

PAULA CRISTINA TREVILATTO

***ANÁLISE DE POLIMORFISMO DO GENE DA
AMELOGENINA X***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do grau de Mestre
em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Piracicaba
1999

PAULA CRISTINA TREVILATTO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO DO GENE DA
AMELOGENINA X**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do grau de Mestre
em Biologia e Patologia Buco-Dental, Área
de Morfologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres
Line – Faculdade de Odontologia
de Piracicaba (UNICAMP).

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCEG-036/83

CPG, 22 / 10 / 99

Assinatura do Orientador

Piracicaba
1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	729a
V.	Ex.
TOMBO BC/	39870
PROC.	278190
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/01/00
N.º CPD	

CM-00134425-9

Ficha Catalográfica

T729a Trevilatto, Paula Cristina.
 Análise de polimorfismo do gene da amelogenina X. / Paula Cristina Trevilatto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.
 75p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Polimorfismo (Genética). 2. Reação em cadeia da polimerase.
 3. Amplificação de genes. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 20 de Julho de 1999, considerou a candidata PAULA CRISTINA TREVILATTO aprovada.

1. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

2. Prof. Dr. LUCIANO RESENDE FERREIRA

3. Prof. Dr. EDGARD GRANER

BANCA EXAMINADORA

Edgar Graner - Professor Doutor Assistente do Departamento de Diagnóstico Oral, Área de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.

Luciano Resende Ferreira - Professor Doutor do Departamento de Patologia, Área de Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Alfenas.

Reginaldo Bruno Gonçalves - Professor Colaborador do Departamento de Diagnóstico Oral, Área de Microbiologia e Imunologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.

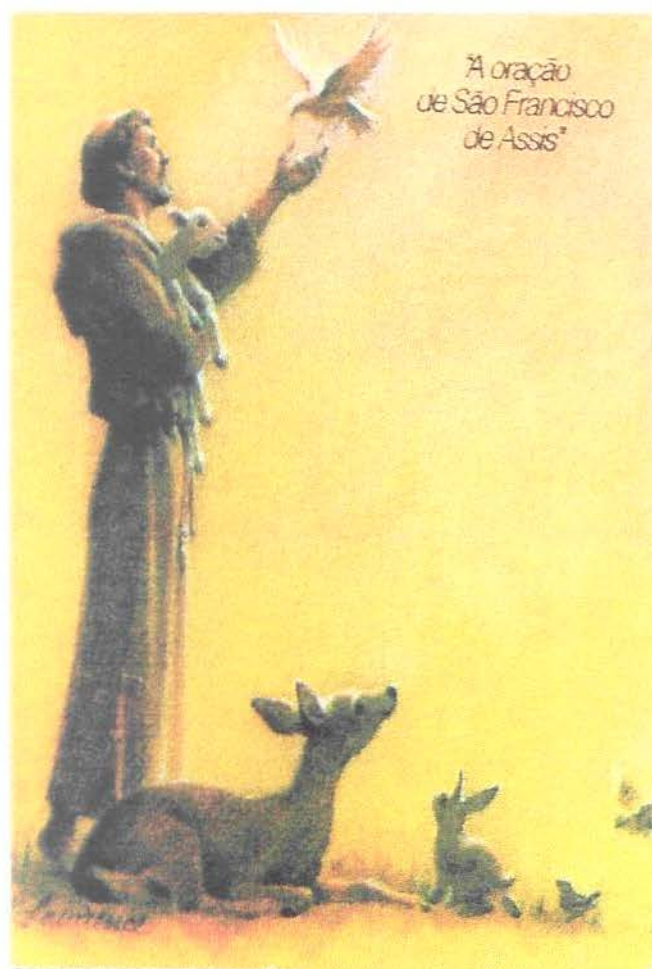
DEDICATÓRIA



*A DEUS, que nos proporciona
tantas oportunidades...*

*Aos meus pais, NARCISO e DORA, pelos
ensinamentos constantes ao longo de nossa
caminhada evolutiva e por ampararem
toda a minha existência*

*Aos meus irmãos, NARCISO Jr. e CLAUDIA,
pela convivência e por iluminarem meu caminho*



Ó, SENHOR!

*Faz de mim um instrumento da Tua Paz;
Onde há ódio, faz que eu leve o Amor;
Onde há ofensa, que eu leve o Perdão;
Onde há discórdia, que eu leve a União;
Onde há dúvidas, que eu leve a Fé;
Onde há erros, que eu leve a Verdade;
Onde há desespero, que eu leve a Esperança;
Onde há tristeza, que eu leve a Alegria;
Onde há trevas, que eu leve a Luz!
Ó, Mestre! Faz que eu procure menos
Ser consolado, do que consolar;
Ser compreendido, do que compreender;
Ser amado, do que amar...
Porquanto;
É dando, que se recebe;
É perdoando, que se é perdoado;
É morrendo, que se vive para a vida eterna.*

*“A vida fica mais fácil quando
não se está sozinho...”*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - UNICAMP, pela utilização de suas instalações desde a minha graduação e principalmente agora, que posso contribuir um pouquinho pela manutenção do seu bom nome. A você, minhas reverências!

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, meu orientador, por fortalecer meu espírito crítico, e por seus valores como ser humano. Um exemplo de trabalho sério e verdadeira vocação à investigação científica, nos estimulando sempre a curiosidade biológica. A você, todo o meu reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Hope Fortingüerra, Chefe do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - UNICAMP, por ser tão solícito em nos atender a qualquer tempo, e por permitir a utilização dos laboratórios durante o desenvolvimento de nossas pesquisas.

À Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP, pela contínua disponibilidade e simpatia.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Cury, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pelo exemplo de seriedade, competência e poder de liderança.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa que me foi conferida e pelo auxílio financeiro nos congressos e de reserva técnica, que permitiram a boa execução desta pesquisa. Muito obrigada.

Às 86 mulheres que tão gentilmente cederam aos apelos da ciência e contribuíram com a execução dos bochechos na cessão do material de estudo.

Ao Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Diretor da FOP – UNICAMP, pela amizade e pela ótima administração desta casa.

A todos os professores do Departamento de Morfologia, Laboratório de Histologia, especialmente ao Prof. Dr. José Merzel e Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, o meu muito obrigada pela disponibilidade.

Às “meninas” do Depto. de Morfologia, Eliene (super querida), Cidinha, Suzete e Ivani, muito obrigada pela paciência e pela convivência no dia-a-dia. À Ana Paulinha, obrigada pela sua simpatia, e por você ser tão inteligente e solícita.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, do Depto. de Diagnóstico Oral, pelo exemplo de amor que tem à obtenção do conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral, principalmente à Aninha e à Maria Helena, por serem sempre tão interessadas e continuamente darem “uma força”. À Rosinha, por ser tão solícita e me ajudar nos momentos mais críticos.

À Érica, da Secretaria da Pós-Graduação, pelos esclarecimentos cabíveis a qualquer tempo.

Às garotas da Biblioteca, especialmente à Heloisa, pela paciência em me atender na elucidação de dúvidas pertinentes à tese.

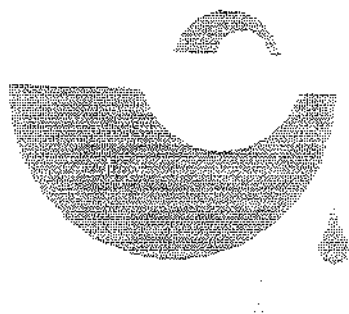
Ao Marquinho, do CRA, pelo auxílio na digitalização de imagens.

Ao José Ângelo Frachia (Gê), desenhista projetista, pela criação e arte gráfica.

Ao André Frachia, pelo carinho, compreensão, exemplo de serenidade, e por me apoiar tanto, com sorrisos, em todos os meus momentos. Grande companheiro!

À minha amiga Lúcia Elvira Alvarez que, ao longo do tempo, apesar de por vezes distante, sempre esteve presente nos momentos importantes de minha vida e por clarear momentos difíceis.

Às grandes companheiras e amigas do Curso de Pós-Graduação Ana Paula, Raquel Gerlach e Raquel Scarel, do Laboratório de Biologia Molecular, e à Silvana Pasetto, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, meus agradecimentos e reconhecimentos pela paciência, e por juntas compartilharmos momentos bons de muito trabalho. Obrigada a todas pela oportunidade de lapidamento espiritual. À estagiária Cristina, minha admiração.



A Ciência é exata. Esta figura geométrica representa a exatidão da Ciência. No entanto, aguarda por ser revelada, fonte inesgotável... Estas gotas, além de poderem ser sentidas como gotas da fonte, podem representar o sentimento, - fruto da interpretação desta revelação - como lágrimas, suor ou bálsamo.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTAS

Lista de abreviaturas, unidades e palavras em outro idioma	1
Lista de tabelas.....	3
Lista de figuras.....	3

RESUMO.....	7
-------------	---

ABSTRACT.....	8
---------------	---

INTRODUÇÃO.....	9
-----------------	---

REVISÃO DE LITERATURA

Amelogênese.....	11
Amelogeninas.....	13
Gene da amelogenina.....	15
RFLP-PCR.....	18
PCR a partir de células do epitélio bucal.....	19

PROPOSIÇÃO.....	21
-----------------	----

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do DNA.....	23
Extração do DNA.....	25
PCR.....	25
RFLP.....	28
Eletroforese das amostras.....	29

RESULTADOS

Obtenção de DNA.....	31
PCR.....	32
RFLP.....	33
Tabelas.....	37
Figuras.....	43

DISCUSSÃO

Obtenção de DNA.....	55
PCR.....	57
RFLP.....	60

CONCLUSÕES.....	63
-----------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
---------------------------------	----

ANEXO.....	77
------------	----

APÊNDICE.....	87
---------------	----



LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES, SIGLAS E PALAVRAS EM OUTRO IDIOMA

AI: Amelogênese *Imperfecta*

AMGX: gene da amelogenina presente no cromossomo X

AMGY: gene da amelogenina presente no cromossomo Y

AMX: *primer(s)* para seqüências do gene da amelogenina

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido diaminotetracético

et al.: e outros (abreviatura de *et alii*)

ϕ X174-RF *Hae* III DNA *digest*: padrão de massa molecular

Imperfecta: imperfeita

kDa: k: quilo, Da=Dalton, (1 Da equivale a aproximadamente 1 unidade de massa atômica)

OD: densidade óptica

ON: durante à noite (*overnight*)

pb: par(es) de base(s)

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

primer: oligonucleotídeo

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento(s) de restrição (*restriction fragment length polymorphism*)

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro.

SDS: dodecil sulfato de sódio

splicing: processamento

tampão *one-phor-all*: tampão utilizado na digestão com todas as enzimas de restrição

TBE: tampão tris-borato, para corrida de eletroforese

TE: Tris/EDTA

U: unidade(s)

Xp22.31-Xp22.1: localização do gene da amelogenina no braço curto do cromossomo X

Yp11: localização do gene da amelogenina no braço curto do cromossomo Y, próximo ao centrômero

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração e grau de pureza do DNA obtido de 86 mulheres a partir de células epiteliais da mucosa bucal.....	37
Tabela 2. Amplificação das seqüências intragênicas da amelogenina X.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata. Seqüências de 1690 pb amplificadas pelos <i>primers</i> AMX1 e AMX2, correspondentes à região de 1° a 2° éxon. Notar a amplificação de fragmento adicional de cerca de 1000 pb em uma das mulheres estudadas, sugerindo deleção de aproximadamente 700 pb em um dos alelos.....	43
Figura 2. Gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata, mostrando fragmentos de 1986 pb amplificados pelos <i>primers</i> AMX3 e AMX4, que compreendem do 2° ao 3° éxon.....	44

Figura 3. Gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata. Segmentos de 1550 pb amplificados pelos *primers* AMX5 e AMX6, do 3° éxon ao 5° intron.....45

Figura 4. Eletroforese mostrando seqüências de 879 pb amplificadas pelos *primers* AMX7 e AMX8, que incluem do 4° ao 6° éxon.....46

Figura 5. Amplificação de seqüências de 2039 pb pelos *primers* AMX 9 e AMX10, equivalentes ao 7° intron e 7° éxon.....47

Figura 6. Análise de restrição com as enzimas *Hha* I, *Rsa* I, *Hpa* II e *Taq* I das seqüências de 1690 pb amplificadas pelos *primers* AMX1 e AMX2.....48

Figura 7. Digestão das seqüências de 1986 pb amplificadas pelos *primers* AMX3 e AMX4 com as enzimas de restrição *Hha* I, *Rsa* I, *Hpa* II e *Taq* I.....49

Figura 8. Digestão das seqüências de 1550 pb amplificadas pelos *primers* AMX5 e AMX6 com as enzimas de restrição *Hha* I, *Rsa* I, *Hpa* II e *Taq* I.....50

Figura 9. Digestão das seqüências de 879 pb amplificadas pelos *primers* AMX3 e AMX4 com as enzimas de restrição *Hha* I, *Rsa* I, *Hpa* II e *Taq* I.....51

Figura 10. Análise de restrição com as enzimas *Hha* I, *Rsa* I, *Hpa* II e *Taq* I das seqüências de 2039 pb amplificadas pelos *primers* AMX9 e AMX10.....52

Figura 11. Esquema representando o padrão de restrição do fragmento amplificado de 1986 pb (*primers* AMX3 e AMX4) conferido pela digestão com a enzima *Rsa* I, o que indica a presença de dois alelos variantes.....53

*“A felicidade tem base
no dever cumprido”*



RESUMO
ABSTRACT

RESUMO

O estudo visou buscar polimorfismos do gene da amelogenina X (AMGX). Para tanto, analisou 79 indivíduos do sexo feminino (158 cromossomos), de etnias diferentes, quanto à presença de variações de sítios de restrição (RFLP) em cinco segmentos intragênicos amplificados por PCR. Uma deleção de aproximadamente 700 pb foi evidenciada em uma paciente, provavelmente em região intrônica, pois não foi observada qualquer alteração fenotípica no esmalte dental. Foram detectadas duas formas variantes com relação ao padrão de restrição da enzima *Rsa* I no segundo intron do gene. O trabalho também reportou a extração e amplificação de DNA genômico de alta massa molecular a partir de células epiteliais em processo de descamação da mucosa bucal. O método de obtenção de DNA a partir dessas células é não-invasivo, rápido, fácil e barato, sendo especialmente indicado na coleta de DNA de crianças e pessoas relutantes em doar sangue. Além disso, não apresenta riscos de infecção e dispensa a supervisão médica, podendo ser utilizado com sucesso em amostragens populacionais de larga escala e em estudos epidemiológicos.

ABSTRACT

The study aimed to search for polymorphisms of the amelogenin X (AMGX) gene. It analyzed 79 female individuals (158 chromosomes), from different races, as for the variations of restriction sites (RFLP) of five fragments of the AMGX amplified by PCR. A deletion of about 700 bp was observed in one of the patients, probably in an intronic region. No phenotypic alterations were noted in the dental enamel of this individual. Two variant forms were visualized with two different patterns of restriction of the enzyme *Rsa* I in the second intron of the gene. The number of women studied is small to precisely determine the frequency of the alleles in the population. The work also reported the extraction and amplification of genomic DNA of high molecular mass from epithelial cells of the buccal mucosa. The method using DNA obtained from these cells is easy, rapid, cheap and non-invasive, being especially indicated for DNA collection of children and people reluctant to donate blood. In addition, it does not present risks of infection and require no medical supervision. It can be successfully employed in large scale populational samplings and in epidemiological studies.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A principal proteína envolvida na formação do esmalte dental humano é a amelogenina (EISENMANN, 1994). Ela atua como matriz insolúvel sobre a qual ocorre a deposição de cristais de hidroxiapatita durante a fase de mineralização do esmalte. A amelogenina é rapidamente degradada assim que se inicia a calcificação do esmalte (CHEN *et al.*, 1994; CATALANO-SHERMAN *et al.*, 1993; COUWENHOVEN & SNEAD, 1994; FINCHAN *et al.*, 1989; FINCHAN *et al.*, 1990). Além de participar da formação do esmalte dental, a amelogenina também influencia diretamente características fenotípicas, tais como sua dureza e espessura. Estudos de mapeamento cromossômico em humanos mostraram que o gene da amelogenina se localiza nos braços curtos dos cromossomos X (Xp22.31-Xp22.1) e Y (Yp11) (NAKAHORI *et al.* 1991; SALIDO *et al.*, 1992). A existência de dois genes homólogos que codificam a amelogenina nos cromossomos X e Y (AMGX e AMGY) é certamente um dos fatores responsáveis pelo dimorfismo sexual em dentes humanos: a coroa dental é normalmente maior em indivíduos do sexo masculino (ALVESSALO, 1971). A inativação de um cromossomo dos X nas mulheres permite que os homens expressem potencialmente mais produto gênico (SALIDO *et al.*,

1992). Um mecanismo de processamento diferencial do RNAm (o “splicing” alternativo do RNAm) está envolvido em gerar uma família heterogênea de amelogeninas da matriz a partir de um único gene (SALIDO *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1998). Existem evidências de que haja também heterogeneidade da amelogenina em nível interindividual, em função da existência de polimorfismo nesse gene, o que provavelmente contribui na determinação de características peculiares e individuais ao esmalte dental humano (LAU *et al.*, 1990). Alterações de caráter hereditário em ambas as dentições, decídua e permanente, como a *Amelogênese Imperfecta*, determinam condições patológicas relevantes no que tange à função e estética do órgão dental (BACKMAN & HOLM, 1986; BACKMAN & HOLMGREN, 1988; WITKOP & SAUK, 1976). Evidências experimentais indicam que os dois homólogos (AMGX e AMGY) são normalmente transcritos, sendo que o AMGX responde por cerca de 90% da mensagem (GIBSON *et al.*, 1992). Este fato poderia explicar porque a *Amelogênese Imperfecta* ligada ao X é mais branda em indivíduos do sexo feminino.



***REVISÃO DE
LITERATURA***

REVISÃO DE LITERATURA

Amelogênese

O desenvolvimento do órgão dental é um processo complexo que envolve eventos biológicos importantes, como a interação epitélio-mesênquima (TEN CATE, 1994). O esmalte dental é um tecido de origem ectodérmica formado a partir das células do epitélio interno do órgão do esmalte (CHEN *et al.*, 1998). No final do estágio de campânula, as células do epitélio interno do órgão dental cessam sua divisão e sofrem intensas modificações estruturais, tornando-se alongadas com núcleo localizado apicalmente distante da papila dental. As células do mesênquima subjacente ao epitélio interno, sob influência deste último, aumentam de tamanho, adquirindo forma cilíndrica, dando origem aos odontoblastos. Estas células passam a secretar matriz orgânica constituída principalmente por colágeno e proteoglicanos. Concomitantemente à deposição da matriz, os odontoblastos migram em direção ao centro da papila, deixando uma projeção citoplasmática conhecida como prolongamento dos odontoblastos. Após o início da formação da dentina, as células alongadas do epitélio interno, denominadas agora ameloblastos, migram em direção oposta à

dentina, depositando uma matriz orgânica ao longo do seu trajeto. Essa matriz servirá como suporte para a deposição de minerais que vão formar o esmalte dentário (LINE *et al.*, 1996). A amelogênese pode ser simplificada em duas etapas principais: a fase secretória e a fase de maturação do esmalte. Na fase secretória há a secreção das proteínas da matriz orgânica do esmalte. A matriz orgânica do esmalte dental é composta por amelogeninas (cerca de 90% de sua composição), 5% a 10% de amelina/ameloblastina, 2% de enameline, e 1% de tuftelina, se presente. Existem também na matriz, enzimas: metaloproteases, serina proteases, fosfatases, sulfatases, e outras proteínas não-colagênicas (TEN CATE, 1994). Já na fase secretória, a matriz se encontra parcialmente mineralizada, em cerca de 30%. Quando a espessura do esmalte é atingida, inicia-se a fase de maturação do esmalte. A fase de maturação do esmalte é caracterizada por um influxo maciço de íons de cálcio e fosfato para dentro da matriz. Assim, os cristais de hidroxiapatita crescem ao mesmo tempo que ocorre a remoção das proteínas e água da matriz. O esmalte dental é um tecido muito peculiar, por três motivos principais: sua origem ectodérmica, os demais tecidos mineralizados do organismo são de origem mesodérmica; sua dureza, 90% de mineralização, enquanto a dentina e osso apresentam-se

mineralizados em cerca de 70%, e sua matriz orgânica, que não é colágeno do tipo I, como é o caso da dentina e do osso.

Amelogeninas

A matriz do esmalte, depositada na fase secretória, é constituída principalmente de proteínas denominadas amelogeninas (CHEN *et al.*, 1994; COUWENHOVEN & SNEAD, 1994). A amelogenina é expressa exclusivamente pelos ameloblastos nas fases iniciais do broto dentário, sendo rapidamente degradada já no início da calcificação do esmalte (TENCATE, 1994). Ela é formada por uma única cadeia polipeptídica, cuja massa molecular pode variar entre 25 kDa e 30 kDa (CATALANO-SHERMAN *et al.*, 1993). A amelogenina é rica em aminoácidos hidrofóbicos, principalmente prolina e leucina que tornam a proteína bastante insolúvel em soluções aquosas (CATALANO-SHERMAN *et al.*, 1993; FINCHAN *et al.*, 1989; FINCHAN *et al.*, 1990). Essas propriedades químicas conferem à molécula a possibilidade de desempenho de suas funções biológicas. Grande parte da heterogeneidade das amelogeninas é devida à sua clivagem pós-secretória por enzimas proteolíticas; mas, mesmo depois de clivada em polipeptídeos de baixa massa molecular, grupamentos

hidrofóbicos garantem a manutenção de sua natureza apolar. É possível que as amelogeninas e estes polipeptídeos de baixa massa molecular atuem como matriz insolúvel, sobre as quais ocorre a deposição dos cristais de hidroxiapatita durante a fase de secreção do esmalte (TEN CATE, 1994; LI *et al.*, 1998). Não se sabe ao certo como se dá a precisa relação entre as amelogeninas e os cristais de hidroxiapatita, mas acredita-se que elas regulem de alguma forma a biomineralização do esmalte dental (TEN CATE, 1994). A importância desta proteína na formação do esmalte dental é especialmente notada em análises genéticas de famílias portadoras da Amelogênese *Imperfecta* (AI). A AI é uma alteração de caráter hereditário, que afeta o esmalte dental em ambas as dentições, decídua e permanente (BACKMAN & HOLM, 1986). Ela pode ser do tipo hipoplásico (esmalte com pouca espessura associado a falhas na superfície) ou do tipo hipomineralizado (insuficientemente mineralizado, de consistência mais mole que o normal). A AI pode ser autossômica dominante, recessiva ou ligada ao cromossomo X (BACKMAN & HOLMGREN, 1988; WITKOP & SAUK, 1976). A causa da AI ligada ao cromossomo X está relacionada a mutações no gene da amelogenina (LAGERSTROM-FERMÉR *et al.*, 1991; LAGERSTROM-FERMÉR *et al.*, 1993).

Gene da amelogenina

O gene da amelogenina é expresso tanto em invertebrados inferiores, como anfíbios adultos e répteis, quanto em mamíferos (LYNGSTADAAS *et al.*, 1990; ISHIYAMA, *et al.*, 1998). Análises de seqüenciamento mostraram que a amelogenina é bastante conservada entre os mamíferos, tanto em regiões codificadoras quanto intrônicas (FINCHAN *et al.*, 1983; SNEAD *et al.*, 1985). Em várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, o gene da amelogenina localiza-se nos braços curtos dos cromossomos X (Xp22.31-Xp22.1) e Y (Yp11) (NAKAHORI *et al.*, 1991), sendo que ambos são normalmente transcritos (GIBSON *et al.*, 1992; SALIDO *et al.*, 1992). Os genes AMGX e AMGY mostram grandes similaridades na sua estrutura e seqüência. A principal diferença entre eles parece ser uma inserção de 177 pb no 3° íntron do AMGX (NAKAHORI *et al.*, 1991). Ambos são formados por 7 éxons, com homologia de aproximadamente 90 %, sendo esta homologia ligeiramente maior nos éxons (SALIDO *et al.*, 1992). Seus transcritos são diferencialmente processados, gerando pelo menos 5 tipos de mRNA (SALIDO *et al.*, 1992), o que proporciona expressão de amelogeninas com certo grau de heterogeneidade.

Apesar de o AMGX ser responsável por cerca de 90 % da expressão protéica, o dimorfismo sexual entre a coroa dental de indivíduos dos dois sexos parece ser devido a fatores genéticos não-hormonais (ALVESSALO, 1971), já que indivíduos que apresentam distúrbios genéticos ligados aos cromossomos sexuais, como a Síndrome de Feminização Testicular (cariótipo 46, XY), caracterizada pela incapacidade das células de responderem a hormônios androgênicos, apresentam dentes com coroa compatível à de indivíduos normais do sexo masculino (ALVESSALO & VAMELA, 1980), e, por outro lado, uma deleção no braço curto do cromossomo Y proporciona, nos indivíduos que apresentam esta mutação, uma coroa dental menor que em indivíduos normais do mesmo sexo (ALVESSALO & DE LA CHAPELLE, 1981). Pacientes do sexo feminino com cariótipo 47, XXX possuem esmalte mais espesso que indivíduos normais (ALVESSALO *et al.*, 1987), enquanto que aqueles com cariótipo 45, XO, portadores da Síndrome de Turner, apresentam esmalte com menor espessura (ALVESSALO & TAMMISALO, 1981).

A heterogeneidade da amelogenina parece ainda ser determinada por polimorfismos gênicos entre indivíduos (FINCHAN *et al.*, 1989). Polimorfismo genético é definido como a ocorrência de múltiplos alelos em

um determinado *locus*, onde pelo menos 2 alelos aparecem com frequência maior que 1% na população (THOMPSON *et al.*, 1991). Há relato de um sítio polimórfico para a enzima de restrição *Taq* I no gene AMGY (LAU *et al.*, 1990). Grande parte das análises genéticas que possibilitam o diagnóstico de doenças hereditárias e as utilizadas com aplicação forense, como testes de identificação criminal e de exclusão de paternidade, é baseada em polimorfismos genéticos (GILL *et al.*, 1985). Calcula-se que aproximadamente 1/3 dos genes exibam certo grau de polimorfismo (CAVALLI-SFORZA & BODMER, 1971; HARRIS, 1980). Os homólogos AMGX e AMGY são utilizados em humanos no diagnóstico de doenças hereditárias, como é o caso da Amelogênese *Imperfecta* ligada ao X, e em testes de tipagem sexual. A determinação do sexo é de inestimável valor em pesquisas forenses, como na identificação individual (ROUSSELET *et al.*, 1996) e na análise de restos arqueológicos (FAERMAN *et al.*, 1995; STONE *et al.*, 1996), e na tipagem sexual em casos de hermafroditismo e outras síndromes que envolvam cromossomos sexuais (COPELLI *et al.*, 1996). Testes de tipagem sexual se baseiam na amplificação de seqüências específicas dos dois genes e eletroforese para a identificação/separação dos dois homólogos. A região do 3° íntron que contém a inserção de 177 pb no

gene da amelogenina X é amplificada, produzindo seqüências de 977(X) e 780(Y) pb (COPELLI *et al.*, 1996). Também, segmentos de 330(X)-218(Y) pb, que abrangem parte desta inserção são utilizados (FAERMAN *et al.*, 1995). A opção principal em análises forenses e de remanescentes arqueológicos é a amplificação de fragmentos de ainda menor tamanho, como os produtos de 106(X)-112 pb(Y), por deleção de 6 pb no 3° íntron do alelo X (SULLIVAN *et al.*, 1993; MANNUCCI *et al.*, 1994), e as seqüências de 112 pb (X e Y) no éxon 6, com a diferença de apenas 2 pb entre os alelos (STONE *et al.*, 1996). Desde que as seqüências requeridas para amplificação são relativamente pequenas, mesmo o DNA altamente degradado pode conferir tipagem satisfatória (BUEL *et al.*, 1995; FAERMAN *et al.*, 1995; ROUSSELET *et al.*, 1996; STONE *et al.*, 1996; LAFOUNTAIN *et al.*, 1998).

RFLP-PCR

O desenvolvimento de técnicas como a amplificação de DNA *in vitro* (PCR) tem revolucionado a análise de genes ao nível de seqüências de nucleotídeos. O número crescente de métodos de Biologia Molecular tem evoluído para capacitar análises genéticas de seqüências específicas do

genoma, com reduções da necessidade de qualidade e quantidade de material, tempo e trabalho. A identificação e caracterização de mutações têm contribuído significativamente para a compreensão de mecanismos e caminhos dos processos fenotípicos normais e da patogênese de doenças. Dentre os métodos utilizados para a detecção da presença de diferenças na sequência de um dado fragmento de DNA, se encontra a *RFLP* (*restriction fragment length polymorphism*), que se utiliza de endonucleases que clivam sequências específicas pequenas, de quatro a oito nucleotídeos. Assim, a presença ou ausência de mutações puntiformes e polimorfismos podem ser detectados pela ocorrência ou resistência à clivagem de restrição (YAP & Mc Gee, 1994).

PCR a partir de células do epitélio bucal

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é tão específica que permite que uma sequência intrínseca de um gene seja amplificada a partir de uma mistura heterogênea de DNA humano íntegro, sequências contaminantes e DNA parcialmente degradado (LENCH *et al.*, 1988). Além de específica, a técnica é de tal forma sensível que é extremamente utilizada para análise de material biológico encontrado em cenas de crimes, como

sangue e saliva. O DNA extraído a partir de 1 μ L de saliva proporciona resultados semelhantes a tipagens com 10 μ L de sangue total (SWEET, 1997). De acordo com FRIDEZ & COQUOZ (1996), as pessoas deixam entre 2 a 10 μ L de saliva em selos de postagem, sendo possível extrair cerca de 1 a 50 ng de DNA por selo. Tocos de cigarro fornecem entre 2 e 160 ng de DNA (HOCHMEISTER *et al.*, 1991). Apesar da relativa facilidade com que a extração e caracterização de DNA a partir dessas fontes são possíveis, a análise genética de um grande número de indivíduos por métodos moleculares é freqüentemente restringida pela disponibilidade de DNA. Além de esbarrar em limitações como quantidades por vezes insuficientes de DNA e a presença de inibidores da PCR, a aplicação destas técnicas ainda não é viável na amostragem populacional de larga escala.

PROPOSTA DE EMENDA À CONSTITUIÇÃO Nº 100, DE 2018

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O mapeamento e caracterização de genes relacionados a anomalias genéticas contribuem para a compreensão dos processos biológicos normais e podem auxiliar no diagnóstico de doenças hereditárias (LINE *et al.*, 1996).

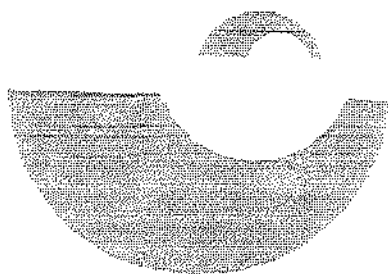
A proposta do presente trabalho abrange dois objetivos específicos:

Objetivo específico 1:

Amplificação de seqüências de grande massa molecular a partir do DNA genômico obtido de células epiteliais da mucosa bucal, pela técnica de PCR.

Objetivo específico 2:

Investigação da presença de polimorfismos no gene da amelogenina X, através da digestão dos produtos de amplificação com enzimas de restrição (RFLP).



MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do DNA

A obtenção do material foi realizada mediante o consentimento do grupo amostral, após breve explanação dos objetivos do estudo, segundo as recomendações de ética para os projetos financiados pela FAPESP. O DNA genômico foi obtido de 86 mulheres (172 cromossomos X) supostamente não-aparentadas e desprovidas de genitores consangüíneos. O grupo amostral constituiu-se de 29 mulheres caucasóides (de ascendência européia), 27 negróides (de descendência provavelmente africana), 28 asiáticas (descendentes japonesas) e 2 indianas da população brasileira, selecionadas por suas características físicas e investigação da história genealógica. A proposta de analisarem-se mulheres pertencentes a diferentes etnias não visou a comparação de polimorfismos entre os grupos, mas constituiu-se em estratégia para aumentar a possibilidade de detecção de polimorfismos que eventualmente pudessem ser mais freqüentes em um determinado grupo racial.

Um bochecho com 5 mL de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) era realizado por cerca de 2 min, juntamente com uma leve raspagem da mucosa jugal com espátula de

madeira esterilizada. Esta espátula era mergulhada e agitada na solução previamente bochechada. Essa concentração de glicose é desejada para que as células estejam intactas até que os procedimentos de extração do DNA propriamente ditos sejam executados, minimizando o índice de degradação molecular, pela liberação de enzimas catalíticas. Os protocolos da literatura que utilizam bochecho e raspagem da mucosa bucal como métodos de obtenção de DNA, o fazem invariavelmente com o objetivo de amplificar seqüências de pequena massa molecular, em estudos de prevalência viral na cavidade bucal (ROBINSON *et al.*, 1992; OSTWALD *et al.*, 1994), não utilizando, portanto, DNA genômico humano, mas viral. O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção do material de estudo, pois constitui o método menos invasivo e prático de obtenção de DNA. O tecido ou tipo de célula dos quais o DNA é extraído não faz diferença nesta análise, pois visa-se a amplificação de regiões do gene que codifica a proteína amelogenina pertencente ao cromossomo X. Dessa forma, a colheita se faria facilmente e sem entraves do ponto de vista ético.

Esta solução era imediatamente levada ao laboratório para a execução de uma centrifugação por 10 min a 2000 rpm (raio da centrífuga de 15 cm) para a colheita da fase celular. Para a suspensão das células, acrescentavam-

se 500 μ L de tampão de extração [Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 5 mM, SDS a 0,5%, 600 U/mL de garamicina/gentamicina] e as células eram congeladas a -20°C até o momento de extração do DNA.

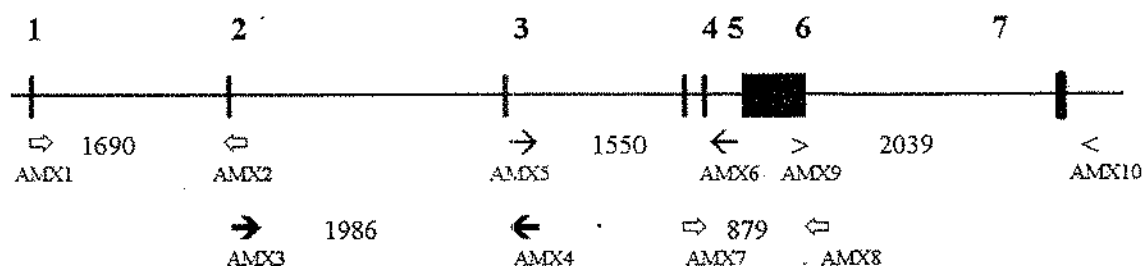
Extração do DNA

Após descongeladas, as amostras em tampão de extração foram incubadas *overnight* (ON) com 100 ng/mL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 37°C , sob agitação. O DNA foi então purificado através de duas extrações sucessivas com Fenol/Clorofórmio e precipitação com acetato de sódio a 2,5 M (pH 5,2) e etanol (MANIATIS *et al.*, 1989). O DNA foi ressuspenso em 70 μ L de tampão TE [Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM] à temperatura ambiente, ON. A concentração do DNA genômico de cada uma das 86 mulheres estudadas foi determinada pela leitura em OD^{260} e o índice de pureza estimado pela razão $\text{OD}^{260}/\text{OD}^{280}$, com o auxílio de um espectofotômetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator-Pharmacia-Biotech).

Reação em cadeia da *Taq* DNA polimerase (PCR)

Quantidades entre 300 e 700 ng de DNA foram utilizadas num volume de 50 μ L de reação contendo Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50

mM, MgCl_2 a 4 mM, desoxirribonucleotídeos (200 μM cada), *primers* a 1 μM e 2U de *Taq* DNA polimerase (Amersham *Pharmacia-Biotech*, Uppsala, Sweden). Cinco pares de *primers* foram utilizados, como segue:



Os números de 1 a 7 indicam os éxons do gene AMGX, representados por barras verticais (éxons 1, 2, 3, 4, 5 e 7) ou caixa (éxon 6). As linhas horizontais representam os íntrons. Os pares de setas iguais indicam pares de oligonucleotídeos que amplificam os segmentos, cujo tamanho está representado entre as setas (*primers*) que os amplificam. Os *primers* foram confeccionados sobre as seqüências de nucleotídeos do gene da amelogenina X descritas nos trabalhos de NAKAHORI *et al.* (1991) e SALIDO *et al.* (1992)



RESULTADOS

Primers:

AMX1 - 5' GGATTGGTTGTTACAGATGCC 3'

AMX2 - 5' TTA CTCACAGGCATGGCAAAAGCTGC 3'

AMX3 - 5' CAT TTCAGA ACCATCAAGAAATGGG 3'

AMX4 - 5' CTTTACAGAGCCCAGGGCATTG 3'

AMX5 - 5' CCTCCCTGTAAAAGCTACCACC 3'

AMX6 - 5' AATGTCTACATAACCGGTGGCC 3'

AMX7 - 5' GTAGAACTCACATTCTCAGGC 3'

AMX8 - 5' GGCTTCAAAATATACTCACC ACTTCC 3'

AMX9 - 5' CCAGCCCCAGCCTGTTCAGCCAC 3'

AMX10 - 5' TGTCTGCTAATGGTACTTTTTTAG 3'

O DNA genômico foi desnaturado inicialmente a 95°C por 5 min. As amostras foram submetidas a 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo compreendeu 50 s de desnaturação, 1 min de anelamento a 67°C e 2 min de extensão a 72°C, com 7 min finais de extensão para término da polimerização das seqüências amplificadas. Seqüências de 1690 pb (AMX1 e AMX2), 1986 pb (AMX3 e AMX4), 1550 pb (AMX5 e AMX6), 879 pb (AMX7 e AMX8) e 2039 pb (AMX9 e AMX10) foram amplificadas,

através da técnica de PCR em um termociclador convencional (*GeneAmp®PCR System 2400*).

Polimorfismo por comprimento dos fragmentos de restrição (*RFLP*)

Cada uma das cinco seqüências amplificadas, produto da *PCR*, foi submetida à digestão com enzimas de restrição para análise de *RFLP*, da seguinte forma:

***Hha* I (GCG↓C)** - 8 µL de DNA amplificado eram adicionados a 12 µL de tampão *one-phor-all* 2X (Tris-acetato a 20 mM, pH 7,5, acetato de magnésio a 20 mM e acetato de potássio a 100 mM - *Pharmacia -Biotech*), contendo 1 U da enzima. As amostras eram colocadas em estufa a 37°C e digeridas ON.

***Rsa* I (GT↓AC)** - 8 µL de DNA amplificado eram adicionados a 12 µL de tampão *one-phor-all* 1X (Tris-acetato a 10 mM, pH 7,5, acetato de magnésio a 10 mM e acetato de potássio a 50 mM - *Pharmacia*), contendo 1 U da enzima. As amostras eram colocadas em estufa a 37°C e digeridas ON.

Hpa II (C↓CGG) - 8 µL de DNA amplificado eram adicionados a 12 µL de tampão *one-phor-all* 1X, contendo 1 U da enzima. As amostras eram colocadas em estufa a 37°C e digeridas ON.

Taq I (T↓CGA) - 8 µL de DNA amplificado eram adicionados a 12 µL de tampão *one-phor-all* 1X, contendo 1 U da enzima. As amostras eram colocadas em banho-maria a 65°C e digeridas ON.

As enzimas de restrição foram selecionadas com base em alguns critérios. Primeiramente, três delas são sensíveis à metilação e, portanto, constituem *hot spots*, ou seja, locais onde mutações podem ocorrer com mais frequência. Além disto, reconhecem seqüências pequenas, de quatro nucleotídeos, mais facilmente encontradas ao longo dos fragmentos amplificados. Como o gene da amelogenina X não é totalmente conhecido, apenas as seqüências já reportadas foram averiguadas quanto à presença de sítios de restrição para as enzimas que seriam utilizadas.

Eletroforese das amostras

As seqüências amplificadas eram submetidas à eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 5% em TBE 1X (89 mM de Tris-Borato, 89

mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA) para sua visualização. Quantidades de 5 a 10 μ L de amostra de DNA amplificado eram adicionadas a 5 a 10 μ L de água acrescida de 3 μ L de tampão de amostra para eletroforese (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30% em água). Os géis eram submetidos a uma corrente elétrica de 25 mA, cujo tempo de eletroforese era de aproximadamente 2,5 h, até cerca de 2 cm antes do início da saída do corante azul de bromofenol do gel. A concentração de 5% e a amperagem de corrida foram mantidas para a análise dos fragmentos de restrição, sendo o tempo de corrida variável de acordo com o tamanho destes fragmentos. Neste caso, todos os 20 μ L eram dispensados nas canaletas do gel acrescidos de 4 μ L de tampão de amostra de eletroforese. Utilizou-se como padrão o marcador de massa molecular ϕ X174-RF *Hae*III DNA *digest* (1 μ L em 14 μ L de água e 3 μ L de tampão de amostra).

Os géis eram corados pela técnica da prata (BLUM *et al.*, 1987) ou através do *kit* de coloração pela prata da *Bio-Rad* (*Bio-Rad* Silver Stain Kit). Os géis foram fotografados através de sistema de documentação digital (*Scientific Digital Documentation System – KODAK*).

RESULTADOS

Obtenção de DNA

A quantidade de DNA extraído esteve entre 2 e 360 μg . A concentração e índice de pureza do DNA genômico de cada uma das 86 mulheres inicialmente presentes na amostra, bem como a categoria étnica a que as mesmas pertencem, são mostrados na tabela 1. As amostras 70, 75 e 81 não foram consideradas, pois parte delas foi perdida durante os procedimentos de extração de DNA, e sua quantidade final não permitiu a amplificação de todos os fragmentos. Os DNAs correspondentes às amostras 1, 12, 51 e 53 não apresentaram amplificação nem mesmo quando os *primers* para o gene da β -globina (controle positivo de integridade do DNA) foram utilizados, sugerindo más condições de extração (DNA parcialmente degradado, co-precipitação de proteínas inibidoras). Assim, 79 indivíduos do sexo feminino foram investigados (158 cromossomos X) quanto à presença de polimorfismos, sendo 25 japonesas (amarelas), 28 caucasóides (brancas), 24 negróides (negras) e 2 indianas.

Amplificação das seqüências gênicas por PCR

O sucesso da amplificação dos fragmentos gênicos, entre 879 pb e 2039 pb, foi em média de 94 % para as seqüências estudadas (Tab. 2).

As figuras 1A (canaletas 2 a 13) e 1B (2 a 5) mostram as seqüências de 1690 pb, de 16 pacientes, amplificadas pelos *primers* AMX1 e AMX2. Na canaleta 5 da figura 1B (paciente 29) podem ser observadas duas bandas coradas pela prata. Em vez de apenas uma banda equivalente à seqüência de 1690 pb, uma banda adicional foi evidenciada, com cerca de 1000 pb. Esta observação pode estar sugerindo uma deleção dentro da seqüência amplificada pelos *primers* AMX1 e AMX2 (região do 1° ao 2° éxon).

Os segmentos de 1986 pb, amplificados pelos *primers* AMX3 e AMX4, podem ser vistos nas canaletas 2 a 18 da figura 2.

Os fragmentos gênicos de 1550 pb, amplificados pelos *primers* AMX5 e AMX6, podem ser notados na figura 3 (canaletas 2 a 17).

A figura 4 mostra a amplificação das seqüências de 879 pb pelos *primers* AMX7 e AMX8 (canaletas 2 a 12).

A figura 5 proporciona a visualização dos fragmentos de 2039 pb amplificados pelos *primers* AMX9 e AMX10 (canaletas 2 a 15).

Os géis observados nas figuras 1A, 2, 3, 4 e 5 representam o padrão de amplificação de todas as pacientes, cuja sequência foi passível de amplificação. A primeira canaleta destes géis mostra o padrão de massa molecular ϕ X174-RF *Hae*III DNA *digest*. A amplificação das cinco sequências de cada uma das 79 mulheres abrange todo o gene da amelogenina X destas pacientes.

Análise de RFLP

As sequências referentes aos cinco segmentos intragênicos amplificados de cada uma das 79 mulheres analisadas foram sujeitas à digestão com as enzimas de restrição *Hha* I (GCG↓C), *Rsa* I (GT↓AC), *Hpa* II (C↓CGG) e *Taq* I (T↓CGA). As figuras de 6 a 10 mostram cada qual quatro géis. Os quatro géis de cada figura apresentam fragmentos amplificados por um dos cinco pares de *primers* utilizados, digeridos pelas quatro enzimas de restrição empregadas neste estudo.

A digestão dos fragmentos de 1690 pb (*primers* AMX1 e 2) com a *Hha* I (Fig. 6A) e com a *Hpa* II (Fig. 6C) não conferiu a formação de sequências de restrição nas mulheres estudadas. A figura 6B mostra a digestão com a enzima *Rsa* I, que proporcionou a visualização de um

segmento de cerca de 780 pb, um de 600 pb e outro de 270 pb em todas as pacientes, com exceção da amostra 29 (última canaleta), que apresentou duas bandas peculiares adicionais de aproximadamente 380 pb e 350 pb, possivelmente decorrentes da existência de sítio(s) de restrição na sequência de cerca de 1000 pb. A paciente 29 (branca) apresentou padrão diferente das demais, com a presença de dois alelos (1690 pb e 1000 pb), já visualizados no gel após amplificação (Fig. 1B). A confirmação da presença de heterozigose por deleção de aproximadamente 700 pb em um dos alelos só poderá ser obtida após seqüenciamento dos dois alelos, já que não são descritas as seqüências do primeiro e segundo íntrons. A *Taq* I gerou fragmentos de 1300 pb e 400 pb em todas as pacientes amostradas (Fig. 6D).

Os fragmentos amplificados de 1986 pb (*primers* AMX3 e 4), digeridos pela *Hha* I e pela *Taq* I não apresentaram sítios de restrição para essas duas enzimas, proporcionando a visualização do padrão de bandas observado nas figuras 7A e 7D, respectivamente. Já a digestão com a *Rsa* I forneceu a observação de uma banda de aproximadamente 1400 pb (presente em apenas 16% das mulheres analisadas), na maior parte negras; uma de cerca de 880 pb, uma de aproximadamente 620 pb e outras duas

menores: uma de 350 pb e outra de 280 pb (Fig 7B). A presença do segmento de 1400 pb sugere, se não digestão incompleta, ausência do sítio de restrição presente neste segmento em 94% das mulheres analisadas. A figura 11 mostra um esquema representando os dois alelos em heterozigose (o que contém e o que não possui o sítio de restrição no segmento de 1400 pb). A digestão com a *Hpa* II mostra duas bandas em todas as mulheres estudadas: uma de aproximadamente 1350 pb e outra de cerca de 650 pb (Fig. 7C).

As seqüências de 1550 pb (*primers* AMX5 e AMX6), digeridas com a *Hha* I (Fig. 8A), com a *Rsa* I (Fig. 8B), e com a *Hpa* II (Fig. 8C), não geraram fragmentos, o que dá indícios da inexistência de sítios de restrição para estas enzimas. A digestão com a *Taq* I forneceu um segmento de 800 pb (Fig. 8D) e outro(s) não passível (eis) de observação, possivelmente pelo seu pequeno tamanho.

Os segmentos de 879 pb (*primers* AMX7 e 8) resultantes da digestão enzimática com a *Hha* I aparentemente não apresentam sítios de restrição para esta enzima (Fig. 9A). A enzima *Rsa* I gerou fragmentos de aproximadamente 500 pb e 280 pb (Fig. 9B). A *Hpa* II proporcionou a observação de um fragmento de cerca de 700 pb e outro de

aproximadamente 180 pb (Fig. 9C). A digestão com a *Taq* I não forneceu fragmentos, o que sugere a ausência de sítios de restrição para esta enzima neste trecho de DNA (Fig. 9D).

As seqüências de 2039 pb (*primers* 9 e 10) não apresentaram sítios de restrição para as enzimas *Hha* I (Fig. 10A), *Hpa* II (Fig. 10C) e *Taq* I (Fig. 10D), conferindo o padrão de apenas uma banda de 2039 pb. A digestão com a *Rsa* I, no entanto, proporcionou a observação de um padrão de restrição, com bandas de cerca de 790 pb, 600 pb e 250 pb (Fig 10B).

TABELAS

Tab. 1 - Leitura em espectrofotômetro da concentração e grau de pureza do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa de indivíduos do sexo feminino.

Amostras	Grupo Racial	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	[] em ng/uL
1	AMARELO	1,374	320
2	AMARELO	1,847	320
3	AMARELO	1,746	130
4	AMARELO	1,839	240
5	AMARELO	1,771	360
6	AMARELO	1,793	480
7	AMARELO	1,281	910
8	AMARELO	1,642	340
9	AMARELO	1,374	90
10	AMARELO	1,894	60
11	AMARELO	1,846	210
12	AMARELO	1,692	130
13	AMARELO	1,778	130
14	AMARELO	1,819	70
15	INDIANO	1,723	220
16	INDIANO	1,759	350
17	BRANCO	1,8	210
18	BRANCO	1,75	310
19	BRANCO	1,76	1010
20	BRANCO	1,729	370
21	BRANCO	1,751	260
22	BRANCO	1,787	200
23	BRANCO	1,6	380
24	BRANCO	1,7	30
25	BRANCO	2,051	50
26	BRANCO	1,7	150
27	NEGRO	1,771	1270
28	BRANCO	1,713	120
29	BRANCO	1,783	260
30	BRANCO	1,877	400
31	AMARELO	1,8	170
32	BRANCO	1,807	1090
33	BRANCO	1,76	380
34	BRANCO	1,752	390
35	BRANCO	1,956	6260
36	BRANCO	1,778	240
37	AMARELO	1,568	80
38	NEGRO	1,739	100
39	NEGRO	1,761	400
40	AMARELO	1,766	680
41	NEGRO	1,788	1000
42	BRANCO	1,626	1230
43	NEGRO	2,159	50

Tab. 1 - Leitura em espectrofotômetro da concentração e grau de pureza do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa de indivíduos do sexo feminino.

Amostras	Grupo Racial	OD ²⁶⁰ /OD ²⁸⁰	[] em ng/uL
44	BRANCO	1,8	360
45	BRANCO	1,793	690
46	NEGRO	1,785	560
47	BRANCO	2,238	100
48	BRANCO	1,762	430
49	BRANCO	1,868	120
50	BRANCO	1,68	50
51	BRANCO	2,063	120
52	BRANCO	1,83	390
53	AMARELO	1,925	280
54	NEGRO	0,9	740
55	AMARELO	1,694	1010
56	AMARELO	1,553	2570
57	NEGRO	1,748	310
58	AMARELO	1,766	670
59	NEGRO	1,789	280
60	NEGRO	1,732	480
61	BRANCO	1,809	930
62	NEGRO	1,735	610
63	NEGRO	1,798	400
64	AMARELO	1,983	190
65	AMARELO	1,792	550
66	AMARELO	1,782	560
67	AMARELO	1,837	330
68	NEGRO	1,8	180
69	NEGRO	1,744	520
70	NEGRO	1,830	70
71	NEGRO	1,713	400
72	NEGRO	1,806	570
73	NEGRO	1,797	530
74	NEGRO	1,712	280
75	NEGRO	1,919	110
76	NEGRO	1,8	260
77	NEGRO	1,757	280
78	NEGRO	1,788	540
79	BRANCO	1,775	630
80	NEGRO	1,898	120
81	NEGRO	1,675	220
82	NEGRO	1,772	320
83	NEGRO	1,793	130
84	AMARELO	1,767	570
85	AMARELO	1,774	300
86	AMARELO	1,699	450

Tabela 2 - Amplificação das seqüências intragênicas da amelogenina X.
A: japonesas, **B:** caucasóides, **N:** negróides e **I:** indianas.

DNA	$\frac{A}{M}$ $\frac{X}{X}$ 1 e 2 1690 pb	$\frac{A}{M}$ $\frac{X}{X}$ 3 e 4 1986 pb	$\frac{A}{M}$ $\frac{X}{X}$ 5 e 6 1550 pb	$\frac{A}{M}$ $\frac{X}{X}$ 7 e 8 879 pb	$\frac{A}{M}$ $\frac{X}{X}$ 9 e 10 2039 pb
2 A	+	+	+	+	-
3 A	+	+	+	+	+
4 A	+	+	+	+	+
5 A	+	+	+	+	-
6 A	+	+	+	+	+
7 A	+	+	+	+	+
8 A	+	+	+	+	+
9 A	+	+	+	+	+
10 A	+	+	+	+	-
11 A	+	+	+	+	+
13 A	+	+	+	+	+
14 A	+	+	+	+	+
15 I	+	+	+	+	+
16 I	+	+	+	+	+
17 B	+	+	+	+	+
18 B	+	+	+	+	+
19 B	+	+	+	+	+
20 B	+	+	+	+	+
21 B	+	+	+	+	+
22 B	+	+	+	+	+
23 B	+	+	+	+	+
24 B	+	+	-	+	+
25 B	-	-	+	-	-
26 B	+	+	+	+	+
27 N	+	+	+	-	+

Tabela 2 - Amplificação das seqüências intragênicas da amelogenina X.

A: japonesas, B: caucasóides, N: negróides e I: indianas.

DNA	A M X 1 e 2	A M X 3 e 4	A M X 5 e 6	A M X 7 e 8	A M X 9 e 10
	1690 pb	1986 pb	1550 pb	879 pb	2039 pb
28 B	+	+	+	+	+
29 B	+	+	+	+	+
30 B	+	+	+	+	+
31 A	+	+	+	+	+
32 B	+	+	+	+	+
33 B	+	+	+	+	+
34 B	+	+	+	+	+
35 B	+	+	+	+	+
36 B	+	+	+	-	+
37 A	+	+	+	+	+
38 N	+	+	+	+	+
39 N	+	+	+	+	+
40 A	+	+	+	+	+
41 N	+	+	+	+	+
42 B	+	+	+	+	+
43 N	+	+	+	+	+
44 B	+	+	+	+	+
45 B	+	+	+	+	+
46 N	+	+	+	-	+
47 B	+	-	+	+	+
48 B	+	+	+	+	+
49 B	+	+	+	+	+
50 B	-	+	+	+	-
52 B	+	+	+	+	+
54 N	+	+	-	+	+

Tabela 2 - Amplificação das seqüências intragênicas da amelogenina X.

A: japonesas, B: caucasóides, N: negróides e I: indianas.

DNA	^A _M X 1 e 2	^A _M X 3 e 4	^A _M X 5 e 6	^A _M X 7 e 8	^A _M X 9 e 10
	1690 pb	1986 pb	1550 pb	879 pb	2039 pb
55 A	+	+	+	+	+
56 A	+	+	+	+	+
57 N	+	+	+	+	+
58 A	+	+	+	+	+
59 N	+	+	-	+	+
60 N	+	+	+	+	+
61 B	+	+	+	+	+
62 N	+	+	-	-	+
63 N	+	+	-	+	+
64 A	-	+	-	-	-
65 A	+	+	+	+	+
66 A	+	+	+	+	+
67 A	+	+	+	+	+
68 N	+	+	+	+	+
69 N	+	+	+	+	+
71 N	+	+	+	+	+
72 N	+	+	+	+	+
73 N	+	+	+	+	+
74 N	+	+	+	+	+
76 N	+	+	+	+	+
77 N	+	+	+	+	+
78 N	+	+	+	+	+
79 B	+	+	+	+	+
80 N	+	+	+	+	+
82 N	+	+	+	+	+
83 N	+	+	+	+	+
84 A	+	+	+	+	+

Tabela 2 - Amplificação das seqüências intragênicas da amelogenina X.
A: japonesas, B: caucasóides, N: negróides e I: indianas.

DNA	^A _M ^X 1 e 2 1690 pb	^A _M ^X 3 e 4 1986 pb	^A _M ^X 5 e 6 1550 pb	^A _M ^X 7 e 8 879 pb	^A _M ^X 9 e 10 2039 pb
85 A	+	+	+	+	+
86 A	+	+	+	+	+
25 A	24 A	25 A	24 A	24 A	21 A
28 B	26 B	26 B	27 B	26 B	26 B
24 N	24 N	24 N	20 N	21 N	24 N
2 I	2 I	2 I	2 I	2 I	2 I
TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL
79	76	77	73	73	73
(100%)	(96,2 %)	(97,5 %)	(92,4 %)	(92,4 %)	(92,4 %)



FIGURAS

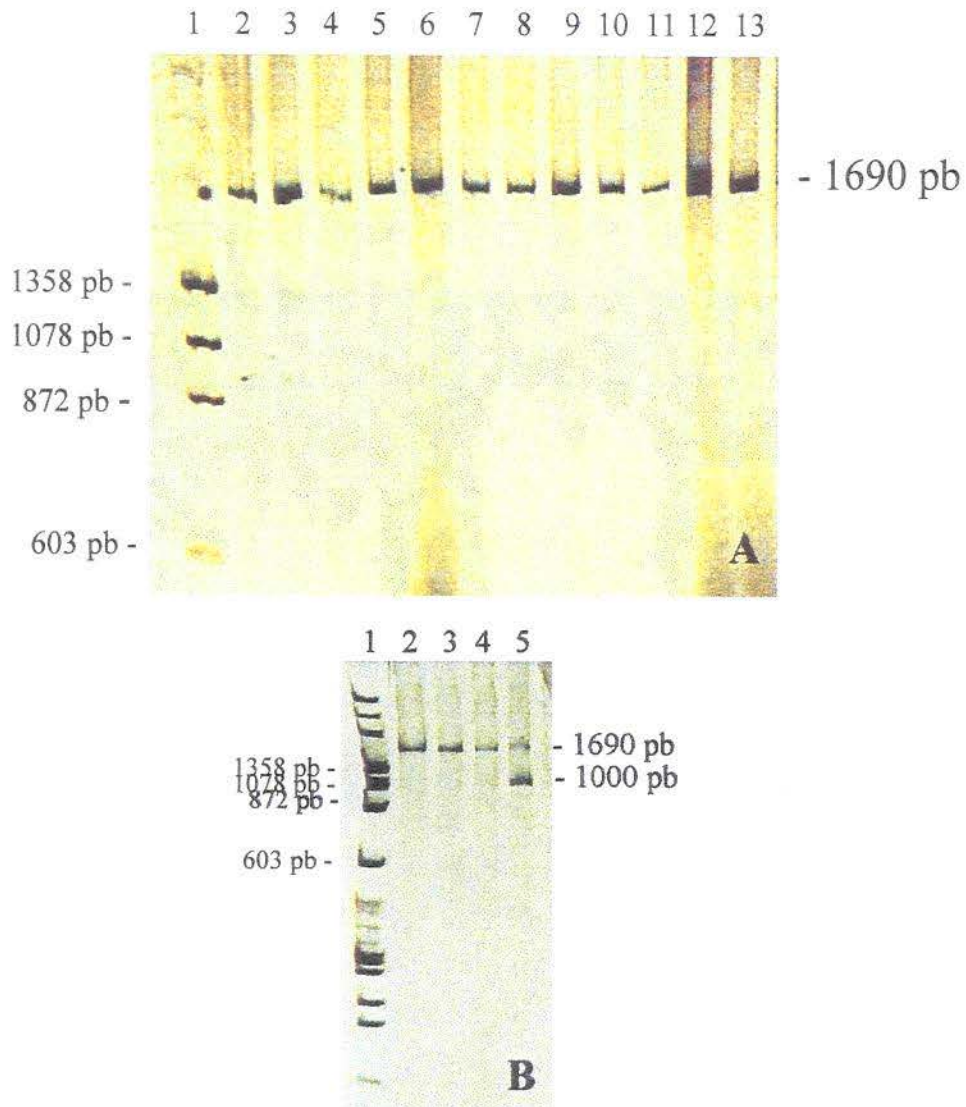


Fig. 1 - Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata. **A)** Canaleta 1: marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III digest. Canaletas 2 a 13: seqüências de 1690 pb amplificadas pelos primers AMX 1 e AMX2. **B)** Canaleta 1: marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III digest. Canaletas 2 a 5: amplificação das seqüências de 1690 pb (AMX1 e AMX2). Notar a amplificação de uma seqüência adicional de aproximadamente 1000 pb pelos primers AMX1 e AMX2 na paciente 29 (canaleta 5)

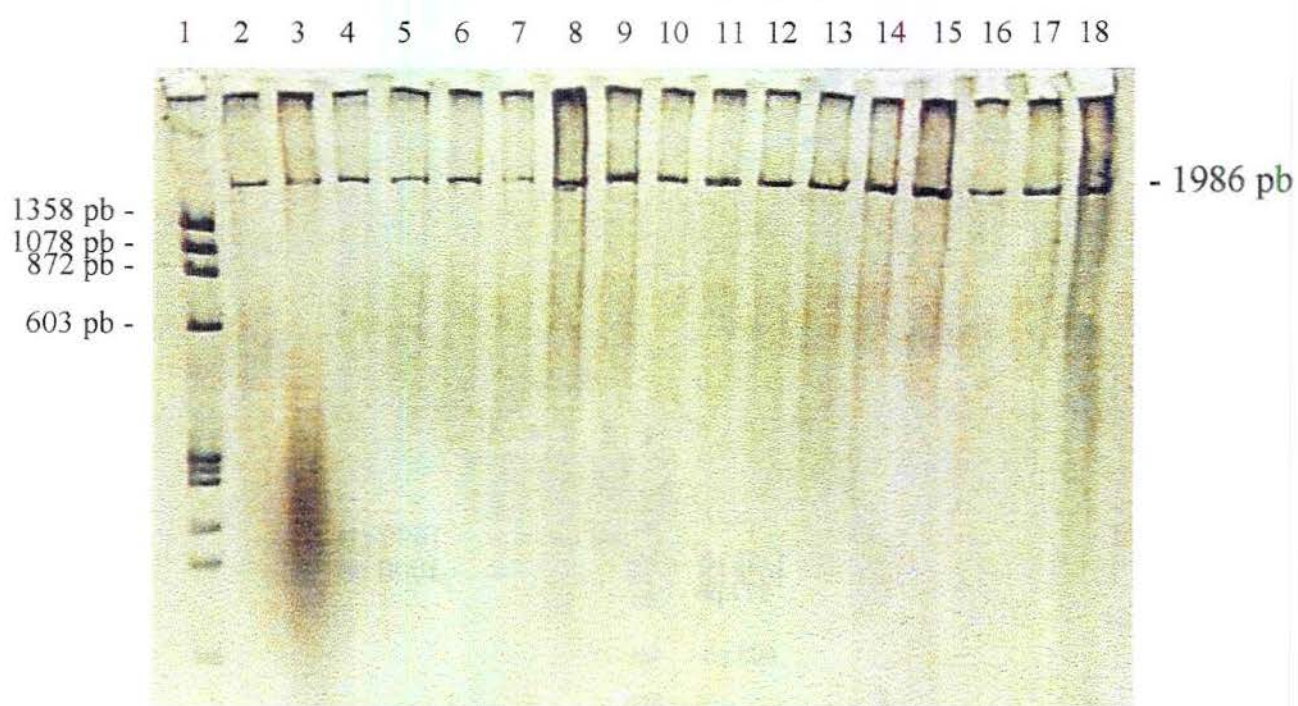


Fig. 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata. *Canaleta 1*: marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III digest. *Canaletas 2 a 18*: seqüências de 1986 pb amplificadas pelos primers AMX 3 e AMX4.

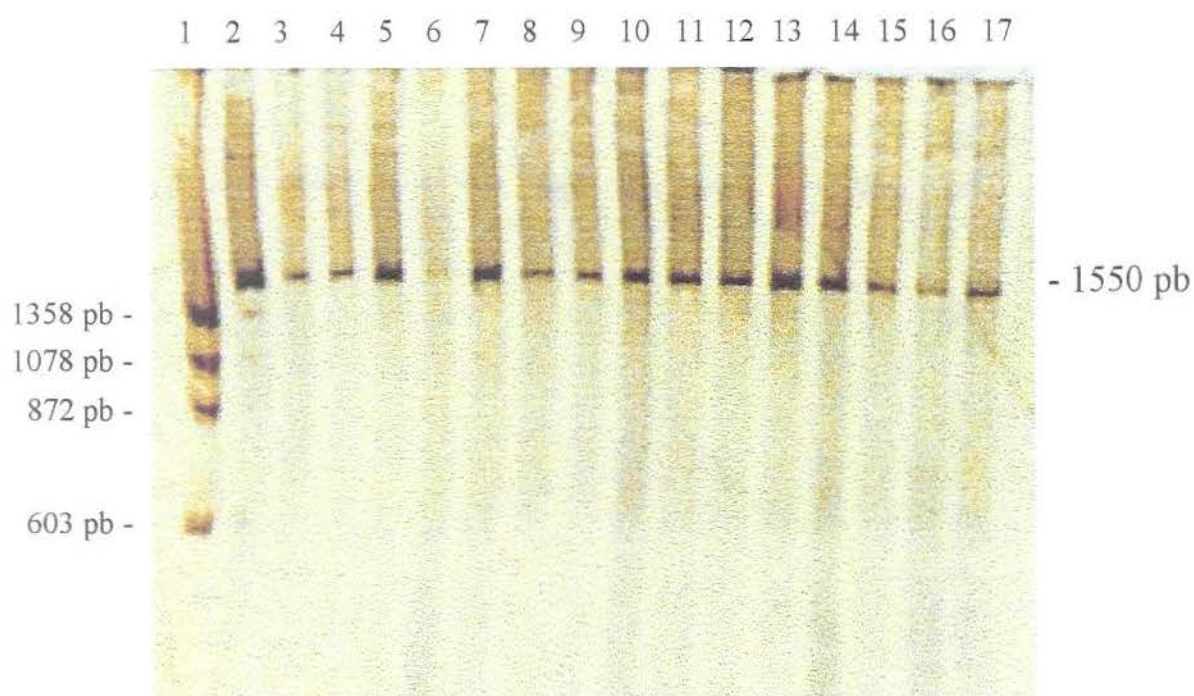


Fig. 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata. *Canaleta 1*: marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III *digest*. *Canaletas 2 a 17*: amplificação dos fragmentos de 1550 pb amplificados pelos primers AMX 5 e AMX6.

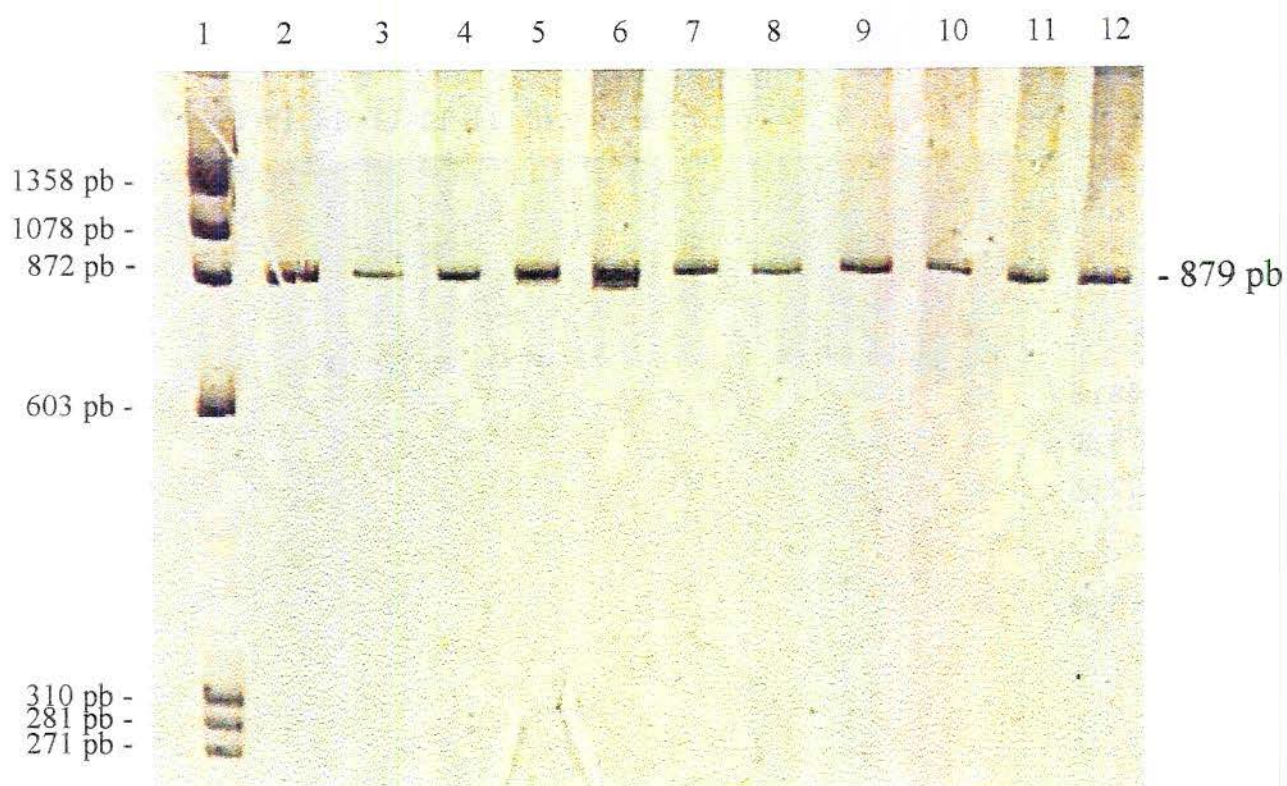


Fig. 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata. *Canaleta 1*: marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III digest. *Canaletas 2 a 12*: seqüências de 879 pb amplificadas pelos primers AMX 7 e AMX8.

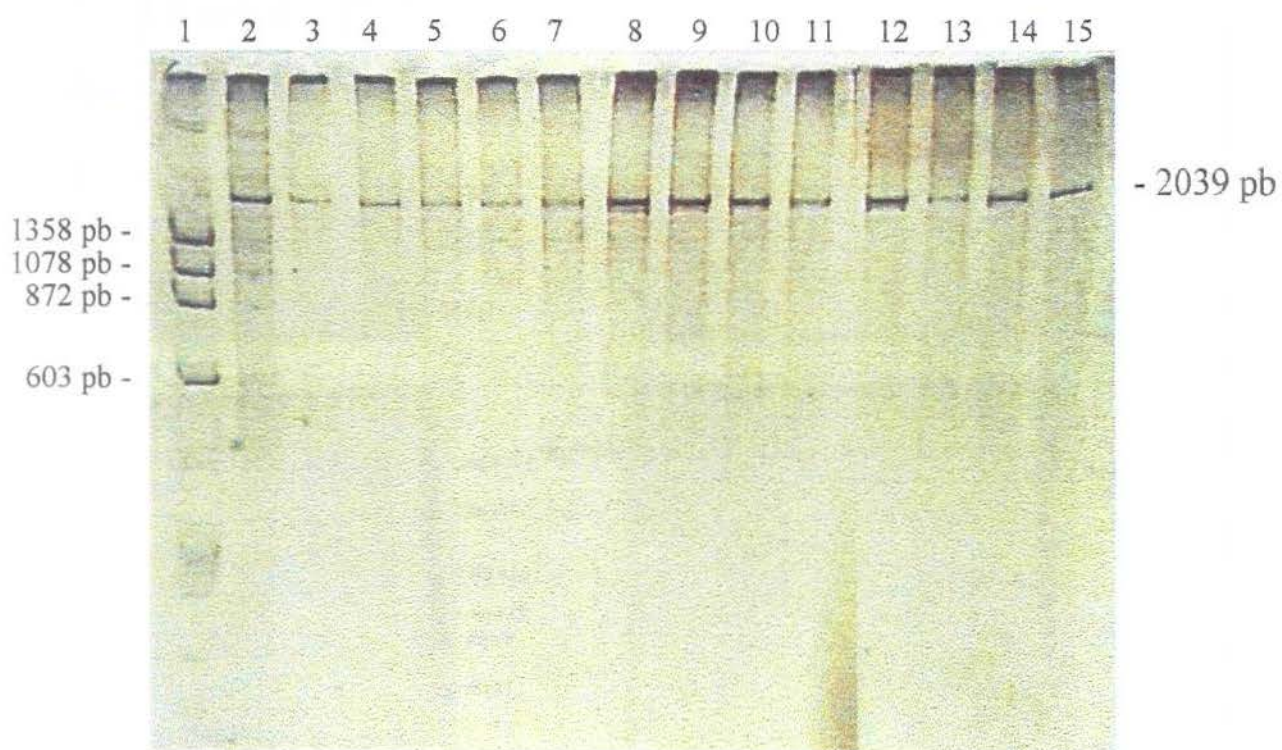


Fig. 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata. *Canaleta 1*: marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III digest. *Canaletas 2 a 15*: seqüências de 2039 pb amplificadas pelos *primers* AMX 9 e AMX10.

29

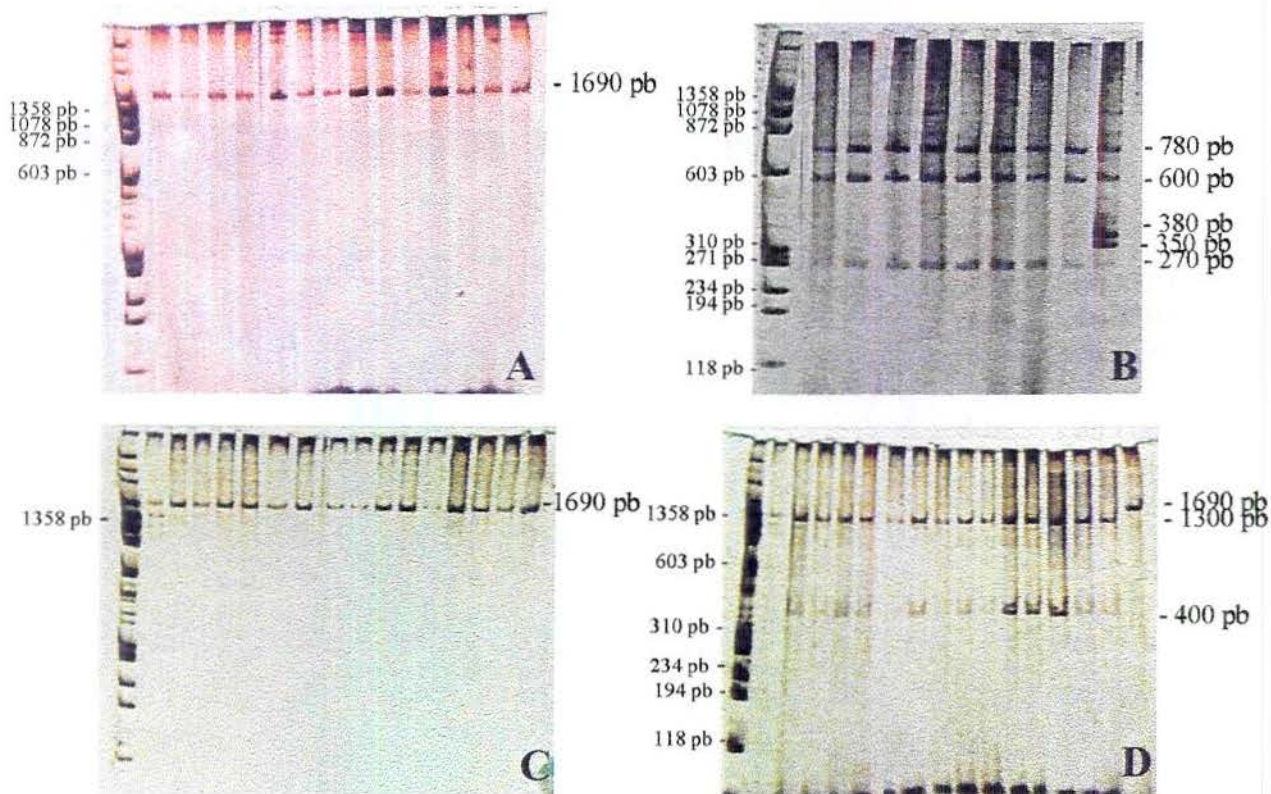


Fig. 6 - Eletroforese em géis de poliacrilamida (TBE 1X) a 5% corados pela prata, mostrando os segmentos de 1690 pb amplificados pelos *primers* AMX1 e 2. **A)** digestão com a *Hha* I. A última canaleta possui DNA não-digerido com esta enzima. **B)** digestão pela *Rsa* I. A última canaleta apresenta a digestão dos fragmentos de 1690 pb e 1000 pb com a *Rsa* I da paciente 29. **C)** digestão com a *Hpa* II. A última canaleta deste gel mostra DNA de uma paciente não-digerido com a *Hpa* II. **D)** digestão com a *Taq* I. Na última canaleta há o DNA de uma paciente não sujeito à digestão com a *Taq* I. A primeira canaleta dos quatro géis contém o marcador de massa molecular - ϕ X-174 -RF DNA *Hae* III digest.

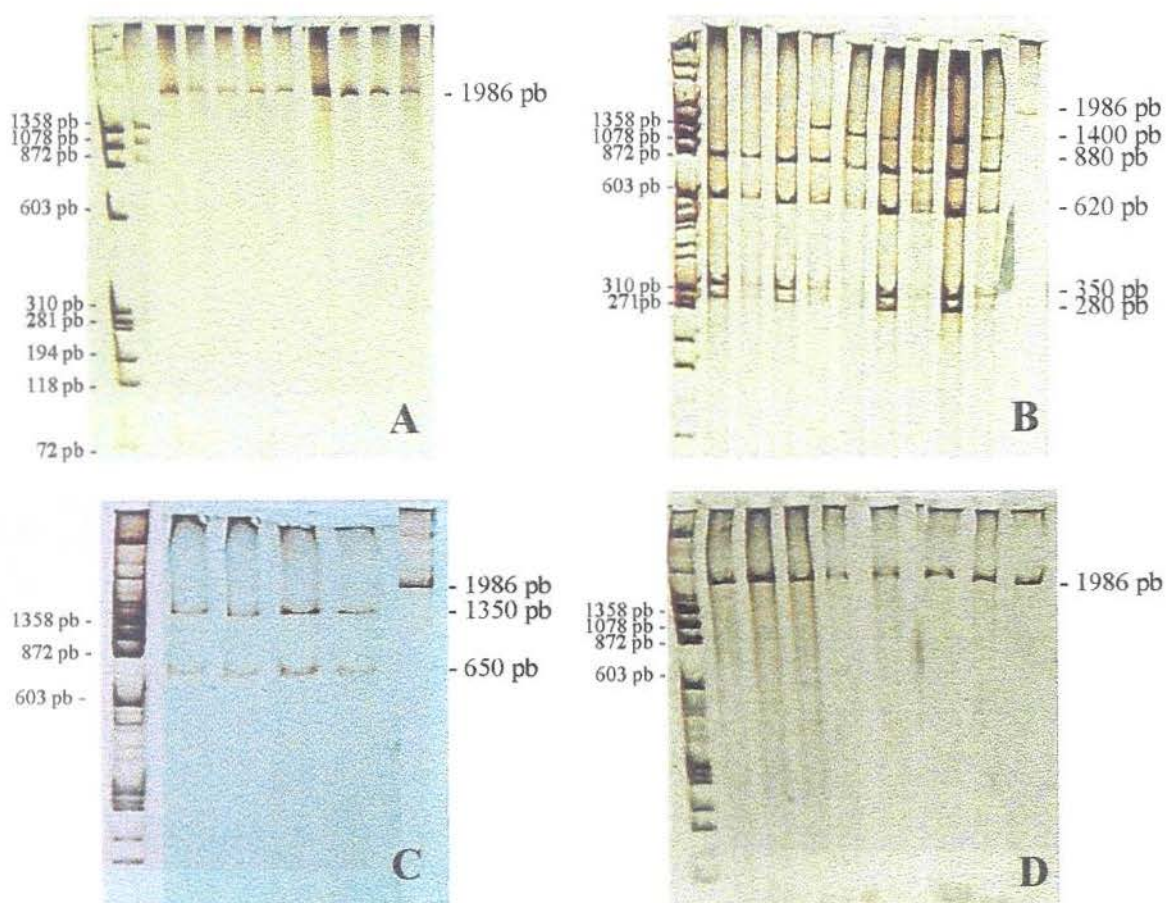


Fig. 7 - Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata mostrando as seqüências de 1986 pb amplificadas pelos *primers* AMX 3 e 4. **A)** digestão com a enzima de restrição *Hha* I. **B)** digestão com a *Rsa* I. Notar uma banda de 1400 pb presente em algumas pacientes. **C)** digestão com a *Hpa* II. **D)** digestão pela *Taq* I. A primeira canaleta de cada gel apresenta o marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III digest. A última canaleta de cada gel contém DNA não-digerido com as enzimas de restrição.

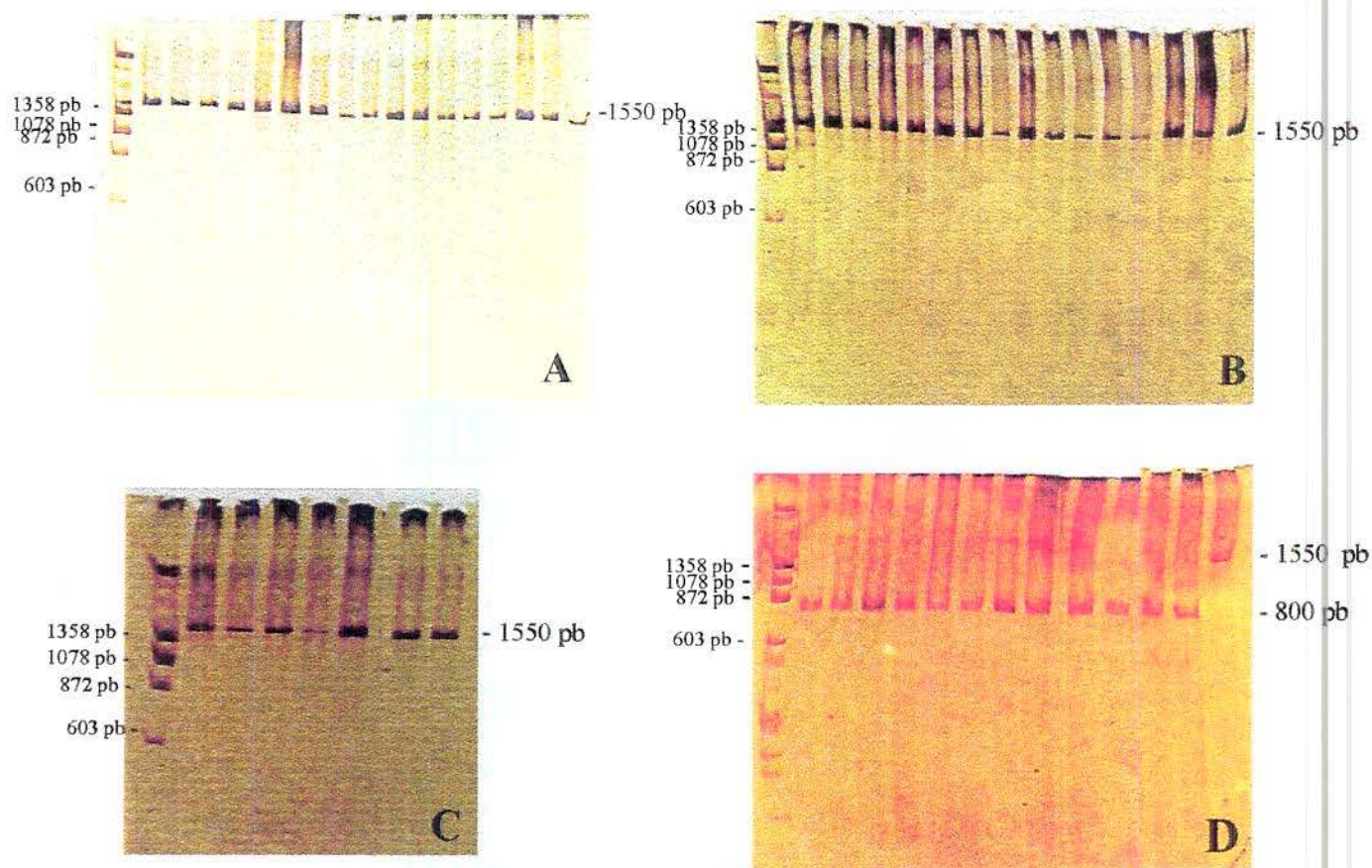


Fig. 8 - Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata, mostrando o segmento de 1550 pb amplificado pelos *primers* AMX 5 e 6. **A)** digestão com a *Hha* I. **B)** digestão pela *Rsa* I. **C)** digestão com *Hpa* II. **D)** digestão com *Taq* I. A primeira canaleta de cada gel mostra o marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III *digest*. A última canaleta dos quatro géis apresenta DNA não-digerido pelas quatro enzimas de restrição utilizadas.

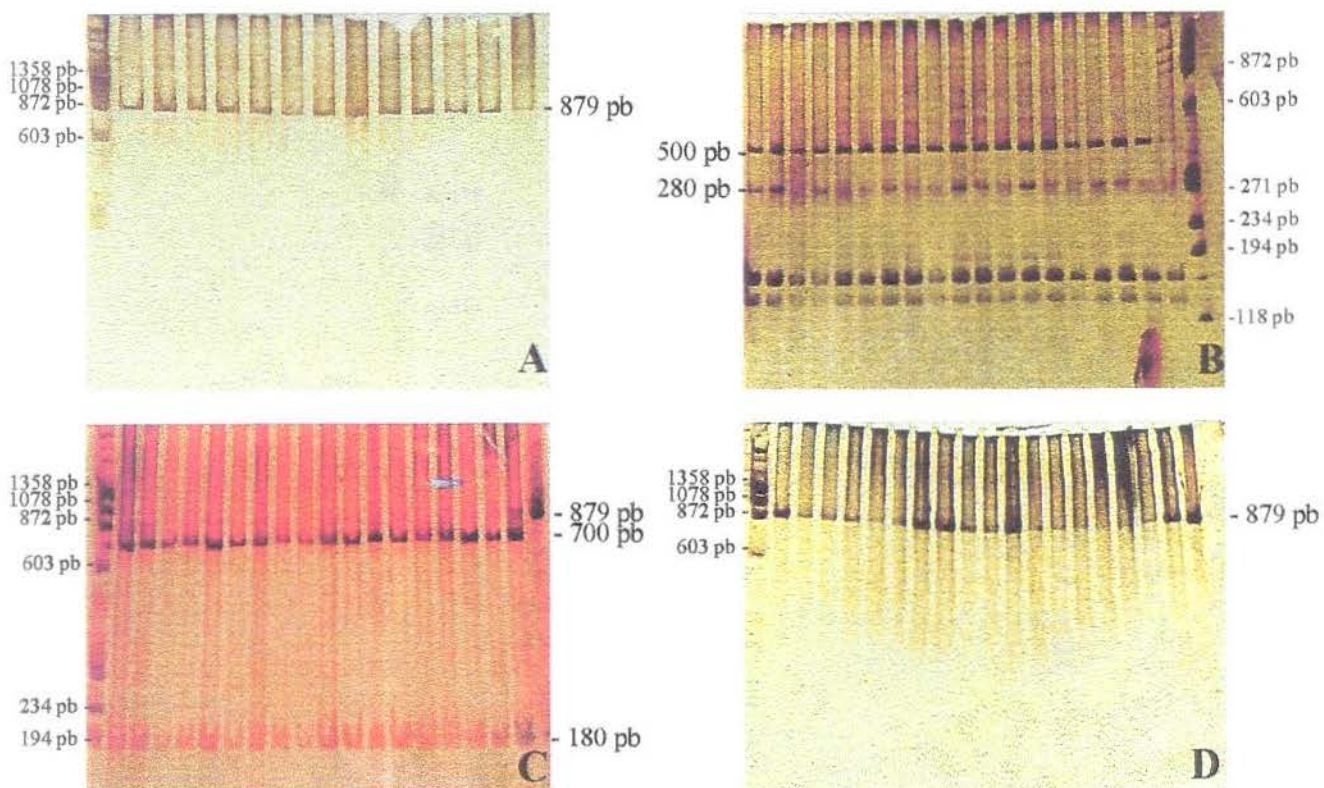


Fig. 9 - Géis de poliacrilamida a 5% corados pela técnica da prata, mostrando o segmento de 879 pb amplificado pelos *primers* AMX 7 e AMX8. **A)** digestão com a enzima de restrição *Hha* I. **B)** digestão pela *Rsa* I. **C)** digestão com a *Hpa* II. **D)** digestão com a *Taq* I. O marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III *digest* se encontra na primeira canaleta dos géis, com exceção do gel **B**, no qual está na última canaleta. Os géis **A**, **C** e **D** apresentam na última canaleta DNA não-digerido.

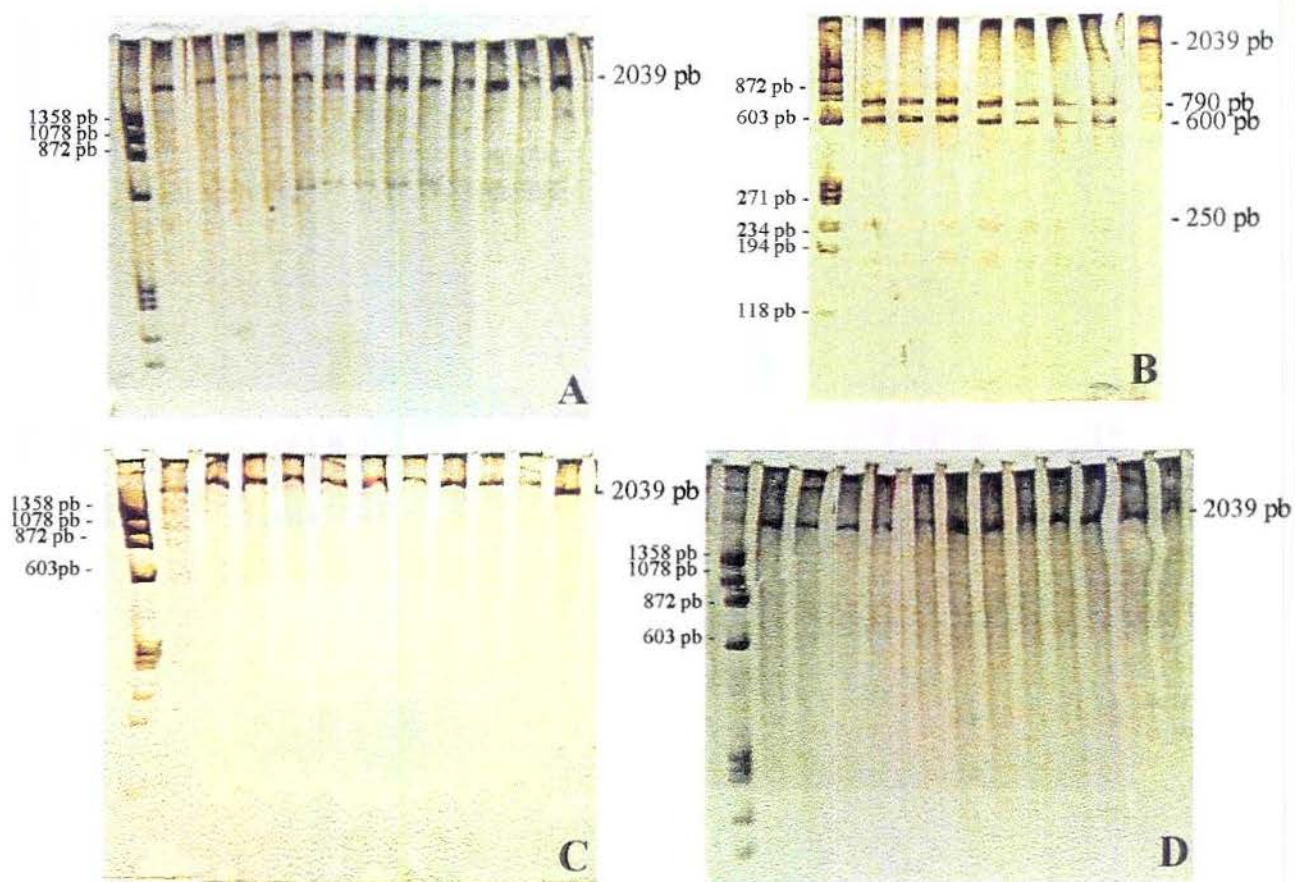


Fig. 10 - Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata mostrando as seqüências de 2039 pb amplificadas pelos *primers* AMX 9 e AMX10. **A)** digestão com a enzima de restrição *Hha* I. **B)** digestão com a *Rsa* I. **C)** digestão pela *Hpa* II. **D)** digestão pela *Taq* I. Na primeira canaleta de cada gel, o marcador de massa molecular - ϕ X-174-RF DNA *Hae* III *digest* e na última, DNA não-digerido.

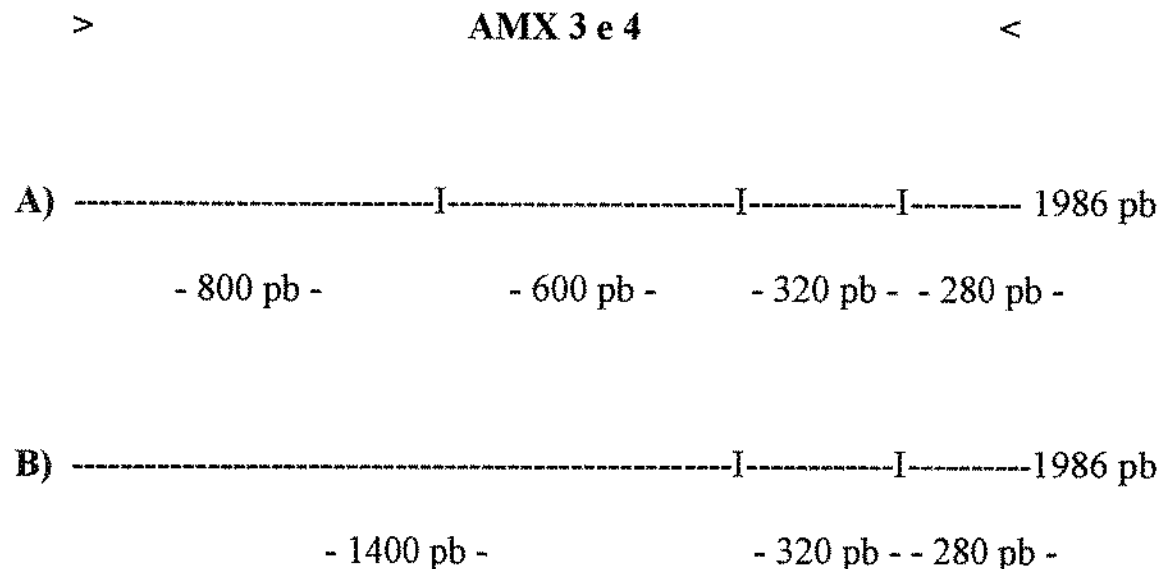


Fig. 11 - Padrão de restrição conferido pela digestão com a enzima *Rsa* I dos fragmentos de 1986 pb amplificados pelos *primers* AMX 3 e 4, correspondentes ao segundo intron do gene da amelogenina X. A presença dos dois alelos foi verificada em cerca de 15% das mulheres amostradas. O alelo que apresenta o sítio de restrição dentro da sequência de 1400 pb, para a enzima *Rsa* I (A) foi observado em todas as amostras. Não foi evidenciada homozigose para o alelo (B). Os fragmentos estão apenas ordenados por tamanho, não refletindo sua localização no segmento amplificado. Importante notar que a ausência do sítio de restrição pode se tratar de digestão incompleta do segmento de 1400 pb.



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Obtenção de DNA de células epiteliais da mucosa bucal

A variabilidade entre amostras, indicada pelas diferentes quantidades de DNA recobrado e pelos diversos índices de pureza (Tab. 1), pode ser pelo menos em parte atribuída a diferenças individuais quanto à presença de enzimas catalíticas (proteases e nucleases) e a características peculiares concernentes à taxa de descamação das células da mucosa, e talvez ao vigor com que o bochecho era executado. Deve-se ter em mente que o ambiente bucal é extremamente complexo e representa a somatória de fatores intrínsecos (genéticos e de microbiota indígena), e extrínsecos (referentes a condições de alimentação e higiene individuais), que fazem com que a presença e a quantidade de células não garantam a existência de DNA suficiente e íntegro, apropriado para permitir a amplificação. Ainda que algumas vezes abaixo do valor desejado para serem consideradas puras, amostras com leitura abaixo de 1,75 não foram desprezadas e se prestaram às finalidades de amplificação. O DNA genômico é considerado puro quando a OD^{260}/OD^{280} é igual ou maior a 1,8 (MANIATIS *et al.*, 1989). Se essa relação é inferior à relatada, significa que a quantificação acurada do DNA não será possível, devido à contaminação com proteínas ou fenol.

Ainda, pode indicar a presença de componentes de natureza catalítica passíveis de degradarem inclusive o próprio DNA, fazendo com que se perca parcialmente por vezes o segmento a ser amplificado. De qualquer forma, a pureza do DNA genômico sempre indica redução nas chances de problemas durante a PCR. Talvez seja aconselhável, no caso de células obtidas a partir do processo de bochecho, aumentar-se a concentração de EDTA no tampão de extração e elevar-se a quantidade de proteinase K, e/ou o tempo de digestão, para que a extração com solventes orgânicos satisfaça, no final do processo, o grau de pureza do DNA obtido; não se tornando, a taxa de degradação parcial do mesmo, determinante na obtenção de resultados satisfatórios. Se por um lado o EDTA quela Ca^{++} , reduzindo significativamente a atividade catalítica da proteinase K, por outro lado auxilia na preservação da integridade do conteúdo nucléico, diminuindo a ação de nucleases presentes na amostra durante o processo de armazenamento das células a baixas temperaturas. Em geral, a atividade residual da proteinase K é suficiente para degradar proteínas que comumente contaminam preparações de ácidos nucléicos (MANIATIS *et al.*, 1989).

PCR das seqüências gênicas de alta massa molecular

Em termos gerais, o sucesso de amplificação ficou por volta de 94% para as seqüências estudadas, muito embora alterações nas condições da PCR e contínua otimização pudessem aumentar a positividade dos resultados. Células epiteliais bucais como fonte de DNA para análise de PCR têm sido utilizadas em estudos de prevalência de agentes infecciosos presentes na mucosa bucal (ROBINSON *et al.*, 1992; OSTWALD *et al.*, 1994) e em análises forenses, em situações nas quais a amostragem sanguínea não está disponível (FRIDEZ & COQUOZ, 1996; SWEET *et al.*, 1997). Estes estudos reportam a amplificação de fragmentos de DNA invariavelmente pequenos (em geral menores que 300 pb), na identificação de seqüências virais e bacterianas, bem como na análise de *loci* altamente polimórficos em tipagem de DNA humano. No entanto, a amplificação de seqüências de grande massa molecular pode ser necessária em análises moleculares, como a RFLP-PCR (MELTZER, 1993). A possibilidade de amplificação, inclusive de grandes seqüências de DNA, a partir de células da mucosa bucal pode ser de grande valia em amostragens populacionais de larga escala e em estudos epidemiológicos. A saliva, apesar de proporcionar DNA passível de amplificação por PCR quando presente em um simples

selo (FRIDEZ & COQUOZ, 1996) ou em tocos de cigarro (HOCHMEISTER *et al.*, 1991), contém inibidores da reação de PCR (FRIDEZ & COQUOZ, 1996). A presença de inibidores da PCR e o DNA parcialmente degradado em nível individual pode ter tido um efeito sobre a positividade dos resultados. O alto grau de sucesso das reações, por outro lado, é possivelmente devido à boa qualidade/integridade do DNA. Quando se pesquisa a ciência forense, onde mais se utilizam fontes de DNA em quantidades restritas e ricas em inibidores, com DNA altamente degradado - (saliva, sêmen e restos arqueológicos e cadavéricos) - grande número de autores lança mão dos mais diversos sistemas de purificação (como Chelex e Centricom 100, por exemplo), usam quantidades minutas de DNA (em volume pequeno de reação) e não dispensam a utilização de BSA em concentração igual ou maior a 16 µg/100 µL de reação para contornar a inibição da PCR (HAGELBERG *et al.*, 1989; GEHRIG *et al.*, 1996; HOCHMEISTER *et al.*, 1996).

A técnica empregada neste estudo para extração de DNA (MANIATIS *et al.*, 1989) utiliza TE na tentativa de recuperar DNA da fase orgânica após a primeira extração com fenol/clorofórmio. Este passo faz com que também proteínas (algumas inibidoras) sejam recuperadas,

“contaminando” o DNA. Durante a precipitação com etanol, independentemente da quantidade de DNA extraído, são co-precipitadas tais proteínas que, não obstante por vezes em baixa concentração relativa, podem inibir a PCR. Sugerimos que a técnica seja modificada (como vem sendo feito com sucesso em nosso laboratório), removendo-se a etapa que utiliza TE, com duas ou três extrações consecutivas de fenol/clorofórmio.

Houve dificuldade aumentada quando na busca de positividade de amplificação em indivíduos negros, o que especulativamente pode estar relacionado com a qualidade racial de inibidores ou à quantidade de pigmentação. Os melanócitos dos negros apresentam significativamente mais melanina que os dos brancos (YOHN *et al.*, 1992) e a melanina inibe reações de PCR (SHIONO, 1996). Este autor purifica o DNA com iodeto de potássio em vez de fenol/clorofórmio para contornar a inibição. Nada foi encontrado na literatura relacionando a quantidade de queratina ou proteínas do citoesqueleto com o grau de dificuldade de extração de DNA nos negros, o que tornaria mais difícil a colheita de células descamadas da mucosa bucal.

Análise de polimorfismo (RFLP) no gene da amelogenina X

A existência de correlação entre polimorfismos do tipo deleção e alteração na estrutura do esmalte dental é bem relatada. Estudo em família sueca mostrou que uma deleção de 5000 pb, que se estendia desde o 2º intron até parte do 7º éxon causava *Amelogênese Imperfecta* do tipo hipomineralizada (LAGERSTRÖM-FERMÉR *et al.*, 1991; LAGERSTRÖM-FERMÉR *et al.*, 1993). ALDRED *et al.* (1992) descreveram uma família que exibia deleção de uma única base no éxon 5, introduzindo um códon de parada em região próxima à mutação, o que conferia ao indivíduo afetado alteração na cor e consistência do esmalte dental. LAGERSTRÖM-FERMÉR (1995) mostraram que uma deleção de 9 pb no 2º éxon da AMGX causava *Amelogênese Imperfecta* do tipo hipoplásico, interferindo no deslocamento da amelogenina durante sua síntese, o que resultava em esmalte “fino”.

No presente estudo, a paciente mutada (amostra 29) não apresentou sinais clínicos de alteração no esmalte dental. Radiograficamente, o esmalte apresentava características normais de espessura e radiopacidade. Isto pode ser devido à presença de deleção em região intrônica (neste caso, primeiro intron), o que não acarreta comprometimento fenotípico. O primeiro e o

segundo íntrons do gene da amelogenina X, bem como parte do sexto íntron ainda não foram seqüenciados. Após a clonagem e seqüenciamento destes íntrons, o seqüenciamento dos segmentos, comum (de 1960 pb amplificado pelos *primers* AMX1 e AMX2, presente em todas mulheres estudadas), e variante/mutado (de cerca de 1000 pb), pode comprovar a existência da deleção, caracterizando a mutação. Muito embora a deleção tenha sido encontrada em apenas um exemplar da amostra, é possível que se esteja no rastro de um novo alelo. A análise de familiares do indivíduo mutado, poderia ser útil para a observação da segregação deste alelo e, se apareceu como mutação espontânea, para a determinação da geração de surgimento da mesma. Se o tamanho da amostra for aumentado, e esta deleção for observada em outros indivíduos “normais”, pode-se apontar a frequência do alelo na população estudada. Com relação à variação no padrão de restrição encontrado aparentemente no segundo íntron (seqüência de 1986 pb amplificada pelos *primers* AMX3 e AMX4) em 16% das mulheres analisadas, repetiu-se a digestão várias vezes e parece se estar diante de uma variante que esteve presente nos indivíduos da amostra em heterozigose. Observou-se maior prevalência desta variante em mulheres negras. Para que se infira, no entanto, que esta seja uma variante típica do

grupo negróide, é imprescindível que se aumente o tamanho da amostra. Uma enzima de restrição isoquiomérica também pode ser utilizada para a comprovação dos resultados.

A RFLP-PCR é útil numa análise preliminar na busca de polimorfismos, principalmente na investigação de grandes seqüências. Existem, no entanto, limitações técnicas em termos de resolução na observação dos resultados; por exemplo, se o sítio de reconhecimento da enzima se encontrar nas extremidades ou se sítios de restrição estiverem muito próximos e houver mutação, não há discriminação suficiente para a precisa interpretação do que realmente está ocorrendo em nível molecular. Além disso, mesmo que se utilize um número considerável de enzimas de restrição, as seqüências reconhecidas por estas, na maior parte das vezes, perfazem apenas uma porcentagem pequena de todo o segmento estudado.



CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. A possibilidade de amplificar seqüências de DNA genômico de grande massa molecular a partir de células epiteliais descamadas da mucosa bucal para análise de PCR permite uma análise genética fácil, rápida, barata e não-invasiva, através da execução de um simples bochecho com solução de glicose pelo paciente. Este protocolo pode ser de grande valia em estudos epidemiológicos que demandem amostragem populacional de larga escala, principalmente quando crianças ou pessoas relutantes em doar sangue fizerem parte do grupo amostral, dispensando supervisão médica e eliminando riscos de infecção durante a coleta das amostras.
2. A RFLP-PCR é útil numa análise preliminar na busca de polimorfismos, principalmente na investigação de grandes seqüências, sendo mais acurada essa busca quanto maior o número de enzimas utilizadas.

3. A análise das seqüências de 1690 pb amplificadas pelos *primers* AMX1 e AMX2 (éxon 1, íntron 1 éxon 2) sugere a presença de uma deleção de cerca de 700 pb em um dos indivíduos analisados, possivelmente em região do primeiro íntron, a qual poderá ser confirmada pelo seqüenciamento dos segmentos amplificados (de 1690 pb, comum, e de 1000 pb, variante).
4. Foram detectadas duas formas variantes com relação ao padrão de restrição da enzima *Rsa* I no segundo íntron do gene (*primers* AMX3 e AMX4). O alelo menos freqüente só esteve presente em heterozigose. Porém, não se elimina totalmente a possibilidade de digestão incompleta.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRED, M.J. *et al.* Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum. Gen.*, v.90, p.413-416, 1992.

ALVESSALO, L. The influence of sex-chromosome genes on tooth size in man. *Proc. Finn.9. Dent. Soc.*, v.67, p.53-54, 1971.

ALVESSALO, L., DE LA CHAPELLE, A. Tooth sizes in two males with deletions of the long arm of the Y-chromosome. *Ann. Hum. Genet.*, v.45, p.49-54, 1981.

ALVESSALO, L., VAMELA, J. Permanent tooth sizes in 46, XY females. *Am. J. Hum. Genet.*, v.32, p.736-742, 1980.

ALVESSALO, L. *et al.* 47,XXX females, sex chromosomes, and tooth crown structure. *Hum. Genet.*, v.77, p.345-348, 1987.

- BACKMAN, B., HOLM, A-K. Amelogenesis imperfecta: prevalence and incidence in a northern Swedish country. *Commun. Den. Oral Epidemiol.*, v.47, p.43-47, 1986.
- BACKMAN, B., HOLMGREN, G. Amelogenesis imperfecta: a genetic study. *Hum. Hered.*, v.38, p.189-206, 1988.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p.93-99, 1987.
- BUEL, E., WANG G., SCHWARTZ, M. PCR amplification of animal DNA with human X-Y amelogenin primers used in gender determination. *J. Forensic Sci.*, v.40, n.4, p. 641-644, July, 1995.
- CATALANO-SHERMAN, J. *et al.* Amino acid sequence of a major human amelogenin protein employing Edman degradation sequencing. *J. Dent. Res.*, v.72, p.1566-1572, 1993.

CAVALLI-SFORZA, L.L., BODMER, W. **The genetics of human populations.** San Francisco: W.H. Freeman, 1971.

CHEN, E. *et al.* Regulation of amelogenin gene expression during tooth development. *Dev Dyn.*, v.199, p.189-198, 1994.

CHEN, E. *et al.* Comparison of upstream regions of X- and Y-chromosomal amelogenin genes. *Gene*, v.216, p.131-137, 1998.

COPELLI, S.B. *et al.* Molecular analysis of Sex determination in sex-reversed and true hermafroditism. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.29, n.6, p.743-748, 1996.

COUWENHOVEN, R.I., SNEAD, M.L. Early determination and permissive expression of amelogenin transcription during mouse mandibular first molar development. *Dev. Dyn.*, v.164, p.290-299, 1994.

- FAERMAN, M. *et al.* Sex identification of archaeological remains based on amplification of X and Y amelogenin alleles. *Gene*, v.167, p.327-332, 1995.
- FINCHAN, A.J. *et al.* Amelogenins: sequence homologies in enamel-matrix proteins from three mammalian species. *Biochem. J.*, v.211, p.149-154, 1983.
- FINCHAN, A.J. *et al.* Human amelogenin: Sequences of TRAP molecules. *Calcif. Tissue Int.*, v.45, p.243-250, 1989.
- FINCHAN, A.J. *et al.* Isolation and partial characterization of a human amelogenin from a single fetal dentition using HPLC techniques. *Calcif. Tissue Int.*, v.47, p.105-111, 1990.
- FRIDEZ, F., COQUOZ, R. PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. *Forensic Sci. Int.*, v.78, p.103-110, 1996.

GEHRIG, C. *et al.* HLA-DQA1 subtyping data in Swiss population.
Forensic Sci. Int., v.83, p.27-30, 1996.

GIBSON, C.W. *et al.* Bovine amelogenin message heterogeneity:
alternative splicing and Y-chromosomal gene transcription.
Biochemistry, v.31, p.8384-8388, 1992.

GILL P. *et al.* Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature*, v.318,
p.577-579, 1985.

HAGELBERG, E., SYKES, B., HEDGES, R. Ancient bone DNA
amplified. *Nature*, v.342, p.485, 1989.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics.** Oxford,
England: Elsevier/North-Holland press, 1980.

HOCHMEISTER, M.N. A discussion of 'PCR DNA typing of stamps:
evaluation of the DNA extraction'. *Forensic Sci. Int.*, v.83, p.75-77,
1996.

ISHIYAMA, M. *et al.* Amelogenin protein in tooth germs of the snake *Elaphe quadrivirgata*, immunohistochemistry, cloning and cDNA sequence. *Arch. Histol. Cytol.*, v.61, n.5, p.467-474, 1998.

LaFOUNTAIN, M. *et al.* Validation of capillary electrophoresis for analysis of the X-Y homologous amelogenin gene. *J. Forensic Sci.*, v.43, n.6, p.1188-1194, 1998.

LENCH, N., STAINER, P., WILLIAMSON, R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet*, v.18, p.1356-1358, June, 1988.

LAGERSTRÖM-FERMÉR, M. *et al.* A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics*. v.10, p.971-975, 1991.

LAGERSTRÖM-FERMÉR M., PETTERSON U, LANDEGREN U. Molecular basis and consequences of a deletion in the amelogenin gene, analysed by capture PCR. *Genomics.*, v.17, v.89-92, 1993.

LAGERSTRÖM-FERMÉR, M. *et al.* Amelogenin signal peptide mutation: correlation between mutations in the amelogenin gene (AMGX) and manifestations of X-linked amelogenesis imperfecta. *Genomics*. v.26: p.159-162, 1995.

LAU, E.C., SLAVKIN, H.C., SNEAD, M.L. Analysis of human enamel genes: insights into the genetic disorders of enamel. *Cleft Palate J.*, v.27, p.121-130, 1990.

LI, W. *et al.* Identification of two additional exons at the 3' end of the amelogenin gene. *Archs. Oral Biol.*, v.43, p.497-504, 1998.

LINE, S.R.P., COLETTA R.D., TREVILATTO P.C. Amelogenina, *amelogênese imperfecta* e estrutura do esmalte dental. *Revista da APCD*, v.50, n.1, p.32-35, 1996.

LYNGSTADAAS, S.P. *et al.* Amelogenin gene similarity in vertebrates: DNA sequences encoding amelogenin seem to be conserved during evolution. *J. Comp. Physiol. B.*, v.160, p.469-472, 1990.

MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2nd Edition. USA: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545p.

MANUCCI, A. *et al.* Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.*, v.106, p.190-193, 1994.

MELTZER, S.J. Determination of loss of heterozygosity using polymerase chain reaction. *In:* White B.A. **Methods in molecular biology. PCR protocols. Current methods and applications.** Clifton, New Jersey: The Humana Press Inc., 1993a. v.2, cap.15, p.129-136.

MELTZER, S.J. Direct sequencing of polymerase chain reaction products. *In:* White B.A. **Methods in molecular biology. PCR protocols. Current methods and applications.** Clifton, New Jersey: The Humana Press Inc., 1993b. v.2, cap15, 137-142.

- NAKAHORI, Y., TAKENAKA, O., NAKAGOME, Y. A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics*, v.9, 264-269, 1991.
- OSTWALD, C. *et al.* Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J. Oral Pathol. Med.*, v.23, p.220-225, 1994.
- ROBINSON, P.A., HIGH, A.S., HUME, W.J. Rapid detection of human herpes simplex virus type 1 in saliva. *Arch. Oral Biol.*, v.37, n.10, p.797-806, 1992.
- ROUSSELET, F., PFITZINGER H., MANGIN, P. A pentaplex automated fluorescent typing system for forensic identification and French caucasian population data. *J. Forensic Sci.*, v.42, n.3, p.500-503, 1997.
- SALIDO, E.C. *et al.* The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and Y chromosomes. *Am. J. Hum.Gen.*, v.50, p.303-316, 1992.

- SHIONO H. Personal identification using DNA polymorphism - the identification of forensic biological materials. *Nippon Hoigaku Zasshi*, v.50, n.5, p.320-330, 1996.
- SNEAD, M.L. *et al.* DNA sequence for cloned cDNA for murine amelogenin reveal the amino acid enamel-specific protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.129, p.812-818, 1985.
- STONE, A.C. *et al.* Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.*, V.99, p.231-238, 1996.
- SULLIVAN, K.M. *et al.* A rapid and quantitative DNA Sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*, v.15, p.636-641, 1993.
- SWEET, D. PCR-based DNA typing of saliva stains recovered from human skin. *J. Forensic Sci.*, v.42, n.3, p.447-451, 1997.

TEN CATE A.R. **Oral histology**: development, structure, and function. 4th Edition. Ed. Mosby - Year Book, Inc., 532p.

THOMPSON, M.W., McINNES, R.R., WILLARD, H.F. **Genetics in medicine**. 5th Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991. 500p.

WITKOP, C.J., SAUK, J.J. Heritable defects of enamel. *In*: STWART, F.E., PRESCOT, J. **Oral facial genetics**. St. Louis: Mosby, 1976, 151-226.

YAP, E.P.H. & Mc GEE, J. O'D. Detection of mutations by PCR. *In*: GRIFFIN, H.G. & GRIFFIN, A. M. **PCR Technology: current innovations**. CRC Press, Inc., 1994, 107-120.

YOHN, J.J., LYONS, M.B., NORRIS, D.A. Cultured human melanocytes from black and white donors have different sunlight and ultraviolet A radiation sensitivities. *J. Invest. Dermatol.*, v.99, n.4, p.454-459, 1992.

Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments.

Paula C. Trevilatto, Sergio R. P. Line

Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, Av. Limeira 901, 13414-018
Piracicaba-SP, Brazil

Corresponding author: Sergio R. P. Line

FAX: 55194305218

e-mail: serglin@fop.unicamp.br

Abstract

The analysis of human DNA is widely employed in the genetic studies of families and populations. In most cases it is performed in samples obtained from peripheral blood. The use of buccal epithelial cells as source of DNA for PCR amplifications has several advantages over blood sampling. However, DNA obtained from buccal epithelium has only been used to amplify small fragments of DNA, and its use in forensic analysis has been limited to cases where the sampling of peripheral blood is not feasible. In the present study we show that buccal epithelial cells are a reliable source of DNA for the PCR amplification of high molecular mass fragments, which could be used in large-scale population sampling.

Keywords: PCR, buccal, epithelium, amelogenin

1. Introduction

The analysis of human DNA is widely employed in the genetic studies of families and populations. In most cases it is performed in samples obtained from peripheral blood. However, blood sampling is an invasive procedure, and sample collection may involve ethical problems in cases such as in extremely ill persons, elderly and babies. Additionally, it requires medical supervision and specific equipment, which contribute to increase the overall costs of the procedure.

The polymerase chain reaction (PCR) provides a rapid and sensitive approach for the analysis of polymorphisms and mutations of the human genome. The use of buccal epithelial cells as a source of DNA for PCR reactions has been limited to studies of infectious agents present in oral mucosa [1,2]; and in forensic analysis, where the sampling of peripheral blood is not feasible [3,4]. Invariably, these studies report the amplification of small fragments of DNA (< 300 base pairs), which are suitable for the identification of viral and bacterial sequences, as well as the analysis of highly polymorphic loci in human genome. However, amplification of larger DNA fragments may be desirable in some instances such as PCR-RLFP [5], mismatch cleavage mutation analysis [6,7], cloning, and sequencing of amplified sequences [8]. In the present study, we show that buccal epithelial cells are a reliable source of DNA for the PCR amplification of high molecular mass fragments, which could be used in large-scale population sampling and epidemiological studies, as well as in forensic analysis.

2. Materials and methods

Sampling: A group of consenting female subjects comprised 83 individuals. Subjects undertook a mouthwash after 2 min, containing 5 mL 3% sucrose. Following mouthwash, a sterile wood spatula was used to scrape oral mucosa. The tip of the spatula was then shaken into the already mouthwashed solution. Buccal epithelial cells were pelleted by centrifugation at 2000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in 500 uL of extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5

mM EDTA, 0.5% SDS] with antibiotics. The samples were then frozen at -20°C until used for DNA extraction.

DNA extraction: After defrosted, samples were incubated overnight with 100 ng/mL proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 37°C with agitation. DNA was then purified by sequential phenol/chloroform extraction and salt/ethanol precipitation (Maniatis et al 1982). DNA was dissolved in 70 μL TE buffer [10 mM Tris (pH 7.8), 1 mM EDTA]. The concentration was estimated by measurements of OD 260.

Polymerase chain reaction: Amplification reactions were performed with 300 to 700 ng DNA in a volume of 50 μL in reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , deoxyribonucleotides (200 μM each), 1 μM primers, 2U *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Five pairs of primers were used. The primer sequences are as follows:

AMX1- 5' GGATTGGTTGTTACAGATGCC 3'

AMX2- 5' TTA CTCACAGGCATGGCAAAAGCTGC 3'

AMX3- 5' CAT TTCAGA ACCATCAAGAAATGGG 3'

AMX4- 5' CTTTACAGAGCCCAGGGCATTG 3'

AMX5- 5' CCTCCCTGTAAAAGCTACCACC 3'

AMX6- 5' AATGTCTACATAACCGGTGGCC 3'

AMX7- 5' GTAGAACTCACATTCTCAGGC 3'

AMX8- 5' GGCTTCAAAATATACTCACC ACTTCC 3'

AMX9- 5' CCAGCCCCAGCCTGTT CAGCCAC 3'

AMX10- 5' TGTCTGCTAATGGTACTTTTTTAG 3'

Samples were heated initially to 95°C for 5 min. Each cycle comprised denaturation at 95°C for 50 sec, primer annealing at 67°C for 1 min and polymerization at 72°C for 2 min. Samples were subjected to 35 cycles of amplification followed by a final extension of 72°C for 7 min. Amplification was carried out in a Perkin-Elmer GeneAmp 2400 thermal cycler. Amplification products were visualized by electrophoresis on vertical 5% polyacrylamide gels in 1X TBE (89 mM Tris-Borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA), followed by silver staining (Bio-Rad Silver Stain Kit).

3. Results and discussion

The use of buccal epithelial cells as source of DNA for PCR amplifications has several advantages over blood sampling. The collection of material is fast and inexpensive, buccal samples can be easily obtained from people who are reluctant to donate blood, consent becomes simplified, there is no need of medical supervision during sampling, and the risk of contamination is reduced [9,10].

Figure 1 illustrates typical PCR products from total genomic DNA derived from buccal epithelial cells. The amplifications produced specific reaction products of 1690 base pairs [bp] (AMX1-AMX2), 1986 bp (AMX3-AMX4), 1550 bp (AMX5-AMX6), 879 bp (AMX7-AMX8), and 2039 bp (AMX9-AMX10), spanning the whole amelogenin X gene. It shows that buccal epithelial cells can be used for the PCR amplification of large DNA fragments. The amount of DNA extracted ranged from 2.1 ug to 360 ug, which is sufficient to enable PCR amplification. The success of PCR amplifications was around 90% of large fragments ranging from 879 to 2039 base pairs (table I). Failure to amplify DNA may result

from degradation or from the presence of inhibitors, which interfere with PCR reaction. Inhibition can be in most cases overcome by adding bovine serum albumin to PCR reaction [11,12,13], or by repurification of DNA with Chelex extraction [14]. The use of small volumes of DNA extract is also recommended in order to reduce the amount of inhibitors [3,14].

The X-Y homologous gene amelogenin has been used as a PCR sex typing test for humans. Gender determination can be a valuable piece of information in forensic investigations. Most PCR sex typing systems rely on the amplification and electrophoretic separation of the amelogenin gene. These systems produce small PCR products with 106-112 bp [15,16] or 330-218 bp [14] from the X and Y chromosomes respectively. However, the main difference between X and Y loci is a 177 bp insertion in the X gene [17]. The X and Y sequences can be amplified using a single set of primers which produce a 977 bp and 780 bp fragments [18], which can be clearly distinguished in agarose or polyacrylamide gels. The results presented here show that buccal epithelial cells may be the preferred source of DNA for sex typing analysis. Finally, it is worth mentioning that DNA extracted from this source has been routinely used in our laboratory for RLFP and direct sequencing of PCR products.

Acknowledgements

This project was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Grants 1995/4272-5 and 1996/11950-2.

References

- [1] P.A. Robinson, A.S. High, W.J. Hume, Rapid detection of human herpes simplex virus type I in saliva, *Archs. Oral Biol.* 37 (1992) 797-806.
- [2] C. Otswald, P. Muller, M. Barten, K. Rutsatz, M. Sonnemberg, K. Milde-Langosch, Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J. Oral Pathol. Med.* 23 (1994) 220-225.
- [3] F. Fridez, R. Coquoz, PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. *Forensic Sci. Int.* 78 (1996) 103-110.
- [4] D. Sweet, J.A. Lorente, A. Valenzuela, M. Lorente, E. Villanueva, PCR-based DNA typing of saliva stains recovered from human skin. *J. Forensic Sci.* 42 (1997) 447-451.
- [5] S.J. Meltzer, Determination of loss of heterozygosity using polymerase chain reaction. In: *Methods in molecular biology. PCR Protocols. Current Methods and Applications*, B.A. White (editor), 15 (1993) 129-136.
- [6] T.P. Ellis, K.E. Humphrey, M.J. Smith, R.G. Cotton, Chemical cleavage of mismatch: a new look at an established method. *Hum. Mutat.* 11 (1998) 345-353.
- [7] G.R. Taylor, J. Deeble, Enzymatic methods for mutation scanning. *Genet. Anal.* 14 (1999) 181-186.
- [8] S.J. Meltzer, Direct sequencing of polymerase chain reaction products. In: *Methods in molecular biology. PCR Protocols. Current Methods and Applications*, B.A. White (editor), 15 (1993) 137-142.
- [9] N. Lench, P. Stanier, R. Williamson, Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet* ii (1988) 1356-1358.

- [10] I. Meulenbelt, S. Droog, G.J.M. Trommelen, D.I. Boomsma, P.E. Slagboom, High-yield noninvasive human genomic DNA isolation method for genetic studies in geographically dispersed families and populations. *Am. J. Hum. Genet.* 57 (1995) 1252-1254.
- [11] E. Hagelberg, R. Hedges, Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342 (1989) 485.
- [12] C. Gehrig, M.N. Hochmeister, B. Budowle, R. Reynolds, R. Dirnhofer, HLA-DQA1 subtyping data in the Swiss population. *Forensic Sci. Int.* 83 (1996) 27-30.
- [13] M.N. Hochmeister, A discussion of 'PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction' *Forensic Sci. Int.* 83 (1996) 75-77.
- [14] M. Faerman, D. Filon, G. Kahila, C.L. Greenblatt, P. Smith, A. Oppenheim, Sex identification of archaeological remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 167 (1995) 327-332.
- [15] K.M. Sullivan, A. Mannucci, C.P. Kimpton and P. Gill, A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 15 (1993) 636-641.
- [16] A. Mannucci, K.M. Sullivan, P.L. Ivanov, P. Gill, Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.* 106 (1994) 190-193.
- [17] Y. Nakahori, O. Takenaka, Y. Nakagome, A human X-Y homologous region encodes amelogenin. *Genomics* 9 (1991) 264-269.
- [18] S.B. Copelli, C. Bergadá, A.E.C. Billerbeck, A.C. Goldberg, J. Kalil, D. Damiani, H.M. Targovnik, Molecular analysis of sex determination in sex-reversed and true hermaphroditism. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (1996) 743-748.

Figure legends

Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis showing PCR products from total genomic DNA derived from buccal epithelium. A- 879 bp product of amplification with primers AMX7 and AMX8. B- 2039 bp product of amplification with primers AMX9 and AMX10. Lane 1- ϕ X-174-RF DNA Hae III digest molecular weight marker (Pharmacia).

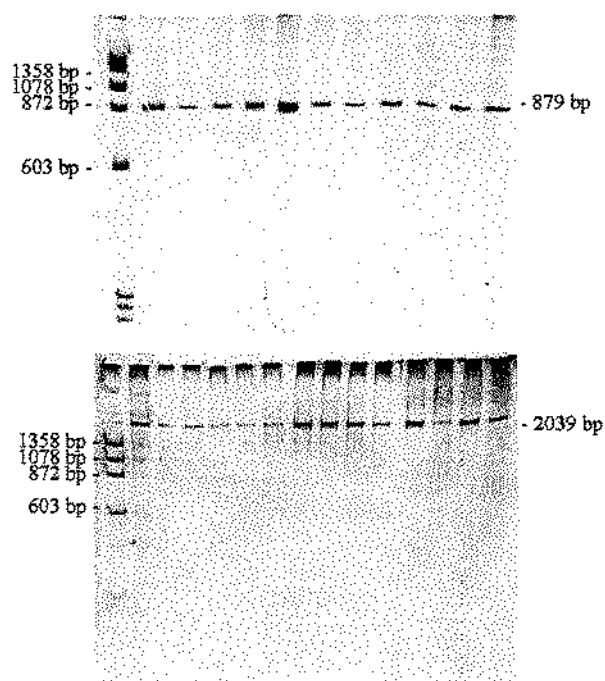


Table I- Positive amplification percentages of amelogenin X gene of 83 individuals.

Primers	Fragment size (bp)	% positive
AMX1-AMX2	1690	91.5
AMX3-AMX4	1986	92.5
AMX5-AMX6	1550	88
AMX7-AMX8	879	88
AMX9-AMX10	2039	88



APÊNDICE

PLANO GERAL DA TESE

A amelogenina é a principal proteína envolvida na formação do esmalte dental humano, influenciando diretamente sua dureza e espessura. Embora o gene da amelogenina se localize nos cromossomos X e Y, o AMGX responde por cerca de 90% da mensagem. Este fato explica porque a Amelogênese *Imperfecta*, doença que afeta a função e estética do esmalte dental, ligada ao cromossomo X é mais branda em mulheres. Ainda, os transcritos dos AMGX e AMGY são diferencialmente processados, gerando pelo menos cinco tipos de mRNA. Existem evidências de que haja também heterogeneidade da amelogenina em nível interindividual, em função da existência de polimorfismo nesse gene, o que provavelmente contribui na determinação de características peculiares e individuais ao esmalte dental. Assim, o objetivo do presente estudo é a investigação da presença de polimorfismos no gene da amelogenina X, através da técnica de RFLP-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material. O DNA genômico será obtido a partir de bochecho com solução de glicose a 3% e raspagem da mucosa bucal de 60 indivíduos do sexo feminino pertencentes a 03 etnias; 20 caucasianas de descendência européia, 20 negras de descendência africana, e 20 asiáticas de descendência japonesa. As amostras serão obtidas com o consentimento das pacientes seguindo as recomendações do código de ética para os projetos da FAPESP. O DNA será extraído com fenol/clorofórmio.

Métodos. 1. O gene será dividido em 5 fragmentos amplificados por pares de “primers” específicos (AMX). As seqüências, assim, terão 1690pb (AMX1-2), 1986pb (3-4), 1550pb (5-6), 879pb (7-8) e 2039pb (9-10), respectivamente. *PCR.* 500ng de DNA genômico serão adicionados à mistura de 1µM de oligonucleotídeos (“primers”), 200uM de dNTPs e 0,5 unidade de *Taq* DNA Polimerase. As amostras serão inicialmente denaturadas a 95°C por 2 min. e submetidas a 35 ciclos de 94°C por 1 min., 67°C por 1 min. e 72°C por 2 min em um termociclador convencional.

2. Análise de polimorfismo (*RFLP* – polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição). Os produtos das PCRs serão digeridos pelas enzimas de restrição *Taq* I (T↓CGA), *Hpa* II (C↓CGG), *Rsa* I (GT↓AC) e *Hha* I (GCG↓C). Os produtos de digestão serão analisados em gel de poliacrilamida a 5% e corados pela prata.

SINOPSE DA TESE

O DNA genômico foi obtido de 86 mulheres: 29 caucasóides, 27 negróides, 28 japonesas e 2 indianas. As cinco seqüências intragênicas foram amplificadas por PCR para cada indivíduo e cada qual digerida pelas quatro enzimas de restrição (RFLP) para análise de polimorfismo. Foram detectadas duas formas variantes com relação ao padrão de restrição da enzima *Rsa* I no segundo intron do gene ("primers" AMX 3 e 4 - seqüência de 1986 pb), mas o número de indivíduos analisados não permite a determinação precisa da frequência alélica na população. A análise das seqüências de 1690 pb, amplificadas pelos "primers" AMX1 e AMX2 (éxon 1, íntron 1, éxon 2), sugere a presença de uma deleção de cerca de 700 pb em um dos indivíduos analisados. Clinicamente e radiograficamente o esmalte da paciente não mostrava quaisquer alterações de padrão estético ou de espessura dignas de nota, possivelmente pela ocorrência da mutação em região intrônica, o que poderá ser confirmado pelo seqüenciamento do segmento amplificado. Concluimos que 1) a RFLP-PCR é útil numa análise preliminar na busca de polimorfismos, principalmente na investigação de grandes seqüências, sendo mais acurada essa busca quanto maior o número de enzimas utilizadas. 2) A possibilidade de amplificar seqüências de DNA genômico de grande massa molecular a partir de células descamadas da mucosa bucal para a análise de PCR permite uma análise genética mais fácil, rápida e não-invasiva, através de um simples bochecho de solução açucarada pelo paciente. Este protocolo pode ser de grande valia em estudos epidemiológicos que demandam amostragem em larga escala, principalmente quando crianças ou pessoas relutantes em doar sangue fizerem parte do grupo amostral, dispensando supervisão médica e eliminando riscos de infecção durante a coleta das amostras.