

CRISTIANE PEREIRA BORGES SAITO

**Análise de polimorfismos na região de íntron do gene *MSX1* em indivíduos com
Hipodontia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental. Área de Morfologia

Piracicaba

2005

i

CRISTIANE PEREIRA BORGES SAITO

**Análise de polimorfismos na região de íntron do gene *MSX1* em indivíduos com
Hipodontia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-
Dental. Área de Morfologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba

2005

ii

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Sa28a

Saito, Cristiane Pereira Borges.

Análise de polimorfismos na região de íntron do gene *MSX1* em indivíduos com hipodontia. / Cristiane Pereira Borges Saito. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

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

1. Eletroforese. 2. Polímeros. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Polymorphisms in *MSX1* gene can be related to tooth agenesis in a Brazilian population

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Electrophoresis; Polymers

Área de concentração: Morfologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora: Raquel Mantuanelli Scarel Caminaga; Rui Barbosa de Brito Júnior; Sérgio Roberto Peres Line

Data da defesa: 24/02/2005



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2005, considerou a candidata CRISTIANE PEREIRA BORGES aprovada.

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

PROF. DRa. RAQUEL MANTUANELLI SCAREL CAMINAGA

PROF. DR. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Marli e Alberto** pelo imenso apoio, afeto e amizade de todos esses anos, minha muito obrigada. Ao meu marido **Daniel Saito**, pelo companheirismo, amor e compreensão por mim demonstrados em todas as horas. À **Tsai Siu Mui**, pela ajuda incondicional.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line**, sua inteligência, carisma e humildade os tornam um grande mestre e a todos os colegas e amigos da FOP-UNICAMP, Faculdade de Odontologia de Piracicaba-Universidade de Campinas, especialmente os mais presentes nos momentos difíceis, **Alexandre, Marisi, Marcelo, Cristiane, Isabela e Regina**, minha muito obrigada. A todos os funcionários da FOP-UNICAMP, pela prestatividade e atenção. À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho**.

A todos os voluntários que se dispuseram com tanto desprendimento a participar desta pesquisa, minha muitíssimo obrigada.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	1
Resumo	4
Abstract	5
1. Introdução	6
2. Revisão da Literatura	8
3. Objetivos	19
4. Material e Métodos	20
5. Resultados	26
6. Discussão	31
7. Conclusões	34
Referências Bibliográficas	35
Anexos	50

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

Aa	Aminoácido.
Antp	Antenapedia , designa partes do corpo da <i>Drosophila melanogaster</i> .
APS	Persulfato de amônio.
arg196pro	Arginina196prolina.
BMP	Proteína morfogenética do osso, <i>bone morphogenetic protein</i> .
C	Citosina.
CA	Dinucleotídeo citosina adenina.
Cm	Centímetros.
ddNTP	Dideoxynucleotídeo.
Dlx2	<i>Distal-less homeobox 2</i> .
ΔDlx5	Proteína Dlx5 truncada com ausência do domínio <i>homeo</i> .
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>).
dNTP	Deoxynucleotídeo.
EDTA	Etilenodiaminotetraacético.
<i>Et al</i>	E outros (abreviatura de <i>et alii</i>).
FGF	Fator de crescimento fibroblástico.
FOP-UNICAMP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Universidade de Campinas.
G	Guanina.
<i>Gli</i>	Pertence à família de proteínas Gli –Kruppel.
HCl ⁻	Hipoclorito de sódio.
<i>Hox7</i>	Antiga denominação do grupo de genes homeóticos <i>Msx</i> .

<i>Knockout</i>	Técnica utilizada em Biologia Molecular na qual se utilizam ratos transgênicos, ou geneticamente modificados.
Lef1	<i>Lymphoid enhancer binding factor 1</i> .
<i>Locus</i>	Diferentes alelos colocados na mesma posição em cromossomos homólogos.
M	Molar.
mA	Miliamper.
met61lys	Metionina61Lisina.
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio.
mM	Milimolar.
Msx	Nomenclatura para <i>muscle segment homeobox</i> em ratos.
MSX	Nomenclatura para <i>muscle segment homeobox</i> em humanos.
ng/μl	Nanograma por microlitro.
<i>nonsense</i>	Sem sentido. Mutação que impede a transcrição em RNA mensageiro e/ou a tradução em proteína funcional.
<i>Overnight</i>	De um dia para o outro. Expressão utilizada em Biologia Molecular.
<i>Pax</i>	Nomenclatura para <i>paired base homeobox</i> em ratos.
Pb	Pares de bases.
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR.
4p16.1	Localização do gene <i>MSX1</i> humano no braço curto do cromossomo 4.
<i>RFLP</i>	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).

RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic acid</i>).
Rpm	Rotações por minuto.
ser202stop	Serina202códon de parada.
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
TBP	TATA <i>binding protein</i> .
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> . Enzima extraída da bactéria que leva o seu nome e que é adaptada a altas temperaturas.
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i> .
TBE	Tampão tris borato EDTA.
TE	Tris/EDTA.
TGF- β	Fator de crescimento transformante – beta, <i>tumor growth factor</i> – β .
μ l	Microlitros.
>	Maior que.
<	Menor que.

A ausência congênita de um ou mais dentes, denominada agenesia dentária ou hipodontia, figura entre as anomalias mais bem reconhecidas em humanos, porém de etiologia ainda desconhecida. Os dentes permanentes mais comumente ausentes são: terceiros molares, segundos pré-molares e incisivos laterais superiores. A hipodontia não representa um sério problema de saúde pública, mas pode causar disfunções mastigatórias e da fala, bem como problemas estéticos. O gene *MSX1* tem um papel crítico no desenvolvimento crânio-facial, como já foi observado em experimentos de expressão em fenótipos de ratos transgênicos. Com isso, mutações no gene *homeobox* humano *MSX1* podem ser responsáveis por alguns tipos de hipodontia ou agenesia dentária em humanos. O objetivo do presente estudo foi correlacionar polimorfismos no gene *MSX1* com a agenesia dentária ou hipodontia em indivíduos da espécie humana. Foram coletadas amostras de 200 pacientes – 100 pacientes sem agenesia e 100 pacientes com agenesia de incisivos, pré-molares e/ou terceiros molares permanentes. Para ambos os grupos (controle e agenesia), 4 alelos foram encontrados: 169, 171, 173 e 175, utilizando-se eletroforese em gel desnaturante para a separação dos alelos de interesse. O alelo 169 foi o mais prevalente em ambos os grupos e pacientes portadores do genótipo 169-169 têm 1,85 mais chance de desenvolver agenesia, segundo a análise de *odds-ratio* (OR=1,85; 95% CI= 1,03 – 3,32; p=0,05). Pacientes não portadores do alelo 175 possuem maior chance (p=0,04) de desenvolver esta alteração (OR= 2,12; 95% CI=1,05–4,26).

ABSTRACT

Congenital agenesis of one or more permanent teeth, also known as hypodontia, is among the most well-recognized morphologic anomalies in humans, and yet the etiology is largely unknown. The most common permanent missing teeth are the third molars, second premolars and maxillary lateral incisors. Hypodontia does not represent a serious public health problem, but it may cause masticatory and speech dysfunctions and esthetic problems. *MSX1* has a critical role in craniofacial development, as indicated by expression assays and transgenic mouse phenotypes. Thus, mutations in the homeobox of human *MSX1* must be responsible for some instances of tooth agenesis in humans. DNA was extracted from oral epithelial cells of 100 control individuals and 100 individuals with tooth agenesis. PCR (polymerase chain reaction) and denaturing gel electrophoresis were employed in the investigation of four alleles: 169,171,173 and 175 (corresponding to their respective size in base numbers). The shortest allele, 169, was the most prevalent in both groups. In this work, patients who presented the 169-169 genotype had a 1.85 higher risk to develop hypodontia (OR=1.85; 95% CI= 1.03 – 3.32; p=0.05). Patients who did not show the 175 allele had higher risk to develop hypodontia (p=0.04), (OR= 2,12; 95% CI=1,05–4,26) suggesting an important role for this polymorphism in the etiology of tooth agenesis.

1. INTRODUÇÃO

Cada organismo possui a informação requerida para construir e manter uma cópia viva de si próprio. A partir dos conceitos de hereditariedade mendelianos concluiu-se que cada gene possuía dois alelos responsáveis, por sua vez por um único fenótipo. Para a genética moderna, um dos principais desafios é identificar e entender os mecanismos genéticos responsáveis pela diversidade fenotípica que existe em uma população. As características fenotípicas seriam causadas ou influenciadas por polimorfismos presentes em determinados genes que atuam durante o desenvolvimento embrionário e crescimento. Segundo Schalk-van der Weide *et al.* (1994), a hipodontia, ausência congênita de um a seis dentes permanentes e/ou decíduos, é uma das características observadas em mais de 120 síndromes, sendo em algumas delas muito importante para o diagnóstico. Em algumas síndromes, a agenesia dentária é meramente descrita como um atributo associado. Uma das principais síndromes em que a ausência congênita de dentes é um aspecto chave para o diagnóstico é a Displasia Ectodérmica Anidrótica. Indivíduos afetados apresentam, além de hipodontia, hipertricose (rareamento de cabelos) e inabilidade de transpirar devido à falta ou menor quantidade de glândulas sudoríparas (anidrose ou hipoidrose), os quais são tecidos originados embriologicamente da ectoderme (KuriSu & Tabata, 1997; Thesleff, 1996). As alterações no número ou na estrutura dentária ocorrem como característica principal ou secundária.

A agenesia dentária ou hipodontia é definida como ausência congênita de um ou mais (até seis) dentes permanentes e/ou decíduos (Stewart & Poole, 1982). É uma das alterações mais frequentes da dentição humana e pode ocorrer associada a síndromes ou como uma entidade isolada, podendo, neste caso, seguir um padrão herdado ou não. Os terceiros molares são os dentes mais afetados, estando ausentes em aproximadamente 20% da população, seguidos pelos segundos pré-molares (3,4%) e incisivos laterais maxilares (2,2%) (Graber, 1978; Cua-Benward *et al.*, 1992). De acordo com Bredy *et al.* (1991), Lynham (1990) e Grahnén (1956), que observaram indivíduos de origem européia, a prevalência de dentes ausentes foi: terceiros molares > segundos pré-molares inferiores > incisivos laterais superiores. Ainda, em indivíduos caucasianos, segundo Lidral & Reising (2002), a forma de agenesia mais comum envolve terceiros molares, com aproximadamente 10 a 25% da população afetada. Achados de incidência geral da

hipodontia, excluindo-se terceiros molares, ainda segundo os mesmos autores, variam substancialmente, de 2 a 10% na população. Desta forma, a agenesia dentária de terceiros molares, segundos pré-molares superiores, e incisivos laterais superiores pode ser entendida como uma variação da normalidade (quando aparece como uma forma isolada), devido a sua presença freqüente na população, sendo um modelo adequado para estudos que correlacionam variações genéticas com variações morfológicas do desenvolvimento (Line, 2001).

O gene *MSX1*(*muscle segment homeobox*) pertence a um grupo de genes que codificam proteínas que regulam a transcrição de si próprios ou de outros genes, conhecidos como fatores de transcrição. Este grupo recebe, especificamente, a denominação de genes homeóticos, ou família *homeobox* (Hewitt *et al.*, 1991), sendo expressos principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e modulando a transcrição de outros genes (Maas & Bei, 1997). O gene *MSX1* localiza-se no braço curto do cromossomo quatro, sendo composto por um íntron e dois exons. A região de íntron possui seqüências nucleotídicas não codificantes, não sendo transcritas e nem traduzidas em proteínas importantes para a célula.

Correlações significativas entre a presença de polimorfismos gênicos específicos e a deficiência de membros em humanos já foram descritas em estudo anterior (Hwang *et al.*, 1998), no qual foram avaliadas diferentes repetições do dinucleotídeo CA em região intrônica do gene *MSX1*. Segundo este estudo, ficou constatada a existência de 4 variações alélicas para o gene em questão: 169, 171, 173 e 175 (segundo os respectivos tamanhos em pares de bases).

O presente estudo procura determinar a freqüência dos polimorfismos de repetição dinucleotídica CA em região intrônica do gene *MSX1*, em indivíduos portadores e não-portadores de hipodontia, visando-se a determinação de possíveis correlações entre a presença dos polimorfismos e as características clínicas apresentadas pelos pacientes. Procura-se, com isto, contribuir para o esclarecimento do papel do gene *MSX1* na etiologia da agenesia dentária.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Agenesia dentária ou hipodontia

A ausência de um ou mais dentes constitui uma das anomalias de desenvolvimento mais comuns no homem. Agenesia dentária e hipodontia são termos apropriados para significar a ausência congênita de um ou mais (até seis) dentes permanentes (Stewart & Poole, 1982). Oligodontia é definida como a ausência congênita de seis ou mais dentes, não associada a desordens sistêmicas (Stockton *et al.*, 2000; Arte *et al.*, 2004). Encontra-se também o termo anodontia parcial, com significado análogo a hipodontia, em alguns livros e artigos anteriores a 1978, quando foi considerado obsoleto (Erwing & Cockern 1949; Shafer *et al.*, 1958).

O gene *homeobox MSX1* foi associado com agenesia de segundos pré-molares e terceiros molares em uma única família por (Vastardis *et al.*, 1996). O envolvimento do gene *MSX1*, no entanto, foi excluído de outras formas de hipodontia como a agenesia de segundos pré-molares e incisivos laterais (Nieminen, 1995).

Apesar de a agenesia dentária estar associada a mais de 49 síndromes (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>), muitos casos estudados descrevem formas não sindrômicas e que podem ser tanto de natureza esporádica como familiar (Jorgenson, 1980; Gorlin *et al.*, 1990; Vastardis *et al.*, 1996). No caso da hipodontia por herança familiar, essa característica parece ser resultado de uma ou mais mutações pontuais em um sistema poligênico estreitamente ligado, transmitidas mais frequentemente de modo autossômico dominante, de penetrância incompleta e expressividade variável. A incidência de hipodontia como herança familiar varia com cada classe de dentes e os mais comumente afetados são os terceiros molares, seguidos pelos incisivos laterais superiores e segundo pré-molares inferiores. Agenesia envolvendo primeiros e segundos molares são extremamente raras (Graber, 1978). A agenesia dentária é a anomalia de dentição mais frequentemente observada, ocorrendo em 1 a cada 4 pessoas (Bredy *et al.*, 1991). A incidência varia de 1,6% a 1,9%, excluindo a agenesia de terceiros molares, que ocorre em 20% da população (Graber, 1978). Muitos estudos têm avaliado que a prevalência da agenesia dentária (exceto terceiros molares) varia de 5% a 10% em populações européias e asiáticas (Arte *et al.*, 1996). Os dentes mais afetados são os

segundos pré-molares (3,4%) seguidos dos incisivos laterais maxilares (2,2%) (Graber *et al.*, 1992). A agenesia ou hipodontia de pelo menos um dente e a má posição dos caninos, em humanos, também são anomalias conhecidas por ocorrer concomitantemente com frequência (Peck & Kataja, 2002).

Os indivíduos que possuem oligodontia além de apresentar número consideravelmente reduzido de dentes, o tamanho destes é menor e a forma muitas vezes é anômala. Observa-se também erupção dentária tardia, fato mais evidente em indivíduos do sexo masculino (Schalk-van der Weide *et al.*, 1994).

Expressão das proteínas homeóticas

O padrão de expressão das proteínas codificadas por genes do grupo homeo pode ser observado em vários modelos de estudo e entre eles está o que utiliza ratos *knockout* (Satokata & Maas 1994) para os genes que codificam essas seqüências de aminoácidos. O desenvolvimento dentário de camundongos foi o primeiro exemplo de um órgão no qual as interações indutivas e eventos moleculares de sinalização começaram a ser definidas (Vainio *et al.*, 1993; Thesleff *et al.*, 1995). O grupo de genes homeobox foi originalmente identificado como uma região de 180 pares de bases no DNA dos genes da *Drosophila melanogaster*, onde mutações em antenapedia (*Antp*) resultaram na transformação da antena em parte do corpo semelhante à pata (Scott *et al.*, 1983; McGinnis *et al.*, 1984; Gehring, 1987). Os genes homeobox também estão presentes em outros indivíduos do reino metazoa, incluindo: *Caenorhabditis elegans* (Burglin *et al.*, 1989; 1991) *Xenopus laevis* (Ruiz *et al.*, 1989; Su *et al.*, 1991), *Mus musculus* (Monaghan *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1989) e *Homo sapiens* (Boncinelli, 1988; Ivens *et al.*, 1990). Proteínas codificadas por genes do grupo homeo mostraram-se funcionar como fatores de transcrição (Ko *et al.*, 1988) e capazes de se ligar à molécula de DNA (Mihara & Kaiser, 1988), bem como alterar o padrão de expressão de si mesmas e de outros genes.

A expressão seletiva dos genes em células eucarióticas foi alcançada pela ação de proteínas reguladoras transcricionais que funcionam interagindo com seqüências específicas do DNA, em regiões de controle transcricional de seus respectivos genes alvo. Os fatores de transcrição têm como principal característica utilizar seqüências limitadas dos domínios conservados para sua interação com o DNA. O domínio *homeo*

pode ser encontrado em numerosas proteínas que regulam a expressão gênica durante a embriogênese e que têm sido altamente conservadas através da evolução com respeito à seqüência primária, à estrutura terciária e ao modo de interação com o DNA (Gehring, 1987; Kessel & Gruss, 1990; McGinnis & Krumlauf, 1992; Scott *et al.*, 1989; Laughon, 1991). Alguns desses resíduos são invariáveis entre os domínios *homeo* constituindo uma seqüência consenso que é crítica para manter a estrutura apropriada e para manter a atividade de ligação ao DNA (Scott *et al.*, 1989). Da mesma forma, estruturas de muitas proteínas que pertencem ao grupo *homeo* são altamente conservadas (Kissinger *et al.*, 1990; Billeter *et al.*, 1993), bem como a sua interação com os sítios de DNA que compartilham uma seqüência nucleotídica comum : TAAT (T-timina; A-adenina) (Scott *et al.*, 1989; Laughon, 1991). Apesar de muitos aspectos conservados, o domínio *homeo* é também o maior determinante da especificidade funcional *in vivo*. Portanto, numerosas proteínas com domínio *homeo* são expressas durante o desenvolvimento e suas características funcionais são direcionadas por resíduos específicos contidos em seus domínios (Kuziora & McGinnis, 1989; Gibson *et al.*, 1990; Mann & Hogness, 1990; Lin & McGinnis, 1992; Zeng *et al.*, 1993). É presumível que esses resíduos sirvam como intermediários na seleção de genes marcados, através da combinação de seletivas interações proteína-proteína e proteína-DNA. Portanto, enquanto todos os homeodomínios se ligam aos sítios de DNA que contêm um fragmento comum TAAT, domínios *homeo* diferentes exibem sutil, porém distinta preferência por sítios de DNA que diferem em nucleotídeos ao flanquear esse fragmento (Treisman *et al.*, 1989; Ekker *et al.*, 1991, 1992; Dessain *et al.*, 1992; Corsetti *et al.*, 1992; Catron *et al.*, 1993; Pellerin *et al.*, 1994). Além disso, foi demonstrado que a especificidade de ligação ao DNA *in vitro* está correlacionada com a especificidade funcional *in vivo* (Dessain *et al.*, 1992; Ekker *et al.*, 1992), indicando que suas propriedades de ligação diferencial às proteínas podem fornecer uma contribuição significativa para funções seletivas das proteínas que contêm o domínio *homeo*.

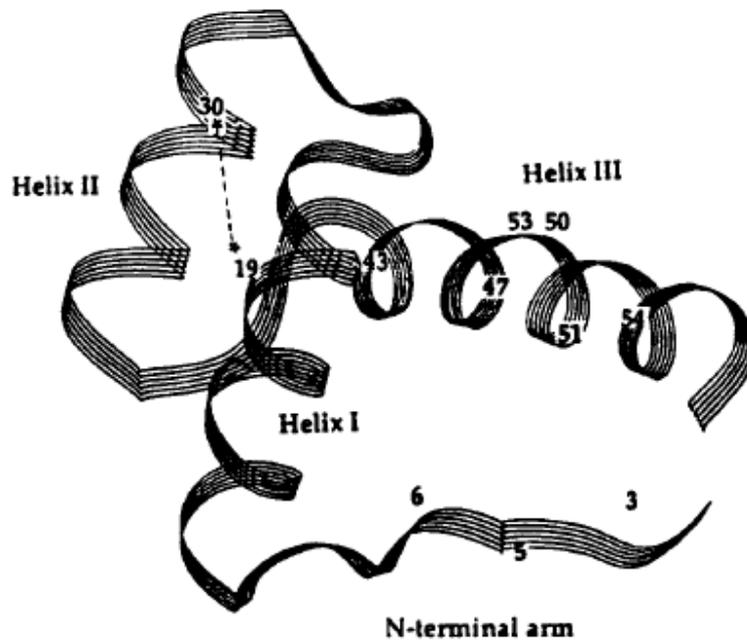


Figura 1: Modelo da estrutura do homeodomínio *MSX1* (descrito por Shang *et al.* 1994) baseado em estrutura cristalográfica do DNA.

Homeobox, genes *hox* dos vertebrados são estreitamente relacionados, tanto na seqüência quanto na organização genômica aos genes homeóticos da *Drosophila*. A maioria dos genes pertencentes ao grupo homeobox dos vertebrados estão localizados em quatro únicos grupos no genoma: *HoxA*, *HoxB*, *HoxC*, e *HoxD*, cada grupo constituído por aproximadamente 10 genes. Existe também uma correlação entre a ordem linear dos genes *Hox* no cromossomo e sua expressão regional no desenvolvimento do embrião (Manak & Scott, 1994; Carrol, 1995). Em contrapartida, os membros da classe de genes *homeobox Msx*, que também compartilham grande homologia com o gene *msh* da *Drosophila*, são encontrados fisicamente separados no genoma dos vertebrados (Holland *et al.*, 1994; Davidson, 1995). Apesar de os genes *Hox* codificarem fatores de transcrição, e caracterizarem-se pela presença de um domínio composto por 60 aminoácidos de cadeia longa de hélice dobrada (Shang *et al.*, 1994), altamente conservados e que têm capacidade de se ligar ao DNA, o homeodomínio (*homeodomain*), os genes alvo da sua regulação e os mecanismos de funcionamento molecular estão somente no início de

serem desvendados. Em embriões de vertebrados, os caminhos da sinalização morfogênica foram parcialmente elucidados pela análise de membros (Riddle *et al.*, 1993; Niswander *et al.*, 1994; Laufer *et al.*, 1994; Yang & Niswander, 1995), somitos (Fan & Tessier-Lavigne, 1994; Johnson *et al.*, 1994; Munsterberg *et al.*, 1995; Pourquié *et al.*, 1996) e tubos neurais (Echelard *et al.*, 1993; Roelink *et al.*, 1995; Liem *et al.*, 1995). Na organogênese de mamíferos, no entanto, os caminhos da regulação que controlam sinalização são ainda desconhecidos.

No embrião em desenvolvimento, os genes *homeobox* desempenham um papel primordial na especificação da posição, padrão de formação e organogênese. Interações indutivas entre várias camadas de células, mediadas pela ação moléculas com seus receptores e uma cascata de eventos sinalizadores regulam a expressão espacial e temporal dos genes *Hox* (IzpiSu´ a-Belmonte & Duboule, 1992; Muneoka & Sassoon, 1992; Kessel & Gruss, 1990). A expressão ectópica inapropriada dos genes *Hox* que ocorre quando da sua eliminação por “*knockout*” genético, ocasiona sérias anomalias de desenvolvimento (Krumlauf, 1993; Dolle *et al.*, 1993).

Yang (1998) avaliou a proteína *Dlx5* com a ausência do domínio *homeo* ($\delta Dlx5$) e verificou que suas propriedades químicas poderiam ser significativamente diferentes daquelas nas quais a proteína estivesse completa. Em estudos prévios, esses autores demonstraram que as propriedades bioquímicas das proteínas *Dlx*, incluindo *Dlx5*, são moduladas por suas interações com a proteína *MSX1* e que a interação *Msx-Dlx* é mediada por seus respectivos *homeo* domínios (Zhang *et al.*, 1997).

O Gene *MSX1*, sua proteína e função

Os genes *Msx* já foram identificados em várias espécies incluindo: ratos, sapos, galinhas, peixes e humanos (Shen *et al.*, 1994; Davidson, 1995).

O gene *MSX1* encontrado em ratos, anteriormente conhecido como *Hox7/7.1*, apresentou cerca de 94% de similaridade com o gene encontrado em humanos, em especial 100% de identidade quando comparados os domínios *homeo* (Davidson, 1995).

As interações epitélio-mesenquimais governam o desenvolvimento de todos os órgãos de origem epitelial, incluindo os dentes e inúmeras outras estruturas como o

folículo do cabelo e glândulas mamárias (Kollar, 1970). O gene *MSX1* é expresso em altos níveis no mesênquima do processo mandibular e maxilar desde o estágio de iniciação, destacando-se na região em contato com o botão dental até o estágio de capuz, sendo menos expresso no estágio de sino (Maas & Bei, 1997). Nas regiões posteriores do palato em desenvolvimento não é observada a expressão do gene *MSX1*, somente nas regiões anteriores (Zhang *et al.*, 2002). O primeiro evento no desenvolvimento do dente molar ocorre no dia 11.5 do desenvolvimento embrionário (estágio E11.5), quando o epitélio oral se torna espessado e se tem a região de formação dentária que será representada pela lâmina dental. No estágio E12.5, a lâmina invagina para o interior do mesênquima dentário subjacente para formar o botão dentário. O mesênquima então se prolifera e condensa ao redor do botão, onde duas moléculas de adesão celulares, o sindecan-1 proteoglicano sulfato heparan (heparan sulfato proteoglycan syndecan-1) e a proteína tenascina da matriz extracelular são expressas no mesênquima dentário. Ambas as moléculas estão envolvidas na condensação celular (Thesleff *et al.*, 1995). O botão dentário então progride para o estágio de capuz (E14) e de sino (E16). Após o nascimento, essas interações epitélio-mesenquimais culminam com a diferenciação do epitélio em ameloblastos secretores de esmalte e o mesênquima em odontoblastos secretores de dentina, bem como em polpa e osso alveolar (Palmer & Lumsden, 1987). Antes do estágio E12.5, o arco epitelial mandibular pode provocar a formação dentária quando recombinado com a crista neural derivada do mesênquima do segundo arco branquial, enquanto que a combinação recíproca falha (Mina & Kollar, 1987; Lumsden, 1988). Dessa forma, nesse momento o potencial indutivo de formação dentária reside no provável epitélio dental. Depois do estágio E12.5, esse potencial muda para o mesênquima dentário, que pode agora induzir à formação dentária quando combinado com o segundo arco epitelial, enquanto o epitélio dentário e o segundo arco mesenquimal falham. Estudos recentes têm sugerido que o membro *BMP4* (*Bone Morphogenetic Protein 4*) da super-família *TGF- β* , constitui um componente do sinal indutivo que transfere o potencial de indução do epitélio-dental para o mesênquima. (Vainio *et al.*, 1993; Turecková *et al.*, 1995).

Em humanos, mutações no gene *MSX1* causam fissuras lábio-palatais e agenesia dentária (Blanco *et al.*, 2001). O domínio homeo do gene *MSX1* é o principal mediador em suas múltiplas funções como: ligação ao DNA, interações do tipo proteína-proteína, estabilidade e repressão da transcrição protéica. Uma mutação que ocasiona a troca de proteínas (*missense mutation*), resultando em substituição de arginina por prolina envolvendo o domínio *homeo* do gene *MSX1*, causa agenesia dentária seletiva em humanos, um fenótipo autossômico dominante. Essa mutação afeta segundos pré-molares e terceiros molares permanentes e foi descrita por Vastardis *et al.* (1996). Análises bioquímicas e funcionais da proteína mutante estabeleceram a haploinsuficiência, terminação empregada quando o produto de um gene está na metade do nível normal, do gene *MSX1* como a base molecular que explica esse fenótipo. A proteína mutante exibiu estabilidade reduzida como resultado de perturbações estruturais e falha em interagir com o DNA ou com fatores de proteína análogos. Portanto, sua habilidade em funcionar como repressor transcricional foi imensamente prejudicada. O aumento da suscetibilidade de acordo com a dosagem do gene *MSX1*, parece ser específico para os seres humanos. Curiosamente, em ratos à despeito de mutações nulas (*Null mutation*), que não interferem na transcrição, no gene *MSX1*, o fenótipo resultante foi de completa ausência de desenvolvimento dentário, enquanto que ratos heterozigotos não apresentaram quaisquer anomalias dentárias (Satokata & Maas, 1994; Houzelstein *et al.*, 1997). A despeito dos diferentes fenótipos exibidos por diferentes dosagens do gene *MSX1* em humanos sua importância do desenvolvimento dentário permanece incontestável (Alappat *et al.*, 2003).

Segundo Takahashi (1997), em trabalho sobre a organização estrutural das regiões codificantes e não codificantes do gene *MSX1*, sugeriu que a expressão do gene *MSX1* pode estar sujeita à auto-regulação. Jezewski *et al.* (2003), que estudaram fendas palatais associadas a mutações no gene *MSX1*, encontraram alterações pontuais na região codificante do exon 2 que modificaram o padrão de *splicing* ou divisão -remoção dos íntrons do transcrito primário, do RNA mensageiro. Este mesmo trabalho sugere que microsátélites (*microsatellites*), extensões do DNA que contém repetições em tandem (por exemplo, CGECGECGE), no íntron têm mostrado influência sobre a expressão gênica sugerindo análise funcional para essa região do gene. Estudos *in vitro*, nos quais foi forçada a expressão do gene *MSX1* em células musculares, os mioblastos, a

diferenciação em miotubos foi bloqueada (Song *et al.*, 1992). Subsequentemente, Zhang *et al.* (1996) mostraram que o *MSX1* poderia reprimir alguns promotores até mesmo se os sítios de ligação do gene *MSX1* fossem removidos, possivelmente isso aconteceria por interações proteína-proteína entre os componentes da maquinaria transcricional e a proteína *MSX1*. A demonstração da ligação do *MSX1* à proteína de ligação TATA (TATA binding protein, TBP) condiz com tal mecanismo de repressão transcricional (Catron *et al.*, 1995; Catron *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). O braço N-terminal da proteína *MSX1* (ver figura 1) desempenha um papel importante nesse processo, onde o *MSX1* age como repressor transcricional sobre promotores que contém e que não contém TBP (TATA binding protein), *in vivo* e *in vitro* (Catron *et al.*, 1993, 1995).

Em ratos, um fator de transcrição além do *MSX1*, o *MSX2* tem interação epitélio-mesenquimal direta e ambos iniciam a formação dentária (Hewitt *et al.*, 1991; Jowett *et al.*, 1993). O gene *MSX1* é fortemente expresso no mesênquima dentário e excluído do epitélio dentário durante os estágios de botão, capuz e sino da odontogênese (MacKenzie *et al.*, 1991a,b; 1992). A expressão do *Msx2* é inicialmente restrita ao mesênquima abaixo da futura lâmina dentária, conseqüentemente marcando o mesênquima da papila dentária e o nó de esmalte epitelial (MacKenzie *et al.*, 1992). Ainda, de acordo com Davidson (1995) os genes *MSX1* e *Msx2*, os mais estudados do grupo *Msx*, demonstraram maior expressão nas áreas em que ocorrem interações epitélio-mesenquimais. Segundo esse autor, partindo do fato de que as proteínas sintetizadas à partir dos genes *Msx* são genuínos fatores de transcrição, a modulação transcricional dos genes marcados por proteínas *MSX1* e *Msx2* mutadas podem alterar um ou mais processos chaves da diferenciação celular, levando a anomalias de desenvolvimento. Agenesias dentárias seletivas e a craniosinostose do tipo Boston têm sido associadas com mutações pontuais no domínio *homeo* dos genes *MSX1* e *Msx2* respectivamente (Vastardis *et al.*, 1996; Jabs *et al.*, 1993).

Genes homeóticos e sua correlação com Agenesia Dentária

A função dos genes do grupo *homeo*, em mamíferos, tem sido sugerida através de estudos em ratos mutantes (Stadler *et al.*, 1992) e evidências adicionais da importância desses genes para o desenvolvimento foram observadas em ratos transgênicos, homocigotos para a forma mutante de genes *homeobox* (Capecchi, 1989). Em 1996,

Vastardis *et al.* detectaram uma mutação *missense*, ou seja, ocasiona a troca de aminoácidos sem a perda da função protéica, (arg196pro) na região localizada no domínio homeo do gene *MSX1*, transmitida de forma autossômica dominante e que é responsável pela agenesia de segundos e terceiros molares em uma família. Outra mutação, também no domínio homeo desse gene foi encontrada na síndrome de Witkop (Jumlongras *et al.*, 2001) desta vez uma mutação *nonsense*, ou seja, ocasiona a perda da função protéica (ser202stop), co-segregada com o fenótipo. Indivíduos afetados por essa doença mostraram muitos tipos de dentes ausentes mas, principalmente: pré-molares, primeiros e terceiros molares. Uma terceira mutação no gene *MSX1* foi encontrada em uma família holandesa, relatada por van den Boogaard *et al.* (2000), foi associada à fenda orais e faciais, bem como agenesia dentária, predominantemente segundos pré-molares e terceiros molares, segregando-se de forma autossômica dominante. Nesta síndrome, uma mutação *nonsense* (ser105stop) no exon 1 do domínio homeo foi observada em todos os indivíduos afetados. Mais recentemente, em 2002, Lidral & Reising relataram uma quarta mutação em uma síndrome relacionada ao gene *MSX1* (met61lys), a qual se segrega de forma autossômica dominante e, segundo os autores, apresentou cinco membros de uma mesma família com agenesia de segundos pré-molares e terceiros molares.

O gene *PAX9* tem sido descrito como contribuinte para uma forma específica de agenesia dentária. Produtos do gene *Pax* parecem funcionar ligando-se a sequências de DNA e modificando a atividade transcricional de genes próximos (Chi & Epstein, 2002). De acordo com Stockton *et al.* (2000), uma mutação no quadro de leitura (frameshift) dos genes *Pax*, resultando em uma alteração no gene *Pax9*, está associada a agenesia dentária. A mutação pode ter efeito de uma das seguintes maneiras: perda da função devido à ausência do domínio de ligação do DNA; haploinsuficiência para o mutante mRNA ou instabilidade da proteína; efeito dominante pela interferência com o produto do alelo normal do gene *Pax9*.

Outros Genes envolvidos na Odontogênese

Muitas moléculas são expressas no início do desenvolvimento (estágio de iniciação) do epitélio dental, como: *Pax9*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Fgf1*, *Fgf2*, *Fgf4*, *Fgf8*, *Fgf9*, *Lef1*, *Gli2*, e *Gli3*, entre outros (<http://bite-it.helsinki.fi>) , conforme Vieira (2003). Todos esses genes são candidatos em potencial para agenesia dentária humana.

A expressão do gene *Pax9* pode ser observada no mesênquima do arco mandibular, na região dos futuros molares (Peters & Balling, 1999). Em 2004, Vieira *et al.*, publicaram trabalho avaliando os genes *MSX1*, *PAX9* e *TGFA* no qual avaliaram 116 famílias com indivíduos afetados por agenesia dentária, com exceção de terceiros molares. Neste, foi testada a interação dos genes *MSX1-TgfA* e *MSX1-Pax9*, sendo encontrada associação entre *MSX1-Pax9*, sugerindo que esses dois genes possam interagir para causar a hipodontia em humanos. Entre essas interações, podemos ainda citar a indução do *MSX1* sobre o *Bmp4*, que por sua vez induz o gene *Lef1* (Vainio *et al.*, 1993). A expressão da proteína *Bmp4* é primeiramente observada no epitélio da lâmina dentária do molar, no dia 11.5 de desenvolvimento embrionário (estágio-E11.5), porém ela se desloca, no estágio E12.5 para o mesênquima dentário, coincidentemente com a mudança do potencial de desenvolvimento dentário entre as camadas de tecidos (Vainio *et al.*, 1993; Turecková *et al.*, 1995). Além disso, essa proteína pode funcionar como uma molécula de sinalização indutiva no início da morfogênese dentária, capaz de causar mudanças morfológicas e de induzir sua própria expressão no mesênquima dentário. A proteína *Bmp4* também é capaz de induzir a expressão de dois membros da família de genes *homeobox Msx* em mamíferos: *MSX1* e *MSX2* no mesênquima dentário (Vainio *et al.*, 1993). O gene *Bmp4*, também requer que o gene *Msx1* induza sua própria expressão no mesênquima, sugerindo uma cascata genética durante o desenvolvimento dentário (Chen *et al.*, 1996).

Ratos deficientes para o gene *homeobox Lef1*, exibiram uma parada no estágio de botão fenotipicamente similar ao observado para o gene *MSX1*, no desenvolvimento dos dentes molares (van Genderen *et al.*, 1994), sugerindo a possibilidade do *MSX1* e do *Lef1* agirem sob o mesmo mecanismo genético.

Modelos animais nos quais foram produzidas mutações nulas, que não impedem a transcrição em RNA e/ou tradução para uma proteína funcional) para genes *Dlx1* e *Dlx2* não desenvolveram molares superiores, sendo os inferiores normais (Thomas *et al.*, 1997). Em contraste com ratos mutantes para a activina βA , que desenvolveram molares superiores com ausência dos molares inferiores (Ferguson *et al.*, 1998). Bushdid *et al.* (2001), demonstraram que um membro da família dos fatores nucleares de transcrição, NF- κB (nuclear factor- κB), que está envolvido na proliferação diferenciação e apoptose

celular durante o desenvolvimento embrionário quando inibido pode alterar o padrão de expressão de genes como o *MSX1*, sugerindo que esse gene possa interferir na regulação dos sinais da expressão gênica do *MSX1*.

3. OBJETIVOS

O presente estudo tem a proposta de investigar possíveis correlações entre polimorfismos na região de íntron do gene *MSX1* em 100 indivíduos humanos afetados pela agenesia dentária de incisivos, pré-molares e/ou terceiros molares permanentes, e 100 indivíduos não afetados, através de :

- a) Amplificação do DNA da região polimórfica.
- b) Observação em gel de poliacrilamida desnaturante, associada a seqüenciamento do DNA para comprovação do tamanho dos fragmentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

A amostragem foi composta pelo DNA genômico de 200 (duzentos) pacientes: 100 (cem) indivíduos portadores de agenesia dentária de terceiros molares, primeiros pré-molares e/ou incisivos e 101 (cento e um) indivíduos não portadores de quaisquer tipos de agenesia dentária.

Os pacientes foram selecionados entre os alunos de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade de Campinas (FOP – UNICAMP) e que se dispuseram a participar deste estudo. Indivíduos portadores de síndromes ou malformações de qualquer natureza foram excluídos desta pesquisa.

Participaram indivíduos de ambos os sexos e não foram excluídos indivíduos pertencentes a qualquer grupo étnico racial, pois este procedimento seria de pouco valor em um país altamente miscigenado racialmente.

Obtenção do DNA

O DNA genômico foi obtido à partir de bochecho com 3 ml de solução de glicose a 3% (d-glicose anidra), autoclavada, por 1 minuto e posterior depósito em tubo de vidro também autoclavado. A solução de glicose impede que as células sejam rompidas, impedindo assim, a perda do DNA. Pediu-se ainda que o paciente realizasse um bochecho vigoroso para que fosse obtido maior número de células.

Cada solução bochechada foi imediatamente centrifugada por 10 minutos a 2.000 rpm (raio da centrifuga de 15 cm). Ao precipitado de material celular acrescentou-se 500µL de tampão de extração (pH 8,0), SDS a 0,5% e 600.000 U/L de Garamicina (Gentamicina). A solução foi homogeneizada e armazenada a -20°C até o momento da extração do DNA.

Extração do DNA

Depois de descongeladas, as amostras em tampão de extração foram incubadas a 37°C com 100 ng/mL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sob agitação constante durante uma noite. Tal procedimento é necessário para desnaturar as proteínas nativas antes de proceder a extração do DNA. Para remover proteínas de preparações de ácidos nucleicos foi utilizada uma mistura do fenol equilibrado, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1) (Maniatis *et al.*, 1989). Essa mistura de solventes orgânicos foi adicionada em igual volume às amostras celulares já digeridas. Depois de homogeneizadas, centrifugou-se por 15 segundos a 12.000g em temperatura ambiente. Reservou-se o sobrenadante (que contém o DNA) e desprezou-se a fase orgânica. Tal procedimento foi repetido mais duas vezes. Desta maneira, após três “banhos” da mistura de solventes orgânicos, o DNA foi purificado das proteínas. Para remover quaisquer traços de fenol que pudessem contaminar o DNA, foi realizado um último banho com o clorofórmio. A seguir, procedeu-se à precipitação do DNA com 1/10 (v/v) de acetato de sódio 3,0 M (pH5,2) mais o dobro do volume de etanol absoluto gelado, segundo Maniatis *et al.* (1989). O DNA precipitado (seco) foi ressuspenso em 60µL de tampão TE (trisCl 10 mM, EDTA 1mM PH 7,8) à temperatura ambiente durante uma noite. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

Amplificação dos Segmentos do Gene *MSX1* por PCR - Reação em Cadeia da Taq DNA Polimerase – (*Polymerase Chain Reaction*)

A região de interesse, um segmento do íntron desse gene, foi amplificado em cada amostra por reação de PCR. Os *primers* utilizados foram previamente descritos por Hwang S.H. *et al.*, 1998 e produzidos pela IDT® (*Integrated DNA Technologies, Inc*).

Os iniciadores utilizados na amplificação do segmento de interesse foram:

Forward 5'- GGG CAT GTT GAT GTC TGC TGAC – 3'

Reverse 5'- TTA GAT TGT CAT CAG TCCTC – 3'

Para as reações em cadeia da polimerase, foram utilizados aproximadamente 5µg/mL para um volume total de 50 µL contendo: 20mM de dNTP, 25mM de cada primer (*forward* e *reverse*), 1U de *Taq* DNA polimerase, 50 mM de Cloreto de magnésio (concentração final desses reagentes). O DNA genômico de cada amostra foi desnaturado inicialmente a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos consistindo em uma desnaturação de 95°C por 60 segundos, anelamento a 57°C por 60 segundos e extensão a 72°C por um tempo de 1 minuto. Após 7 minutos em uma temperatura de 72°C as amostras permaneceram por 4°C por um tempo não superior a uma hora. As reações foram realizadas no aparelho termociclador *GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer)*.

Eletroforese das amostras

As sequências foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida: acrilamida, bis-acrilamida (29:1) a 10%. Foi depositado no gel para a corrida 1µL de DNA amplificado (amostra) juntamente ao tampão carreador, também 1 µL contendo: xilenocianol a 0,25%, azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30% - diluídos em água bidestilada-deionizada. O padrão utilizado foi uma amostra de tamanho conhecido e que possui o mesmo comprimento do fragmento de interesse. As eletroforeses foram realizadas em cubas verticais, sob cerca de 20mA. Foi utilizado tampão - TBE1X- contendo: Tris-CL, ácido bórico e EDTA (89mM, 89mM, 2mM) e a “corrida” durou em média 2 horas, variando de acordo com pequenas oscilações da corrente. O método para corar foi a técnica do nitrato de prata (Blum *et al*, 1987), após o que foram secos e armazenados.

Gel de Poliacrilamida Desnaturante com Uréia

Após a eletroforese com o gel de poliacrilamida a 10%, as amostras foram submetidas a outra eletroforese, em gel de poliacrilamida: acrilamida, bis-acrilamida (27,5:1,36) a 8% desta vez usando uréia como elemento desnaturante. Nesta etapa foram construídos três géis para uma mesma corrida. O primeiro gel (na ordem em que foi inserido na placa) foi constituído por: acrilamida - acrilamida, bis-acrilamida (27,5:1,36)– 4,4 ml; TBE 5X – Tris-Cl, ácido bórico e EDTA (ethylenediaminetetraacetic), (89mM, 89mM, 2mM respectivamente) 3,0 ml; água – bidestilada-deionizada - 7,6 ml e como

catalisadores: TEMED (Tetramethylethylenediamine) – 7,5 µL e APS (persulfato de amônio) – 105 µL.

O segundo gel foi constituído por: acrilamida - acrilamida, bis-acrilamida (27,5:1,36) – 22,5 ml; TBE 5X – Tris-Cl, ácido bórico e EDTA (89mM, 89mM, 2mM) 15,5 ml; uréia – 31,824 g; água – bidestilada-deionizada – até completar um volume total de 76,5ml e como catalisadores: TEMED – 38µL e APS – 535,5 µL. O terceiro gel foi constituído por: acrilamida - acrilamida, bis-acrilamida (27,5:1,36) – 0,68 ml; TBE 5X – Tris-CL, ácido bórico e EDTA (89mM, 89mM, 2mM) 1,0 ml, água – bidestilada-deionizada - 3,0 ml e como catalisadores: TEMED – 2,5 µL e APS– 35 µL. O volume de DNA aplicado no gel variou de 1µL até 12µL de acordo com a intensidade da banda observada no primeiro gel (10%). Foi utilizado tampão carreador desnaturante, 10µL contendo: formamida, azul de bromofenol e xilenocianol (50:0,001:0,001) diluídos em água bidestilada-deionizada. Essa solução de DNA e tampão desnaturante foi submetida a um choque térmico, a qual permaneceu durante 3 minutos em água fervente e, após esse tempo, foi imediatamente transferido para o interior de um recipiente gelado (Markoff *et al.*, 1998). O padrão utilizado foi uma amostra de tamanho conhecido e que possui o mesmo comprimento do fragmento de interesse. Para evidenciação das bandas foi feita técnica do nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987), após o que, os géis foram secos e armazenados.

SEQUENCIAMENTO DO DNA

Eluição das amostras de DNA

A eluição das bandas nos géis foi feita à partir de cortes efetuados na altura dos diversos alelos encontrados. As bandas foram cuidadosamente excisadas com o auxílio de um bisturi estéril e submetidas a um protocolo preconizado por Sanguinetti *et al.* (1994), sendo incubadas a 95°C por 20 minutos em uma solução de 100 µL contendo Tris-HCl, KCl, MgCl₂, Triton® X-100, pH 9,0 (10mM, 50mM, 1,5mM, 0,1%). Após a incubação, 1 µL da solução foi retirada para reamplificação, utilizando protocolo idêntico ao descrito no tópico “Amplificação dos Segmentos do Gene *MSX1* por PCR - Reação em Cadeia da Taq DNA Polimerase – (*Polymerase Chain Reaction*)” e posterior purificação.

Purificação dos produtos amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Nesta fase, foi eleita a técnica de purificação do produto da segunda reação de PCR e não do gel de agarose. Foi utilizado o kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega* conforme protocolo descrito pelo fabricante.

Sequenciamento

O sequenciamento consiste em uma reação de PCR com a adição de ingredientes (ddNTPs- dideoxynucleotídeos) que interrompem o anelamento e assim podem ser lidas em um sequenciador. Nesse estudo, o sequenciamento de DNA é particularmente importante, pois permite a comprovação do tamanho dos fragmentos de DNA e posterior comparação entre indivíduos portadores e não portadores de agenesia dentária.

O fragmento do íntron, após a purificação foi submetido à reação de PCR em um termociclador *Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Para o sequenciamento foram utilizados 3,2 pmol do *primer forward*, 8 µL do *Big Dye Terminator Ready v.2.0 (Applied Biosystems)*, tampão de sequenciamento (*Buffer*: 200mM Tris-HCl pH 9,0, 5mM MgCl₂), aproximadamente 13 ng/µL de cada amostra purificada de DNA, 2 µL de água de Milli-Q para completar o volume final. O ciclo utilizado foi: 96°C para desnaturação inicial por 2 minutos, 25 ciclos consistindo em uma desnaturação de 96°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Após os 25 ciclos as amostras permaneceram por 4°C por um tempo não superior a uma hora. Terminada a amplificação, o produto foi precipitado com isopropanol a 60%, por 20 minutos à temperatura ambiente. A seguir, nova precipitação do produto foi realizada, com etanol a 70%, para retirada dos excedentes de dNTPs marcados e dos aneladores (*primer*). O precipitado foi submetido à 40°C por 5 minutos para volatilização dos resquícios de etanol. Para ressuspensão do precipitado foram utilizados 6µL de tampão carreador de DNA - 500µL de *Blue Dextran/ EDTA* (50mg/ml de *Blue Dextran*, 25 mM de EDTA pH 8.0). O precipitado ressuspendido foi desnaturado à 95°C por 3 minutos e mantido em gelo. A leitura das amostras transcorreu no aparelho capilar *ABI Prism 3100 DNA Sequencer[®]* e as sequências obtidas processadas pelo programa *Sequencing Analysis*. O sequenciador é capaz de “ler” e interpretar o fragmento colocado devido a marcação por corantes fluorescentes específicos que emitem luz em um determinado

comprimento de onda, transformando um sinal luminoso em sinal gráfico. O resultado é visto no cromatograma (ver anexo). Nele, cada “pico” é determinado por uma base nucleotídica caracterizada por uma cor específica para cada um dos quatro tipos de base. O programa de computador *BioEdit*[®] possibilitou a colocação das imagens em anexo a este trabalho.

Foram seqüenciadas 14 amostras de DNA, 13 de pacientes com hipodontia e 1 amostra de paciente sem hipodontia.

5. RESULTADOS

Obtenção do DNA

O protocolo descrito por Maniatis *et al.* (1989) para a separação da fração protéica mostrou-se bastante eficaz e atendeu às necessidades de obtenção de DNA puro e adequado para a utilização em técnicas de Biologia Molecular (ver tabelas 1 e 2).

Amplificação dos fragmentos do gene MSX1 por PCR

A amplificação dos segmentos do gene *MSX1* obteve sucesso tanto para os indivíduos com agenesia dentária como para os indivíduos normais.

Gel de Poliacrilamida Desnaturante com Uréia

Através dessa técnica foi possível a evidenciação, como já foi descrito por Vastardis *et al.* (1996) e Hwang *et al.* (1998), de quatro bandas com alturas diferentes, correspondentes ao tamanho dos alelos em pares de bases. Para a confirmação dos resultados alcançados pelo gel desnaturante, foi empregado o sequenciamento a partir de algumas amostras eluídas do gel e devidamente purificadas.

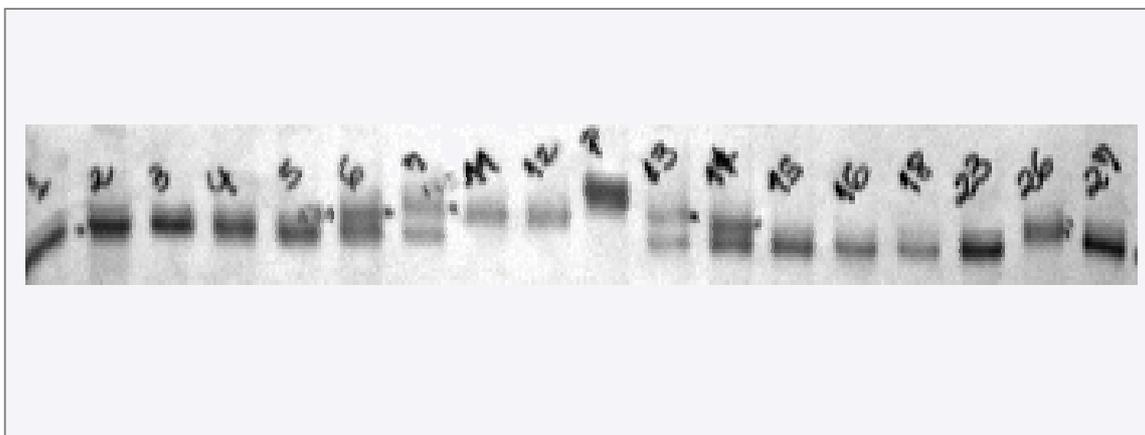


Figura 2. Gel de poliacrilamida 8% desnaturante com uréia, (pacientes relacionados por número; p: padrão utilizado)

Sequenciamento

Com a obtenção das seqüências, e comprovação da identidade das amostras obtidas com as seqüências do *MSX1* pertencentes ao banco de dados *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), os fragmentos seqüenciados foram analisados pelo programa *BioEdit*® a fim de confirmar os dados obtidos pelo gel desnaturante, referentes ao tamanho dos alelos, com o que foi obtido pelo seqüenciador.

Análise Estatística

A análise estatística mostrou algumas diferenças significantes entre as freqüências de alelos e genótipos para os polimorfismos no gene *Msx1* entre os dois grupos amostrais. A significância das diferenças, nas freqüências dos polimorfismos observados em ambos os grupos, foi obtida através do teste de *odds-ratio*. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

Interessantemente, o genótipo 171/175 não foi observado em nenhum dos indivíduos estudados. Em contrapartida, o genótipo 169/169 mostrou-se o mais freqüente nos dois grupos de estudo. Indivíduos portadores desse genótipo têm 1,85 mais chance de desenvolver agenesia, segundo a análise de *odds-ratio* (OR=1,85; 95% CI= 1,03 – 3,32; $p=0,05$). O alelo 169 foi o mais freqüente nos dois grupos de estudo, apresentando as seguintes freqüências: 27,7% no grupo controle e 33,1% no grupo teste (indivíduos com hipodontia). O alelo 175 mostrou correlação ($p=0,04$) quando comparado entre os grupos teste e controle, (OR= 0,47; 95% CI=0,23 – 0,94) indicando menor chance de desenvolvimento da doença em indivíduos portadores desse alelo. O mesmo ocorreu quando se avaliaram os casos de hipodontia com exceção de terceiros molares, os quais mostraram uma correlação negativa entre a freqüência deste alelo e o fenótipo da doença ($p=0,02$; OR= 0,11; 95%CI=0,01 – 0,89); porém, faz-se necessário aumentar o número de pacientes neste subgrupo para uma avaliação mais precisa. Outras correlações não obtiveram resultados significativos.

Tabela1. Leitura dos valores obtidos para a quantificação do DNA do grupo controle.

Amostras do grupo controle		
	□ DNA (µg/mL)	Pureza
1	4,7	1,823
2	1,5	1,434
3	5,9	1,563
4	2,2	1,510
5	3,5	1,444
6	2,9	1,485
7	6,0	1,675
8	0,6	1,605
9	2,4	1,301
10	4,6	1,611
11	5,8	1,318
12	7,3	1,772
13	7,3	1,692
14	14,4	1,741
15	5,7	1,569
16	2,8	1,499
17	16,4	1,705
18	1,0	2,157
19	1,0	1,412
20	0,6	1,119
21	3,0	1,474
22	2,0	1,525
23	5,8	1,424
24	0,4	1,247
25	2,8	1,690
26	3,7	1,353
27	2,0	1,531
28	2,5	1,477

Tabela 2. Leitura dos valores obtidos para a quantificação do DNA do grupo teste.

Amostras do grupo com hipodontia		
	□ DNA (µg/mL)	Pureza
1	2,0	1,343
2	9,4	1,203
3	1,0	1,620
4	0,5	2,141
5	1,1	1,4
6	1,4	1,525
7	7,9	1,720
8	4,9	1,652
9	3,5	1,328
10	0,6	2,007
11	3,3	1,825
12	9,9	1,731
13	4,5	1,459
14	1,1	1,199
15	2,9	1,186
16	3,3	1,302
17	3,9	1,565
18	9,2	1,429
19	4,6	1,324
20	0,4	5,320
21	7,8	1,631
22	5,1	1,556
23	2,0	1,348

Tabela 3. Distribuição de alelos e genótipos do gene *MSX1*, nos grupos controle e teste.

	Grupo controle		Hipodontia		Hipodontia do terceiro molar		Exclusão dos terceiros molares	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Alelos*								
169	112	27,7	130	33,1	69	31,9	41	35,3
OR(95%CI)	1,49(0,09 – 2,23)				1,42(0,87 – 2,29)		1,93(1,03 – 3,63)	
p	0,06				0,18		0,05	
171	17	4,2	14	2,7	9	4,1	0	0
OR(95%CI)	0,81(0,39 – 1,7)				0,98(0,42 – 2,03)			
p	0,73				0,84			
173	47	11,6	43	10,8	20	9,2	16	13,7
OR(95%CI)	0,9(0,56 – 1,44)				0,74(0,41 – 1,34)		1,25(0,64 – 2,43)	
p	0,76				0,41		0,61	
175	26	6,4	13	3,3	10	4,6	1	0,8
OR(95%CI)	2,12(1,05 – 4,26)				0,69(0,31 – 1,49)		0,11(0,01 – 0,89)	
p	0,04				0,44		0,02	
Genótipos								
169/169	30	29,7	44	43,5	24	42,8	13	46,4
OR(95%CI)	1,85(1,03 – 3,32)				1,77(0,89 – 3,50)		2,05(0,87 – 4,83)	
p	0,05				0,13		0,15	
169/171	7	6,9	5	4,9	4	7,1	0	0
OR(95%CI)	0,71(0,21 – 2,30)				1,03(0,28 – 3,69)			
p	0,78				0,78			
169/173	28	27,7	31	30,6	13	23,2	13	46,4
OR(95%CI)	1,17(0,63 – 2,15)				0,78(0,36 – 1,68)		2,25(0,95 – 5,34)	
p	0,72				0,66		0,09	
169/175	17	16,8	8	7,9	8	14,2	0	0
OR(95%CI)	0,43(0,17 – 1,04)				0,82(0,33 – 2,05)			
p	0,09				0,84			
171/171	4	3,9	3	2,9	2	3,5	0	0
OR(95%CI)	0,75(0,16 – 3,44)				0,89(0,15 – 5,06)			
p	0,99				0,75			
171/173	2	1,9	1	0,9	1	1,7	0	0
OR(95%CI)	0,5				0,9			
p	0,99				0,6			
171/175	0	0	0	0	0	0	0	0
173/173	6	5,9	5	4,9	3	5,35	1	3,5
OR(95%CI)	0,83(0,24 – 2,82)				0,89(0,21 – 3,73)		0,58(0,06 – 5,08)	
p	0,99				0,83		0,98	
173/175	5	4,9	1	0,9	0	0	1	3,5
OR(95%CI)	0,19(0,02 – 1,7)						0,71(0,07 – 6,34)	
p	0,22						0,84	
175/175	2	1,9	2	1,9	1	1,7	0	0
OR(95%CI)	1,01				0,9			
p	0,62				0,6			

* Número de bases nucleotídicas

*Teste qui-quadrado

6. DISCUSSÃO

O modelo de estudo proposto no trabalho tema dessa dissertação foi sobremaneira adequado aos propósitos desta pesquisa. Tendo em vista que os terceiros molares, segundos pré-molares e incisivos laterais são comumente perdidos nas populações humanas devido a uma variação normal, foi sugerido que esses dentes são comumente afetados por mutações genéticas (Line, 2001; Symons *et al.*, 1993). Além disso, o desequilíbrio de ligação da repetição de CA relatado por Padanilam *et al.* (1992), confirma o uso dessas repetições em estudos que correlacionam esses polimorfismos com fenótipos específicos.

O método para a obtenção do DNA genômico a partir do bochecho se mostrou de fácil execução e indolor, aspecto importante quando se trata da cooperação por parte dos pacientes. O protocolo de extração foi bastante eficaz no que se refere à quantidade e à pureza do DNA obtido (ver tabelas 1 e 2). Esse resultado pode ser atribuído aos três banhos com a solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (modificado de Maniatis *et al.* 1989, que indica dois banhos). Na amplificação dos produtos, os *primers* utilizados, descritos por Hwang *et al.* (1998) demonstraram alta especificidade para o fragmento de interesse.

A técnica do gel de poliacrilamida desnaturante, previamente descrita por Markoff *et al.* (1998); Padanilam *et al.* (1992), foi eficiente na detecção das bandas, para o grupo controle e grupo teste (com hipodontia). Para a eluição do DNA foi seguido o protocolo descrito por Sanguinetti *et al.* (1994), no qual as amostras foram eluídas em solução contendo HCl, MgCl₂ e Triton® X-100, sendo também de grande utilidade. Outro protocolo Meksen *et al.* (2001), no qual foi utilizada água bidestilada-deionizada como solução para eluição das amostras de DNA, foi reproduzido neste experimento, porém sem sucesso.

O sequenciamento, observado em alguns trabalhos envolvendo o gene *MSX1* (Jezewski *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Fernandez-Llebrez *et al.*, 2004), foi conduzido para algumas amostras utilizando-se o mesmo *primer forward* usado durante a reação de PCR, obtendo-se bons resultados (ver anexo). Nesse sentido foi observado que, quanto menores as quantidades de DNA, melhor a qualidade do sequenciamento.

Quanto à frequência dos alelos encontrados, o mais comum foi o correspondente a 169 pares de bases (27,7% no grupo controle e 33,1% no grupo teste). O alelo menos freqüente correspondeu àquele com 171 pb (4,2% no grupo controle e 2,7% no grupo teste) em concordância com os achados de Hwang *et al.* (1998). Todavia, Vieira *et al.* (2004) relataram menor freqüência do alelo 175 para maioria dos grupos estudados. Na análise dos genótipos, o 171/175 não foi observado em nenhum dos indivíduos estudados. Em contrapartida, o genótipo 169/169 mostrou-se o mais freqüente em ambos os grupos, e indivíduos portadores deste mostraram-se ser 1,85 vezes mais suscetíveis a desenvolver hipodontia (OR= 1,85; 95% CI= 1,03 – 3,32; p= 0,05), enquanto que Hwang *et al.* (1998) encontraram alta freqüência desse genótipo somente no grupo controle.

Pacientes não portadores do alelo 175, segundo a análise estatística, possuem maior chance (p=0,04) de desenvolver esta alteração (OR= 2,12; 95% CI=1,05–4,26). O mesmo resultado foi alcançado por Vieira *et al.* (2004), quando analisou o mesmo alelo quanto à perda de incisivos, porém sem significância. Hwang *et al.* (1998) também encontrou baixa freqüência desse alelo em pacientes portadores de fissura do palato.

A correlação de mutações no gene *MSX1* e alterações fenotípicas, como síndromes e agenesias dentárias, já foi tema de alguns trabalhos que analisaram as regiões polimórficas dos indivíduos afetados, o padrão de expressão desse gene e de outros envolvidos no desenvolvimento embrionário (Vastardis *et al.*, 1996; Jezewski *et al.*, 2003; van den Boogaard *et al.*, 2000; Lidral & Reising, 2002; Jumlongras *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2001). Em humanos algumas características, como a fenda do palato e do lábio, bem como a hipodontia, são similares ao fenótipo obtido em ratos mutantes para gene o *MSX1* (Satokata & Maas, 1994; Houzelstein *et al.*, 1997). Isso reforça a idéia de que a origem dessas anomalias compartilha um mecanismo comum que, por sua vez, envolve o gene *MSX1*. Porém, a análise e associação de polimorfismos em regiões não codificadas desse gene, o íntron, e agenesia dentária ou hipodontia até a pouco não havia sido observada. Muitos trabalhos reportaram resultados negativos para polimorfismos do gene *MSX1* em associação com hipodontia (Nieminen *et al.*, 1995; Scarel *et al.*, 2000; Lidral & Reising 2002). A correlação negativa para o alelo 175 encontrada no presente estudo, que indicou menor chance de desenvolvimento da doença em indivíduos portadores desse alelo, pode auxiliar no esclarecimento de parte do mecanismo de

origem da agenesia dentária em humanos. Contudo, é necessária a avaliação conjunta de outros genes importantes também envolvidos na embriogênese crânio-facial, como *Pax9*, *Tgf*, *Bmp*, dentre outros, para a obtenção de resultados mais completos acerca dessa alteração.

7. CONCLUSÕES

1. Para ambos os grupos (controle e agenesia), 4 alelos foram encontrados: 169, 171, 173 e 175. O alelo 169 foi o mais prevalente, para ambos os grupos.

2. Pacientes portadores do genótipo 169-169 têm 1,85 vezes mais chance de desenvolver agenesia, segundo a análise de *odds-ratio* (OR=1,85; 95% CI=1,03 – 3,32; $p=0,05$), o que pode indicar um papel importante desse genótipo na gênese da hipodontia.

3. Pacientes não portadores do alelo 175 possuem maior chance ($p=0,04$) de desenvolver hipodontia (OR= 2,12; 95% CI=1,05–4,26).

4. Não foram encontradas demais correlações entre genótipos/alelos e hipodontia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[&]

Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. Msx homeobox gene family and craniofacial development. **Cell Res.** 2003; 13(6): 429-42.

Alvarez Martinez CE, Binato R, Gonzalez S, Pereira M, Robert B, Abdelhay E. Characterization of a Smad motif similar to Drosophila mad in the mouse Msx 1 promoter. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002; 291(3): 655-62.

Arte S, Nieminen P, Pirinen S, Thesleff I, Peltonen L. Gene defect in hypodontia: exclusion of EGF, EGFR, and FGF-3 as candidate genes. **J Dent Res.** 1996; 75(6): 1346-52.

Arte S, Pirinen S. Hypodontia. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/UK-hypodontia.pdf>. Orphanet encyclopedia. 2004.

Bei M, Kratochwil K, Maas RI. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. **Development.** 2000; 127(21): 4711-8.

Berdal A, Lezot F, Pibouin L, Hotton D, Ghouli-Mazgar S, Teillaud C *et al.* Msx1 homeogene antisense mRNA in mouse dental and bone cells. **Connect Tissue Res.** 2002; 43(2-3): 148-52.

Bendall AJ, Abate-Shen C. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. **Gene.** 2000; 247(1-2): 17-31.

Billeter M, Wuthrich K. Model studies relating nuclear magnetic resonance data with the three-dimensional structure of protein-DNA complexes. **J Mol Biol.** 1993; 234(4):1094-7.

Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreno H, Paredes M, Jara L *et al.* Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. **Hum Biol.** 2001; 73(1): 81-9.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Bjorn H, Grahnen H. Cleido-cranial dysostosis. *Odontol Revy*. 1966; 17(2): 167-75.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*. 1987; 8: 93-99.
- Boncinelli, E. *et al*. Organization of human homeobox genes. *Hum Reprod* .1988; 3(7): 880-6.
- Bredy E, Erbring C, Hubenthal B. The incidence of hypodontia with the presence and absence of wisdom teeth. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl*. 1991; 79(5): 357-63.
- Bushdid PB, Chen CL, Brantley DM, Yull F, Raghov R, Kerr LD *et al*. NF-kappaB mediates FGF signal regulation of msx-1 expression. *Dev Biol*. 2001; 237(1): 107-15.
- Burglin TR, Finney M, Coulson A, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* has scores of homeobox-containing genes. *Nature*. 1989; 341(6239): 239-43.
- Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989; 244(4910): 1288-92.
- Carroll SB. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature*. 1995; 376(6540): 479-485.
- Catron KM, Iler N, Abate C. Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*. 1993;13(4):2354-65.
- Catron KM, Zhang H, Marshal SC, Inostroza JA, Wilson JM, Abate C. Transcriptional repression by Msx-1 does not require homeodomain DNA-binding sites. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(2): 861-71.
- Catron KM, Wang H, Hu G, Shen M, Abate-Shen C. Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy. *Mech Dev*. 1996; 55(2): 185-99.
- Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development*. 1996; 122(10): 3035-44.

Chi N, Epstein JA. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. **Trends Genet** . 2002; 18(1): 41-7.

Corsetti MT, Briata P, Sanseverino L, Daga A, Airoidi I, Simeone A *et al*. Differential DNA binding properties of three human homeodomain proteins. **Nucleic Acids Res**. 1992; 20(17): 4465-72.

Cua-Benward GB, Dibaj S, Ghassemi B. The prevalence of congenitally missing teeth in class I, II, III malocclusions. **J Clin Pediatr Dent**. 1992; 17(1): 15-17.

Davidson D. The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. **Trends Genet**. 1995; 11(10): 405–411.

Dessain S, Gross CT, Kuziora MA, McGinnis W. Antp-type homeodomains have distinct DNA binding specificities that correlate with their different regulatory functions in embryos. **EMBO J**. 1992;11(3): 991-1002.

Deweese S, Geiger JH. Structural studies of the Msx-1 homeodomain-DNA complex I. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**. 1999; 55(12): 2039-40.

Dolle P, Dierich A, LeMeur M, Schimmang T, Schuhbauer B, Chambon P *et al*. Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. **Cell**. 1993; 75(3): 431–441.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA *et al*. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. **Cell**. 1993; 75(7): 1417-1430.

Ekker SC, von Kessler DP, Beachy PA. Differential DNA sequence recognition is a determinant of specificity in homeotic gene action. **EMBO J**. 1992; 11(11): 4059-72.

Ekker SC, Young KE, von Kessler DP, Beachy PA. Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of Drosophila. **EMBO J**. 1991; 10(5):1179-86.

Ennis S, Collins A, Tapper W, Murray A, MacPherson JN, Morton NE. Allelic association discriminates draft orders. **Ann Hum Genet**. 2001; 65(5): 503-4.

Erwing WG, Cockern RW. A pedigree of partial anodontia. **J Hered.** 1949; 40: 215-218.

Fan CM, Tessier-Lavigne M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: Evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. **Cell.** 1994; 79(7), 1175-1186.

Ferguson CA, Tucker AS, Christensen L, Lau AL, Matzuk MM, Sharpe PT. Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. **Genes Dev.** 1998; 12(16): 2636-49.

Fernandez-Llebrez P, Grondona JM, Perez J, Lopez-Aranda MF, Estivill-Torrus G, Llebrez-Zayas PF, Soriano E, Ramos C. Msx1-deficient mice fail to form prosomere 1 derivatives, subcommissural organ, and posterior commissure and develop hydrocephalus. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 2004; 63(6): 574-586.

Gibson G, Schier A, LeMotte P, Gehring WJ. The specificities of Sex combs reduced and Antennapedia are defined by a distinct portion of each protein that includes the homeodomain. **Cell.** 1990; 62(6):1087-103.

Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. *Syndromes of the Head and Neck.* Oxford University Press, New York, 1990.

Graber, LW. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns. **J Am Dent Assoc.** 1978; 96(2): 266-75.

Grahnén H. Hypodontia in the permanent dentition. **Odontol Revy.** 1956; 7(3): 1-100.

<<http://bite-it.helsinki.fi>>. Acesso em: 18 jan. 2005.

Han J, Ito Y, Yeo JY, Sucov HM, Maas R, Chai Y. Cranial neural crest-derived mesenchymal proliferation is regulated by Msx1-mediated p19(INK4d) expression during odontogenesis. **Dev Biol.** 2003; 261(1): 183-96.

Han M, Yang X, Farrington JE, Muneoka K.. Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. **Development.** 2003; 130(21): 5123-32.

Hewitt JE, Clark NL, Ivens A, Williamson R. Structure and sequence of the human homeobox gene HOX7. **Genomics**. 1991; 11(3): 670-8.

Hill RE, Jones PF, Rees AR, Sime CM, Justice MJ, Copeland NG, Jenkins NA, Graham E, Davidson DR. A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. **Genes Dev**. 1989; 3(1): 26-37.

Holland PWH, Garcia-Fernandez J, Williams NA, Sidow A. Gene duplications and the origins of vertebrate development. **Dev Suppl**. 1994: 125–133.

Houzelstein D, Cohen A, Buckingham ME, Robert B. Insertional mutation of the mouse Msx1 homeobox gene by an nlacZ reporter gene. **Mech Dev**. 1997; 65(1-2):123-33.

Hu G, Vastardis H, Bendall AJ, Wang Z, Logan M, Zhang H *et al*. Haploinsufficiency of MSX1: a mechanism for selective tooth agenesis. **Mol Cell Biol**. 1998; 18(10): 6044-51.

Hwang SJ, Beaty TH, McIntosh I, Hefferon T, Panny SR. Association between homeobox-containing gene MSX1 and the occurrence of limb deficiency. **Am J Med Genet**. ; 75(4): 419-23.

Isaac VE, Sciavolino P, Abate C. Multiple amino acids determine the DNA binding specificity of the Msx-1 homeodomain. **Biochemistry**. 1995; 34(21): 7127-34.

Ivens, A. *et al*. The human homeobox gene HOX7 maps to chromosome 4p16.1 and may be implicated in Wolf-Hirschhorn syndrome. **Hum Genet**. 1990; 84(5):473-6.

Izpisua-Belmonte JC, Duboule D. Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. **Dev Biol**. 1992; 152(1): 26–36.

Jabs EW, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS *et al*. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. **Cell**. 1993; 75(3): 443-50.

- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE *et al.* Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. **J Med Genet.** 2003; 40(6): 399-40.
- Johnson RL, Laufer E, Riddle RD, Tabin C. Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. **Cell.** 1994; 79(7):1165-73.
- Jorgenson RJ. Clinician's view of hypodontia. **J Am Dent Assoc.** 1980; 101(2): 283–286.
- Jowett AK, Vainio S, Ferguson MW, Sharpe PT, Thesleff I. Epithelial-mesenchymal interactions are required for msx 1 and msx 2 gene expression in the developing murine molar tooth. **Development.** 1993; 117(2): 461-70.
- Jumlongras D, Bei M, Stimson JM, Wang WF, DePalma SR, Seidman CE *et al.* A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. **Am J Hum Genet** . 2001; 69(1): 67-74.
- Kessel M, Gruss P. Murine developmental control genes. **Science.** 1990; 249(4967): 4374–79.
- Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. **Cell.** 1990; 63(3):579-90.
- Ko HS, Fast P, McBride W, Staudt LM. A human protein specific for the immunoglobulin octamer DNA motif contains a functional homeobox domain. **Cell.** 1988; 55(1): 135-44.
- Kollar EJ. The induction of hair follicles by embryonic dermal papillae. **J Invest Dermatol** .1970 ; 55(6):374-8.
- Krumlauf R. Hox genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. **Trends Genet.** 1993; 9(4): 106–112.
- Kurusu K, Tabata, MJ. Human genes for dental anomalies. **Oral Dis.** 1997; 3(4): 223-8.
- Kuziora MA, McGinnis W. A homeodomain substitution changes the regulatory specificity of the deformed protein in Drosophila embryos. **Cell.** 1989; 59(3):563-71.

- Kuzuoka M, Takahashi T, Guron C, Raghov R. Murine homeobox-containing gene, Msx-1: analysis of genomic organization, promoter structure, and potential autoregulatory cis-acting elements. **Genomics**. 1994; 21(1): 85–91.
- Lee H, Habas R, Abate-Shen C. MSX1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis. **Science**. 2004; 304(5677): 1675-1678.
- Lee T, Bradley ME, Walowitz, JL. Influence of promoter potency on the transcriptional effects of YY1, SRF and Msx-1 in transient transfection analysis. **Nucleic Acids Res**. 1998; 26(13): 3215-20.
- Laufer E, Nelson CE, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. **Cell**. 1994;79(6):993-1003.
- Laughon A. DNA binding specificity of homeodomains. **Biochemistry**. 1991; 30(48): 11357-67.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S *et al*. Association of MSX1 and TGFB3 with Nonsyndromic Clefting in Humans **Am J Hum Genet**. 1998; 63(2): 557-68.
- Lidral AC, Reising BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis. **J Dent Res**. 2002; 81(4): 274-8.
- Liem KF Jr, Tremml G, Roelink H, Jessell TM. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. **Cell**. 1995;82(6):969-79.
- Lin L, McGinnis W. Mapping functional specificity in the Dfd and Ubx homeo domains. **Genes Dev**. 1992; 6(6): 1071-81.
- Line SR. Molecular morphogenetic fields in the development of human dentition. **J Theor Biol**. 2001; 211(1): 67-75.
- Lu MF, Pressman C, Dyer R, Johnson RL, Martin JF. Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. **Nature**. 1999; 401(6750): 276-8.

Lumsden AGS. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development*. 1988; 103: 155-169.

Luo L, Yang X, Takihara Y, Knoetgen H, Kessel M. The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions. *Nature*. 2004; 427(6976): 749-53.

Lynham A. Panoramic radiographic survey of hypodontia in Australian Defence Force recruits. *Aust Dent J*. 1990; 35(1): 19-22.

Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8(1): 4-39.

MacKenzie A, Ferguson MWJ, Sharpe PT. *Hox-7* expression during murine craniofacial development. *Development*. 1991; 113: 601-611.

MacKenzie A, Leeming GL, Jowett AK, Ferguson MWJ, Sharpe PT. The homeobox gene *Hox 7.1* has specific regional and temporal expression patterns during early murine craniofacial embryogenesis especially tooth development in vivo and in vitro. *Development*. 1991; 111: 269-285.

MacKenzie A, Ferguson MWJ, Sharpe PT. Expression patterns of the homeobox gene, *Hox-8*, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development*. 1992; 115:403-420.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. USA: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Mann RS. The specificity of homeotic gene function. *Bioassays*. 1995; 17(10): 855–863.

Mann RS, Hogness DS. Functional dissection of Ultrabithorax proteins in *D. melanogaster*. *Cell*. 1990; 60(4): 597-610.

Markoff A, Sornbroen H, Bogdanova N, Preisler-Adams S, Ganey V, Dworniczack B *et al*. Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation

polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. **Eur J Hum Genet.** 1998; 6: 145-150

Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Francioso F, Baciliero U *et al.* Linkage analysis of three candidate regions of chromosome 1 in nonsyndromic familial orofacial cleft. **Ann Hum Genet.** 2001; 65(5): 465-71.

McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. **Cell.** 1992; 68(2): 283-302.

McGinnis W, Levine MS, Hafen E, Kuroiwa A, Gehring WJ. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes. **Nature.** 1984; 308(5958): 428-33.

Meksen K, Ruben E, Hyten D, Triwitayakorn K, Lightfoot DA. **Mol Genet Genomics** . 2001; 256: 207-214

Mihara H, Kaiser, ET. A chemically synthesized Antennapedia homeo domain binds to a specific DNA sequence. **Science.** 1988; 242(4880): 925-7.

Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. **Arch.Oral Biol.** 1987; 32: 123-127.

Monaghan, A.P. *et al.* The Msh-like homeobox genes define domains in the developing vertebrate eye.**Development.** 1991; 112(4):1053-61.

Muneoka K, Sassoon D. Molecular aspects of regeneration in developing vertebrate limbs. **Dev. Biol.** 1992; 152(1): 37-49.

Munsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA, McMahon AP, Lassar AB. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. **Genes Dev.** 1995; 9(23): 2911-22.

Niswander L, Jeffrey S, Martin G, Tickle C. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. **Nature.** 1994; 371(6498):609-12.

- Nieminem P, Arte S, Tanner D, Paulin L, Alaluusua S, Thesleff I, *et al.* Identification of a nonsense mutation in the *PAX9* gene in molar Oligodontia. ***Eur J Human Genet.*** 2001; 9:743-746.
- Nunes FD, de Almeida FC, Tucci R, de Sousa SC. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. ***Pesqui Odontol Bras.*** 2003; 17(1): 94-8.
- Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. ***Cell.*** 2000; 103(7): 1099-109.
- Ollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. ***J Biol Chem.*** 1999; 274(28): 19838-45.
- Orestes-Cardoso S, Nefussi JR, Lezot F, Oboeuf M, Pereira M, Mesbah M *et al.* *Msx1* is a regulator of bone formation during development and postnatal growth: in vivo investigations in a transgenic mouse model. ***Connect Tissue Res.*** 2002; 43(2-3): 153-60.
- Peck S, Peck L, Kataja M. Concomitant occurrence of canine malposition and tooth agenesis: evidence of orofacial genetic fields. ***Am J Orthod Dentofacial Orthop.*** 2002; 122(6):657-60.
- Padanilam BJ, Stadler HS, Mills KA, McLeod LB, Solursh M, Lee B *et al.* Characterization of the human *HOX 7* cDNA and identification of polymorphic markers. ***Hum Mol Genet.*** 1992; 1(6): 407-10.
- Pellerin I, Schnabel C, Catron KM, Abate C. Hox proteins have different affinities for a consensus DNA site that correlate with the positions of their genes on the hox cluster. ***Mol Cell Biol.*** 1994;14(7):4532-45.
- Palmer RM, Lumsden AGS. Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombinations of enamel organs and papillary, pulpal and follicular mesenchyme in the mouse. ***Arch Oral Biol.*** 1987; 32(4): 281-9.

- Park J, Park K, Kim S, Lee JH. Msx1 gene overexpression induces G1 phase cell arrest in human ovarian cancer cell line OVCAR3. **Biochem Biophys Res Commun.** 2001; 281(5): 1234-40.
- Peters H, Balling R. Teeth- where and how to make them. **Trends Genet.** 1999; 15: 59-65.
- Ramos C , Fernandez-Llebrez P, Bach A, Robert B, Soriano,E. Msx1 disruption leads to diencephalon defects and hydrocephalus. **Dev. Dyn.** 2004; 230(3): 446-460.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. **Cell.** 1993; 75(7):1401-16.
- Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA *et al.* Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. **Cell.** 1995; 81(3): 445-55.
- Ruiz I, Altaba A, Melton DA. Involvement of the Xenopus homeobox gene Xhox3 in pattern formation along the anterior-posterior axis. **Cell.**1989 ; 57(2):317-26.
- Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG. Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products Separated on Polyacrylamide Gels. **Biotechniques.** 1994; 17(5): 914-21.
- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. **Nat Genet .** 1994; 6(4): 348-56.
- Scarel RM *et al.* Absence of mutations in the homeodomain of the MSX1 gene in patients with hypodontia. **Am J Med Genet.** 2000; 92(5): 346-9.
- Scott MP. *et al.* The molecular organization of the Antennapedia locus of Drosophila, **Cell.** 1983; 35(3) Pt 2: 763-76.
- Scott MP, Tamkun JW, Hartzell GW 3rd. The structure and function of the homeodomain. **Biochim Biophys Acta.** 1989; 989(1): 25-48.
- Schalk-Van Der Weide, Y. *et al* . Symptomatology of patients with oligodontia. **J Oral Rehabil.** 1994; 21(3): p. 247-61.

Shafer WG, Hine MK, Levy BM. *Tratado de patologia bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1958.

Shang Z, Ebright YW, Pendergrast PS, Echelard Y, McMahon AP, Ebright RH *et al*. DNA affinity cleaving analysis of homeodomain-DNA interaction: identification of homeodomain consensus sites in genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(1): 118-122.

Shen R, Chen Y, Huang L, Vitale E, Solursh M. Characterization of the human MSX-1 promoter and an enhancer responsible for retinoic acid induction. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40(4):297-312.

Shetty S, Takahashi T, Matsui H, Ayengar R, Raghov R. Transcriptional autorepression of Msx1 gene is mediated by interactions of Msx1 protein with a multi-protein transcriptional complex containing TATA-binding protein, Sp1 and cAMP-response-element-binding protein-binding protein (CBP/p300). *Biochem J*. 1999; 339(3): 751-8.

Sidow A, Bulotsky MS, Kerrebrock AW, Birren BW, Altshuler D, Jaenisch R *et al*. A novel member of the F-box/WD40 gene family, encoding dactylin, is disrupted in the mouse dactylaplasia mutant. *Nat Genet*. 1999; 23(1):104-7.

Song K, Wang Y, Sassoon D. Expression of Hox-7.1 in myoblasts inhibits terminal differentiation and induces cell transformation. *Nature*. 1992; 360(6403): 477-81.

Stadler HS, Padanilam BJ, Buetow K, Murray JC, Solursh M. Identification and genetic mapping of a homeobox gene to the 4p16.1 region of human chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(23): 11579-83.

Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of *PAX9* is associated with oligodontia. *Nature Genetics*. 2000; 24(1): 18-9.

Streit A, Berliner AJ, Papanayotou C, Sirulnik A, Stern CD. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature*. 2000; 406(6791): 74-78.

Su MW *et al*. Progressively restricted expression of a new homeobox-containing gene during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Development*. 1991; 111(4): 1179-87.

Sun X, Mariani FV, Martin GR. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. **Nature**. 2002; 418(6897): 501-8.

Stewart, R.E.; Poole, A.E. The orofacial structures and their association with congenital abnormalities. **Pediatr Clin North Am**. 1982; 29(3): 547-84.

Symons AL, Stritzel F, Stamation J. Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisor and second premolar. **J Clin Pediatr Dent**. 1993; 17(2): 109-11.

Takahashi T, Guron C, Shetty S, Matsui H, Raghov R. A minimal murine Msx-1 gene promoter. Organization of its cis-regulatory motifs and their role in transcriptional activation in cells in culture and in transgenic mice. **J Biol Chem**. 1997; 272(36): 22667-78.

Thomas BL, Tucker AS, Qui M, Ferguson CA, Hardcastle Z, Rubenstein JL *et al*. Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. **Development**. 1997; 124(23): 4811-8.

Treisman J, Gonczy P, Vashishtha M, Harris E, Desplan C. A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. **Cell**. 1989; 59(3): 553-62.

Turecková J, Sahlberg C, Åberg T, Ruch JV, Thesleff I, Peterková R. Comparison of expression of the *msx-1*, *msx-2*, *BMP-2* and *BMP-4* genes in the mouse upper diastemal and molar primordia. **Int.J.Dev.Biol**.1995; 39: 459-468.

Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. **Cell**. 1993; 75(1): 45-58.

Van Den Boogaard, M.J. *et al*. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. **Nat Genet** . 2000; 24(4): 342-3.

Van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo R-G, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R . Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1 deficient mice. **Genes Dev**. 1994; 8:2691-2703.

- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet.* 1996; 13(4): 417-21.
- Vieira AR *et al.* MSX1, PAX9, and TGFA Contribute to tooth Agenesis in Humans. *J Dent Res.* 2004; 83(9): 723-727.
- Wilson SI, Rydstrom A, Trimborn T, Willert K, Nusse R, Jessell TM *et al.* The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature.* 2001; 411(6835): 325-30.
- Whittaker JC, Morris AP. Family-based tests of association and/or linkage. *Ann Hum Genet.* 2001; 65(5): 407-19.
- Yamamoto TS, Takagi C, Ueno N. Requirement of Xmsx-1 in the BMP-triggered ventralization of Xenopus embryos. *Mech Dev.* 2000; 9(1-2): 131-41.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 1999; 398(6729): 714-8.
- Yang L, Zhang H, Hu G, Wang H, Abate-Shen C, Shen MM. An early phase of embryonic Dlx5 expression defines the rostral boundary of the neural plate. *J Neurosci.* 1998; 18(20): 8322-30.
- Yang Y, Niswander L. Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell.* 1995; 80(6):939-47.
- Zeng W, Andrew DJ, Mathies LD, Horner MA, Scott MP. Ectopic expression and function of the Antp and Scr homeotic genes: the N terminus of the homeodomain is critical to functional specificity. *Development.* 1993; 118(2): 339-52.
- Zhang H, Catron KM, Abate-Shen C. A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(5): 1764-9.

Zhang H, Hu G, Wang H, Sciavolino P, Iler N, Shen MM, Abate-Shen C. Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. **Mol Cell Biol** .1997;17:2920-32.

Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. **Development**. 2002; 129(17): 4135-46.

Zhao X, Zhang Z, Song Y, Zhang X, Zhang Y, Hu Y *et al*. Transgenically ectopic expression of Bmp4 to the Msx1 mutant dental mesenchyme restores downstream gene expression but represses Shh and Bmp2 in the enamel knot of wild type tooth germ. **Mech Dev**. 2000; 99(1-2): 29-38.

ANEXOS

Alelo 173 (Número de bases nucleotídicas)

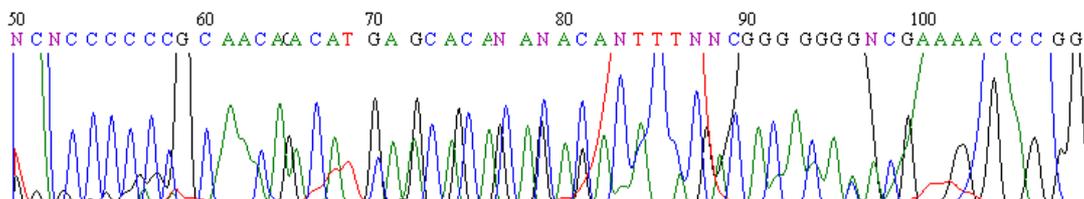


Figura 9. Cromatograma da amostra 49c(173).

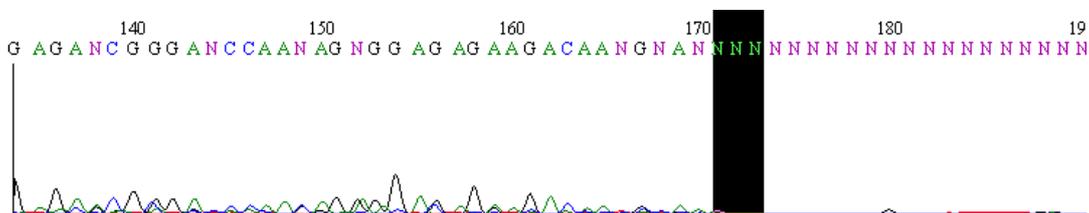


Figura 10. Cromatograma da amostra 49c(173), final do sequenciamento.

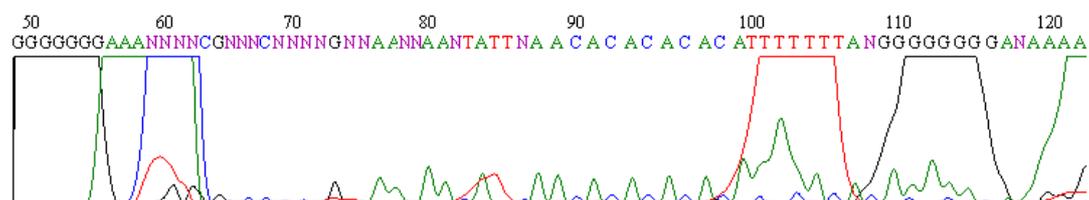


Figura 11. Cromatograma da amostra 67(173).

Alelo 175 (Número de bases nucleotídicas)

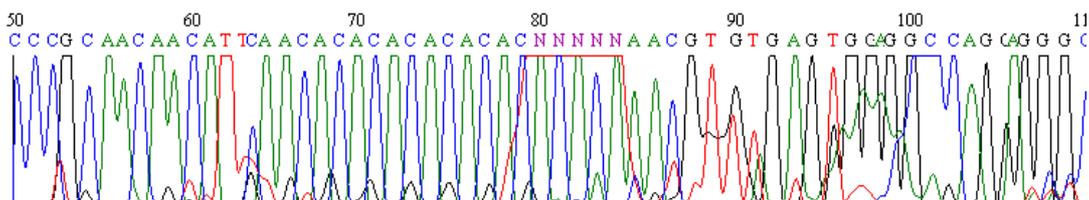


Figura 12. Cromatograma da amostra 1(175).

