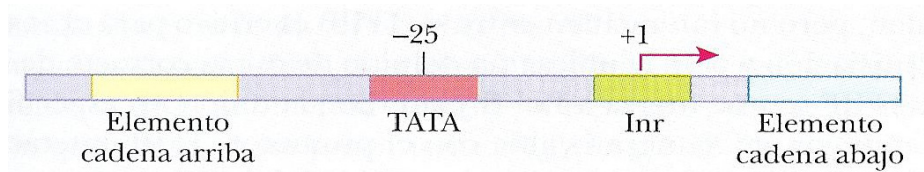


Figura 36. Cuatro elementos de los promotores Pol II [13].

Cualquier proteína que regule la transcripción, pero no sea en sí una subunidad de la RNA polimerasa, se llama *factor de transcripción*. La iniciación de la transcripción comienza con la formación de un *complejo de preiniciación* y la mayoría del control de la transcripción ocurre en este evento. Este complejo normalmente contiene RNA polimerasa II y seis *factores de transcripción generales (GTF)-TFIIA, TFIID, TFIID, TFIIE* y *TFIIH*. Cada GTF tiene una función específica y se agregan al complejo de un orden definido. En la figura 37 se muestran las secuencias de eventos de la transcripción de Pol II. El primer paso en la formación del complejo de preiniciación es el reconocimiento de la caja TATA por TFIID. Este factor de transcripción es en realidad una combinación de varias proteínas. La proteína primaria se llama *proteína de unión TATA (TBP TATA binding protein)* hay muchos factores *asociados a TBP (TAFII)*. Como TBP está también presente y se requiere para RNA Pol I y para RNA Pol III, es un factor de transcripción universal. Desde especies tan distintas como levaduras, plantas, mosca de la fruta y humanos, los TBP tienen más del 80% de aminoácidos idénticos en su proteína, la proteína TBP se une con el surco mayor del DNA a través de los últimos 180 aminoácidos de su dominio C-terminal. Como se muestra en la figura 38, una vez que es

ligado TFIID, se une TFIIA y éste TFIIA también interactúa con ambos, el DNA y TFIID. TFIIB también se liga con TFIID, teniendo un puente con TBP y RNA Pol II. TFIIA y TFIIB se pueden ligar en cualquier orden, pero no interactúan entre sí. TFIIB es crítico para el ensamblaje del complejo de iniciación y para la ubicación del sitio correcto de inicio de la transcripción. Luego, TFIIF se une con fuerza a RNA Pol II y suprime la unión no específica. La RNA Pol II y TFIIB, se enlazan de manera estable con el promotor. TFIIF interactúa con RNA Pol II, TBP, TFIIB y TAFIIs, regula también la actividad de la CTD fosfatasa. Los dos últimos factores que se agregan TFIIE y TFH. TFIIE interactúa con RNA Pol II sin fosforilar. Estos dos factores han sido implicados en la fosforilación de la RNA polimerasa II. TFIIH también tiene actividad de helicasa, después de que todos estos GTF están ligados a la RNA Pol II no fosforilada, el complejo de preiniciación se encuentra completo. Se han determinado que TFIIH tiene también otras funciones como la de reparación del DNA. Antes de que inicie la transcripción, el complejo de preiniciación debe formar el *complejo abierto*, en este complejo, RNA Pol II CTD es fosforilado y las cadenas de DNA son separadas [10].

Como se ve en la figura 37, la RNA Pol II fosforilada sintetiza RNA y deja la región promotora detrás. Al mismo tiempo, los GTF o bien se quedan en el promotor o se disocian de la RNA Pol II. La RNA Pol II no elonga de manera eficiente cuando esta sola *in vitro*, bajo estas circunstancias puede sintetizar solamente de 100 a 300 nucleótidos por minuto, mientras que la velocidad *in vivo* es de 1,500 a 2,000 nucleótidos por minuto. La diferencia se debe a los factores de elongación. Uno de ellos es TFIIF, que además de su función en la formación del complejo de preiniciación, también ejerce un efecto de estimulación sobre la elongación, esta es controlada de diversas maneras, hay secuencias llamadas *síntos de pausa*, donde las RNA polimerasa no actúa de manera adecuada. La elongación también puede ser abortada, lo que propicia la terminación prematura. Por último, la elongación puede proceder más allá del punto normal de terminación. Los factores de elongación tipo TFIIF promueven la lectura rápida en los sitios de pausa los factores de elongación tipo TFIIS se llaman *factores de liberación de la tensión*, también actúan ayudando a la RNA polimerasa a desplazarse de nuevo después de un sitio de pausa. Un tercer tipo de factores de elongación son los *P-TEF* y *N-TEF K* (*factores de transcripción positiva* y *factor de elongación de transcripción negativa*) [13].

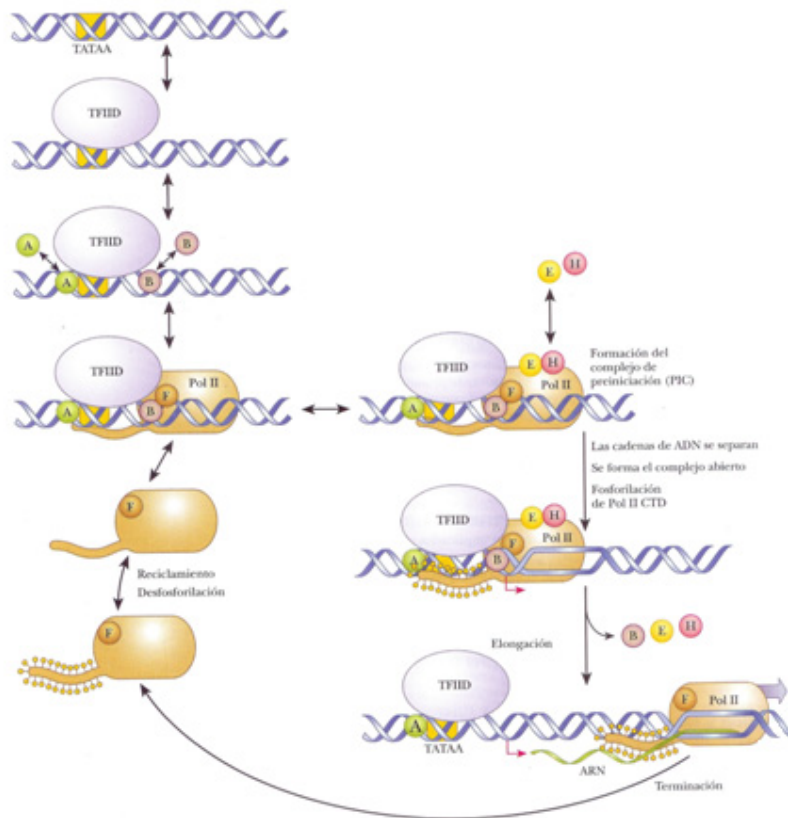


Figura 37. Representación diagramática del orden de sucesos en la transcripción. TFIID (contiene la proteína de unión a TATA, TBP), se liga a la caja TATA. Después se unen TFIIA y TFIIB, seguidos por el reclutamiento de la RNA polimerasa II y TFIIF. TFIIH y TFIIE entonces se unen para formar el complejo de preiniciación (PIC). Las cinasas fosforiladas el dominio C de la RNA Pol II, conducen al complejo abierto donde se separan las cadenas de DNA. Durante la elongación se produce RNA conforme RNA Pol II se disocia durante la fase de terminación y CTD se desfosforila. Después la RNA Pol II/TFIIF se recicla para ligarse a otro promotor [13].

La terminación comienza deteniendo a la RNA polimerasa. Hay una secuencia consenso para la terminación en eucariotes, que es AAUAAA, esta secuencia puede estar a una distancia de 100 a 1000 pares de bases con respecto al extremo real del mRNA, después de que se produce la terminación, la transcripción es liberada y también se libera la forma abierta de la RNA Pol II (fosforilada) del DNA, los fosfatos son removidos por fosfatasas y el complejo RNA Pol/TFIIF es reciclado [13].

El nivel de transcripción de algunos genes puede ser muchas veces mayor que el nivel basal. La diferencia son los factores de transcripción específicos de algunos genes, conocidos como *activadores*. Como ya se sabe de la transcripción en eucariotes, los potenciadores y silenciadores son secuencias regulatorias que aumenta y disminuyen la transcripción, respectivamente. Pueden encontrarse cadena arriba o cadena abajo respecto al iniciador de la transcripción y su orientación no es importante para el proceso

de transcripción. Actúan por medio de un factor de transcripción específico para el gen [13].

Algunos mecanismos de control de la transcripción pueden calificarse basándose en la respuesta común a ciertos factores metabólicos, así, los potenciadores que responden a estos factores se llaman elementos de *respuesta*.

## 2.4 Traducción.

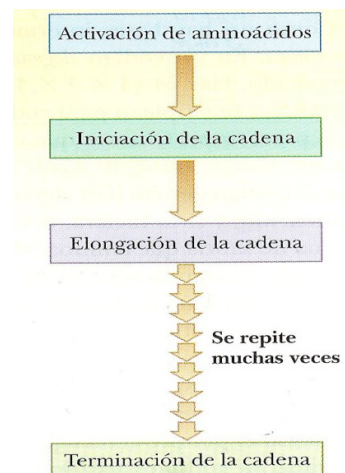
La biosíntesis es un proceso que requiere ribosomas, RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA) y diversos factores proteícos. El ribosoma y el tRNA que se une con el mRNA en el curso de la síntesis de proteínas conducen al orden correcto de aminoácidos de la cadena polipeptídica en crecimiento. Antes de que se pueda incorporar un aminoácido a la cadena de polipeptídica en crecimiento debe ser *activado*, un proceso en el que participa tanto el tRNA como una enzima específica del tipo conocido como *aminoacil-tRNA sintetasa*. El aminoácido se une covalentemente con el tRNA en el proceso y forma un aminoacil-tRNA. La formación de la cadena polipeptídica se lleva a cabo en tres pasos.

1.- En el paso de *iniciación de la cadena*, el mRNA mensajero y el ribosoma están unidos entre sí, el primer aminoacil-tRNA se al mRNA en el sitio que codifica el inicio de la síntesis sitio A.

2.- El siguiente aminoacil-tRNA forma un complejo en el ribosoma y con el mRNA.

3.- El sitio de enlace para el segundo aminoacil-tRNA es cercano al del primer aminoacil-tRNA sitio P, Se forma un enlace peptídico entre los dos aminoácidos en el paso llamado *elongación de la cadena*. Este último proceso se repite una y otra vez hasta que se completa la cadena polipeptídica. Por último se lleva a cabo la terminación de la cadena [13].

Figura 38. Etapas de la biosíntesis de proteínas [13].



Pueden existir varios tRNA para cada aminoácido, pero un tRNA dado no se une con más de un aminoácido. La enzima sintetasa requiere de  $Mg^{+2}$  y es altamente específica tanto para el aminoácido como para el tRNA. Hay una sintetasa distinta para cada aminoácido, la cual funciona para todas las distintas moléculas de tRNA de dicho aminoácido. La especificidad de la enzima contribuye a la exactitud del proceso de traducción. La síntesis asegura que los aminoácidos correctos se apareen con el tRNA correcto y esta es su función principal. La sintetasa tiene también otro nivel de actividad. Un nivel extra de *proofreading* (corrección) realizado por la sintetasa es parte de lo que a veces se conoce como “el segundo código genético” [13].

Al describir la síntesis proteíca hemos considerado hasta el momento las reacciones que se realizan en un ribosoma. Sin embargo no solo es posible, sino también bastante común que varios ribosomas estén unidos al mismo mRNA. Cuando estos ribosomas llevan un polipéptido en una o diversas etapas de terminación, dependiendo de la posición del ribosoma a medida que se desplaza a lo largo del mRNA, a este complejo del mRNA con varios ribosomas se llama polisoma [13].

#### 2.4.1 Traducción en procariontes.

Los detalles de la cadena de eventos de la traducción difieren ligeramente en los procariontes y eucariontes. Al igual que la síntesis de DNA y de RNA, este proceso ha sido estudiado altamente en procariontes, se utilizarán los trabajos hechos en *E. coli*, como ejemplo. La traducción se divide en tres etapas, iniciación de la cadena, elongación de la cadena y terminación de la cadena polipeptídica. La síntesis proteíca requiere una de la unión del mRNA y la aminoacil-tRNA con el ribosoma. En todos los organismos, la síntesis de la cadena polipeptídica se inicia en el extremo N-terminal y la cadena crece del extremo N-terminal hacia C-terminal [13].

#### 2.4.2 Iniciación.

En los procariontes, el aminoácido inicial del extremo N-terminal de todas las proteínas es la *N-formilmetionina* (fMet), este residuo es retirado por los procesos postraduccionales después de que se termina de sintetizar la cadena polipeptídica. Para el inicio de la síntesis de polipéptidos se requiere que se forme un *complejo de iniciación*, por lo menos ocho componentes participan en la formación del complejo de iniciación, incluyendo el mRNA, las subunidades ribosómicas 30S, el fMet-tRNA, GTP y tres factores de



iniciación llamados IF-1, IF-2 e IF-3, las proteínas IF-3 facilitan la unión del mRNA con la subunidad 30S, también parece evitar la unión prematura de la subunidad 50S, que tiene lugar en el paso posterior en el proceso de iniciación. IF-2 se une con GTP y ayuda a la selección del tRNA iniciador (fMent-tRNA) entre todos los otros tRNA aminoacilados disponibles; la función de IF-1 aparentemente se enlaza con IF-2 y con IF-3 y facilita la acción de ambas. También cataliza la separación de las unidades ribosómicas 30S y 50S que se reciclan para otra ronda de traducción. La combinación resultante de mRNA, la subunidad ribosómica 30S y de fMent-tRNA forma el *complejo de iniciación 30S*. La subunidad ribosómica 50S se une con el complejo de iniciación 30S para producir el *complejo de iniciación 70S*. La hidrólisis de GTP a GDP y Pi favorece el proceso al suministrar energía [13].

Para que el mRNA se traduzca correctamente, el ribosoma debe estar colocado en la ubicación correcta de inicio. La señal de inicio es precedida por un segmento líder de mRNA rico en purina, llamado *secuencia Shine-Dalgarno (5'-GGAGGU-3')* que usualmente se encuentra en una posición aproximadamente 10 nucleótidos río arriba con respecto a la señal de inicio AUG, también conocida como codón de iniciación actúa como sitio de enlace ribosómico. Esta área rica en purinas se une con una secuencia rica en pirimidinas sobre el RNA ribosomal 16S que forma parte de la subunidad 30S y lo alinea para una traducción correcta, que comienza en el codón de inicio AUG [13].

#### 2.4.3 Elongación.

La fase de elongación de la síntesis de proteínas en procariontes utiliza el hecho de que hay tres sitios de unión para el tRNA presentes sobre la subunidad 50S ribosómica 70S. Estos tres sitios de unión del tRNA se llama *sitio P* (peptidil), el *sitio A* (aminoacil) y el *sitio E* (salida). El sitio P se une a un tRNA que transporta una cadena peptídica y el sitio A se une al aminoacil-tRNA entrante. El sitio E transporta un RNA sin aminoácido o descargado. La elongación de la cadena se inicia con la adición del segundo aminoácido especificado por el mRNA al complejo de iniciación 70S (paso 1), el sitio P sobre el ribosoma es el ocupado inicialmente por el fMent-tRNA en el complejo de iniciación 70S, el segundo aminoacil-tRNA se enlaza a un sitio A; un triplete de bases de tRNA (la secuencia anticodón AGC de la imagen) forma puentes de hidrogeno con un triplete de bases de mRNA (GUC, el codón para la adenina); además GTP y dos factores de elongación proteica, EF-Tu y EF-Ts (factores de elongación inestable y estable a la temperatura, respectivamente) son requeridos (paso 2). El EF-Tu guía al aminoacil-tRNA hacia una parte del sitio A y alinea el anticodón con el codón del mRNA, solo cuando se

determina que el apareamiento de las bases es correcto, se inserta en su totalidad el aminoacil-tRNA al sitio A. GTP se hidroliza y EF-Tu se disocia, EF-Ts participa en la regeneración de EF-Tu-GTP. A continuación se forma un *enlace peptídico* en una reacción catalizada por la *peptidil transferasa*, la cual forma parte de la subunidad 50S (paso 3). El grupo  $\alpha$ -amino del aminoacil en este sitio A lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del aminoácido unido al tRNA en el sitio P. Ahora hay un dipeptidil-tRNA en el sitio A y un tRNA sin aminoácido unido a él (un *tRNA descargado*) en el sitio P. A continuación se produce un paso de *translocación* antes de que se pueda agregar otro aminoácido a la cadena en crecimiento, en el proceso, tRNA sin carga se desplaza del sitio P al sitio E, del cual es liberado subsecuentemente; el peptidil-tRNA se desplaza del sitio A hacia el sitio P vacío. Además el mRNA se desplaza con respecto al ribosoma. Se requiere en este punto otro factor de elongación, el EF-G que también es una proteína y de nuevo GTP se hidroliza para dar GDP y Pi. Estos pasos se repiten para cada aminoácido especificado por el mensaje genético del mRNA hasta llegar a la señal de terminación [13].

#### 2.4.4 Terminación.

Se requiere una señal de terminación para que finalice la síntesis proteica. Los codones UAA, UAG y UGA son señales de paro o terminación. Estos codones no son reconocidos por ningún tRNA, pero sí son reconocidos por las proteínas llamadas factores de liberación. Es necesario uno de los dos factores de liberación de proteínas (RF-1 o RF-2), al igual que GTP, el cual se une a un tercer factor de liberación, el RF-3. El RF-1 se une con UAA y UAG y el RF-2 con UAA y UAG. El RF-3 no se une con ningún codón, pero sí facilita la actividad de los otros factores de liberación. El factor de liberación no solo bloquea el enlace de un nuevo peptidil transferasa, sino que también afecta la actividad de ésta transferasa de modo tal, que el enlace entre el extremo carboxilo del péptido y el tRNA se hidroliza, GTP también se hidroliza durante el proceso. Todo el complejo se disocia y libera a los factores de liberación, al tRNA y mRNA y las subunidades ribosómicas 30S y 50S [13].

### 2.5 Importancia del código genético, en la Traducción.

Se puede decir que el mensaje genético está contenido en un *código universal, degenerado, sin comas, sin traslape y en triplete*. Cada uno de estos términos contiene un mensaje definido que describe la manera en se traduce este. El código genético en *triplete* implica que se requiere una secuencia de tres bases, llamado *codón*, para

especificar un aminoácido. El código genético debe traducir el lenguaje del DNA, que contiene cuatro tipos de bases, al lenguaje de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en las proteínas. El término sin *traslape* indica que ninguna base es compartida por codones consecutivos; el ribosoma se desplaza a lo largo del mRNA de tres en tres bases. Hay 64 posibles tripletes de las cuatro bases que ocurren en el RNA (4 X 4 X 4), y se emplean para codificar los 20 aminoácidos o para una de las tres señales de paro (*stop*). Cada aminoácido puede tener más de un codón, de modo que el código genético es algo redundante o degenerado. Los 64 codones tienen asignado su significado, 61 de ellos codifican para aminoácidos y los tres restantes sirven como señales de terminación. La degeneración del código actúa como amortiguador contra mutaciones dañinas. Por ejemplo en ocho aminoácidos, la tercera base es completamente irrelevante. Además, cualquier mutación en la tercera base de estos codones no cambiará el tipo de aminoácido en la mayoría de los casos. Una mutación en el DNA, que no conduce a un cambio en el aminoácido traducido se llama *mutación silenciosa*. Además, la segunda base del codón también parece ser muy importante para determinar el tipo de aminoácido tabla 2 [10-13].

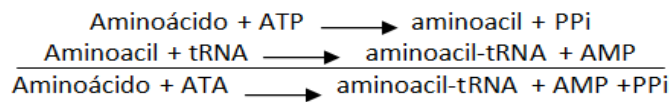
Primera posición 5'	Segunda posición				Tercera posición 3'
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA paro	UGA paro	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG paro	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

Tabla 2. El código genético [10-13].

Un codón forma puentes de H con el *anticodón* complementario de un tRNA cuando se incorpora un aminoácido durante la síntesis de la cadena polipeptídica. La base de la

tercera posición del codón o triplete produce una unión doble que se *bamboleo* o *inestabilidad* y se aplica a la tercera base de un anticodón, pero no a la segunda o la primera bases. El modelo de bamboleo permite comprender algunos aspectos de la degeneración del código. En muchos casos, aunque no en todos ellos, los codones degenerados para un cierto aminoácido difieren en la tercera base, aquella que se aparea con la base de bamboleo del anticodón. Por lo tanto esto explica por qué se necesitan menos tRNA diferentes que los que podrían esperarse para cada aminoácido [13].

La activación de los aminoácidos y la formación de aminoacil-tRNA tiene lugar en dos pasos distintos y ambos son catalizados por la aminoacil-tRNA sintetasa. En primer lugar, el aminoácido forma un enlace covalente con un nucleósido de adenina y produce un aminoacil-tRNA. La energía liberada por hidrólisis del ATP suministra la energía necesaria para la formación del enlace. La parte de aminoácidos entonces es transferida al tRNA y forma un aminoacil-tRNA [13].



Pueden existir varios tRNA para cada aminoácido, pero un tRNA dado no se une con más de un aminoácido. La enzima sintetasa requiere de  $\text{Mg}^{+2}$  y es altamente específica tanto para el aminoácido como para el tRNA. Hay una sintetasa distinta para cada aminoácido, la cual funciona para todas las distintas moléculas de tRNA de dicho aminoácido. La especificidad de la enzima contribuye a la exactitud del proceso de traducción. La síntesis asegura que los aminoácidos correctos se apareen con el tRNA correcto y esta es su función principal [13].

## 2.6 Traducción en Eucariontes.

Las principales características de la traducción son las mismas en los procariontes y eucariontes, aunque difieren en los detalles. Los RNA mensajeros de los eucariontes se caracterizan por dos modificaciones postranscripcionales mayores, la primera es la cap 5' y la segunda, la cola de poli-A, ambas modificaciones son esenciales en la traducción en eucariontes [13].

### 2.6.1 Iniciación.

Esta es la parte que mas difiere en eucariontes y procariontes, los factores adicionales se designan como eIF, que significa *factor de iniciación* en eucariontes, muchos de ellos son proteínas de subunidades múltiples. El paso 1 de la iniciación de una cadena incluye el ensamble de un complejo 40S de preiniciación, el aminoácido es esencial es la metionina, la cual se une a un tRNA especial que sirve únicamente como tRNA iniciador. No hay fmet en los eucariontes. El metRNA<sub>i</sub> se une a la subunidad ribosomal 40S como un complejo con GTP y eIF2. El ribosoma 40S también se une a Eif1A y el eIF3. En el paso 2 se recluta el mRNA. El *cap* 5' orienta al ribosoma al UAG correcto a través de lo que se llama *mecanismo de barrido* impulsado por la hidrólisis de ATP. El eIF4E también es una proteína de unión al tapón que forma un complejo con varios otros eIF. Una proteína de unión a poli A (Pab1p) une la cola *poli A* con el eIF4E. El complejo Eif40 se posiciona inicialmente río arriba del codón de inicio y se desplaza río abajo hasta que encuentra el primer AUG en el contexto correcto. El contexto es determinado por algunas bases que rodean el codón de inicio conocido como la *secuencia de Kozak*, esta contiene la secuencia consenso -3ACCAUGG+4. El ribosoma podría saltarse el primer AUG si detecta que el siguiente tiene la secuencia de Kozak. Otro factor es la presencia de la estructura secundaria del mRNA. Si se forman horquillas cadena abajo con respecto a un AUG, quizá se elija a un AUG anterior. El mRNA y los siete eIF constituyen el complejo de preiniciación 40S. En el paso 3, el ribosoma 60S es reclutado formando el complejo de iniciación 80S. GTP es hidrolizado y los factores de iniciación se libera (Fig. 39) [13].

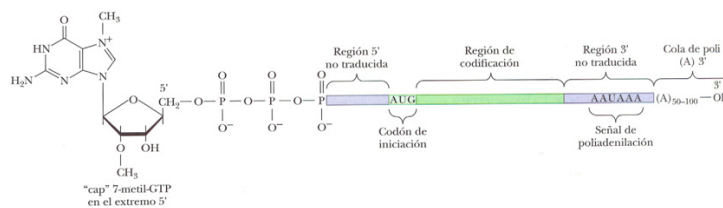


Figura 39. Estructura característica de los mRNA eucarióticos [13].

### 2.6.2 Elongación y terminación.

En la elongación de la cadena de polipéptido en eucariontes se observa el mismo mecanismo de la peptidil transferasa y la translocación del ribosoma, en lo eucariontes el ribosoma no tiene sitio E, solo hay A y P. Existen dos factores de elongación en eucariontes, el eEF1 y el eEf2; el eEF1 consta de dos subunidades, el eEF1A y el

eEF1B. La proteína eEf2 es la contraparte de EF-G que promueve la translocación en los procariontes [13].

Al igual que la terminación en procariontes, el ribosoma llega hasta el codón de terminación, el cual puede ser UAG, UAA o UGA y éstos no serán reconocidos por ninguna molécula de tRNA. En eucariontes solo un factor de liberación se une con los tres codones de paro y cataliza la hidrólisis del enlace entre el aminoácido del extremo C-terminal y el tRNA. Hay un tRNA especial llamado *tRNA supresor*, el cual permite que la traducción continúe más allá de un codón de terminación. El *tRNA supresor* suele encontrarse en las células en las que la mutación ha introducido un codón de terminación [13].

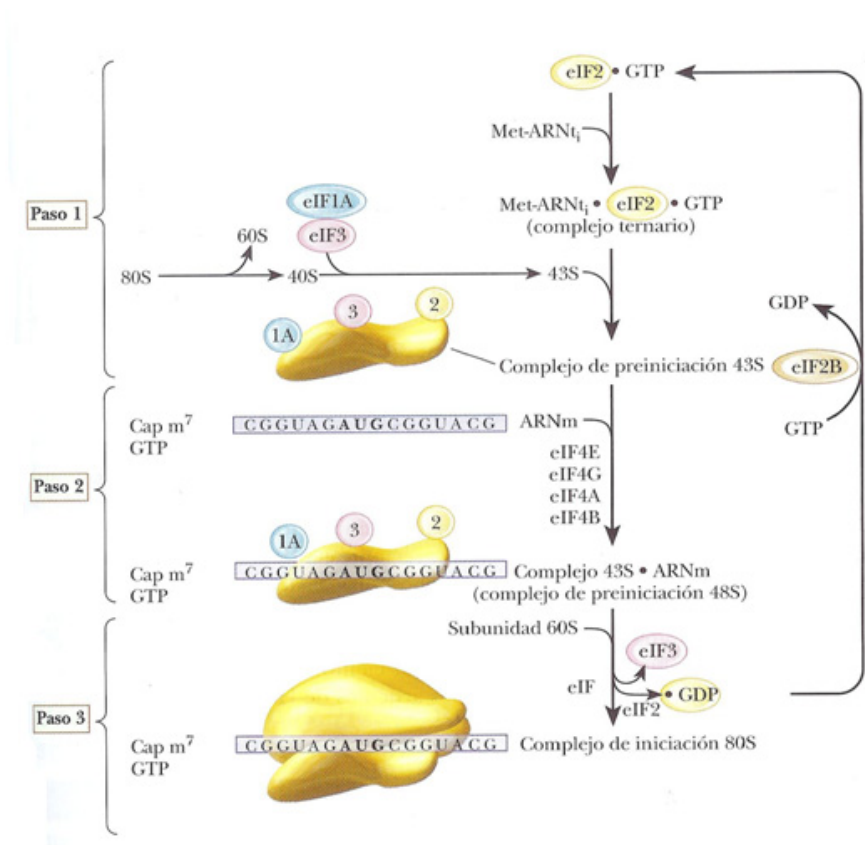


Figura 40. Las tres etapas de la iniciación de la traducción en las células [13].

### 3. Empalme alternativo de genes.

El empalme alternativo precursor de RNA mensajeros (pre-RNA) fue primeramente descrito al menos hace 30 años, cuando se descubrió que las unidades de la membrana y secreción de antibióticos son codificados por el mismo gene. Poco después, mas

ejemplos de este fenómeno fueron descritos para la calcitonina genes relacionados con el polipéptido de calcitonina codifican dos hormonas peptídicas que son expresadas de manera específica en un tejido. En ambos ejemplos, la inclusión y exclusión diferencial de secuencias exónicas a través del empalme alternativo es responsable del doble número de proteínas codificada por los genes. Aunque estaba considerada en un tiempo inusual, el número estimado de genes que codifican más de una proteína (o la isoforma de una proteína) como resultado del empalme alternativo de un pre-mRNA ha aumentado de manera constante en el tiempo. Estudios recientes estudios mediante la secuenciación de alto rendimiento indican que el 95-100% de los pre-mRNAs del humano contienen secuencias correspondientes de más de un exón que se procesan para producir múltiples RNAs. Y no solo la mayoría de los genes codifican pre-mRNAs que son empalmados alternativamente, sino también el número de isoformas de mRNA codificadas por un solo gene puede variar a varios miles [15].

El empalme alternativo implica el uso diferencial de sitios de empalme para crear una diversidad de proteínas. Casi todos los casos de empalme alternativo resultan del uso de uno o más de los cuatro módulos básicos: elección del sitio de empalme 5', elección del sitio de empalme 3', inclusión o salto del casete exónico y retención del intrón (Fig. 41). Los genes que codifican para un pequeño número de isoformas de mRNA típicamente contienen uno o más de estos módulos. Por ejemplo, dos mRNAs podrían ser sintetizados de un mismo gene que contiene un único casete exónico: un mRNA que contenga la secuencia exónica y uno que carezca de ella. Por el contrario, una diversidad tremenda de mRNA pueden ser generados de genes contruidos de muchos de estos módulos. Por ejemplo el gene humano KCNMA1 (también conocido como SLO) contiene numerosos módulos, incluido el empalme alternativo 5', sitio de empalme alternativo 3' y casetes exónicos y más de 500 isoformas de mRNAs de KCNMA1 pueden ser generadas (Fig. 42a). Similarmente las 38,016 isoformas de mRNA son sintetizadas de un gene que contiene 95 casetes exónicos, que se empalman del pre-mRNA de una manera mutuamente excluyente (cada isoforma de mRNA contiene secuencias correspondientes de solo un casete exónico (Fig. 42b). Una más elaborada manifestación del empalme alternativo es ejemplificada por el gene *D. melanogaster modifier of mdg4 (mod(mdg4))*, que codifica 28 mRNAs. Estos son generados por *trans*-empalme de la secuencia correspondiente de un grupo común de exones, presentes en un pre-mRNA y con secuencia correspondiente a un conjunto de 28 exones variables presentes por separado en pre-mRNAs (Fig. 42c). No se sabe si eventos similares de *trans*-empalme ocurren en otros eucariontes multicelulares [15].

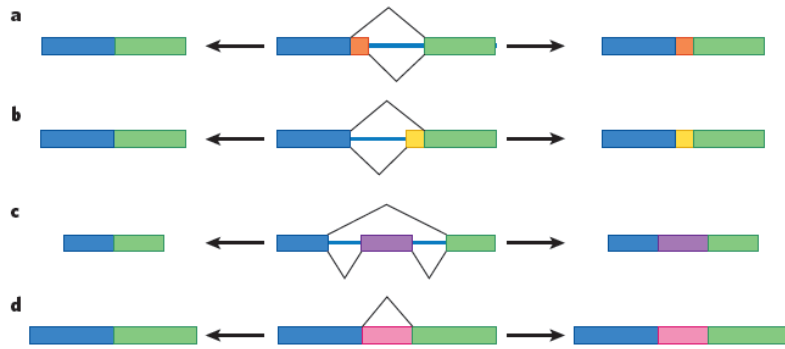


Figura 41. Tipos de empalme alternativo. Hay cuatro tipos básicos: selección de empalme alternativo 5' (a), selección de empalme alternativo 3' (b), inclusión o salto del casete exónico (c) y retención del intrón (d). Los rectángulos en el centro representan los pre-mRNAs. Para cada pre-mRNA, hay líneas de negro que abarcan la región que se empalman, las flechas corresponden al mRNA maduro a la derecha e izquierda. Es decir que el mRNA que es sintetizado con el exón central es saltado a la izquierda y en la derecha se muestra el mRNA que es sintetizado con esta secuencia. En "d" la porción en rosa es considerada un intrón cuando es incluido (a la derecha) y cuando el exón es saltado (izquierda) [15].

No es claro cuánto del empalme alternativo es constitutivo, es decir, la medida en que múltiples isoformas se producen en la misma proporción en la mayoría de los tipos celulares. Esto se debe a que los casos más estudiados de empalme son regulados por eventos de empalme alternativo. La regulación en este contexto significa que los patrones distintos de empalme se observan en diferentes ambientes celulares. Esta regulación puede ser específica del tejido (por ejemplo una secuencia correspondiente a un exón particular es incluida en músculo pero no en cerebro) o dictados por el desarrollo o diferenciación específica de señalización. Adicionalmente, algunos patrones de empalme alternativo se ha observado que pueden ser modulados en respuesta a estimulación externa, tales como la despolarización neuronal, o la activación de cascadas de transducción de señales [15].

Los mecanismos bioquímicos que controlan el uso del sitio de empalme y por lo tanto el empalme alternativo, son complejos y siguen siendo en gran parte no bien entendidos. Es claro que no puede ser específico y distintos factores dedicados a cada uno de las más de 100 000 decisiones de empalme alternativo que ocurren en las células humanas; varios genomas trabajan para regular proteínas que podrían ser requeridas si este fuera el caso [15].



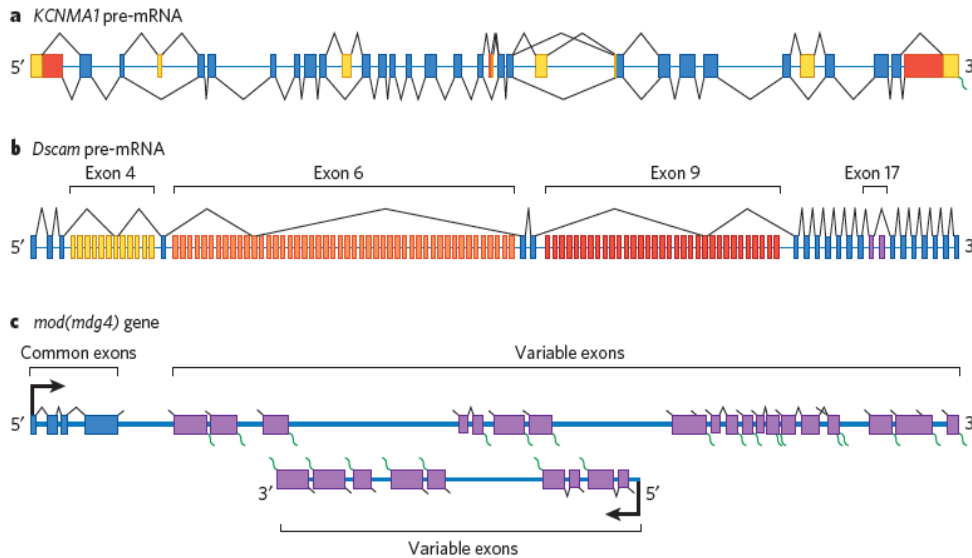


Figura 42. Generación de diversos mRNA. A) pre mRNA humano *KCNMA1* se representa, con sus constitutivos exones en azul y sus exones alternativos en amarillo y rojo. Los posibles patrones de empalme para cada exón son indicados sobre y debajo al pre-mRNA (líneas negras). El pre-mRNA de *KCNMA1* contiene múltiples sitios de empalme 5', sitios de empalme alternativo 3' y secuencias correspondientes a los exones del casete. En conjunto estos permiten más de 500 isoformas de mRNA que se sintetizan a partir de un solo pre-mRNA. B) pre-mRNA *Dscam* de *Drosophila melanogaster* se muestra, con los exones constitutivos en azul y los exones alternativos 4, 6, 9 y 17 se muestran en amarillo, naranja, rojo y púrpura, respectivamente. El patrón de empalme de una isoforma de mRNA se muestra como ejemplo. El gene *Dscam* contiene 95 exones alternativos organizados en cuatro grupos de exones mutuamente exclusivos (es decir, solo un exón de cada grupo se transcribe) estos cuatro grupos se encuentran el exón 4, exón 6, exón 9 y exón 17, que contienen 12, 48, 33 y 2 variables exones respectivamente. En combinación con los 20 constitutivos exones de *Dscam*, esta estructura permite 38,016 mRNAs que son sintetizados a partir de un solo mRNA. C) La organización en el gene *D. melanogaster mod (mdg4)* se representa, con sus comunes exones en azul y sus exones variables en púrpura. Los exones comunes y algunos de los exones variables están presentes en una de las cadenas de DNA y se transcriben de izquierda a derecha como se muestra, mientras que otro grupo de exones variables está presente en la vertiente opuesta y se transcribe de derecha a izquierda como se muestra. El número exacto y la precisa posición de los principios y los finales, de los exones comunes pre-mRNA y el exón variable pre-mRNA se desconoce. Los posibles patrones de empalme para cada exón en el correspondiente pre-mRNA son indicados por líneas negras, con las posibles posiciones de la cola de poly(A)\* indicado por líneas onduladas de color verde. Un total de 28 *mod (mdg4)* mRNA son sintetizados y esto ocurre a través de trans-empalme de los exones comunes a un conjunto de exones variables [15].

Por lo tanto, no es sorprendente que un pequeño número de proteínas en repetidas ocasiones se encuentre siendo responsables, al menos en parte, para la regulación de un gran número de eventos de empalme alternativo (Tabla 3). En realidad, algunas proteínas específicas de unión a RNA, han sido identificadas. En efecto la mayoría de los reguladores conocidos de empalme alternativo, como las proteínas SR y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs), son expresados dondequiera,

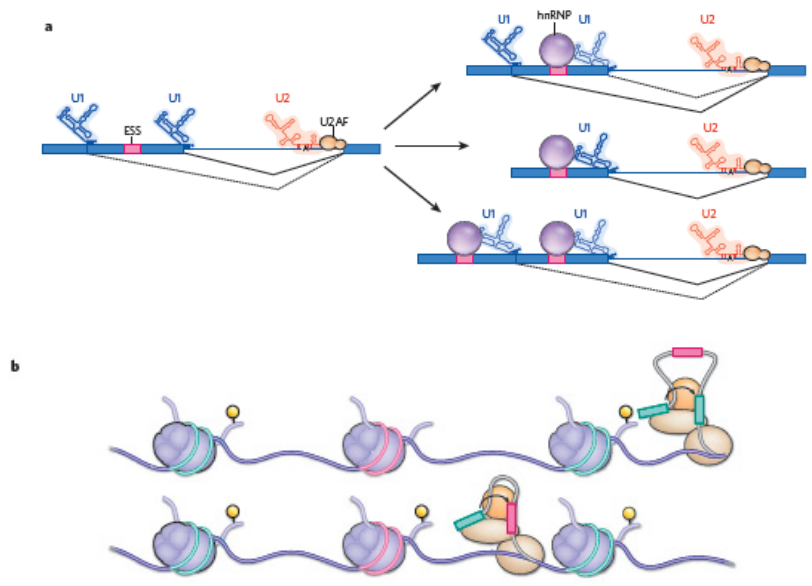
aunque su relativa abundancia puede fluctuar en diferentes tejidos. Notables excepciones son NOVA, nPTB, también conocidas como PTBP2, FOX1 Y FOX2 también conocidas como SRRM4; la codificación de los genes son expresados en diferentes tejidos de manera específica. ¿Cómo puede este puñado de reguladores de empalme ser responsable del control de la superabundancia de eventos de empalme alternativo que ocurren?

<b>Clase</b>	<b>Función</b>	<b>Genes</b>
SR y SR-proteínas relacionadas	Típicamente activan el empalme, por reclutamiento de los componentes del mecanismo de empalme	Nsr100 (SRRM4), SC35, SF2 (ASF), SRM160 (SRRM1), SRp30c, SRp38, SRP40, SRp55, SRP75, TRA2 $\alpha$ , TRA2 $\beta$
hnRNPs	Típicamente reprimen el empalme, por una variedad de mecanismos mal entendidos.	HnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP C, hnRNP F, hnRNP G (RBMX), hnRNP H, hnRNP L, nPTB (PTBP2), PTB (PTB1).
Otras proteínas de unión al RNA	Activan o reprimen el empalme las U1 snRNP es esencial para constituir el empalme pero también puede reprimir el empalme	CELF4 (BRUNOL4), CUGBP, ESRP1, ESRP2, FOX1 (A2BP1), FOX2 (A2BP2), HuD, MBNL1, NOVA1, NOVA2, PSF (SPFQ), quaking, SAM68 (KHDRBS1), SLM2 (KHDRBS3), SPF45 (RBM17), TIA1, TIAR (TIAL1), U1 snRNP

Tabla 3. Tipos y ejemplos de proteínas reguladoras de empalme (los sinónimos están en paréntesis) [15].

Los reguladores de empalme más estudiados hasta ahora son miembros de las proteínas SR y familias hnRNP. Las proteínas SR llamadas así por que contienen dominios compuestos por extensas repeticiones de serina y arginina, son proteínas de unión a RNA que se piensa activan el empalme al unirse a secuencias correspondientes a los exones y reclutamiento de componentes de la maquinaria de empalme central (el espliceosoma). Por el contrario, las hnRNPs, que son proteínas de unión al RNA, se piensa generalmente que reprimen el empalme mediante la unión a secuencias correspondientes a los exones o intrones interfiriendo con la habilidad de la maquinaria a participar en los sitios de empalme, sin embargo, el mecanismo por el cual las hnRNPs regulan negativamente el empalme, está lejos de entenderse [18].

La existencia de clases opuestas de factores de regulación y la abundante evidencia de que estos factores están involucrados en un gran número de decisiones de empalme, han dado lugar a la elaboración de un modelo sencillo del *yin-yang* del empalme alternativo. En este modelo, del sitio usado de empalme es determinado por el número de sitios que activan positivamente los reforzadores de empalme que están enlazados por proteínas SR, y sitios negativos de acción, silenciadores de empalme enlazados por hnRNPs. Cuando sitios positivos superan en número a los sitios negativos, el empalme ocurre, cuando los sitios negativos predominan, el empalme es inhibido. Aunque este modelo es recomendable por su simplicidad y tiene un valor predictivo, es vastamente incomprendido en su complejidad bioquímica el empalme [15].



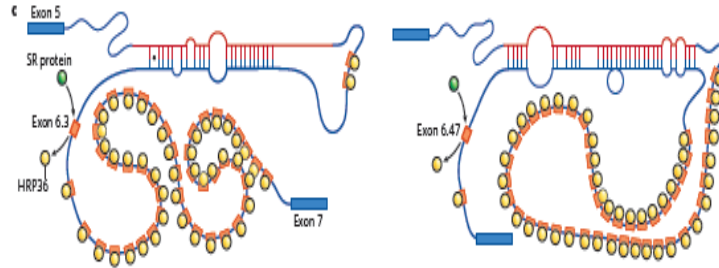


Figura 43. Mecanismos reguladores del empalme alternativo. A) efecto cinético de los silenciadores del empalme sobre un empalme alternativo. Izquierda, cuando dos sitios de empalme 5' compiten son representados en un hipotético pre-mRNA y el silenciador apropiado está ausente (es decir, la hnRNP, que silencia la transcripción mediante la unión de un silenciador en el empalme exonico (ESS)), la U1 pequeña nuclear RNP (U1 snRNP) se une al sitio de unión 5' (mientras que U2 snRNP y U2AF se unen al sitio de unión 3') y al proximal sitio 5' es preferentemente usado (líneas negras solidas; la línea punteada indica el empalme de la parte distal del sitio de empalme 5'). Arriba a la derecha, en cambio, cuando la hnRNP está presente, la tasa a la cual el próximo sitio de empalme 5' puede ser usado disminuye, promocionando el sitio distal de empalme 5'. Al centro a la derecha en comparación con el caso de la izquierda, a falta de una competencia de empalme 5' río arriba, la presencia de hnRNP no disminuye significativamente la tasa de corte y empalme. Abajo a la derecha en comparación con el caso de la izquierda, en caso de que secuencias silenciadoras estén presentes cerca de los sitios de empalme 5', la hnRNP no tiene ningún impacto perceptible en relación a la que utilizan cualquiera de los sitios de empalme. B) Interacciones entre la tasa de elongación de la transcripción, la estructura de la cromatina. Un hipotético gene se representa, tres exones son representados empaquetados en nucleosomas. Los exones constitutivos transcritos (verde) se empaquetan en el nucleosoma que constitutivamente contiene histonas H3 que son trimetiladas (amarillo) en el residuo de lisina 36 (H3K36me3). En las células que no se incluye el exón alternativo (rosa) en el mRNA, los nucleosomas empaquetados en este exónico DNA no contienen la H3K36me3 (arriba). Se propone que cuando la RNA polimerasa (óvalos de color marrón; espliceosoma círculos naranjas) transcriben un gene con esta configuración de la cromatina (con el pre-mRNA se muestra en gris) que atraviesa el exón alternativo rápidamente y esta omisión no está atada a la RNA polimerasa y por consiguiente la secuencia correspondiente a este exón no está incluida en el mRNA maduro (el empalme de las secuencias exónicas se indica por flechas onduladas). Por el contrario, cuando el nucleosoma que es empaquetado contiene el exón alternativo H3K36me3, esto ralentiza el progreso de la polimerasa de RNA, lo que permite capturar el exón, resultando en la inclusión de la secuencia correspondiente en el maduro mRNA (abajo). C) Modelo cinéticos del empalme mutuamente excluyente del empalme de los pre-mRNA *Dscam*. Empalme mutuamente excluyente de la secuencia correspondiente a el exón 6 del gene *Dscam* implica la formación de estructuras secundarias en el mRNA. Estas estructuras se forman entre los sitios de asalto en las secuencias intrónicas río abajo de la secuencia correspondiente a el exón 5 y una secuencia de lección localizada río arriba de cada secuencia correspondiente a una variante del exón 6. Además, las hnRNP HRP36 se unen y reprimen, las 48 secuencias exónicas en el clúster. Qué secuencia exónica se empalma para ser una función de competición cinética entre los 48 estructuras posibles de acoplamiento del sitio de selección y entre las proteínas SR (no se muestra) HRP36. A la izquierda, la secuencias de selección río arriba de la secuencia correspondiente al exón 6.3 en el pre-mRNA interactúa con los sitios de acoplamiento. Las HRP36 desplazadas de esta secuencia exonica, lo que permite que una proteína SR se una al sitio de empalme. Esto da lugar a la inclusión de la secuencia correspondiente al exón 6.3 en el mRNA. A la derecha, la formación de una estructura secundaria con una secuencia más distal, lo que significa que el exón 6.47 se incluye en el mRNA en su lugar [15].

#### 4. Revisión de la odontogénesis.

La formación del diente se origina durante la embriogénesis, produciéndose a partir del epitelio oral que cubre los procesos alveolares maxilar y mandibular, se inicia como una gemación de la capa celular basal situada encima de cada localización específica donde aparecen los dientes. La yema epitelial se alarga para dar lugar a una estructura tubular sólida que penetra en el tejido conjuntivo, proceso conocido como *invaginación* (Fig. 44).



Figura 44. Invaginación del epitelio oral [16].

La estructura epitelial alargada se denomina *lámina dental* y es la fuente de toda la futura actividad y diferenciación de la dentición durante su desarrollo. Cuando alcanza la profundidad adecuada, la capa de células casales del extremo de la lámina dental aumenta de espesor formando una concavidad, esta estructura representa el periodo de caperuza del desarrollo del diente (Fig. 45).



Figura 45. Periodo de caperuza [16].

Cuando la odontogénesis sigue su curso, la estructura en forma de caperuza aumenta de tamaño y la capa interior del epitelio (epitelio interno del esmalte) se separa de la capa superior (epitelio externo del esmalte). La zona interpuesta está formada por células epiteliales estrelladas organizadas de forma laxa (retículo estrellado). Hay una elongación simultánea de la periferia de la estructura epitelial, que conforma la futura corona del diente específico para esa localización [16].

Esta etapa se designa como *periodo de campana temprano* (Fig. 46). Este epitelio especializado induce al tejido conjuntivo adyacente a diferenciarse en una zona circunscrita de tejido conjuntivo embrionario y mixomatoso, que puede más tarde diferenciarse aun más para formar dentina o tejido pulpar.

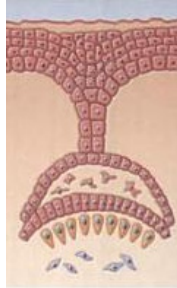


Figura 46. Periodo de campana temprano [16].

El tejido conjuntivo modificado alrededor del cual se forma la raíz del diente futuro se denomina *papila dental*. La inducción del tejido conjuntivo que rodea el conjunto de la estructura del diente embrionario también tiene lugar en esta etapa de la embriogénesis. Esta zona externa del tejido conjuntivo que encapsula el germen del diente en desarrollo es densa y fibrosa y se denomina *folículo dental*. El folículo dental, permanece alrededor del diente hasta que hace erupción, la porción coronaria del folículo se convierte en parte del tejido conjuntivo del borde libre de la encía y la parte radicular se convierte en el ligamento periodontal que separa el hueso del cemento. Durante el periodo de campana tardío (Fig. 47) las células del epitelio interno del esmalte se hacen alargadas y se organizan en forma de empalizada. Al mismo tiempo, tiene lugar la migración del núcleo alejándose de la membrana basal, un proceso que se denomina *polarización inversa*. Este suceso indica el paso de las células en ameloblastos a presecretorios [16].



Figura 47. Periodo de campana tardío [16].

La polarización inversa induce a las células indiferenciadas de la papila dental adyacente a diferenciarse a odontoblastos presecretorios, que se alinean en forma de empalizada en contra de la membrana basal opuesta a los ameloblastos presecretorios.

A medida que los ameloblastos maduran, los odontoblastos son estimulados para segregar la matriz de dentina que, su vez, inicia el depósito de la matriz del esmalte en el lado opuesto de la membrana basal. Durante esta etapa de la ontogénesis, la lámina dental empieza a fragmentarse y forma pequeños islotes en el tejido conjuntivo, estos islotes de epitelio residual son inactivos y se denominan *restos de la lámina dental* o *restos de Serres* [16].

Una vez que se ha completado la forma específica de la corona del diente (Fig. 48a), el epitelio que forma el borde externo del órgano del esmalte con forma de campana se alarga, modelando la forma y longitud de las raíces (Fig. 48b). Este epitelio forma una membrana transitoria delgada que se denomina *vaina radicular de Hertwing*. En esta localización, se forman odontoblastos que producen la dentina necesaria para constituir la raíz del diente. Cuando la raíz está casi terminada, la continuidad de la vaina radicular empieza a degradarse, se hace porosa en primer lugar y finalmente resulta totalmente fragmentada. Esto hace posible que las células del tejido conjuntivo del folículo dental adyacente a la raíz entren en contacto con la dentina recién formada. La dentina estimula a estas células a diferenciarse a *cementoblastos*. Los cementoblastos son responsables de la generación de la capa calcificada situada sobre la dentina, que se denomina cemento [16].

El cemento sirve para anclar las fibras de colágeno del folículo dental y el ligamento periodontal a la raíz del diente para sellar el lado externo del túbulo de dentina. Los restos epiteliales de la vaina radicular de Hertwing permanecen en el ligamento periodontal una vez terminada la formación del diente y se denominan *restos de Malassez* (Fig. 48c) [16].

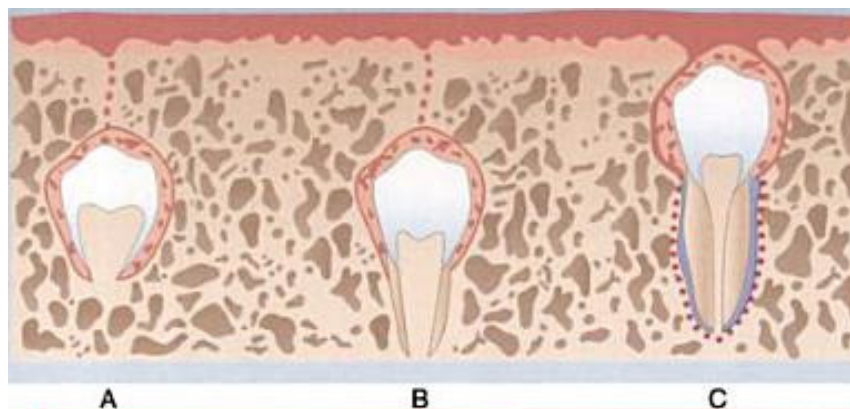


Figura 48. A. Formación de la corona y restos de la lámina dental. B. Formación de la raíz. C. Formación completa del diente y restos de Malassez [16].

## 5. Que son las amelogeninas.

La principal proteína producida por las células ameloblásticas, (una capa de células del órgano del esmalte) son las amelogeninas [17]. El diente y sus tejidos, dentina y esmalte, tienen una larga historia. Sus orígenes se remontan a la estructura dérmica extra oral de los primeros vertebrados sin mandíbula hace aproximadamente 500 millones de años [18]. El esmalte dental provee uno de los más extremos ejemplos de biomineralización. Aproximadamente el 85% de su volumen está ocupado por cristales de hidroxiapatita que son biológicamente únicos en términos de su gran tamaño, su alto grado de cristalinidad y su alta organización dentro del tejido [19]. El diente fetal que aún no erupcionado contiene dos tejidos mineralizados que se forman a través de su desarrollo: el esmalte y la dentina. El esmalte es un tejido que se origina de las capas superiores del epitelio [20]. Es generalmente reconocido que estas características son generadas durante el desarrollo del esmalte por interacciones de la fase mineral precipitada con una proteína única de la matriz extracelular (amelogenina) [19]. En los primeros estadios de desarrollo del diente, las células epiteliales del esmalte interno diferencian en ameloblastos, que sintetizan y secretan proteínas específicas, la matriz del esmalte. La concentración de proteínas está por encima del 25-30% que se encuentran en el esmalte recién secretado. Las proteínas secretadas entonces decrecen durante la maduración del esmalte y son reemplazadas por cristales de hidroxiapatita [21]. Las amelogeninas comprenden el 90% de la matriz extracelular de proteínas del esmalte en desarrollo y desempeñan un importante papel en la biomineralización y organización estructural del esmalte [22-23]. Se ha encontrado recientemente encontrado que las amelogeninas se autoensamblan en agregados esféricos monodispersos [23]. La matriz extracelular del esmalte consiste de un 10 a 20% de proteínas en peso, casi todas son removidas cuando los tejidos comienzan a mineralizar [20-23]. Estas proteínas del esmalte fetal son ricas en prolina (25 a 30% de los residuos de aminoácidos), ácido glutámico (15 a 30%), leucina (8 a 12%) e histidina (6 a 9%) [20]. Esto confieren una considerable hidrofobicidad a la molécula [19]. La amelogenina por lo tanto puede jugar un papel importante en la organización estructural dentro del esmalte y regula la nucleación y el crecimiento de los patrones de los cristales de hidroxiapatita del esmalte. La bioquímica de la amelogenina es bastante compleja a causa de la secreción de moléculas que interactúan para formar una matriz que luego es degradada y eliminada por una variedad de proteasas durante el proceso de sustitución por la fase mineral cuando el esmalte madura. [24]. Estas proteasas específicas, la metaloproteasa enamelinina (MMP20) y la proteasa serina EMSP1 (KLK4) son las encargadas de degradar a las amelogeninas y otras proteínas de la matriz del esmalte y subsecuentemente son reemplazadas por iones minerales de calcio y



fosforo, el esmalte comienza finalmente a endurecer y completa su mineralización (96%) [17].

Las proteínas del esmalte maduro y completamente mineralizado son ricas en ácido aspártico, serina y ácido glutámico (aproximadamente del 10 al 12% de cada uno de los residuos de aminoácidos totales) y grandes cantidades de glicina (15 al 20%) [20]. La otra proteína la enamulina, determinada por Termine y col (1980), es un componente proteínico con menor presencia, con una forma asociada con la fase mineral en el desarrollo del esmalte [21].

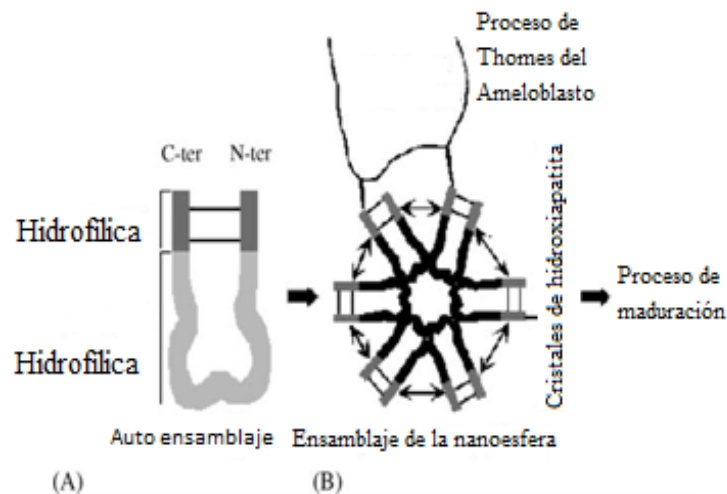


Figura 49 (A). Cada molécula de amelogenina autoensambla por medio de los enlaces N y C terminales, regiones hidrofílicas. (B). Varias moléculas de amelogenina se agregan y forman una nanoesfera, que interactúan tanto con la membrana celular de los procesos de los ameloblastos y los cristales de hidroxiapatita [25].

Las proteínas se autoensamblan dentro de estructuras ordenadas en la biomineralización de sistemas como es el hueso, diente y las conchas de moluscos, lo cual es un paso crucial para el control de la deposición mineral [25].

Las amelogeninas (90%) [22- 25] comparten la matriz orgánica con otras proteínas que incluyen enamelinas, ameloblastinas y proteinasas del esmalte [25]. La mayor molécula principalmente secretada de amelogenina tiene peso molecular absoluto alrededor de 16-20 kDa dependiendo de la especie. La molécula de amelogenina principalmente secretada antes de cualquier procesamiento extracelular puede ser referida como 'amelogenina de 25 kDa. Este valor excluye los 16 aminoácidos, de la región N-terminal, secuencia de la señal de exportación (codificada por el exón 2), que es omitida antes de la secreción (Shimakawa y col., 1987) [19]. La degradación masiva de los componentes de la matriz extracelular, sobre todo amelogeninas es análoga con el rápido crecimiento de los cristales del esmalte, creando una gran organización estructural que es casi

completamente inorgánica (>90%) [25]. La elongación y orientación como de cintas de los cristales de hidroxiapatita en el esmalte maduro es bastante diferente en tamaño y morfología de los de hueso y dentina, que tienen una morfología laminar [25]. La amelogenina intacta de 25kDa se limita a las capas externas de los estadios de secreción del esmalte, donde la amelogenina tiene mayor presencia (Fukae y col., 1980; Aoba y col., 1992). Esta molécula es rápidamente procesada tras la secreción para producir una gama de productos de degradación [19, 25].

La conformación de la amelogenina de bovino de 25kDa ha sido bien estudiada usando métodos físicos y estrategias predictivas. Los primeros estudios de difracción de rayos X sugieren la presencia de estructuras  $\beta$ -cruzadas y  $\beta$ -plegadas con el eje de la fibra corriendo perpendicular a la cadena peptídica [19, 25]. Análisis de Fasman y Chou muestran que la región N-terminal de amelogenina de bovino (residuos 1-40) contienen varios  $\beta$ -giros con pequeñas cantidades de  $\alpha$ -hélice entre los residuos del 20-26 seguido por un dominio globular (residuos del 41-119) conteniendo una  $\alpha$ -hélice entre los residuos 73-78. Finalmente, en el carboxilo terminal (150-197) la molécula se predijo que contenía una estructura aleatoria que termina con una  $\alpha$ -hélice para los cinco residuos finales (Gibson y col., 1991b) [19]. La dificultad en la elucidación de la estructura y función de las amelogeninas se debe a la tendencia de formar agregados reversibles por cambios en la temperatura [25]. Espectrofotometría infrarroja y dicroísmo circular también realizados en la estructura secundaria de amelogenina de bovino muestra que contiene mezclas de  $\beta$ -plegadas/  $\beta$ -giro con bajos contenidos de  $\alpha$ -hélice (Renugopalakrishnan y col., 1986). Análisis de Fasman y Chou de la región N-terminal de amelogenina de bovino (residuos 1-40) contienen varios  $\beta$ -giros con pequeñas cantidades de  $\alpha$ -hélice entre los residuos del 20-26 seguido por un dominio globular (residuos del 41-119) conteniendo una  $\alpha$ -hélice entre los residuos 73-78 [19].

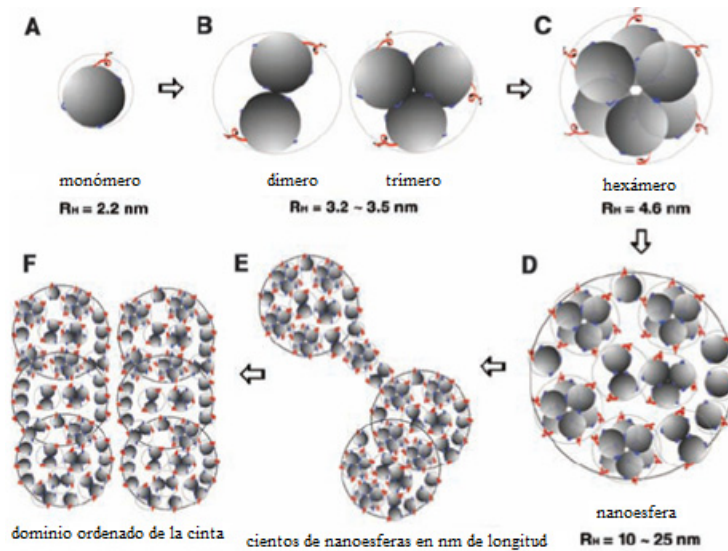


Figura 50. Modelo del autoensamble de las amelogeninas basados en análisis de DSL (Dispersión dinámica de la luz) [25].

## 6. El gen de la amelogenina.

El gen de amelogenina fue primeramente aislado y secuenciado por Shimokawa y col., (1989), una librería genómica de humano en un vector fago fue localizada por la hibridación en una sonda de cDNA de amelogenina bovina [21].

Los genes del humano, Lau y col., 1989, y el bovino Gibson y col., 1992 ya han sido mapeados en ambos cromosomas X y Y, se observó que en murino y en rata el gen es solo exclusivo del cromosoma X. Ambos genes Y y X parecen ser transcritos en ameloblastos de humano y bovino [26]. Un análisis de los ameloblastos de fetos humanos de 26 semanas revelan que los transcritos específicos del cromosoma Y representan el 10% del total de los productos de amelogeninas transcritas [26]. Ni los genes ligados a amelogenina X y Y de bovino y humano exhiben 100% de homología y estos parecen ser susceptibles a un empalme alternativo independiente de sus productos en X y Y. Perfiles específicos electroforéticos de especímenes machos y hembras de la proteína de amelogenina han demostrado que en humanos hay dimorfismo sexual de los mRNA y es traducido [26]. La significativa función de este dimorfismo sexual no es clara; puede no tener importancia o quizá se asocie con el mayor tamaño de los dientes generalmente exhibido en las especies masculinas [21].

Lau y col., 1982 asigna los genes humanos de amelogenina en el brazo corto de el cromosoma X en la región p22.1-p22.3 y el mapeo el locus de Y por fluorescencia *in situ* se encontró claramente que se encuentra en el brazo corto del cromosoma Y en la región p11.2 [21].

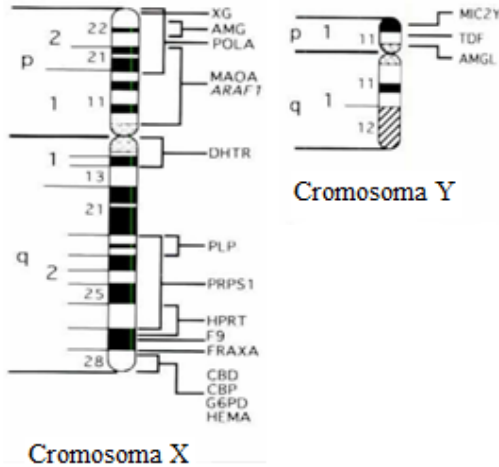


Figura 51. Mapeo de los genes de amelogenina en los cromosomas X y Y. Cromosoma X (**AMG**), cromosoma Y (**AMGL**). En las bibliografías recientes se denominan como AMGX-humano y AMGY-humano [17, 21, 25].

La región codificadora del gen de amelogenina está altamente conservada en muchas especies. La región codificadora de humano, bovino, porcino, murino, rata, hámster y zarigüeya ya han sido todas determinadas. Los genes de humano y bovino tienen forma individual en ambos cromosomas X y Y, pero los genes de porcino, murino y ratón, son localizados solo en el cromosoma X. [25].

Tanto humanos X/Y y bovinos X/Y transcriben mRNA con isoformas similares pero no idéntica secuencia de nucleótidos y empalmes similares exón-intron [25]. Los genes de todas estas especies tienen siete exones en la región de codificación [21, 25]. El exón 1 es fuertemente conservado en muchas especies y contiene la mayor parte de la región 5' no codificante. La traducción inicia, en el exón 2 al igual que la péptido señal. El paro de la traducción o el codón de paro está en el comienzo del exón 7 [25].

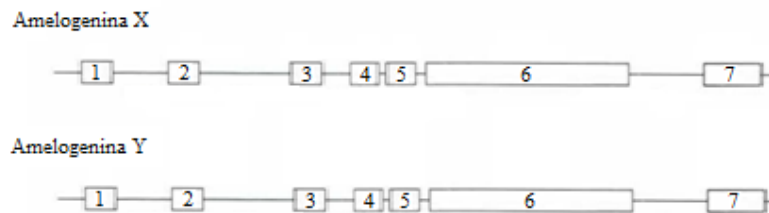


Figura 52. Se muestran los 7 exones (cajas) y los intrones líneas del gen de amelogenina para X y Y [21, 25, 26].

En la figura 54 se muestra el gene de amelogenina. (A). estructura del gen. Los cinco primeros exones son pequeños (ex1-ex5) de 42 a 52pb y los exones 6 (426pb) y 7 (160pb) son grandes. (B). Exones codificantes y no codificantes. Exón 1 es no codificante, mas el exón 2 codifica para un péptido señal y los tres primeros nucleótidos

del exón 7, codifican para la proteína. (C) Representación lineales de la proteína nativa de amelogenina [21, 25].

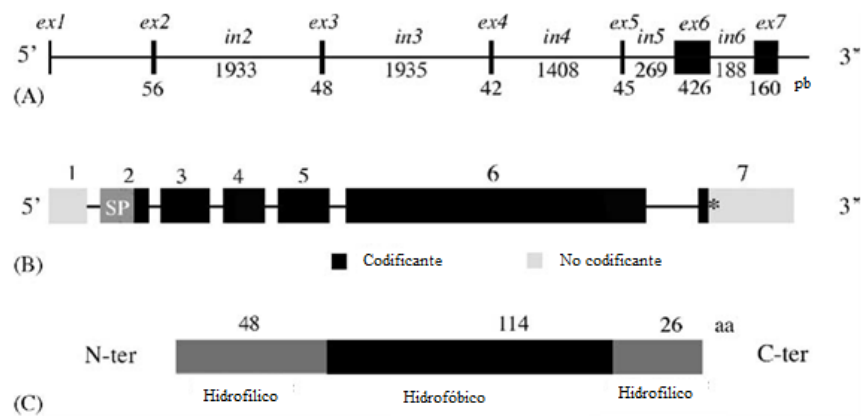


Figura 54. Gen de amelogenina [27].

La amelogenina humana madura del cromosoma X con la omisión del exón 4 es una proteína de 19.8kDa con 175 residuos de aminoácidos y a partir del cromosoma Y es una proteína de 20kDa con 176 aminoácidos. La metionina del residuo 29 de la amelogenina del cromosoma Y está ausente en la amelogenina de X, debido a la supresión de tres bases en el gen de amelogenina del cromosoma X. La similitud de secuencia general entre X y Y derivada de cDNAs es del 91%. Las regiones codificantes de la proteína (exones 1 y 7) son fuertemente conservadas, con un índice de similitud del 93% a 100%, mientras que el 5' y 3' (exones 1 y 7) regiones no traducidas son mucho menos conservadas [25]. La secuencia de amelogenina en el cromosoma Y también se transcribe, aunque a un nivel mucho menor (sobre el 10% del total), que el de su homólogo X [21].

Dado que la secuencia de aminoácidos inicial de procesos de secreción de amelogeninas en muchas especies, MPLPPHPG es fuertemente conservado, la numeración de los residuos habitualmente comienza mediante la designación de una metionina N-terminal como residuo número 1. Las proteínas productos del empalme son identificadas por el número total de residuos de aminoácidos en el producto secretado. Así, la máxima amelogenina secretada por el producto de AMGX-Humana tiene 189 aminoácidos llamada HX189. El mayor producto secretado por AMGY-Humana es HY190. La secuencia de nucleótidos de los intrones es mucho más larga y varían considerablemente entre las especies [21].

La siguiente figura muestra el gen de amelogenina la cual se busco en el NCBI, el gen de amelogenina en los cromosomas X y Y.

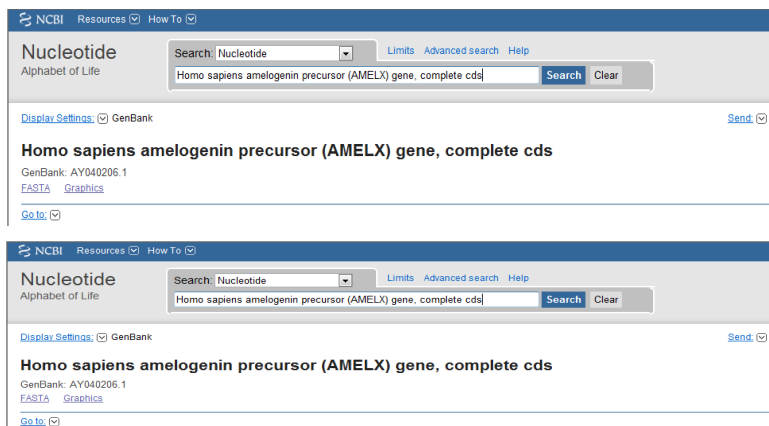


Figura 55. Búsqueda en la base de datos (NCBI) de los genes de amelogenina para humano (hombre y mujer) [28, 29].

```

-----tgaataa attgagctta tagttggaag aaatctaag gatcaagcat cctgagttt
1441 caaacagaaa cttgactga atacattcaa aggtatgtgg atttattta taatttgata
2761 gatgttgact tacatttcag aaccatcaag aaatggggac ctggatttta ttgacctgcc
2821 tectgggagc agcttttgcc atgcctgtga gtaaacacc ccttgcataa gtcagtgtcc
4741 ttcctctctc tttctattct cctccccctc tcctgtaaa agctaccacc tcatectggg
4801 caccctggtt atatcaactt cagctatgag gtaatttttc tctttactaa tttgaccaa
4861 tgtttgcgtt aacaatgcc tggctctgt aaagaatagt gtgttgatc tttatcccag
6061 cacaggaagc acccaacaaa ttttacctt cttctttctt ttgtagaact cacattctca
6121 ggctataaat gttgacagga ctgcattagt gactctatat ttcctactgc atcagtgagt
6181 tctatatttg gatgaaagta aattaatca aatgggttct aatatcttt tctcttaagg
6241 tgcttcccc tttgaagtgg taccagagca taaggccacc ggatgtaga cttttgttc
6301 cttattccct gaaaatatta ggcattgcat aaaattccc tattaagtga aatatcatgt
6481 gaaaacactg ctgctctctt ggttggagtc acctgagcca atggtaaacc tgcctctctg
6541 tttctacca gtacccttcc tatgggttag agcccatggg tggatggctg caccacccaa
6601 tcateccctg gctgtcccaa cagcaccctc cgaactcaac cctgcagcct catcaccaca
6661 tcccagtggt gccagctcag cagccctgta tccccagca accaatgatg cccgttctg
6721 gccaacactc catgactcca atccacacc accagccaaa cctccctccg cccgcccagc
6781 agccctacca gccccagcct gttcagccac agcctcaccg gcccatgag ccccagccac
6841 ctgtgcaccc catgcagccc ctgcgccac agccacctct gctccogag tccccatgc
6901 agccctgccc tcccattgct cctgatctga ctctggaagc ttggccatca acagacaaga
6961 ccaagcggga ggaagtgtg agtatatctt gaagccacta caatgcaaat cctgtgaaaa
7021 tgggtgcagc aaataggccc cagagttcta aggtctccga caaccaagga tctagagttg
8521 acaaaaactg agccagacat gttattgtaa atggtactca ctaggaacat ttgtaatta
8581 ttttaactgt tcttttgca ttttttcag gattaaaaga tcagaagatg agagggaat
8641 gaatacttca gatgctttca ggagtgcac aagaacacaa tgatttttgc ttataatcac
8701 tttacttagc aaattctgta actaaaaaag taccattagc agacaataaa atgcattaaa
8761 aatcattcat gtctttgtgt tgaatgaaac taaattttc -----

```

Figura 56. Secuencia correspondiente al gene de amelogenina, cromosoma X, en el cual se muestran los exones. Tamaño del gene 1-8791, promotor del gene de 1-1416, secuencia TATA 1386-1391, unión de mRNA: 1417-1472, 2781-2864, 4783-4830, 6240-6281, 6552-6977 y 1611-8791. Tamaño de los exones 1, 1417-1472 (rojo), 2, 2781-2846 (azul), 3, 4783-4830 (verde), 4, 6107-6146 (naranja), 5, 6240-6281 (gris), 6, 6552-6977 (amarillo) y 7, 8611-8791 (morado) [28].

El número relativamente grande de empalmes alternativos de amelogenina y de polipéptidos traducidos refleja las diferentes funciones de la amelogenina [20]. Hasta la fecha, 14 mutaciones en el gen de amelogenina humana X-amelogenina gen (**AMELX**), han sido asociadas con amelogénesis imperfecta (AI), los trastornos genéticos más comunes que afectan al esmalte. Esto demuestra el importante papel de las amelogeninas en la mineralización del esmalte. La formación anormal del esmalte y la mineralización también se han demostrado por la knock-out (KO) de la expresión de la amelogenina usando oligonucleótidos antisentido, ribozimas y por la destrucción destructiva del locus de amelogenina. Los dientes de ratón de KO se encontró que expresan un fenotipo de esmalte hipoplásico, similar al de AI y un espesor reducido en el esmalte [17].

## Antecedentes.

### 7. Evolución del gen de amelogenina.

La amelogenina juega un papel crucial en la estructura del esmalte y la mineralización del diente, pero la función de sus distintos ámbitos no se alcanza. El análisis evolutivo parece ser una manera prometedora de abordar las relaciones estructura-función [24].

El diente y sus tejidos una vez reclutados en la boca de los primeros *gnatostomados*, hace 450 millones de años, fueron sometidos a fuerte presión selectiva debido a su crucial función. Esto explica por qué los dientes y en particular su proceso de desarrollo, organización y componentes estructurales fueron conservados casi sin cambios a través de tiempos geológicos [17].

En *mamíferos*, como en la mayoría de los taxones de *tetrápodos*, los dientes están cubiertos por una gruesa y fuerte mineralización, protectora de tejidos (esmalte). El gen de la amelogenina (AMEL) codifica la proteína más abundante del esmalte (90% de la matriz orgánica). Recientes análisis moleculares han aportado ideas sobre la evolución del patrón de AMEL en mamíferos y se ha observado que la historia de esta proteína podría haber comenzado hacia finales del periodo *Precámbrico* [24].

Estudios comparativos de AMEL en *mamíferos*, *reptiles* y *anfibios*, han revelado residuos altamente conservados localizados en las regiones C y N terminales y esto indica que un gran parte de la región hidrofóbica localizada en el centro de la molécula, codificada por el exón 6 el más grande, es la más variable. Debido a que AMEL es ligado al cromosoma X, en muchos linajes de mamíferos, el gen está muy conservado [24].

	Gen de amelogenina en los cromosomas X e Y.	Gen de amelogenina solo en el cromosoma Y
	Humano	
	Gorila	
	Chimpancé	
	Orangután	
Monos del mundo viejo	Mono japonés	Hamdryas babuino
	Mono Rhesus	Mono Patas
	Macaco cangrejo	Mono verde
	Talapion	
Monos del mundo nuevo	Macaco clavo	Mono titi
	Gato	Rata
		Ratón

(Nakahori y col., Baily y col., 1992)

Figura 57. Distribución del gene de amelogenina [20].

### 7.1.1 Desde las escamas de peces hasta la evolución de la amelogenina.

Desde la década de 1980 estudios comparativos de los dientes y los distintos elementos del esqueleto dérmico (odontodes, *denticulos*, *escamas* y *huesos dérmicos*) han sido realizados para entender cómo se relacionan evolutivamente. Uno de los principales descubrimientos fue que las escamas de los peces teleósteos derivan de elementos como los dientes, odontoides: (i) el desarrollo de los dientes y las escamas son similares, (ii) la estructura de la capa superior de las escamas es depositada por células epiteliales como el esmalte y (iii) las escamas se derivan de odonto-complejos ancestrales [24].

### 7.1.2 Evolución en euterios.

En euterios como, humano, caballo, oso negro y mono, una copia de AMEL es localizada en cada cromosoma sexual, mientras que el gen es autosómico en monotremas, marsupiales y especies de animales no mamíferos. AMELX y AMELY muestran varias diferencias (sustituciones e indeles), que puede explicarse por una evolución independiente durante millones de años. Esto indica que AMELY no está bajo una fuerte limitación funcional. AMELY está enmascarado por AMELX y no puede proveer protección cuando este está inactivo [18]. La evolución particular de AMELY se puede entender cuando se en función de la evolución de los cromosomas sexuales [25,30]. Los cromosomas X y Y en mamíferos han evolucionado desde un par de cromosomas autosomales de un antepasado común parecido a un reptil (un terápsido), hace 250 millones de años. Durante la evolución de los mamíferos, cuatro inversiones multigénicas han ocurrido en el cromosoma Y, que han llevado a la recombinación restringida de X y



Y. El gen AMELY está situado cerca de un lugar de inversión no recombinante, esto resultó en bajos niveles de recombinación [27, 31]. AMELY por lo tanto podría tener tendencia a ser un pseudogen. La inversión ocurrió primeramente en la evolución de los euterios y el análisis de las pocas secuencias disponibles de AMELY indican claramente que los loci de AMELY se convirtieron en un sitio no recombinante separadamente en cada linaje y en algunas especies esto ocurrió mucho tiempo después de la diversificación de los euterios [27, 30].

### 7.1.3 Evolución de la amelogenina en tetrápodos.

Hasta la fecha, datos de la secuencia de la amelogenina se conocen sobre todo en los mamíferos, con solo una secuencia encontrada para anfibios (*Xenopus*), cocodrilos, víbora y lagarto. Comparaciones de amniotas (reptiles + mamíferos) en amelogeninas revelan que las regiones C y N terminales (48 residuos y 26 residuos respectivamente) tienen gran similitud de secuencias. La mayor parte del exón es variable, lo que refleja la baja presión de selección, el número de sustituciones es particularmente importante en lagarto y víbora, lo que evita la alineación entre ambos genes. Son necesarios datos adicionales y el análisis actual de 26 secuencias de reptil aumenta el entendimiento sobre la evolución del exón en amniotas. Por otra parte, el análisis evolutivo de la amelogenina usando 26 secuencias de mamíferos representativos de los linajes principales han permitido calcular la amelogenina ancestral putativa, tal como existía en el ancestro de los mamíferos hace más de 200 millones de años. Curiosamente, una nueva brecha de inserción de tripletes se ha producido durante la evolución de los mamíferos, pero no en otros linajes. Nuevas repeticiones de aminoácidos fueron insertadas independientemente en varios linajes sin relación. Estas inserciones (y supresiones en algunas especies) son siempre localizadas en la misma región, que es considerado un punto crucial para mutaciones en amelogeninas de mamíferos. El análisis evolutivo no revela la presencia de este punto crucial de mutación en mamíferos ancestrales. La presencia de indels largos en esta región de la amelogenina podría tener influencia en la microestructura del esmalte, pero esto sigue sin ser reconocido. Además, esta región altamente variada del exón 6 parece ser un lugar favorable para el polimorfismo de AMELY en humanos [27, 30].

## 7.2 Empalme alternativo del gen de amelogenina.

La isoforma más prominente, la isoforma de mRNA de AMGX humana se compone de los exones 1, 2, 3, 5, 6, 7 y se elimina el exón 4 (80%) dando lugar a la proteína HX175. La Hx159 es la siguiente más abundante (16%) con la supresión de los exones 3 y 4. La

proteína de longitud completa HX189, comprende solo el 3.5% del total de las proteínas de amelogenina. Los patrones de empalme de AMGY son diferentes, con una no detectable HY190 de longitud completa, >95% se encuentra HY176, con la supresión del exón 4 y <2% HY145, con los exones 3, 4 y 5 suprimidos. El exón 4 es siempre suprimido de los mRNA de amelogenina en la mayoría de las especies, pero la supresión del exón 3 es más variable y parece estar en la etapa de desarrollo dependiente de los dientes. Debido a que la obtención de dientes humanos en desarrollo es difícil, muchos más trabajos se han realizado en dientes de bovinos, porcinos y murinos [23].

Exon 1	Intron 1	Exon 2
---TGC ACT GGA ATA CAT TCA <b>AAG</b> ---	<b>GTATGTGG</b> --1.5 KB--	<b>CATTTCAG</b> ---AAC CAT CAA GAA---
<i>TT T</i>		<i>T</i>
Exon 2	Intron 2	Exon 3
---GAG CAG CTT TTG CCA TGC <b>CCT</b> ---	<b>GTGAGTAA</b> --1.8/2.7--	<b>TGTAAG</b> ---CTA CCA CCT CAT ---
	<i>A</i>	
Exon 3	Intron 3	Exon 4
--- TAT ATC AAC TTC AGC TAT <b>GAG</b> ---	<b>GTAATTTT</b> --1.3/1.1--	<b>TTCTGTAG</b> ---AAC TCA CAT TCT---
	<i>C</i>	
Exon 4	Intron 4	Exon 5
--- ATG TTG ACA GGA CTG CAT <b>TTA</b> ---	<b>GTGAGTCT</b> --0.091---	<b>CTCTAAG</b> --- <b>GTG</b> CTT ACC CCT---
		<i>C</i>
Exon 5	Intron 5	Exon 6
--- CAG AGC -----ATA AGG CCA <b>CCG</b> ---	<b>GTATGTAG</b> ---0.27---	<b>CTCACCAG</b> ---TAC CCT TCC TAT ---
<i>ATG</i>	<i>A A A</i>	<i>T</i>
Exon 6	Intron 6	Exon 7
---AAG ACC AAG CGG GAG GAA <b>GTG</b> ---	<b>GTGAGTAT</b> --0.7/2.2--	<b>TTTTTCAG</b> ---GAT TAA AAG ATC---
	<i>C</i>	

Figura 58. Secuencia de codificación de los exones que rodean los intrones, escrito en dirección 5'-3' para el gen de AMGX. AMGY difiere en secuencia, esto se muestra con la base de nucleótidos directamente debajo de los nucleótidos de AMGX en cursivas. Los nucleótidos en los límites del exón-intron están en negrita y más grandes [23].

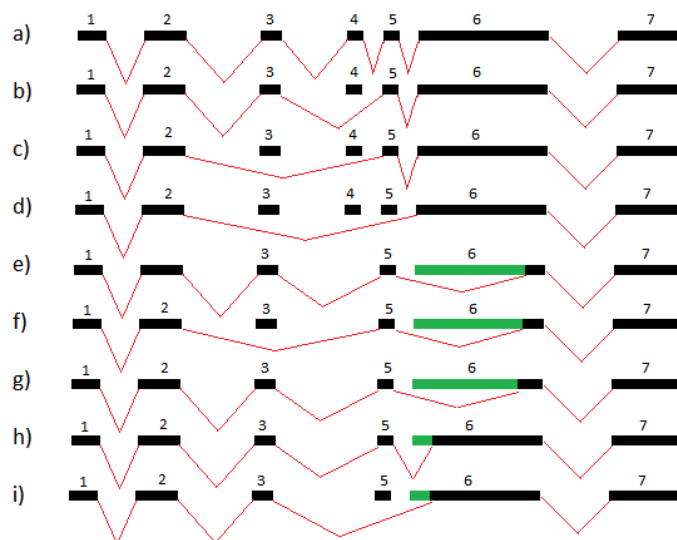


Fig. 59. Estructura del empalme alternativo de las amelogeninas. Las barras negras representan, con el número del exón sobre ellos. Las barras verdes indican las partes de los exones que han sido empalmados usando un sitio interno 3' aceptor. Los intrones aparecen como interrupciones en el gen de la amelogenina en

los mismos puntos en todas las especies estudiadas. A. El colineal empalme de los siete exones, en un cDNA ligado a X codifica para una proteína de 189 aminoácidos identificada en tejido humano. Una proteína traducida para 190 aminoácidos, contiene el exón 4, fue secuenciada de la matriz en desarrollo del esmalte de porcino donde se encontró la presencia de muy pocas cantidades del producto. B. La omisión del exón 4 da un empalme de 6 exones. Por lo general se cree que este arreglo de exones es responsable para generar la mayor cantidad de amelogenina sin procesar en el desarrollo del esmalte. La secuencia de la proteína completa es obtenida de la matriz en desarrollo en puerco. C. La omisión del exón 3 y 4 da mRNA maduros con 5 exones, codificando para una proteína de 160 aminoácidos, cDNAs identificados en tejidos. Una proteína traducida que le falta la secuencia de aminoácidos codificada por los exones 3 y 4 fue secuenciada de esmalte en desarrollo de porcino donde se sintetiza en pequeñas cantidades. D. La omisión del exón 3, 4 y 5 da una transcripción de 4 exones que codifica para una proteína de 144 aminoácidos se han identificado cDNAs en humanos ligados al cromosoma Y. No hay datos sobre la secuencia de esta proteína reportada. E. La omisión de la mayor parte del exón 6 en su región 5' debido al uso de un interno 3' sitio genera el péptido de amelogenina rico en leucina (LARP) y codifica cDNAs para una proteína de 59 aminoácidos identificada en tejidos de bovino, murino y rata. Debido a la sustitución de una base de la amelogenina bovina ligada al cromosoma Y, no contiene la señal del empalme interno en el exón 6. F. Como en la transcripción anterior (E), pero con la omisión del exón 3 y se han identificado cDNAs en tejidos de bovino que codifican para una proteína de 43 aminoácidos. No hay datos de la secuencia concernientes para esta proteína. G. La omisión de la mayor parte de la región 5' del exón 6. Un sitio interno 3' acceptor es usado en esta transcripción es diferente al usado en LRAP. Los cDNAs identificados de tejidos de murino que codifican para una proteína de 72 aminoácidos. No hay datos de la existencia de esta secuencia reportados. I. Como en la transcripción anterior (H) pero con la omisión del exón 5' los cDNAs identificados en tejidos de murino codifican para una proteína de 141 aminoácidos. No hay datos de la existencia de esta secuencia reportados [17, 23].

## 8 ¿El gen de amelogenina restringido a ameloblastos?

Las amelogeninas fueron también detectadas, en pequeñas cantidades, en la calcificación postnatal de los tejidos mesenquimales y varios tejidos no mineralizados incluido el cerebro. Isoformas de la amelogenina de baja masa molecular se sugieren que pueden tener actividad de señalización; para producir tejido ectópico condrogénico y como osteogénico y que afecta la diferenciación del germen de ratón *in vitro*. Recientemente, se encontró que algunas isoformas de amelogenina se unen a los receptores celulares de superficie; LAMP-1, LAMP-2 y CD63 localizados subsecuentemente en la región perinuclear de la célula. La proteína recombinante de amelogenina (rHAM+) produjo la regeneración de los tejidos de soporte del diente: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar, en modelos de perro, a través del reclutamiento de células progenitoras y células mesenquimales. Se demostró que la amelogenina es expresada en varios tejidos en el desarrollo embrionario del complejo craneofacial del ratón, como el cerebro, ojo, ganglios, troncos de los nervios periféricos, el cartílago y el hueso y es expresada alrededor del día E10.5 (Embrionario), en cerebro y ojo, antes de la iniciación de la formación de los dientes. La expresión de la proteína de

amelogenina se detectó en el germen dental (lámina dental) alrededor del día E13.5. La aplicación de la amelogenina (rHAM+), en el mesénquima embrionario mandibular y en el germen dental en los días E13.5 y E14.5, reveló el reclutamiento de células mesenquimales. Los presentes resultados indican que la amelogenina tiene un importante papel en muchos tejidos del complejo craneofacial durante el desarrollo embrionario y diferenciación del ratón y podría ser una proteína multifuncional [21, 23, 31-34].

Por décadas se pensó que la amelogenina era exclusivamente una proteína del esmalte de origen epitelial. Sin embargo en los últimos años diferentes isoformas de amelogenina también se han encontrado en la matriz dentinaria y en los odontoblastos, durante la cementogénesis en la raíz en los remanentes de la vaina de Hertwig's y en las células del ligamento periodontal (PDL). Más recientemente se ha descrito la expresión de amelogeninas en las células de hueso; osteocitos, osteoblastos y osteoclastos y algunas de las células de medula ósea. La amelogenina también tiene expresión en los condrocitos del cartílago articular y de forma diferencial en las capas celulares del crecimiento epifisiario. Hemos identificad la expresión de la amelogenina en células de la medula ósea, algunas de las cuales son células madre mesenquimales y en células que rodean los vasos sanguíneos. La amelogenina también fue identificada en células de tejidos no mineralizados como el cerebro, específicamente en las células gliales, en las glándulas salivales y en algunas células hematopoyéticas como los megacariocitos y los macrófagos. El número relativamente grande de empalme alternativo de los mRNA de amelogenina traduce polipéptidos y el hecho de que la amelogenina es expresada en diferentes tejidos (calcificantes y tejidos blandos) y de diferente origen embrionario, refleja las diversas funciones de la amelogenina [32-34].

## 8.1 Cementogénesis.

El cemento es un tejido mineralizado; sin embargo, el control de su formación sigue siendo indefinido. Una hipótesis es que la matriz de proteínas/péptidos del esmalte secretado por los ameloblastos y/o restos de células epiteliales contribuye en el control de la formación del cemento vía interacciones epitelio-mesénquima.[32, 34]. El péptido de amelogenina rico en leucina parece tener un efecto directo en la actividad de los cementoblastos, que pueden resultar significativas en el desarrollo así como en la regeneración del tejido periodontal [32, 35]. En los complejos procesos de formación del cemento, se pensaba que las proteínas eran liberadas por la vaina radicular de Hertwigs, la extensión apical del asa cervical del epitelio interno del esmalte después de la finalización de la corona. Las amelogeninas estaban entre ellas, Hammarström, observó

por inmunohistoquímica, que los dientes humanos expresan las amelogeninas durante la formación de la raíz. La capa de cemento acelular fue formada con células mesenquimales del folículo dental fueron expuesta a la superficie del esmalte en la matriz de proteínas del esmalte. Cuando las proteínas de la matriz del esmalte fueron puestas en cavidades experimentales en la raíz de un incisivo de mono el cemento acelular fue firmemente unido a la superficie de la dentina de la raíz subyacente [28].

## 9 Expresión de mRNA de amelogenina involucrados en el complejo craneofacial de ratón.

La proteína de amelogenina es considerada como el mejor marcador molecular del desarrollo y mineralización del esmalte ectodérmico, regula la forma, tamaño y dirección de crecimiento de los cristales minerales del esmalte. Datos recientes sugieren más papeles para la amelogenina como la regulación del crecimiento de los cristales minerales del esmalte. El presente estudio describe descubrimientos recientes de la expresión de la amelogenina en tejidos blandos: como cerebro y células del sistema hematopoyético, como son macrófagos, megacariocitos y en algunas de las células madre hematopoyéticas. La reacción en cadena de polimerasa reversa transcripción (RT-PCR) seguida de la secuenciación de cDNA reveló, que en cerebro de ratón, dos isoformas de mRNA de amelogenina, la amelogenina de longitud completa incluido el exón 4 y la isoforma que carece del exón 4 (ver Fig. 61). La inmunohistoquímica reveló la expresión de amelogenina en células gliales de cerebro, en macrófagos de ratón se encontró la expresión de la isoforma de amelogenina de longitud completa que carece del exón 4. La microscopia reveló la colocalización de amelogenina en CD41 (un marcador de megacariocito), así como la amelogenina y CD34 (un marcador de células madre hematopoyéticas) en algunas células de la médula ósea. La expresión de amelogenina, forma la importante proteína estructural de la mineralización de la matriz extracelular del esmalte; así mismo células de los tejidos blandos no mineralizantes sugiere que la amelogenina es multifuncional. Funciones diferentes de la amelogenina se discuten en la actualidad [32].

### 9.1 Expresión de amelogeninas en el desarrollo del ojo.

En el día E10.5 la tinción positiva de amelogenina fue detectada en la zona exterior periférica de la parte interior de la copa óptica (OC), dando lugar a los fotorreceptores. El día E11.5 tiñó en el área de los fotorreceptores (Pr) frente a la futura región del epitelio pigmentario, de manera intensa. En el día E12.5, la tinción aunque débil también fue detectada en fibras de la capa interna del nervio óptico, con los precursores de los

fotorreceptores (Pr) siendo más intensa la tinción. Las células en la periferia de la lente de la tinción positiva, así como las fibras del cristalino. En las células que se desarrollaran en la córnea pocas células fueron teñidas positivamente (Cr). En el día E13.5, las fibras, el tejido conectivo y los vasos sanguíneos coroideos (Ch) fueron teñidas positivamente. En el día E14.5 fibras del cristalino (LF) fueron teñidas positivamente y débilmente se detectó tinción en la mayor parte de las células de la córnea (Cr), así como en la escalera (Sc). También se observaron tinciones en la región del vítreo (Vi), pero no en la retina (Re), los fotorreceptores pierden su tinción. En el día E15.5 del epitelio de revestimiento de la parte anterior de la lente, así como la retina (Re), no se tiñe, mientras que los vasos sanguíneos coroideos tiñen positivamente (Ch). En el día E16.5 principalmente las fibras del cristalino (LF) y toda la córnea (Ch) fue teñida positivamente. En la capa ganglionar (GC) de la retina (Re) los cuerpos celulares (citoplasma) y las fibras fueron teñidos, pero en esta fase la capa de células bipolares, los fotorreceptores y el epitelio pigmentario no se tiñe con anticuerpos de amelogenina. En el día E18.5 el cristalino (LF) fue completamente teñido, los vasos de la retina y las aéreas sub-epiteliales (EI) sobre los párpados también se tiñeron [21].

## 9.2 Expresión de amelogeninas en el desarrollo del cerebro.

En el día E10.5 la tinción positiva de la amelogenina fue detectada en la parte craneal del tubo neural en el límite de la membrana externa (EML), donde las células gliales se tiñeron. Cuando las fibras se detectaron ellas se tiñeron para amelogenina. La mayoría de las tinciones en las fibras nerviosas probablemente se asocian con las células gliales, sin embargo, no está claro si algunas dendritas o axones fueron también teñidas. En el día E11.5 la expresión de amelogenina se detectó en la región anterior (ventral) del mesencefalo (MB), principalmente en estructuras en forma de fibras y células gliales. Las tinciones fueron también observadas en los tejidos que eventualmente desarrollan en el cartilago de la base del craneo. En el día E12.5 positivas tinciones de amelogenina, pero débiles se detectaron en la parte medial (que es rica en fibras) de el telencéfalo (Tc), mientras que no se detectó tinción en la placa cordial (CP), que en esta fase se forma principalmente de neuroblastos. En general la amelogenina se observó en ambos hemisferios del cerebro en estructuras en forma de fibra, en la mayoría de los casos, las células de la glia tiñen positivamente, pero otros tipos de células (neuronas) también podrían estar involucradas. En el día E13.5 fibras (material blanco debajo de la placa cortical) tiñen positivamente mientras que no se detectó tinción en neuronas corticales. En el día E14.5 tinciones positivas dispersas de las células gliales de todo el cerebro en especial en el mesencefalo (MB) y el puente troncoencefálico (P) y no solo en estructuras

parecidas a fibras, fue detectado. En el día E15.5, la tinción de fibras nerviosas en el mesencefalo (MB) fue menos prominente pero la tinción en la corteza cerebral es perceptible (CP). En el día E16.5 y E18.5, las tinciones fueron detectadas en todo el cerebro por una fina capa de neuronas de corteza y alrededor del ventriculo lateral, que fue negativo (LV). Tinciones mas fuertes se detectaron en regiones ricas en fibras o cuando las neuronas no eran densas; estas tinciones se detectaron en celulas gliales. Sin embargo no esta claro si las neuronas, axones y las dendritas fueron tambien teñidas [21].

### 9.3 Expresión de amelogeninas en el desarrollo de los ganglios y de la medula espinal.

En el día E10.5 el tubo neural no fue teñido para amelogenina. En el E11.5 la expresión de amelogenina no fue detectada en el ganglio trigeminal, o en la espina cervical. En el día E12.5 las tinciones de amelogenina fueron observadas en forma de fibra y en la parte ventral de la medula espinal. En las partes donde la medula espinal es más o menos organizada se detectó tinción. En el día E13.5 tinciones positivas fueron detectadas en los ganglios dorsales de la medula, sin embargo, esto no está claro que tipos de células fueron teñidas. En el día E14.5 toda la médula espinal se tiñe positivamente para amelogenina; la tinción se intensificó en E15.5. Desde E14.5 y posteriormente hasta E18.5 el ganglio trigeminal y los ganglios en las inmediaciones del germen dental tiñen positivamente [21].

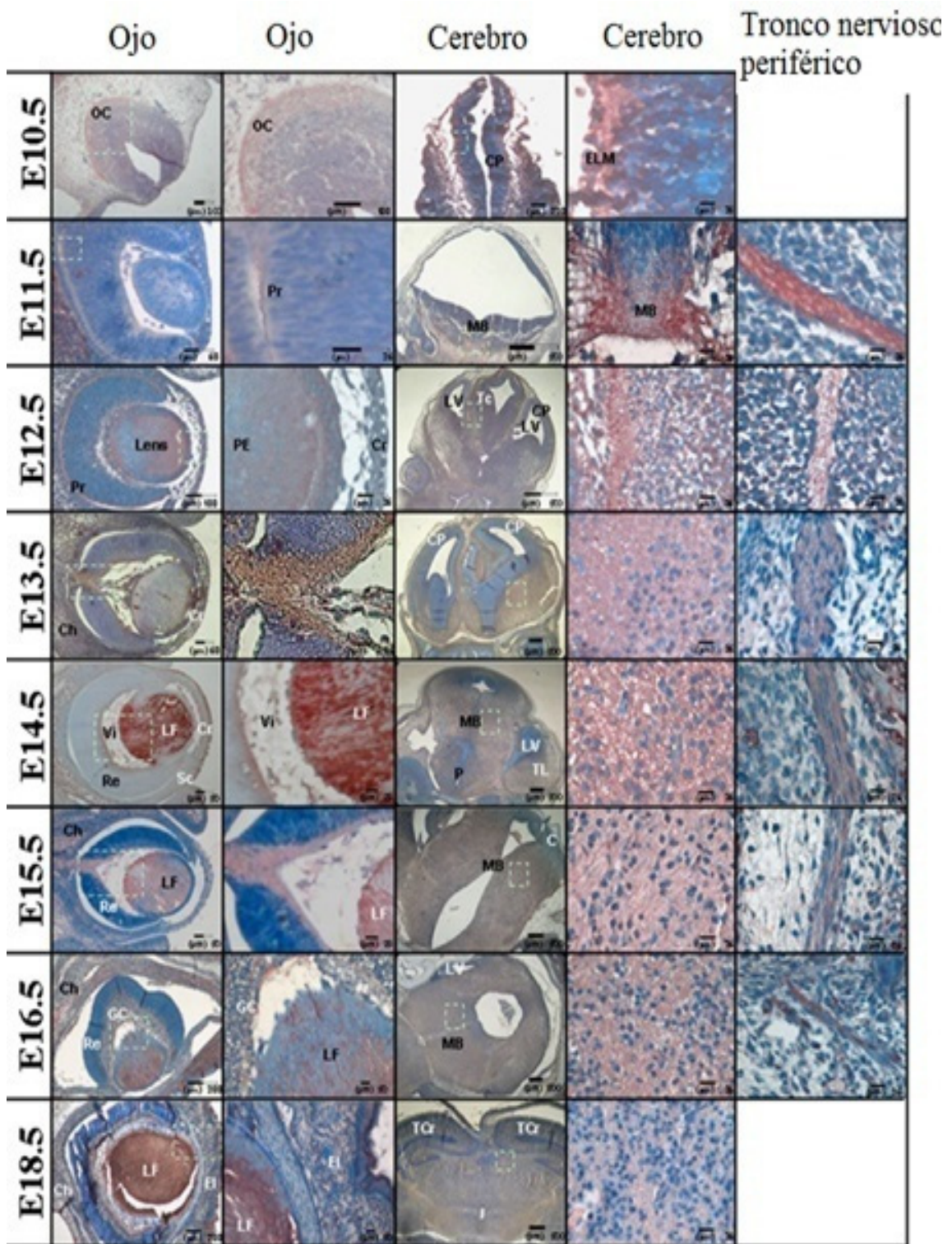


Figura 60. Distribución espacio-temporal de la expresión de amelogenina en los tejidos de ratón en el complejo craneofacial días E10.5-E18.5



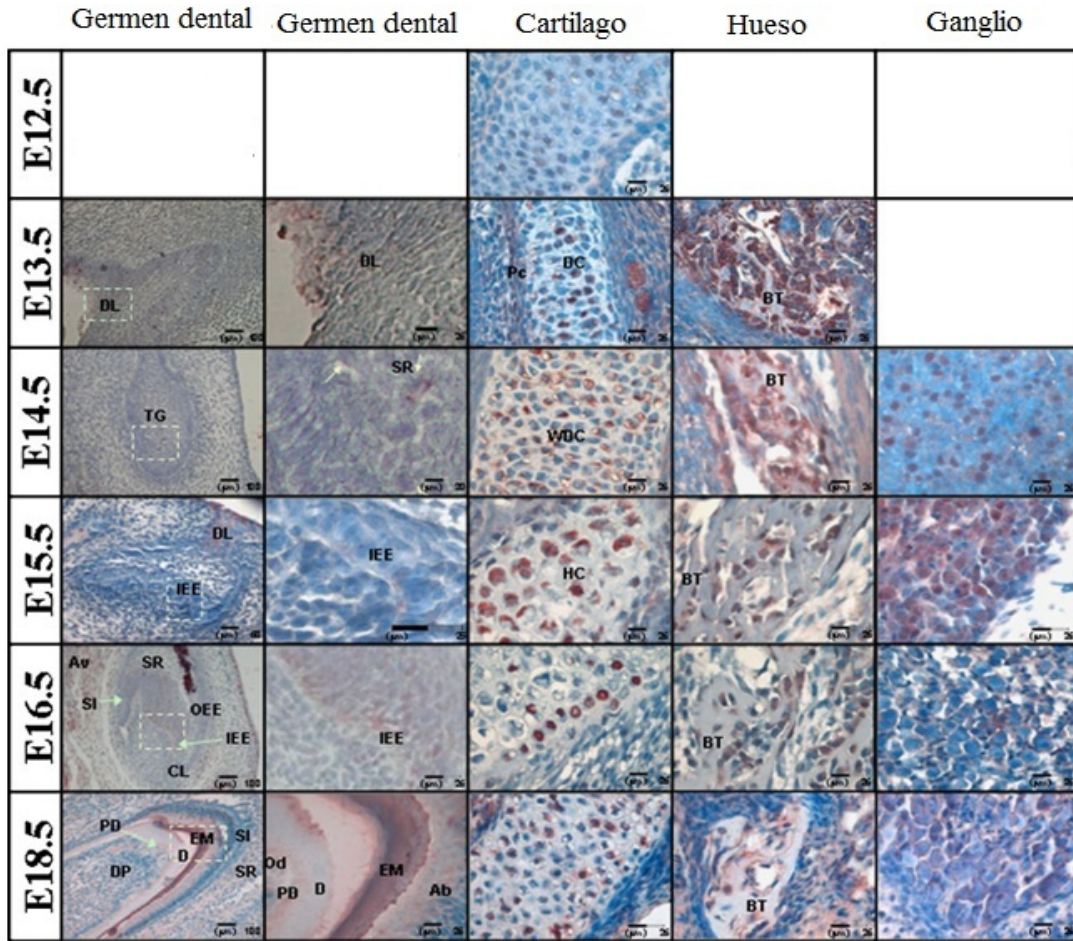


Figura 60. Distribución espacio-temporal de la expresión de amelogenina en los tejidos de ratón en el complejo craneofacial días E10.5-E18.5 (expresión de amelogenina tinción marrón-rojo, hematoxilina tinción azul). Ojo: Ch vasos sanguíneos coroides; Cr córnea; El región subepitelial, GC capa ganglionar; LF fibras del cristalino, OC copa óptica Pr fotorreceptores; Re retina; Sc esclerótica; Vi vítreo. Cerebro: C corteza; CP placa cortical; ELM membrana limitante externa; LV ventrículo lateral; MB mesencéfalo; P puente: Tc telencéfalo, TCr corteza temporal; TI lóbulo temporal. Tronco nervioso periférico: NF fibras nerviosas periféricas. Germen dental: Ab ameloblastos; Av trabéculas del hueso alveolar; CL aza cervical; D dentina; DL lamina dental; DP papila dental; EM matriz extracelular del esmalte; IEE epitelio del esmalte interno; Od odontoblastos; OEE epitelio externo; PD pre dentina; SI estrato intermedio; SR retículo estrellado; TG germen dental. Cartilago: DC condrocitos diferenciados; HC cartilago hipertrófico; Pc precondrocitos; WDC bien desarrollados condrocitos. Hueso: BT trabéculas óseas. (A) En el ojo, en el cerebro y nervios periféricos en los días E10.5, E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E15.5, E16.5 y E18.5. (B) En el germen del diente, cartilago, hueso y ganglios en los días E12.5, E13.5, E14.5, E15.5, E16.5 y E18.5 [21].

## 10. Morfología de los cristales de amelogenina

Los cristales de hidroxiapatita carbonatada son muy elongados, tienen una orientación como de cinta en el esmalte maduro y son bastante diferentes en tamaño y morfología a aquellos presentes en el hueso, cartílago y dentina, en estos su forma es cómo de lámina. Son hidrofóbicos por naturaleza ya que son ricos en prolina, glutamina, histidina y leucina. Las estructuras secundaria y terciaria de las amelogeninas son desconocidas. Los recientes estudios con difracción con rayos X (XRD) han sugerido una estructura  $\beta$ -cruzada y  $\beta$ -plegada en la matriz del esmalte, dicroísmo circular (CD), transformación infrarroja de Fourier (FTIR) y estudios de espectroscopia de Raman, han sugerido que las moléculas de amelogenina contienen  $\beta$ -plegadas y  $\beta$ -giros. La dificultad en dilucidar la estructura y funcionamiento de la amelogenina se debe, en parte, a su tendencia a formar agregantes que son sensibles y reversibles a cambios de temperatura. Con el uso de la técnica de fractura en frío, se han detectado las estructuras esféricas colineales de 30 a 50 nm de diámetro, organizados en órdenes lineales formados en la dirección del eje largo de los cristales. Estudios estructurales de la amelogenina recombinante de murino, junto con comparaciones de preparaciones de esmalte en desarrollo de diferentes especies con microscopia de transmisión electrónica, llevaron a la conclusión que las proteínas de amelogenina autoensamblan en estructuras supramoleculares, se designan como nanoesferas. Las nanoesferas han sido propuestas como la estructura básica de la matriz extracelular del esmalte en desarrollo y juegan una función crucial en la biomineralización del esmalte. Se estudió el proceso de auto ensamblaje de la amelogenina *in vitro* y se exploró la formación de altos niveles de estructuras ordenadas de las nano esferas. Se reporta el ensamblaje espontáneo y la organización jerárquicas de microcintas birrefringentes de amelogenina recombinante porcina de longitud completa (rP172). Además se observó la formación y orientación *c-axial* de la hidroxiapatita en las microcintas auto ensambladas de amelogenina durante el estudio de la mineralización *in vitro*. Se sugiere que el alineamiento substancial de las nanoesferas de amelogenina en cadenas largas pudiera ser relevante en el mecanismo de función, parecido a un andamio facilitación el elongamiento y orientación del crecimiento de los cristales

de apatita durante la biomineralización del esmalte. La amelogenina recombinante porcina de longitud completa (rP172) forma microcintas bajo una amplia variedad de condiciones. En contraste una amelogenina porcina nativa con la omisión del aminoácido 25 en el C-terminal hidrofílico (P148 o amelogenina 20k) falló como formadora de microcintas bajo las mismas condiciones. Las figuras (61 A-C) muestran tres etapas del ensamble de amelogenina y destacan una tendencia específica de la amelogenina al precipitarse durante la cristalización de las microcintas. Cuando las moléculas de la amelogenina se ensamblan en forma de una estructura de red filamentosa (61, B y C), este material evoluciona a través del tiempo en una entidad más organizada que muestra una fuerte birrefringencia (61, D) y tiene bordes definidos que se denominan microcintas (61, E). Es interesante que el grosor y el ancho de las cintas maduras son generalmente para ensamblaje mientras que su longitud varía ampliamente aún bajo un solo set de condiciones experimentales (61, E). Las microcintas maduras fueron estables y su forma general se conservó en el medio de precipitación por varios meses y aún después de haber sido secados. La alta constantes, a pesar de las condiciones de las soluciones birrefringencia de las cintas tiene un débil pero único patrón de XRD que indica una preferencia de orientación de los cristales a lo largo del eje. Se especula que el espaciamiento del enrejado sigue esta dirección (0.26, 0.34 y 0.52 nm) resulta en una conformación única y estructura secundaria de amelogenina plegada. La única estructura que pudiera caber en esta periodicidad es la  $\beta$ -espiral (una estructura repetitiva de  $\beta$ -giros) [28].

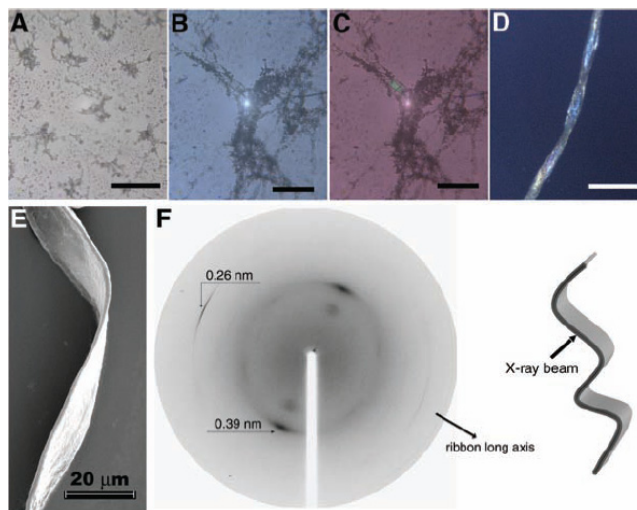


Figura 61. Fig. 1. Formación y caracterización de las microcintas de amelogenina. (A a D) micrografías ópticas de precipitados de amelogenina formados en condiciones de solución diferente durante experimentos

de cristalización. Escala de las barras, de 0,1 mm. (A) Precipitados de amelogenina en el que se observan pocos filamentos. (B) Precipitados que forman un estructura en red, muchos filamentos se pueden observar. (C) La misma muestra en (B), con cambio de polaridad. (D) Cinta madura. (E) Cinta de amelogenina en la que se observa su forma madura. (F) Sincrotrón de XRD de una cinta [25].

## 11. El diente y sus tejidos.

Por medio de los dientes se corta el alimento en trozos adecuados, que se desmenuzan durante la masticación. Además de esta función vital para la digestión, los dientes son importantes para el habla. En los seres humanos hay dos juegos diferentes de dientes: los *dientes deciduos* (primera dentición) y los *dientes permanentes* (segunda dentición). Cada diente se compone de la *corona dentaria*, la parte visible cubierta por esmalte que emerge de la encía, mientras que la *raíz dentaria* permanece incrustada en su alveolo, en el hueso maxilar. El  *cuello del diente*  forma un estrechamiento correspondiente a la transición entre la corona y la raíz. La *cavidad dentaria* es el espacio en el interior del diente que contiene delgadas ramificaciones vasculares y nerviosas incluidas en el tejido conectivo mucoso, denominado en conjunto *pulpa dental*. La cavidad dentaria de la corona, o *cámara de la pulpa de la corona*, presenta una prolongación hacia cada raíz, que forma un *conducto radicular* que se abre camino en la punta de la raíz por un fino *orificio radicular* o *apical*. El tejido dentario duro está compuesto por dentina esmalte y cemento. La *dentina* representa la mayor parte del diente y rodea la cavidad pulpar. La dentina es más gruesa en la corona donde es recubierta por esmalte que varía en espesor desde 2,5 mm en el borde cortante hasta cero en la transición entre el cemento y el esmalte. El esmalte es transparente y presenta una tonalidad blanco azulada. La dentina es de color amarillo claro, por lo que el diente es amarillento salvo en el borde cortante, donde predomina el color claro del esmalte. En la zona correspondiente a la raíz la dentina está recubierta por una fina capa de cemento. El tejido dentario blando son la pulpa, la membrana periodóntica y la encía [35].

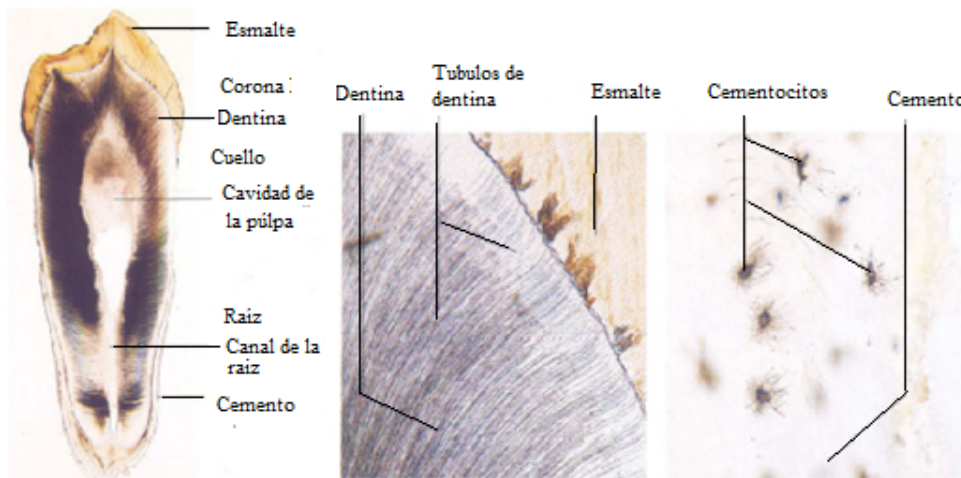


Figura 62. Estructura dental [35].

## 12. Estructura del periodonto.

La biología estructural es un término amplio que, además de la macromorfología y la histología clásicas, abarcan la función, la bioquímica de las células y las estructuras intercelulares. El término periodonto (estructuras de sostén del diente) engloba cuatro tejidos blandos y duros distintos: la encía, el cemento radicular, el hueso alveolar y el ligamento periodontal, que une las dos últimas estructuras [36].

### 13. Encía.

La encía es parte de la mucosa oral y al mismo tiempo la porción más periférica del periodonto. Comienza en la línea mucogingival (LMG) y cubre las porciones coronales del proceso alveolar. En la zona palata no existe LMG y la encía forma parte de la queratinizada e inmóvil mucosa palatina. La encía termina en el cuello del diente, rodea los dientes y, por medio de un anillo epitelial (epitelio de unión), forma la adherencia epitelial. Se distinguen la encía marginal libre, de aproximadamente 1,5 mm de anchura, la encía insertada, de anchura muy variable y la encía interdental. La encía sana es de color (ocasionalmente también en blancos) presenta un grado variable de pigmentación oscura. Es de consistencia variable y no deslizable. Su superficie esta queratinizada y puede presentar pequeñas depresiones en forma de piel de naranja [36].

#### 13.1 Cresta de la papila interdental.

Apicalmente al punto o superficie de contacto, la encía interdental se hunde en el septo interdental. Esta depresión se encuentra entre la papila estabular y la lingual, no se

aprecia clínicamente y su anchura y profundidad varía según la extensión de la superficie de contacto [36].

### 13.2 Epitelio de unión.

La encía marginal se fija a la superficie del diente debido a que su epitelio de unión forma y renueva constantemente la adherencia epitelial.

El epitelio de unión alcanza unos 2 mm de altura y rodea en forma de anillo el cuello del diente. Por la zona apical consta solo de unas pocas capas celulares y por la zona coronal, en la proximidad del sulcus, se compone de 15 a 30 capas celulares. Su anchura en el sulcus es de cerca de 0,15 mm. Consta de dos capas: el estrato basal (mitóticamente activo) y el estrato supra basal (células hijas). Se mantiene indiferenciado y no queratiniza [36].

### 13.3 Adherencia epitelial.

La adherencia epitelial es la a la vez producto, parte del epitelio de unión y se compone de una *lamina basal interna* y *hemidesmosomas*. Permite la fijación epitelial entre la encía y la superficie del diente, independientemente de que se trate de esmalte, cemento o dentina [36].

### 13.4 Sulcus.

El *sulcus* o surco gingival es un pequeño canal de hasta cerca de 0,5 mm de profundidad cuyo suelo está formado por las células del epitelio de unión situadas más coronalmente, las cuales se exfolian aquí en rápida sucesión, está limitado por un lado con la sustancia dental y por el otro con el epitelio del sulcular oral [36].

### 13.5 Estructuras de fijación del tejido conjuntivo.

Las estructuras de fijación del tejido conjuntivo permiten la unión entre los dientes (cemento) y los alveolos, entre los dientes y la encía y entre los propios dientes. Estas estructuras comprenden: Haces fibrosos gingivales y ligamento periodontal (haces fibrosos periodontales) [36].

#### 13.5.1 Haces fibrosos gingivales.

En la región supraalveolar aparecen haces de fibras de colágenas que se entrecruzan en diversas direcciones. Estos haces confieren firmeza a la encía, la fijan al diente por

debajo del epitelio de unión y la aseguran frente a fuerzas de cizallamiento (deformación lateral por una fuerza externa); además, estabilizan la posición de cada uno de los dientes y los mantienen alineados. Los haces periostogingivales pueden considerarse también como parte de las fibras gingivales. Su función consiste en fijar la encía insertada al proceso alveolar [36].

### 13.5.2 Ligamento periodontal.

El ligamento periodontal (LPO) está situado entre la superficie radicular y el hueso alveolar y se compone de fibras de tejido conjuntivo, células, vasos, nervios y sustancia fundamental. En una superficie de cemento de 1mm<sup>2</sup> se insertan un promedio de 28.000 haces fibrosos. El elemento básico de los haces fibrosos son las fibrillas de colágena de 40-70nm de grosor. Un gran número de éstas se une a su vez, para formar haces fibrosos de colágena, los cuales se insertan por un lado en el hueso alveolar y por el otro en el cemento radicular (fibras de Sharpey). Las células son fibroblastos en forma de huso o de disco plano con núcleo oval y numerosos apéndices citoplasmáticos de diversa longitud. Del lado de las sustancias duras se encuentran cementoblastos y osteoblastos. Los osteoblastos solo están presentes en la fase de reabsorción para que sea activa [36].

### 13.6 Cemento radicular.

El cemento radicular es, por un lado, parte del diente y por el otro lado, parte del periodonto. Se distinguen los siguientes tipos:

Cemento afibrilar acelular CAA. Aparece en el margen cervical del esmalte una vez concluida la maduración preeruptiva del esmalte y en algunos casos todavía durante la erupción del diente. Probablemente está formado por cementoblastos. Esta solo presente en la zona del cuello dental, en el límite amelocementario. Se sitúa sobre el esmalte y en algunos casos sobre las porciones marginales de la raíz [36]. Cemento de fibras ajenas acelular CFAA. Aparece preeruptiva y posteruptivamente. Está formado por fibroblastos, en las secciones radiculares más apicales forma parte del cemento de fibras mixtas. Es el principal responsable del anclaje del diente en los alveolos, se encuentra en el tercio cervical de todos los dientes deciduos y permanentes. El CFAA es la forma de cemento que pretende imitar las técnicas de tratamiento regenerativas. Se localiza en el tercio superior de las superficies radiculares, presenta una estructura fibrosa predominantemente horizontal [36]. Cemento de fibras propias celular CFPC. Aparece preeruptiva y posteruptivamente. Está formado por cementoblastos y no contiene fibras ajenas de Sharpey. Suele formar parte del cemento de fibras propias, se encuentra en las

regiones radicales media, apical, furcal y generalmente contiene cementocitos [36]. Cemento de fibras mixtas celular CFMC. Está formado por cementoblastos y fibroblastos y es una mezcla de cemento de fibras propias celular y cemento de fibras ajenas acelular. Es también importante para el anclaje del diente en los alveolos, si bien las fibras de Sharpey formadas por los fibroblastos solo se insertan en las porciones de cemento de fibras ajenas acelular CFAA contenidas en el cemento mixto, fijándose así al diente, este al igual que el CFAA, se une firmemente a la dentina median fibras colágena entrelazadas durante la formación del diente. Éste se encuentra en las regiones radicales apicales, en la cara interna de los dientes multirradicales y en la zona de la furcación [36].

### 13.7 Hueso alveolar.

Las *apófisis alveolares* de maxilar y mandíbula son estructuras dependientes de los dientes que se desarrollan durante su formación, erupción y se atrofian una vez que estos desaparecen. En la apófisis alveolar y en la entrada de los alveolos (borde o cresta alveolar) se forman en la lámina cribiforme o *hueso alveolar* propiamente dicho. El hueso que forma la pared alveolar tiene aproximadamente 0,1-0,4 mm de grosor y presenta numerosos orificios de tamaño pequeño (canales de Volkmann) por lo que los vasos sanguíneos y linfáticos, así como las fibras nerviosas, entran y salen del espacio periodontal. La *esponjosa* se sitúa entre la compacta y el hueso alveolar [36], la apófisis alveolar que alberga el diente se compone de hueso alveolar, esponjoso y compacto. El hueso alveolar y la compacta se reúnen marginalmente respecto de la cresta ósea alveolar [36].

### 13.8 Vascularización e inervación del periodonto.

La segunda rama del trigémino proporciona la inervación sensorial del maxilar y la tercera rama se encarga de la mandíbula [36].

El periodonto, en especial la encía y el ligamento periodontal, esta inervado por *mecanorreceptores* similares a los de Ruffini, *fibras nerviosas nociceptivas*, además de por ramificaciones ubicuas del nervio simpático. Las funciones de estas inervaciones están coordinadas con las de la pulpa y la dentina, el umbral de excitación de los mecanorreceptores, que reaccionan a estímulos táctiles, es muy bajo, en cambio, las terminaciones nerviosas nociceptivas que perciben el dolor poseen un umbral relativamente alto. En este proceso diversos mecanorreceptores transmiten las reacciones conscientes a través del ganglio trigémino hasta el núcleo sensor del



trigémico en el sistema nervioso central, mientras que los reflejos inconscientes llegan a las neuronas sensoriales mesencefálicas [36].

Los tejidos periodontales, en especial el ligamento periodontal, presentan una abundante vascularización, incluso en ausencia de patología, esto podría estar relacionado no solo con el elevado grado de metabolismo del tejido, rico en células y fibras, sino también con la función mecánica del periodonto, las sobrecargas oclusales son absorbidas no solo por el aparato fibroso del ligamento periodontal y las apófisis alveolares, sino también por el líquido tisular y sus desplazamientos dentro de la hendidura periodontal [36].

Los principales vasos que llegan hasta la apófisis alveolar y el periodonto son: las arterias alveolares posteriores y anteriores, las arterias infraorbitarias y las arterias palatinas en el maxilar. En la mandíbula las arterias mandibulares, las arterias sublinguales, las arterias mentonianas, las arterias linguales y las arterias vestibulares [36].

## 14. Enfermedades periodontales.

La estructura periodontal involucra a los siguientes tejidos blandos y duros: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar [36].

Las enfermedades del periodonto son diversas y entre ellas destacan las gingivitis asociadas a la placa (inflamaciones de la encía sin pérdida de inserción) y las periodontitis (atrofia de periodonto debida a inflamación) [36].

La *gingivitis* se limita a los tejidos blandos supracrestales marginales. Se manifiesta clínicamente por sangrado durante el sondaje del sulcus gingival y en casos graves por enrojecimiento e hinchazón, especialmente en la zona de las papilas, es posible que a partir de una gingivitis se desarrolle una *periodontitis*, esto se produce cuando la inflamación de la encía afecta a las estructuras más profundas del aparato de sostén dental. Tiene lugar entonces la desintegración de la colágena y la reabsorción ósea (pérdida de inserción). El epitelio de unión se convierte en un epitelio de bolsa que prolifera apical y lateralmente, se forma así una bolsa que constituye un refugio y depósito de bacterias patógenas oportunistas que mantienen la periodontitis y que pueden favorecer el avance de la infección [36].

### 14.1 Recesión gingival.

La recesión gingival no es una enfermedad propiamente dicha, sino un trastorno debido principalmente a alteraciones morfológicas y favorecida por una incompleta limpieza dental incorrecta (cepillado deficiente) y en algunos casos por sobrecarga funcional, la consecuencia de esta recesión es una inflamación secundaria [36].

Las características de esta alteración es la retracción de la encía no inflamada y la condición morfológica casi siempre es una muy delgada o totalmente ausente lamina ósea en la cara vestibular. La causa principal es una higiene oral traumática e incorrecta y en algunos casos también una sobre carga funcional [36].

## 14.2 Gingivitis.

La gingivitis se caracteriza por la inflamación, provocada por placa, de las regiones papilares y marginales de la encía; los síntomas clínicos son hemorragia al sondaje, enrojecimiento y eventualmente hinchazón. Esta enfermedad puede mostrar diversos grados de intensidad; las estructuras más profundas como hueso y ligamento periodontal no están afectadas. La gingivitis puede evolucionar aunque no tiene por qué hacerlos a una periodontitis [36].

## 14.3 Periodontitis.

En términos generales, la periodontitis es una enfermedad de curso muy lento que, en casos graves, sobre todo si no se trata, puede producir la pérdida de dientes, existen grandes diferencias en la velocidad de la progresión en los distintos pacientes y la cantidad y la composición de la placa bacteriana, se deben a factores distintos en cada individuo, el grado de salud del paciente, el estado inmunitario, determinado genéticamente pero influenciado psicológicamente, la pertenencia étnica y el entorno social, así como factores de riesgo tales como el tabaquismo y el estrés [36].

Las características de la periodontitis coinciden con las de la gingivitis, además los procesos inflamatorios se extienden hasta las estructuras periodontales más profundas, el hueso alveolar y el ligamento periodontal, hay pérdida de inserción y formación de bolsas, se distinguen dos tipos de periodontitis la crónica y que es la más agresiva [36].

## 15. Alteraciones en la estructura del esmalte.

Las modificaciones en la estructura del esmalte pueden presentarse como consecuencia de factores ambientales o hereditarios. Entre los factores ambientales están las infecciones bacterianas y víricas como sífilis y escarlatina, inflamación, estados carenciales de vitaminas A, C y D y calcio, lesiones químicas con (flúor) y traumatismos. En función del factor etiológico, la alteración del esmalte puede localizarse en uno o dos dientes (focal), o puede afectar la totalidad de los dientes. La alteración del esmalte está

relacionada por lo general con el factor etiológico específico, la duración de la agresión y la etapa de formación del esmalte en el momento de la lesión [16].

### 15.1 Hipoplasia del esmalte.

Los factores ambientales sistémicos de duración breve inhiben a los ameloblastos activos en un periodo específico durante el desarrollo del diente y dan lugar desde un punto de vista clínico a una línea horizontal de pequeñas fositas o surcos sobre la superficie del esmalte que corresponden a la etapa de desarrollo y a la duración de la agresión [16].

Si la duración de la agresión ambiental es corta la línea de hipoplasia es estrecha mientras que una agresión prolongada produce zonas de hipoplasia más ancha y puede afectar a más dientes [16].

La hipoplasia del esmalte que es consecuencia de hipocalcemia secundaria a deficiencia de vitamina D suele ser del tipo foveal. Clínicamente, es indistinguible de la hipoplasia del esmalte causada por enfermedades exantemáticas, tales como el sarampión, varicela y escarlatina y por deficiencias de la vitamina A y D. los estudios clínicos señalan también que la hipoplasia del esmalte es más frecuente en los niños nacidos prematuramente que en los nacidos a término [16].

#### 15.1.1 Hipoplasia focal del esmalte.

La hipoplasia focal del esmalte que implica uno o solo dos dientes es relativamente frecuente, aunque es de etiología incierta en algunos casos es evidente, una forma común de hipoplasia es el diente de Turner. Dependiendo de la gravedad de la lesión, la corona puede tener una zona hipoplasia del esmalte relativamente lisa, o estar visiblemente deformada y tener un color amarillento o marrón [16].

#### 15.1.2 Hipoplasia general del esmalte.

Un ejemplo bien identificado de hipoplasia generalizada del esmalte inducida químicamente es la resultante de la ingestión de flúor. El aumento de nivel de flúor interfiere con la función ameloblástica, lo cual afecta desfavorablemente tanto a la formación de la matriz del esmalte como a su calcificación. Clínicamente, el moteado mínimo por el flúor se manifiesta por una superficie del esmalte lisa con algunas manchas blanquecinas poco perceptibles; el moteado leve presenta una superficie del esmalte lisa con áreas blancas opacas; el moteado de moderada a intenso muestra grados variables de formación de fositas evidentes y coloración marrón de la superficie del esmalte. El moteado grave por el fluoruro, el esmalte es considerablemente más blando y más débil

que el normal, con el consiguiente desgaste excesivo y fractura de las superficies incisales y oclusales [16].



Figura 63. Que muestra una banda horizontal forma grave de hipoplasia [16].

## 16. Amelogenesis imperfecta.

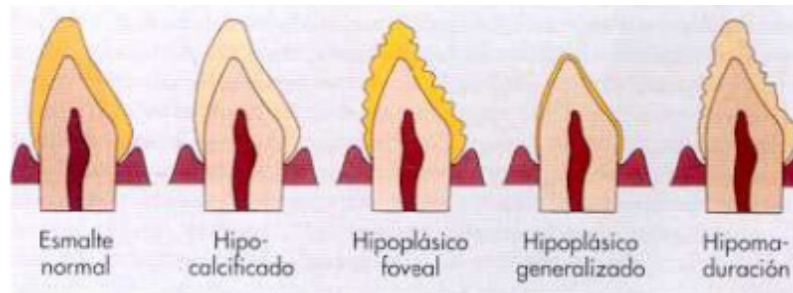


Figura 64. Esquema de los tipos básicos de defectos del esmalte [16].

Grupo heterogéneo de defectos genéticos caracterizados por una formación defectuosa del esmalte. Estos trastornos se limitan al esmalte; los demás componentes del diente son normales evolucionan a través de tres etapas 1) formación de la matriz del esmalte (ameloblastos activos), 2) mineralización de la matriz del esmalte (mineralización primaria) y 3) maduración del esmalte (mineralización secundaria). Tres tipos fundamentales de amelogenesis imperfecta se correlacionan con defectos en esas etapas: 1) el tipo hipoplásico (focal o generalizado), el cual presenta una reducción de la formación de la matriz del esmalte causada por interferencia en la función de los ameloblastos; 2) el tipo hipocalcificado, que constituye una forma gravemente defectuosa de mineralización de matriz del esmalte y 3) el tipo con hipomaduración, que presenta una alteración menos grave en la mineralización, con áreas focales o generalizada de cristallitos del esmalte inmaduro [16].

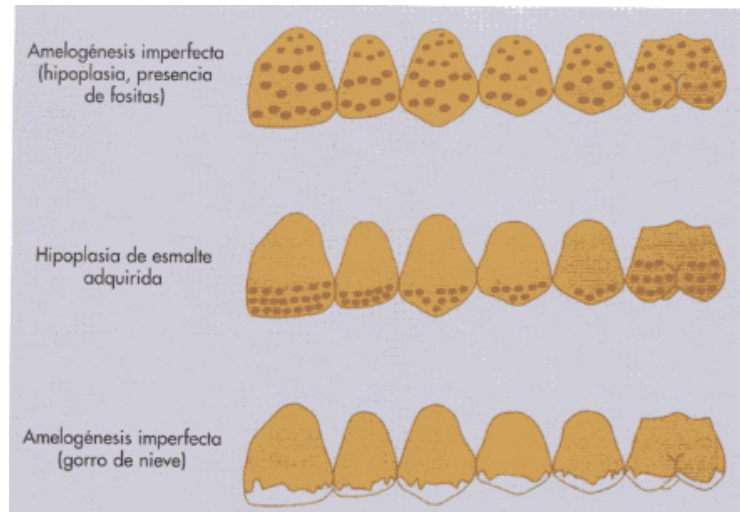


Figura 65. Defectos adquiridos y hereditarios del esmalte [16].

### 16.1 Tipo Hipoplásico.

Tipo hipoplásico: el esmalte es más delgado que lo normal en áreas focales o generalizadas; la radiodensidad del esmalte es mayor que la de la dentina, el hipoplásico focal; el esmalte tiene fositas difusas focales, el tipo generalizado, el esmalte es uniformemente reducido en espesor, pero es de dureza normal lo que da lugar a espaciamentos y alteraciones en la forma de los dientes [16].



Figura 66. Hipoplasia del esmalte [16].

### 16.2 Tipo Hipocalcificado.

El esmalte es de espesor normal, pero es blando y se elimina fácilmente con un instrumento romo; así mismo, es menos radiodenso que la dentina, este da lugar a deformidades en los dientes y espaciamento [16].



Figura 67. Amelogenesis imperfecta hipocalcificada del esmalte [16].

### 16.3 Tipo Hipomaduración.

El esmalte es de espesor normal, pero no de dureza y translucidez; el esmalte puede ser perforado con la punta de una sonda de exploración haciendo presión firme y puede ser separado de la dentina subyacente mediante rascado; la radiodensidad del esmalte es aproximadamente la misma que la de la dentina. La forma más leve de hipomaduración tiene una dureza normal y presenta manchas blancas opacas en los bordes incisales de los dientes, dientes en gorro de nieve [16].



Figura 68. Amelogenesis imperfecta por hipomaduración [16].

## Material y métodos.

### 1. Técnica de aislamiento y análisis de DNA.

Las técnicas de extracción de DNA son múltiples y variadas, aquí se presenta un protocolo y su estudio en geles de agarosa al 1%. El cual se realizó para obtener DNA genómico de sangre y DNA pulpar de terceros molares (3M), sin erupcionar y sin la total formación de la raíz [37]

Objetivo, extracción de DNA total de sangre humana y DNA total de pulpas dentales humanas de hombre y mujer (3M).

DNA total de sangre.

La obtención de las muestras de sangre de hombre y mujer, se realizó mediante la técnica de extracción de muestras de sangre, estas muestra se recolectaron en un tubos vacutainer azules con EDTA (tubo con citrato de sodio capacidad 3.5 a 10ml).

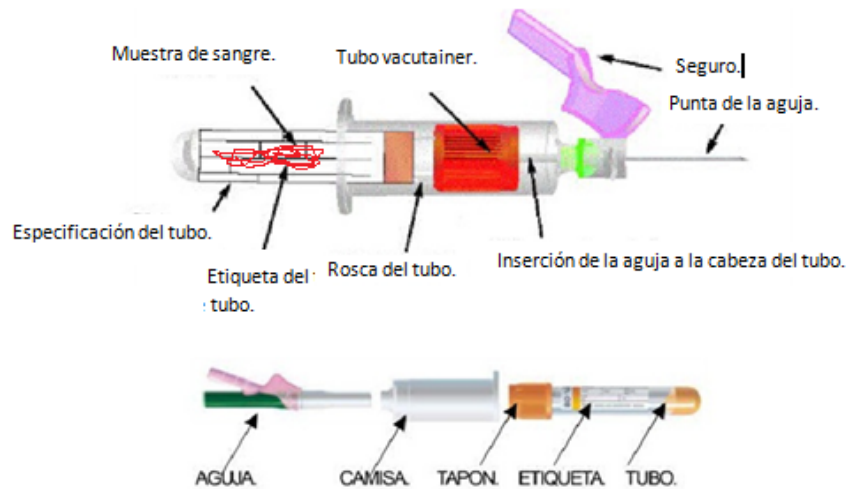


Figura 69. Tubo Vacutainer (forma de utilizar) [38].

#### Reactivos y material

Solución fisiológica, amortiguador de lisis celular, proteinasa K (20mg/ml), Fenol:cloroformo, cloroformo, NaOAc 3M pH 6, etanol al 100% y etanol al 70%, Agua estéril.

Cámara de electroforesis, tubos eppendorf, micropipetas, puntas para micropipeta (0.1, 100 y 100  $\mu$ l), mechero de bunsen, vórtex, incubadora, centrifuga. Guantes y bata bolsa de desechos biológico-infecciosos,

DNA total de pulpas dentales.

Las muestras dentales (3M), se obtuvieron de una clínica de Cirugía Bucal; las muestras dentales eran fracturadas inmediatamente después de su extracción y depositadas en bolsas estériles en nitrógeno líquido, para la posterior extracción de DNA.

#### Reactivos y material.

Motor de baja velocidad, explorador, bolsa de desechos biológico-infecciosos, cámara de electroforesis, excavador, guantes, cubre boca y bata quirúrgica

Solución fisiológica, cloroformo, amortiguador de lisis celular, proteinasa K (20mg/ml), Fenol:cloroformo, NaOAc 3M pH 6, etanol al 100%, etanol al 70% y agua estéril,

Tubos eppendorf, mechero de bunsen, micropipetas, puntas para micropipeta (0.1, 100 y 100  $\mu$ l), centrifuga, vórtex e incubadora.

Metodología.

El protocolo de extracción de DNA ocupado para la sangre y pulpas dentales.

1.- Centrifugar 200 $\mu$ l de muestra a 14 000 rpm (revoluciones por minuto), eliminar el sobrenadante. Observar el fondo del tubo, debe verse un botón o pellet (células). Las pulpas dentales son un tejido fibroso, así que estas son recolectadas de las cámaras pulpares de los molares mediante un explorador.

2.- Resuspender el pellet en 100 $\mu$ l de amortiguador de lisis.

3.- Adicionar 35 $\mu$ l de proteinasa K (20mg/ml). Mezclar en el vórtex e incubar a 58°C durante 1 hora.

4.- Una vez transcurrido el tiempo, agregar 700 $\mu$ l de fenol:cloroformo (1:1). Agitar con el vórtex durante 10 segundos y centrifugar a 14 000 rpm durante 2 minutos. Con la ayuda de una micropipeta recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf de 2ml limpio.

5.- Agregar 700 $\mu$ l de cloroformo. Agitar en el vórtex por 10 segundos y centrifugar a 14 000 rpm durante 2 minutos. Con la ayuda de una micropipeta recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf de 2ml limpio.

6.- Para poder precipitar el DNA se requiere adicionar la 1/10 volúmenes de NaOAc 3M pH 6. Mezclar por inversión. Adicionar 2 volúmenes de etanol al 100%. Mezclar por inversión y refrigerar a -20°C toda la noche.

7.- Al siguiente día, se centrifuga a 14 000 rpm durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.

8.- Lavar el pellet con 500 $\mu$ l de etanol al 70%. Centrifugar a 14 000 rpm durante un tiempo mínimo de 2 minutos. Descartar el sobrenadante. Secar el pellet poniéndole cerca de un mechero.

9.- Resuspender en agua desionizada y estéril; se puede pipetear con el fin de desprender el DNA de las paredes internas del tubo.

Para los análisis de la obtención de DNA se realizan geles de agarosa, este gel se prepara al 1% los cuales se corren en una cámara de electroforesis (de 250ml), la cual contiene TAE 30X. El gel tiene los siguientes reactivos:



-30ml de TAE (Tris, Acetato y EDTA).

-3gr de agarosa.

-3µl de bromuro de etidio.

Nota: hervir hasta disolver.

Otra manera de comprobar la obtención de DNA es utilizando el espectrofotómetro, el DNA tiene una densidad óptica a 260/280 de 1.8, los valores de 1.8 reflejan muestras de DNA con sin contaminantes (proteínas o RNA) [39].

Ver resultados en la parte de Reporte y Resultados para DNA.

## 2. Técnicas de aislamiento y análisis de RNA.

Las técnicas de extracción de RNA son múltiples y variadas [40, 41], aquí se presentan tres protocolos y su estudio en geles de agarosa (modificados para RNA). El cual se realizó para obtener RNA total de *S. cerevisiae* y RNA total de pulpas de terceros molares humanos (3M), sin erupcionar y sin la total formación de la raíz. Estos 3M fueron extraídos e inmediatamente se sumergen en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA.

Objetivo, extracción de RNA total de *S. cerevisiae* y RNA total de pulpas dentales humanas (3M).

RNA total de *S. cerevisiae*.

La obtención de las células de *S. cerevisiae* de un precultivo (medio adecuado), para extracción de RNA, mediante la técnica de miniprep de RNA total de *S. cerevisiae*.

Reactivos y material

Nota: todos los reactivos deben de prepararse con agua estéril y DEPC (dietilpirocarbonato) (1ml/1L).

1M Tris HCL pH 7.4 (2.5ml), 250 mM LiCl (1ml), 1M DTT (ditiotretitol) (500µl), buffer ATA de lisis, MAE 10X, agarosa, agua destilada, formaldehído, etanol al 100%, etanol al 70%, azida de sodio 1M, azida de sodio 20Mm, fenol buffereado con Tris pH 8.0, 100µl de ATA (ácido aurintricarboxílico), 1X LET, buffer de lisis, 0.3g de perlas de vidrio (lavadas y estériles), 1mM de ATA, hielo,

Mechero de Bunsen, tubos eppendorf, micropipetas, puntas para micropipeta (0.1, 100 y 100 µl), espectrofotómetro, microcentrifuga, vórtex,

Bolsa de desechos biológico-infecciosos, guantes y bata.

\*Miniprep de RNA total de *S. cerevisiae*.

Nota todos los reactivos se mantienen en hielo y cerca del mechero de Bunsen.

1.- Inocular un precultivo en YPD (yeast,peptone,dextrose) de la cepa a tratar en el medio adecuado.

2.- Inocular 50ml del medio YPD a una O.D (600nm) de 0.04 y dejar crecer hasta alcanzar una O.D (600nm) entre 0.5 y 0.6.

3.- Adicionar al cultivo 600µl de azida de sodio 1M, mezclar, mantener en hielo.

4.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm a 4°C.

5.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1ml de azida de sodio 20Mm, y transferirlo, y transferirlo a un tubo nuevo eppendorf de 1.5ml y centrifugar 5 segundos en la microcentrifuga.

6.- Resuspender el pellet en 100µl de azida de sodio 20Mm.

7.- Adicionar los siguientes: 200µl de fenol buffereado con Tris pH 8.0, 100µl de ATA (ácido aurintricarboxílico) buffer de lisis y 0.3g de perlas de vidrio (lavadas y estériles).

8.- Vortexear de 2 a 4 (4 veces) minutos a la máxima velocidad en un cuarto frío. Entre cada ciclo de ruptura mantener en hielo por 1 minuto.

9.- Adicionar 200µl de 1X LET, vortexear.

10.- Centrifugar las células por 15 minutos a 14 000 rpm a 4°C.

11.- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo eppendorf, adicionar 1ml de etanol al 100% frío, precipitar a -20°C por al menos 30 minutos.

12.- Centrifugar por 15 minutos a 14 000 rpm a 4° C.

13.- Descartar el sobrenadante, lavar los pellets con 1ml de etanol al 70%.

14.- Secar el precipitado al aire.

15.- Resuspender el precipitado en 80µl de 1mM de ATA.

Para observar el RNA se realizan geles de agarosa para RNA, estos geles se preparan al 1% los cuales se corren en una cámara de electroforesis (250ml) la cual contiene MAE

10X (2.5ml), formaldehído (7.5ml) y agua destilada (217ml) y se corre a 60 mVots por 30 min. El gel contiene los siguientes reactivos:

-0.7 gramos de agarosa.

-7ml de MAE 10X.

-58.8ml de agua destilada.

Nota: hervir hasta disolver. Cuando la temperatura alcance los 70°C adicionar 4.2ml de formaldehído.

Otra manera de comprobar la obtención de RNA es utilizando el espectrofotómetro, el RNA tiene una densidad óptica a 260/280 de 2.0, los valores de 2.0 reflejan muestras de RNA sin contaminantes (proteínas o DNA) [40].

Ver resultados en la parte de Reporte y Resultados de RNA de *S. cerevisiae*

RNA total de pulpas humanas.

Para la obtención de RNA total de pulpas humanas se realizo un protocolo de extracción de RNA, a base de ATA (ácido aurintricarboxílico).

De los 3M extraídos sin erupcionar y con la incompleta formación de la raíz, se obtuvo la pulpa dental, los dientes fueron fracturados y se les fueron retiradas las pulpas por medio de un explorador.

El manejo de las pulpas dentales para la extracción de RNA, siempre es en azida de sodio 20mM.

Reactivos y material

Nota: todos los reactivos deben de prepararse con agua estéril y DEPC (dietilpirocarbonato) (1ml/1L).

Azida de sodio 1M, azida de sodio 20mM, buffer ATA de lisis, ATA 100 100Mm (10ml), ATA 1Mm (2ml), LET5X (11.5ml), LiCl 250Mm (20ml), DTT 50Mm (20ml), hielo, etanol al 100% y etanol al 70%.

Protocolo ATA.

1.- Colocar las pulpas en tubos eppendorf limpios y estériles con 300µl de azida de sodio 1M, mantener en hielo.

2.- mezclar por inversión.

- 3.- Centrifugar 7 minutos, decantar.
4. Resuspender en 1ml de azida de sodio 20Mm, y dar un pulso en la microcentrífuga. Decantar.
- 5.- Resuspender en 500µl de azida de sodio 20Mm
- 6.- Añadir 100 µl de fenol pH 8.0 y 500µl de buffer ATA lisis.
- 7.- Vortexear 3 minutos.
- 8.- Añadir LET 1X, vortexear.
- 9.- Centrifugar 15 minutos.
- 10.- Transferir sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 1ml de etanol al 100% y precipitar a -20°C por al menos 30 minutos.
- 11.- Centrifugar 15 minutos.
- 12.- Lavar con 1ml de etanol al 70%.
- 13.- Secar.
- 14.- Resuspender el precipitado en 30µl de ATA 1Mm.

Ver resultados en la parte de Reporte y Resultados de RNA de pulpas humanas protocolo ATA.

RNA total de pulpas humanas tiocianato de guanidina.

Para la obtención de RNA total de pulpas humanas se realizó un protocolo de extracción de RNA, a base de Tiocianato de guanidina.

De los 3M extraídos sin erupcionar y con la incompleta formación de la raíz, se obtuvo la pulpa dental, los dientes fueron fracturados y se les fueron retiradas las pulpas por medio de un explorador.

El manejo de las pulpas dentales para la extracción de RNA, siempre es en Tris EDTA (pH 7.4)-DEPC.

Reactivos y material

Nota: todos los reactivos deben de prepararse con agua estéril y DEPC (dietilpirocarbonato) (1ml/1L).

Tris EDTA (pH 7.4)-DEPC Tiocianato de Guanidina 4M, fenol saturado, acetato de sodio 2M pH 4.0,  $\beta$ -mercaptoetanol, agua con dietil pirocarbonato 1% y alcohol isoamílico cloroformo 1:1.

Tiocianato de guanidina, fenol, acetato de sódio,  $\beta$ -mercaptoetanol, dietilpirocarbonato y cloroformo.

Tubos eppendorf nuevos y estériles, puntas para micropipeta de 0.1, 100 y 100  $\mu$ l.

Microcentrifuga, micropipetas y Campana de Flujo laminar

Protocolo de extracción de RNA.

1.- Encender la campana de flujo laminar 15 minutos antes de comenzar.

2.- Calibrar el baño de temperatura controlada a 50°C.

3.- Tratar a las células a los tiempos y dosis indicadas.

4.- Ruptura de células. La solución D (se prepara al momento en agua tratada con DEPC), adicionar 1ml. Al tubo eppendorf que contiene las pulpas dentales, se homogeniza la solución en toda la caja y se incuba durante 5 min. A temperatura ambiente. Al término de la incubación recuperar el volumen con una micropipeta de 1ml nueva y estéril y colocarlo en tubos eppendorf (nuevos y estériles).

5.- Extracción. Tratar las células con una mezcla de cloroformo isoamílico 250 $\mu$ l, agitar e incubar durante 5 min. A temperatura ambiente.

6.- Centrifugar en frío a 10,000 rpm durante 15min.

Recuperar el sobrenadante o fase acuosa y pasarlo a otro tubo eppendorf nuevo y estéril. Es conveniente tomar el volumen primero con una punta de 1ml y el restante con una de 200 $\mu$ l. Se forman 3 fases en la inferior quedan los lípidos, en la intermedia las proteínas y en la superior ácidos nucleicos.

7.- Precipitación. Agregar 500 $\mu$ l de isopropanol a un 1ml. de acuerdo a los volúmenes iniciales empleados. Incubar 10min. a temperatura ambiente.

8.- Mezclar por inversión a temperatura ambiente durante 10 minutos.

9.-Centrifugar a 10,000 rpm durante 20min. a 4°C.

10.- Lavado. Tirar el sobrenadante y marcar con plumón donde quedó la pastilla y mezclar con 1ml. de etanol al 75%.

11. - Centrifugar a 8.000 rpm durante 5min.

12. - Tirar el sobrenadante y retirar el remanente mediante evaporación o dejar los tubos invertidos hasta que sequen.

13.- Resuspender de 7 a 10 $\mu$ l. Tomar una alícuota de 1 $\mu$ l para la cuantificación a 260/280nm y el restante congelarlo para utilizarlo en la visualización en gel de agarosa 1% y para la reacción de RT-PCR.

Ver resultados en la parte de Reporte y Resultados de RNA de pulas humanas a base de Tiocianato de guanidina.

### 3. Técnica de PCR y análisis.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta cotidiana en los laboratorios de biología molecular e ingeniería genética, el objetivo de esta técnica es la amplificación de un gene o fragmento de DNA, o indirecta de un RNA (a través de su DNA complementario. cDNA) [15, 43].

Esta mezcla se clica muchas veces (generalmente 30 veces) a diferentes temperaturas que permitan la desnaturalización la hibridación y la extensión del gene a amplificar, estos productos son visualizados en un gel de agarosa al 2% [43, 44 y 45]

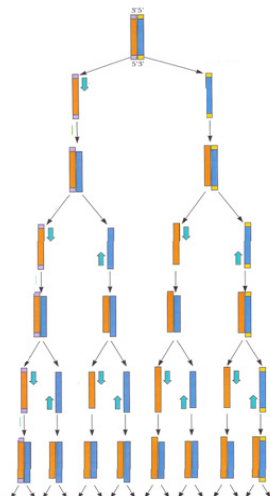


Figura. 70. Etapas de la PCR [16] este método necesita de dos primers (cebadores) complementarios a la cadena en dirección 5' a 3' (un forward y un reverse que inicien la elongación) así como de buffer, MgCl<sub>2</sub>, los cuatro dNTPS, la polimerasa y H<sub>2</sub>O. [15, 43, 44 y 45]

La elección de los oligonucleótidos específicos y eficientes continua siendo empírica. Los siguientes puntos pueden ser de ayuda.

Escoger, siempre que sea posible, oligonucleótidos con una distribución de bases aleatorias con un contenido de GC similar a AT. Evitar secuencias con estructuras secundarias especialmente en el extremo 3'. Comprobar que los oligonucleótidos no sean complementarios [42, 43].

La concentración de MgCl<sub>2</sub> puede tener un efecto importante en la especificidad y rendimiento de la amplificación concentraciones de 1.5mM se acostumbra a ser óptimas con 200µl de cada dNTP. De los dNTP es necesario utilizar entre 50 y 200µl de cada dNTP. La concentración de la polimerasa la da el fabricante, pero por lo general se emplea n dosis de 1 y 4 U [43, 44, 45].

Amplificación del gen de amelogenina identificación del sexo.

Con los DNAs extraídos se monto una PCR con primers para el gene de amelogenina llamados forward (XSP) cromosoma X 5' GACGTCGGTTTGAGGTTCTC 3' y un reverse (YSP) en el cromosoma Y 5' AGGTAAAATTACTA ACTTTGGGCA 3', así como un complementario para los dos cromosomas (COM) 5' TGCTTTGTCAAGTATAATATGAGC 3'.

La PCR se montó de la siguiente manera.

Para realizar la PCR se utiliza el DNA purificado de hombre y mujer diluido 10 veces (1µl en 9µl). Los cuales son para identificar el sexo.

Ciclos de la PCR: Desnaturalización inicial de 94°C.

94°C 30 segundos, 57°C 30 segundos y 72°C por 1 minutos, 40 ciclos, a continuación 74°C por 7 minutos y finalizar en 4°C.

Nota todos los reactivos se pondrán en el siguiente orden:

Tubo 1.	Tubo 2.
Buffer: 10X 2.5µl	Buffer 10X: 2.5µl
MgCl <sub>2</sub> : 2.5µl	MgCl <sub>2</sub> : 2.5µl
dNTPS: 1.25µl	dNTPS: 1.25µl
Iniciador (COM): 1.0µl	Iniciador (COM): 1.0µl
XSP: 0.5µl	XSP: 0.5µl
YSP: 0.5µl	YSP: 0.5µl
DNApol: 0.8µl	DNApol: 0.8µl
DNA (extracción) hombre: 1.0µl	DNA (extracción) mujer: 1.0µl
Agua: 13.7µl	Agua: 13.7µl

Nota: como se sabe el origen del DNA no se poden juntos.

Ver resultados en la parte de Reporte y Resultados de PCR identificación del sexo.

#### 4. Técnica de RT-PCR.

Dado que el ARN usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es ADN complementario (cADN) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR [12, 42]. Esta técnica es montada para el RNA total de pulpas humanas, (protocolos de extracción de RNA total pulpas humanas).

Protocolo de síntesis de la primera cadena de cDNA (ReveryAid, Quick Protocol™. de Fermentas)

Reactivos y material.

Incubadoras, mechero de Bunsen, RNA, Quick Protocolo de Fermentas.

Nota: todos los reactivos se ponen en hielo, y cerca del mechero de Bunsen.

1.- Preparar la siguiente mezcla en un tubo en hielo: RNA total 5µl,



- 2.- Olígo (at) 2μl
- 3.- DEPC-H<sub>2</sub>O 5μl, mezclar suavemente.
- 4.- Incubar a 70°C 5 minutos, enfriar, en hielo y centrifugar brevemente.
- 5.- Poner la mezcla en hielo y colocar buffer de reacción 5X 4μl, Ribo-Lock™ inhibidor de ribonucleasas (20 U/μl) 1μl Y 10mM de dNTPS 2μl.
- 6.- Incubar a 37°C por 5 minutos.
- 7.- Agregar Revent-Aid™ H Minus M-MuLV RT (200 U/μl) 1μl.
- 8.- Incubar la mezcla a 42°C por 60 minutos.
- 9.- Parar la reacción a 70°C por 10 minutos.

## 5. Diseño de primers para amelogenina.

Se diseñaron dos primers (cebadores) para el gen de la amelogenina humana, cumpliendo las características de diseño de primers antes citadas.

Estos primers un forward (AMELX1) cromosoma X 5' GGATCAAGCATCCCTGAG 3' y un reverse (AMELX2), en el cromosoma X 5' GGAGTGACACAAGAACAACA 3'. El primer AMELX1 es complementario para el exón 1 y AMELX2 lo es para el exón 7.



Figura 71. Representación del gen de amelogenina, Tamaño del gene 1-8791, promotor del gene de 1-1416, secuencia TATA 1386-1391, unión de mRNA: 1417-1472, 2781-2864, 4783-4830, 6240-6281, 6552-6977 y 1611-8791. Tamaño de los exones 1, 1417-1472 (rojo), 2, 2781-2846 (azul), 3, 4783-4830 (verde), 4, 6107-6146 (naranja), 5, 6240-6281 (gris), 6, 6552-6977 (amarillo) y 7, 8611-8791 (morado). Obsérvese las bases subrayadas exón 1 (AMELX1) y exón 7 (AMELX2) [28].

Estos primers fueron diseñados con la finalidad de obtener la secuencia completa del gen de amelogenina, de pulpas humanas de 3M en desarrollo. La PCR se monto en cDNAs de la extracción de RNA total de pulpas humanas de 3M en desarrollo.

Se montó la PCR de la siguiente manera en un tubo se colocó la siguiente mezcla:

Buffer: 10X 2.5 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub>: 2.5 $\mu$ l, dNTPS: 1 $\mu$ l, AMELX1: 2 $\mu$ l, AMELX2: 2 $\mu$ l, DNApol: 0.8 $\mu$ l, cDNA –pulpas humanas: 1 $\mu$ l Agua: 13.2 $\mu$ l

En un termociclador, se programaron los siguientes ciclos:

Primer ciclo: 95°C 5 minutos, 1 vez; 95°C 1 minuto, 50°C 1 minuto y 72°C 1 minuto 15 veces. Segundo ciclo: 95°C 1 minuto, 53°C 1 minutio y 72°C 1 minuto 25 veces. Para finalizar se deja a 72°C por un minutos y 4°C para parar la reacción.

Ver resultados en la parte de reporte y resultados.

## Reporte y resultados.

### 1. Geles de DNA.

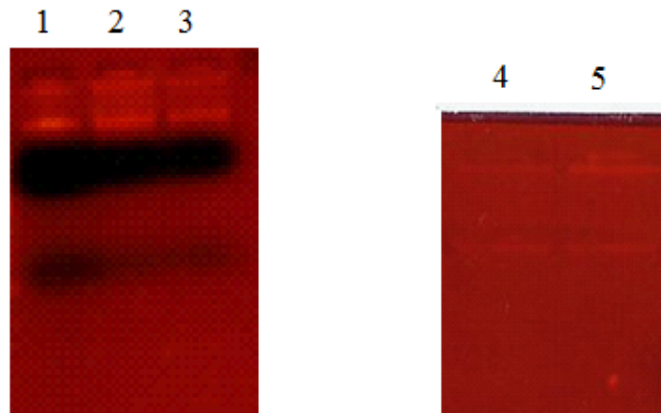


Figura 72. Geles de agarosa al 1% para ver DNA total. Pozo 1, 5 $\mu$ l DNA (hombre 3M), 3H<sub>2</sub>O $\mu$ l y 2 $\mu$ l de buffer de corrida. Pozo 2, 5 $\mu$ l DNA (mujer 3M), 3H<sub>2</sub>O $\mu$ l y 2 $\mu$ l de buffer de corrida. Pozo 3, 5 $\mu$ l DNA (hombre sangre), 3H<sub>2</sub>O $\mu$ l y 2 $\mu$ l de buffer de corrida. Pozo 4 y 5 diluciones 1 en 10 $\mu$ l de DNA de hombre (pozo 4) y mujer (pozo 5), para realizar la PCR de identificación del sexo.

2. Geles de RNA.

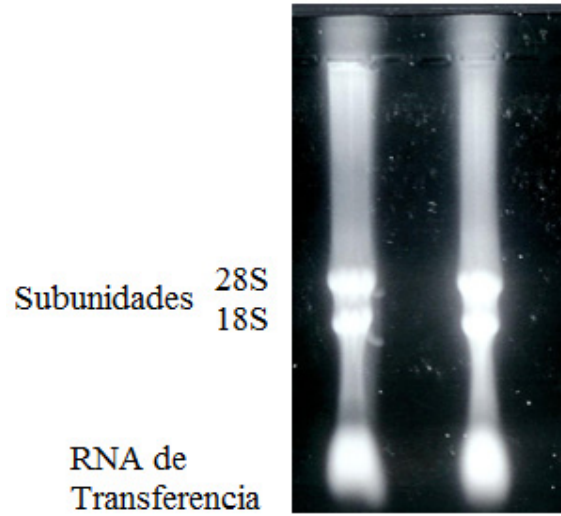


Figura 73. Gel de agarosa para RNA en don se puede observar RNA de la levadura *S. cerevisiae* 10 $\mu$ l del total obtenido.

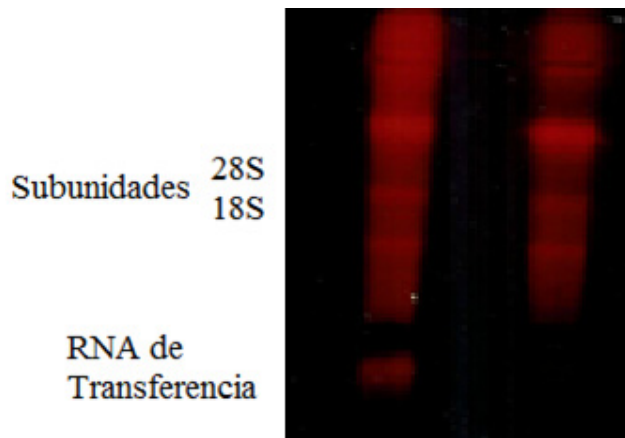


Figura 74. Gel de agarosa para RNA, en la que se puede observar RNA total de pulas humanas (protocolo ATA).

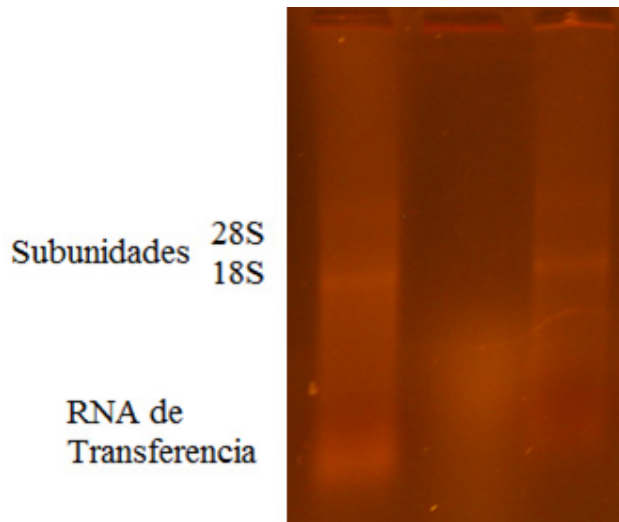


Figura 75. Gel de agarosa para RNA, en la que se puede observar RNA total de pulpas humanas (protocolo tiocianato de guanidina).

### 3. Geles de PCR.

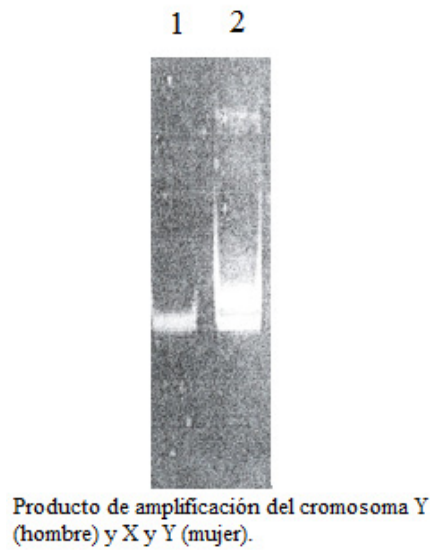
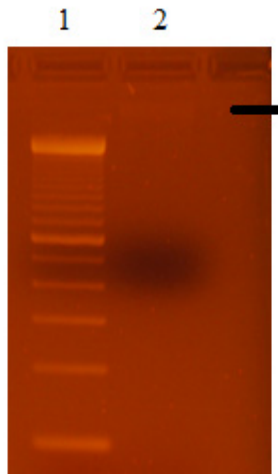


Figura 76. Carril 1 PCR amplificación del cromosoma Y. Carril 2 PCR amplificación X y Y.



Amplificado con los primers muy tenue y fuera del tamaño posible del gene.

Figura 77. Amplificación de cDNA por PCR usando los primers de amelogenina AMELX1 y AMELX2. Poso 1, marcador de pares de bases, poso 2, muestra de PCR.

## Conclusiones.

Podemos concluir que las amelogeninas no se encuentran en estadios de desarrollo tardíos, como la formación de la raíz o que están en pocas cantidades las cuales no son posibles amplificar por PCR. Así que para poder caracterizarlas tenemos que recurrir a tejidos embrionarios.

## Bibliografía.

1. Ralf Dahm., 2004. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* 278 (2005) 274–288.
2. DNA from the Beginning. <http://www.dnafb.org/dnafb/1/concept/index.html>
3. Eugenia Isabel Heres y Pulido, América Nitxin Castañeda Sortibrán, Flujo de la información genética 1 dogma central de la biología molecular, 1ra. Edición, Editorial Universidad Nacional Autónoma de México; Facultad de estudios superiores Iztacala. México 2008. 190pp.
4. Gonzalo Carlos. Aproximación histórica a la biología molecular a través de sus protagonistas, los conceptos y la terminología fundamental. Universidad de Málaga (España). *Panace@* Vol. IV, n. ° 12. Junio, 2003.
5. Maurice H. F. Wilkins. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* Vol. 171 (1953) 738-740pp.
6. Rosalind Franklin y Gosling. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* Vol. 171, (1953), 740-741pp.
7. J. D. Watson y F. H. C. Crick. Molecular Structure of Nucleic Acid *Nature* Vol. 171, (1953), 731-732pp.
8. J. D. Watson y F. H. C. Crick. Implicaciones genéticas de la estructura del ácido desoxirribonucleico. *Nature* Vol. 171, (1953), 965-967pp.
9. Nicole Kresge, Robert D. Simoni, and Robert L. Hill. Arthur Kornberg's Discovery of DNA Polymerase I. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 280 (2005) 46-48 pp.
10. Helena Curtis. N Sue Barner. *Biología*. 6 edición. Buenos Aires: Panamericana; 2000.
11. Rene Fester Kratz. Donna Rae Siegfried. *Biology for Dummies*. 2 edición. Canada: Wiley Publishing, Inc; 2010.
12. José Luque Cabrera. Angel Herráez Sánchez. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Ed. 1. Madrid. Elsevier; 2001.
13. Mary K. Campbell. Shawn O. Farrell. *Bioquímica*. Sexta Edición; 2009.
14. Graziano Pesole. What is a gene? An updated operational definition. *Gene* elsevier *Gene* 417 (2008) 1–4
15. Timothy W. Nilsen<sup>1</sup> & Brenton R. Graveley. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 2010 January Vol 463|28
16. Sapp, J. Philip, Eversole, Lewis Roy, Wysocky George P. *Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology*. 2 edición E.U. Elsevier. 2005. ap.

- 17 Sidney Delgado, Nicolas Vidal, Géraldine Veron, Jean-Yves Sire. Amelogenin, the major protein of tooth enamel: A new phylogenetic marker for ordinal mammal relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47 (2008) 865–869.
- 18 S. J. Brookes, C. Robinson, J. Kirkham and W. A. Bonass. Biochemistry and molecular biology of amelogenin protein of developing dental enamel. *Archs oral Biol.* Vol. 40, No. 1, pp. 1–14, 1995.
- 19 John D. Termine, Alain B. Belcourt, Paul J. Christner, Kathleen M. Conn, and Marie U. Nylen. Properties of Dissociatively Extracted Fetal Tooth Matrix Proteins. PRINCIPAL MOLECULAR SPECIES IN DEVELOPING BOVINE ENAMEL. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 255, No. 20. Issue of October 25, pp. 9760-9768. 1980
- 20 Satoshi Sasaki y Hitoyata Shimokawa. The amelogenin gene. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 127-133 (1995)
- 21 Yael Gruenbaum-Cohen, Abigail S. Tucker, Amir Haze, Dekel Shilo, Angela L. Taylor, Boaz Shay, Paul T. Amelogenin in Cranio-facial Development: The Tooth as a Model to Study the Role of Amelogenin During Embryonic Development. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* 312B:445–457 (2009).
- 22 D. Deutsch, E. Chityat, M. Hekmati. A. Palmon, Y. Farkash, L. Dafni. High expression of amelogenin in *E. coli*. *Adv Dent Res* 10(2): 187-194, November, 1996.
- 23 A. Veis. Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 60 (2003) 38–55
- 24 Jean-Yves Sire, Sidney Delgado, Delphine Fromentin, Marc Girondot. Amelogenin: lessons from evolution. (2005) 50, 205—212
- 25 Chang Du, Giuseppe Falini, Simona Fermani, Christopher Abbott, Janet Moradian-Oldak. Supramolecular Assembly of Amelogenin Nanospheres into Birefringent Microribbons. *Science* Vol 307 4 March 2005.
- 26 Salido EC, Yen PH, Koprivnikar K, Yu LC, Shapiro LJ. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the x and the y chromosomes. *Am J Hum Genet* 1992 50:303–316.
- 27 Fincham AG, Bessem CC, Lau EC, Pavlova Z, Shuler C, Slavkin HC, Snead ML. 1991. Human developing enamel proteins exhibit a sex-linked dimorphism. *Calcif Tissue Int* 48:288–290.
- 28 NCBI National Center for Biotechnology Information and National Center for Biotechnology Information [Online]. 2000 Agosto Disponible URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY040206.1?report=fasta&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY040206.1?report=fasta&log$=seqview).



- 29 NCBI National Center for Biotechnology Information and National Center for Biotechnology Information [Online]. 2000 Agosto Disponible URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG\\_008011.1?report=fasta&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG_008011.1?report=fasta&log$=seqview)
- 30 Sidney Delgado,<sup>1</sup> Marc Girondot,<sup>2</sup> Jean-Yves Sire. Molecular Evolution of Amelogenin in Mammals *J Mol Evol* (2005) 60:12–30
- 31 Fernanda Boabaid, Carolyn W. Gibson, Melissa A. Kuehl, Janice E. Berry, Malcolm L. Snead, Francisco H. Nociti Jr., Eduardo Katchburian y Martha J. Somerman. Leucine-Rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule during cementogenesis. *Journal Periodontol.* August 2004, vol 75 8: 1126-1136.
- 32 Amir Haze, Angela L. Taylor, Anat Blumenfeld, Eli Rosenfeld, Yoav Leiser, Leah Dafni, Boaz Shay, Yael Gruenbaum-Cohen, Era Fermon, Stefan Haegewald, Jean-Pierre Bernimoulin, y Dan Deutsch. Amelogenin Expression in Long Bone and Cartilage Cells and in Bone Marrow Progenitor Cells. *The Anatomical Record* 290:455–460 (2007).
- 33 Thomas G.H. Diekwisch. Developmental Biology of Cementum. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 695-706 (2001).
- 34 Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 669–677
- 35 Finn Geneser. Histología. Tercera edición, Editorial Medicina Panamericana Argentina 2003.
- 36 Herbert Wolf, Edith M, Klaus Rateitschak. Periodoncia. 3ª edición, Editorial Masson, Barcelona España, 2005.
- 37 DNA extracción buscar y citar
- 38 SCRIBID, disponible URL: <http://www.scribd.com/doc/8426648/Tubos-Para-Vacutainer>
- 39 Sambrook Fritsch Maniatis Molecular Cloning. Second edition Laboratory Manual United States of America 1989.
- 40 Piotr Chomczynski y Nicoletta Sacchi. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 1, - 581 - 585 (2006).
- 41 Piotr Chomczynski and Nicoletta Sacchi. Single-step method of RNA isolation acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159 (1987).
- 42 Joan Lluís Vives Corrons, Josep Lluís Aguilar Bascompte. Manual de técnicas de laboratorio en Hematología. 3ª Edición. Editorial Masson 2006.

- 43 Douglas A. Bell and David M. De Marini. Excessive cycling PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 18 1991.
- 44 W.Rychlik, W.J.Spencer and R.E.Rhoads. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 21 1990.