

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA
FOP - UNICAMP

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NA
REGIÃO PROMOTORA DO GENE *LEF 1* EM
INDIVÍDUOS COM AGENESIA DENTAL**

**Investigation of Promoter Region Polymorphisms in the
LEF 1 Gene in Individuals with Hypodontia**

Aluna: Elisângela Ribeiro da Silva
Orientador: Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba - 2003

ELISÂNGELA RIBEIRO DA SILVA

**Investigação de Polimorfismos na Região
Promotora do Gene *LEF 1* em Indivíduos com
Agenesia Dental**

200330187

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

CPG. 18/07/03

Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de
Campinas, FOP-UNICAMP,
para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Buco-
Dental, área de Histologia e
Embriologia

Orientador

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres
Line (FOP-UNICAMP)

Piracicaba - 2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	unicamp SI 381
V	EX
TOMBO BC	55750
PROC.	16/129103
C	<input type="checkbox"/>
P	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/09/03
Nº CPD	

CM00188608-6

BIBID300081

Ficha Catalográfica

Si38i

Silva, Elisângela Ribeiro da.

Investigação de polimorfismos na região promotora do gene *LEF 1* em indivíduos com agenesia dental. / Elisângela Ribeiro da Silva. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.

xi, 68f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Morfogênese. 2. Evolução. 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.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 11 de Abril de 2003, considerou a candidata ELISÂNGELA RIBEIRO DA SILVA aprovada.

1. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

A handwritten signature in black ink, appearing to be "S. Peres", written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. ANTÔNIO WILSON DE ALMEIDA

A handwritten signature in black ink, appearing to be "A. Almeida", written over a horizontal line.

3. Profa. Dra. PAULA CRISTINA TREVILATTO

A handwritten signature in black ink, appearing to be "P. Trevilatto", written over a horizontal line.

DEDICATÓRIA

À Deus, Senhor da minha vida, que me guia e permitiu que tantas portas se abrissem para mim. Obrigada pela saúde e por tantas outras graças que me dá diariamente. Que cada batida do meu coração renove este agradecimento que eu dirijo à vós Senhor!

À minha querida mãe, Esperança, que tanto se dedicou e trabalhou para que eu tivesse um bom estudo, apesar das dificuldades. Dedico este trabalho como sendo uma vitória sua, por toda a oração, incentivo, pelo seus bons conselhos e exemplos, que fizeram de mim o que eu sou hoje.

Ao meu ex-esposo, Marcelísio, dedico com toda gratidão este trabalho que ele possibilitou com paciência e compreensão, apoiando-me, incentivando-me e auxiliando-me em tudo que lhe era possível.

As minhas filhas, Milla e Laura, que me transmitem a cada sorriso que me dedicam, a vontade e a coragem que preciso para viver e para vencer.

SALMO 23 (de Davi) – A Felicidade de Termos o Senhor como nosso Pastor

O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas
tranqüilas.

Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça por amor do
seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal
algum, porque tú estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges
a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da
minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

EM ESPECIAL:

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, meu orientador, por ser sempre solícito, paciente e compreensivo. Obrigada pela maneira humilde e respeitosa com que me corrigiu quando necessário, pelos estímulos e bons exemplos. Agradeço também a sua família, que me acolheu com bondade semelhante.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa que me foi concedida e pelo auxílio financeiro que permitiram uma boa execução desta pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP– UNICAMP, pela utilização de suas instalações, pela acolhida e oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

Ao Prof. Dr. Tales Rocha de Matos Filho, Diretor da FOP-UNICAMP pela sua cordialidade e ótima administração.

Ao Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pela sua competência e a confiança que inspira aos pós-graduandos.

A todos os professores do Departamento de Morfologia, pela amabilidade e disponibilidade diária.

Ao Prof. Dr. Oswaldo di Hipólito, do Departamento de Patologia, pela sua simpatia, incentivo e contribuição com este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, que se mostraram tão prestativos e alegres no dia-a-dia.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular, pela cooperação diária e a oportunidade de aprender bastante com cada um.

Aos demais colegas do Curso de Biologia Buco-Dental, pela boa convivência diária.

Aos demais funcionários da FOP-UNICAMP, que se mostraram sempre solícitos, prestativos e alegres no dia a dia.

À Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi, do departamento de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia-UFU, pela ótima acolhida, paciência e colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Martins Rodrigues, por ter nos cedido gentilmente todos os desenhos de odontogênese utilizados neste trabalho.

Ao meu eterno e querido professor Dr. Antônio Wilson de Almeida, que sempre me apoiou e amparou, e que sempre confiou na minha capacidade.

SUMÁRIO

LISTAS

Listas de abreviaturas, unidades e palavras em outro idioma.....	1
Lista de tabela.....	3
Lista de figuras	4

RESUMO.....	6
-------------	---

ABSTRACT.....	7
---------------	---

INTRODUÇÃO.....	8
-----------------	---

REVISÃO DA LITERATURA

Agenesia Dental.....	13
Genes Envolvidos na Odontogênese.....	19
O Gene <i>LEF1</i>	26
O Gene <i>LEF 1</i> e a Morfogênese.....	27

OBJETIVOS.....	34
----------------	----

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística.....	36
Obtenção do DNA.....	36
Extração do DNA.....	37
Amplificação do Segmento do Gene <i>LEF 1</i> por PCR.....	38
Eletroforese das Amostras.....	39
Técnicas para Análise de Polimorfismo.....	40

RESULTADOS

Obtenção do DNA.....	41
Amplificação do Segmento do Gene <i>LEF 1</i> por PCR.....	41
SSCP.....	42

DISCUSSÃO

Ausência de polimorfismo no promotor do <i>FEF 1</i>	50
Obtenção do DNA.....	52
Amplificação do Segmento do Gene <i>LEF 1</i> por PCR.....	53
Purificação dos Produtos Amplificados por PCR.....	53
SSCP.....	54

CONCLUSÕES.....	55
-----------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
---------------------------------	----

ANEXO.....	68
------------	----

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

BMP: proteína morfogenética do osso (“bone morphogenetic protein”)

BSA: Proteína albumina sérica bovina

c: Citosina

Dlx: grupo de genes homeóticos em ratos (“distal-less homeobox”)

DLX: grupo de genes homeóticos em humanos (“distal-less homeobox”)

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxinucleotídeo

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

Egf: gene do fator de crescimento epidermal em ratos (“epidermal growth factor”)

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

FGF: Proteína do fator de crescimento fibroblástico (“fibroblast growth factor”)

φX174-RF Hae III DNA digest: padrão de massa molecular

g: guanina

Gsc: grupo de genes homeóticos em ratos (“goosecoid”)

HMG: High Mobility Group

LEF: grupo de genes em humanos (“Lymphoid Enhancer-binding Factor 1”)

Lef: grupo de genes em ratos (“Lymphoid enhancer-binding factor 1”)

MSX: grupo de genes homeóticos em humanos (“Muscle Segment Homeobox”)

Msx: grupo de genes homeóticos em ratos (“muscle segment homeobox”)

OD: densidade óptica

Pax: grupo de genes homeóticos em ratos (“paired”)

Pb: par(es) de base(s)

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

Primer: Oligonucleotídeo utilizado na reação de PCR

SDS: dodecil sulfato de sódio

SSCP: polimorfismo conformacional em fita única (“single-strand conformational polymorphism”)

TBE: tampão tris-borato EDTA, para corrida de eletroforese

TE: tampão Tris/ EDTA

TGF- β : Proteína do fator de crescimento transformante- beta (“tumor growth factor- β ”)

U: unidade(s)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Síndromes que apresentam ausência congênita de dentes (pág. 18).

TABELA 2: Sumário das principais alterações na dentição causado pela deleção de genes em camundongos (pág. 25).

TABELA 3: Relação dos pacientes, idade, sexo e padrão de agenesia – (FDI) Federação Dentária Internacional (pág. 44 a 46).

TABELAS 4a e 4b: – Leitura em espectrofotômetro do grau de pureza e da quantidade do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa jugal (pág. 47 a 49).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Paciente com agenesia de incisivo lateral inferior esquerdo decíduo (pág. 14).

FIGURA 2: Paciente com agenesia de incisivos laterais inferiores permanentes (pág. 14).

FIGURA 3: Radiográfico de agenesia de incisivos laterais inferiores permanentes (pág. 15).

FIGURA 4: Paciente portador de Displasia Ectodérmica Anidróica, apresentando Oligodontia característica (pág. 15).

FIGURA 5: Desenho de fase em botão da odontogênese. (pág. 9).

FIGURA 6: Desenho de fase em capuz da odontogênese (pág. 10).

FIGURA 7: Desenho da fase em campânula da odontogênese (pág 10).

FIGURA 8: Desenho da fase em coroa da odontogênese (pág. 11).

FIGURA 9: Eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5% corados pela prata para visualização dos produtos de amplificação da região promotora do gene *LEF 1*, obtidos pelos primers LEF 1 F/R (pág. 42).

FIGURA 10: Eletroforese em géis de poliacrilamida a 7% corados pela prata para visualização da formação de bandas características de SSCP (pág. 42).

RESUMO

Numerosos termos têm sido usados para descrever a ausência congênita de dentes. A hipodontia denota a ausência congênita de um ou poucos dentes permanentes e/ou decíduos. A agenesia de numerosos dentes, comumente associada a síndromes específicas e/ou anormalidades sistêmicas, é classificada como oligodontia. A anodontia, uma expressão extrema da oligodontia, indica uma total ausência das estruturas dentais e tem sido reportada nas mais severas formas de displasias ectodermais. A hipodontia é uma das mais freqüentes alterações da dentição humana, que embora não represente um problema de saúde pública, pode causar disfunções mastigatórias e da fala, além de problemas estéticos. Trabalhos recentes mostraram que a deleção do gene *Lef 1* em ratos proporciona a perda de dentes e outras estruturas originadas da interação epitélio-mesênquima. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de polimorfismos na região promotora do gene *LEF 1* em indivíduos com formas não sindrômicas de agenesia dental. O DNA foi obtido de células epiteliais (em processo de descamação) da mucosa bucal de 38 indivíduos com agenesia nos segundos pré-molares, terceiros molares ou incisivos, e 39 indivíduos controle. A região promotora do gene *LEF 1* foi amplificada pela técnica de PCR. Os produtos de PCR foram submetidos à análise pela técnica de SSCP e não revelaram alterações na região promotora do gene estudado. Este resultado indica que alterações nesta região do gene *LEF 1* em humanos deve ter um efeito altamente seletivo na dentição, e outros genes devem estar envolvidos na etiologia da hipodontia.

ABSTRACT

Numerous terms have been used to describe congenital missing teeth. Hypodontia denotes congenital absence of one or a few teeth in the primary and/or permanent dentition. Agenesis of numerous teeth, commonly associated with specific syndromes and/or severe systemic abnormalities is classified as oligodontia. Anodontia, an extreme expression of oligodontia indicates total absence of dental structures. The latter has been reported in the most severe forms of ectodermal dysplasia. The hypodontia is one of the most frequent alterations of the human dentition. Although it does not represent a public health problem, it may cause both speech and masticatory dysfunction as well as aesthetic problems. Recent work in cats have shown that ablation of *Lef 1* gene causes complete loss of teeth and interferes with the development of other structures formed by epithelial-mesenchymal interaction. The aim of this work was to investigate the presence of polymorphisms/mutations in the promoter region of the *LEF 1* gene in individuals with tooth agenesis. DNA was obtained from epithelial cells of the buccal mucosa of 38 individuals with different patterns of hypodontia in second premolars, wisdom teeth or incisors, and 39 individuals control. The promoter region of the *LEF 1* gene was amplified by PCR technique. The PCR products were submitted to SSCP technique and did not reveal any alterations in that region of the gene studied. This result indicates that alterations in this region of the *LEF 1* gene in humans must have a highly selective effect on dentition, and other regions of this gene as well as other genes may be involved in the aetiology of hypodontia in humans.

INTRODUÇÃO

Uma dentição completa e funcional é pré-requisito para a sobrevivência de muitos mamíferos. A dentição dos mamíferos consiste de dentes que se desenvolveram como órgãos discretos, e de anterior para posterior, a dentição é dividida dentro das regiões de incisivos, caninos, pré-molares e molares. Particularmente, os dentes molares são muito diversificados nas suas formas (Thesleff and Jernvall, 2000).

A hipodontia é a ausência congênita de um a seis dentes permanentes e/ou decíduos, e representa uma das alterações mais freqüentes da dentição humana. Embora não constitua um problema de saúde pública, a agenesia dental pode causar alterações na função mastigatória e fala, assim como problemas estéticos que podem afetar a vida social do indivíduo. Esta alteração 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).

Embora o mecanismo molecular envolvido no desenvolvimento normal do dente em humanos não seja muito bem conhecido, estudos em outros vertebrados têm mostrado várias moléculas envolvidas na interação epitélio-mesênquima, que comanda o desenvolvimento de todos os órgãos epidermais incluindo os dentes, pêlos e glândulas mamárias (Kollar, 1970; Kollar and Baird, 1970; Sakakura, 1987; Lumsden, 1988; Hardy, 1992; Jahoda, 1992). O desenvolvimento inicial desses órgãos é similar à formação de uma estrutura com forma característica de botão.

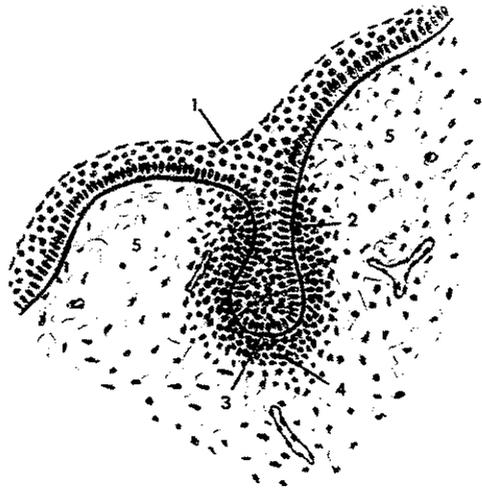


Figura 5 . Fase em botão da odontogênese. 1- Epitélio oral; 2- Lâmina dental; 3- Botão epitelial; 4- Células ectomesenquimais condensadas; 5- Ectomesênquima.

Depois deste estágio, o desenvolvimento destes órgãos diverge para dar origem a estruturas especializadas, com diferentes morfologias, tipos celulares e funções (Lefkowitz *et al.*, 1953; Cohn, 1957; Sakakura, 1987; Hardy, 1992).

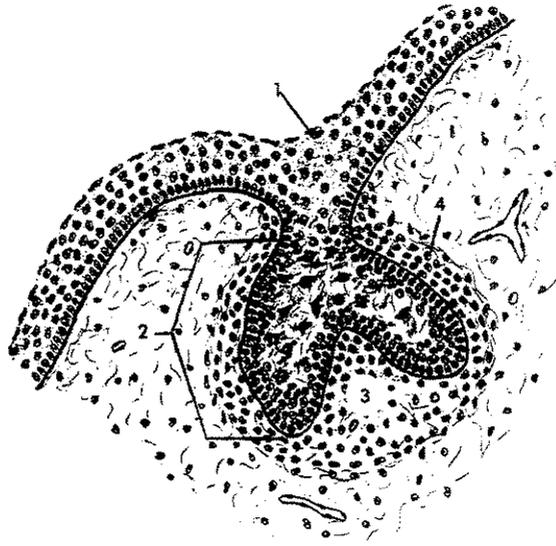


Figura 6: Fase em capuz da odontogênese. 1- Epitélio oral; 2- Órgão do esmalte; 3- Papila dental; 4- Foliculo dental.

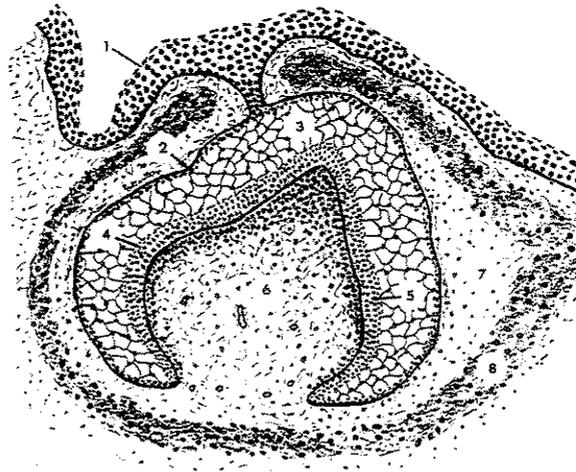


Figura 7. Fase em campânula da odontogênese. 1- Epitélio oral; 2- Epitélio externo do órgão do esmalte; 3- Retículo estrelado; 4- Estrato intermediário; 5- Epitélio interno do órgão do esmalte; 6- Papila dental; 7- Foliculo dental; 8- Tecido ósseo.

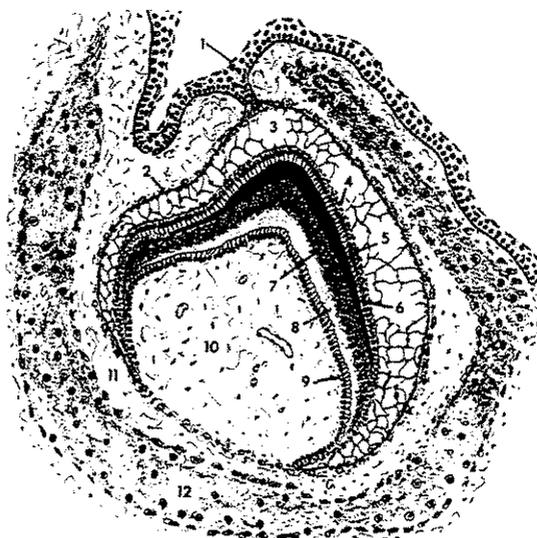


Figura 8: Fase em coroa da odontogênese. 1- Epitélio oral; 2- Epitélio externo do órgão do esmalte; 3- Reticulo estrelado; 4- Estrato intermediário; 5- Ameloblasto; 6- Esmalte; 7- Dentina; 8- Pré dentina; 9- Odontoblasto; 10- Polpa dental; 11- Folículo dental; 12- Tecido ósseo.

A interação indutiva entre o epitélio e o mesênquima comanda a iniciação do desenvolvimento desses órgãos, subsequente morfogênese e citodiferenciação terminal (Grobstein 1967; Gurdon 1992). Estudos (Grobstein 1967; Saxén 1977; Kratochwil 1986) indicam que a interação epitélio-mesênquima é recíproca e seqüencial, e que um ou outro componente (epitélio ou mesênquima) pode ter um papel dominante na organogênese, dependendo do órgão e estágio do desenvolvimento.

Embora muitos genes participem na interação epitélio-mesênquima durante o desenvolvimento do dente em mamíferos, a estrutura molecular implicada neste desenvolvimento é pouco entendida. O gene *LEF 1* (Lymphoid enhancer-binding factor 1) parece desempenhar função essencial

na formação de vários órgãos e estruturas que requerem a interação indutiva dos tecidos (vanGenderen *et al.*, 1994).

A proteína LEF 1 é um fator de transcrição que é expresso em células pré-B e T de ratos adultos nas células da crista neural, germe dental, pêlos e outros lugares durante a embriogênese (Travis *et al.*, 1991; Waterman *et al.* 1991; Oosterwegel *et al.* 1993; van Genderen *et al.* 1994; Zhou *et al.* 1995; Milatovich *et al.*, 1991). A eliminação da proteína LEF1 por ablação genética causa letalidade pós-natal. O animal mutante perde dentes, glândulas mamárias e pêlos, embora estes animais desenvolvam folículos pilosos rudimentares. O animal mutante não apresenta defeitos óbvios nas populações de células linfóides ao nascimento. Sugere-se que a proteína LEF 1 tenha um papel essencial na formação de vários órgãos e estruturas que necessitam da interação indutiva dos tecidos (vanGenderen *et al.*, 1994).

A proteína LEF 1 é um membro da família das proteínas HMG (High Mobility Group), que têm a capacidade de induzir uma dobra na dupla hélice do DNA (Giese *et al.* 1992; Love *et al.* 1995). No entanto, LEF 1 ativa a transcrição somente com a colaboração de outras proteínas que se ligam ao DNA (Carlsson *et al.* 1993).

A proteína LEF 1 é intensamente sintetizada pelas células epiteliais do botão dental, onde desempenha um papel importante na indução das células mesenquimais. A ausência da expressão desta proteína em camundongos faz com que a odontogênese seja interrompida na fase de botão (Kratochwil *et al.*, 1996).

REVISÃO DA LITERATURA

Agenesia Dental

Na literatura científica não há consenso a respeito da terminologia empregada ao referir-se à falta congênita de dentes. Agenesia dental e hipodontia são termos apropriados para significar a ausência congênita de um ou mais (até seis) dentes permanentes e/ou decíduos (Stewart *et al.*, 1982). Oligodontia é definida como a ausência congênita de seis ou mais dentes, excluindo-se os terceiros molares (Schalk-Van Der Weide *et al.*, 1994). Encontra-se também o termo anodontia parcial, com significado análogo a hipodontia, em alguns livros e artigos anteriores a 1978, quando foi considerado obsoleto (Erwin & Cockern, 1949; Shafer *et al.*, 1958).

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 a erupção dental tardia, fato mais evidente em indivíduos do sexo masculino (Schalk-Van Der Weide *et al.*, 1994).

A agenesia dental é uma das alterações mais freqüentes da dentição humana. Muitos estudos têm avaliado que a prevalência da agenesia dental (exceto para 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%) e incisivos laterais maxilares (2,2%) (Graber, 1978; Cua-Benward *et al.*, 1992).



Figura 1: Paciente com agenesia de incisivo lateral inferior esquerdo decíduo

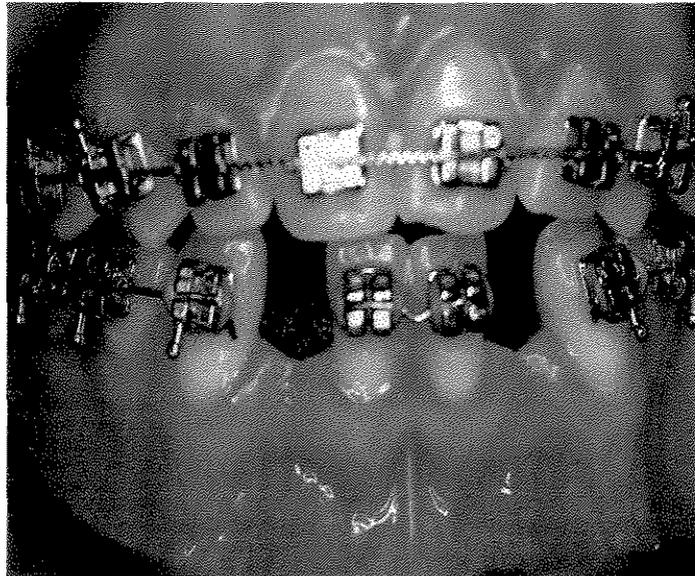


Figura 2: Paciente com agenesia de incisivos laterais inferiores permanentes

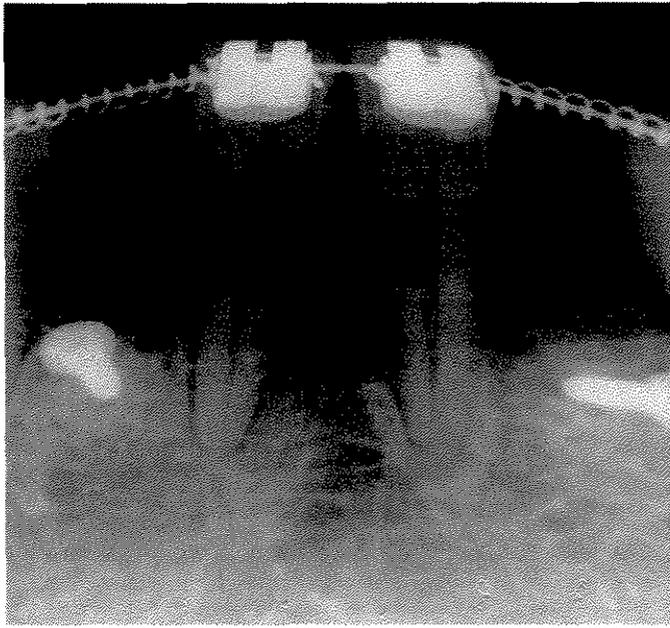


Figura 3: Radiográfico de agenesia de laterais inferiores permanentes

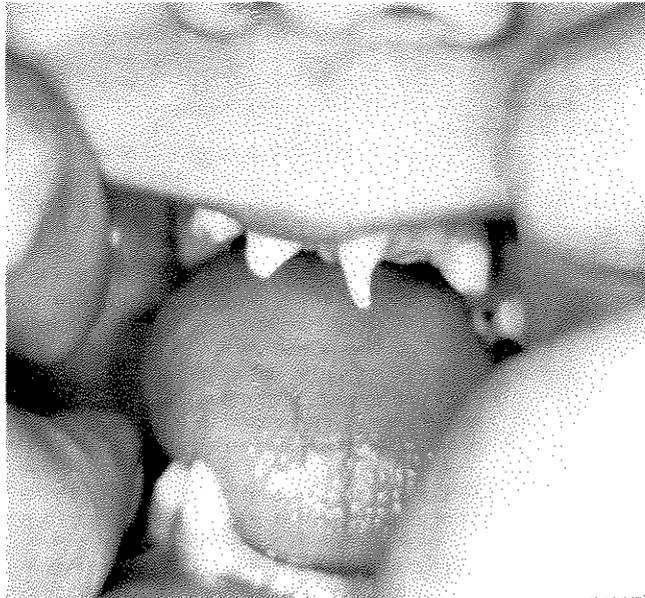


Figura 4: Paciente portador de Displasia Ectodérmica Anidrótica, apresentando Oligodontia característica

Os terceiros molares mostram-se ausentes em aproximadamente 20% da população, demonstrando uma tendência evolutiva.

A hipodontia não constitui um problema de saúde pública, mas pode causar alterações na função mastigatória e fala e, dependendo da severidade do caso, torna-se um desconforto estético do qual muitos indivíduos se queixam. A agenesia dental pode ocorrer como uma entidade isolada ou associada a síndromes. No caso da hipodontia isolada, essa característica parece ser resultado de uma ou mais mutações pontuais em um sistema poligênico estreitamente ligado, transmitidas mais freqüentemente de modo autossômico dominante, de penetrância incompleta e expressividade variável (Graber, 1978). Quando a agenesia dental está ligada a síndromes há uma tendência maior de ser transmitida.

Segundo Yvonne Schalk-Van Der Weide e colaboradores em 1994, a hipodontia ou oligodontia (dependendo do número de dentes ausentes) é uma das características observadas em mais de 120 síndromes, sendo em algumas delas uma característica importante para o diagnóstico. Em algumas síndromes, a agenesia dental é meramente descrita como uma característica associada. Uma das principais síndromes em que a ausência congênita de dentes é uma característica-chave para o diagnóstico é a Displasia Ectodérmica Anidrótica, cujos indivíduos afetados exibem rareamento de cabelos (hipotricose), inabilidade de transpirar devido à falta ou menor quantidade de glândulas sudoríparas (anidrose ou hipoidrose), entre outras características. Com relação à dentição, esta síndrome apresenta número variável de dentes ausentes, indo da hipodontia até a agenesia total, incluindo-se o fato de que a forma dos dentes presentes é anormalmente simples (cônicos) e de tamanho reduzido.

Assim, a Displasia Ectodérmica Anidrótica caracteriza-se pelo desenvolvimento pobre ou ausente de cabelo, glândulas sudoríparas e dentes, os quais são tecidos originados embriologicamente da ectoderme (Thesleff, 1996).

Algumas das síndromes em que a agenesia é uma característica importante estão relacionadas na tabela 1 (Shalk-Van Der Weide *et al.*, 1994), embora não exista interesse no presente estudo em aprofundar esse tópico.

TABELA 1 – Síndromes que apresentam ausência congênita de dentes.

SÍNDROME	MODO DE HERANÇA	DENTES AUSENTES
Böök	Autossômica Dominante	Pré-molares
Rieger	Autossômica Dominante	Incisivos maxilares (sempre), incisivos mandibulares e pré-molares (ocasionalmente)
Ellis – van Creveld	Autossômica Recessiva	Incisivos mandibulares e caninos
Gorlin – Chaudry - Moss	Autossômica Recessiva	Molares decíduos, segundos pré-molares e molares permanentes
Proteinose lipóide	Autossômica Recessiva	Incisivos laterais maxilares, caninos e pré-molares
Coffin - Lowry	Ligado ao X (Recessiva)	Incisivos laterais maxilares e incisivos mandibulares
Orofaciodigital (tipo 1)	Ligado ao X (Dominante)	Incisivos mandibulares e caninos
Lábio e palato fendido	Multifatorial	Incisivos laterais maxilares e caninos
Down	Cromossômica	Terceiros molares, segundos pré-molares mandibulares e incisivos laterais maxilares
Holoprosencefalia	Vários modos são descritos	Incisivos maxilares
Hipoglossia - hipodactilia	Esporádica	Incisivos mandibulares e caninos
Anquilose glossopalatina	Autossômica Dominante	Incisivos

Fonte: Schalk-van der Weide Y., Beemer F. A., Faber J. A. J. & Bosman F. Symptomatology of patients with oligodontia. J. Oral Rehabilitation 21: 249, 1994.

Genes Envolvidos na Odontogênese

O desenvolvimento do dente e outros órgãos derivados de interação epitélio-mesênquima é mediada por moléculas sinalizadoras. Recentemente, evidências sugerem que a cascata de sinais é usada durante todo o processo do desenvolvimento do dente (Thesleff and Jernvall, 2000).

A interação epitélio-mesênquima é mediada por famílias de genes conservados em outros organismos vertebrados. Estudos têm revelado a sinalização indutiva e hierárquica dos genes envolvidos na interação epitélio-mesênquima. Esta é a formidável tarefa de mais de 200 genes que participam da formação dos dentes (Thesleff and Jernvall 2000).

A expressão combinada de membros de grupos da família de genes homeóticos (genes *Hox*) reguladores, desempenham importante papel na especificação posicional de estruturas no sistema esquelético. Análises de expressão em embriões mostraram que genes *Hox* têm uma combinação específica de alguns de seus genes, como um “código Hox”, responsável pelo “modelamento” ou embriogênese de determinadas regiões do embrião (Hunt *et al.*, 1991). De acordo com essa idéia, o código Hox utilizado para modelamento da região craniofacial dos vertebrados (considerando-se os aspectos evolutivos), inclui membros dos grupos de genes Muscle segment (*Msx*), Distal-less (*Dlx*), Goosecoid (*Gsc*) e Paired (*Pax*). Estes grupos de genes foram propostos para definir, pela sobreposição dos domínios de expressão, as regiões em que se originarão os dentes incisivos, molares e caninos na mandíbula em desenvolvimento (Sharpe, 1995).

O grupo *Msx* (em ratos) consiste em três membros cromossomicamente não ligados. O gene *MSX 1* pertence a um grupo de genes altamente conserva-

dos dentro da escala evolutiva, e está incluído em uma grande família chamada de genes homeóticos (genes *Hox*). Em humanos existem os genes *MSX 1* e *MSX 2* que não localizam-se no mesmo cromossomo (Davidson, 1995), e estão estreitamente envolvidos na odontogênese (Maas & Bei, 1997).

Experimentos realizados com ratos transgênicos, em que o gene *Msx 1* foi tornado não-funcional, geraram animais com palato fendido e completa anodontia, permanecendo a odontogênese interrompida na fase de botão. Vale acrescentar que esses animais não apresentaram mal-formações em outros órgãos. Pode-se explicar esse fato devido à redundância funcional entre os genes *Msx 1* e *Msx 2* e sua co-expressão em muitos sítios. Comprova-se esse dado por um outro experimento com ratos transgênicos em que os genes *Msx 1* e *Msx 2* eram não-funcionais; os animais apresentaram, além de anodontia, sérios defeitos no desenvolvimento de muitos órgãos. Conclui-se a importância indubitável da proteína *Msx 1* na odontogênese, e compreende-se o fato de ratos transgênicos para o *Msx 1* não terem sido compensados pelo gene *Msx 2*, já que este expressa-se principalmente nos estágios da odontogênese mais avançados ao de botão. Tal padrão de expressão foi comprovado em ratos transgênicos para o gene *Msx 2*, os quais não exibiram alteração no número de dentes, mas sim defeitos na morfogênese das cúspides, das raízes dentais e dos órgãos do esmalte (Satokata & Maas, 1994; Maas & Bei, 1997; thesleff, 1996).

O grupo *Dlx* recebeu sua denominação a partir da homologia observada com o genoma de *Drosophila*, e é composto por seis membros no genoma de mamíferos. Acredita-se que a partir de um gene *Dlx* ancestral ocorreram eventos de duplicação coincidindo com a evolução dos cordados. Os genes *Dlx 3* e *Dlx 7* são os maiores candidatos a representarem esse gene ancestral,

pois as expressões de suas proteínas são mais generalizadas, enquanto que as expressões dos outros genes são mais restritas, sugerindo que suas funções sejam mais especializadas. Muitos genes *Dlx* são co-expressos com os genes *Msx 1* e *Msx 2*. Em particular os genes *Dlx 1* e *Dlx 2* são expressos respectivamente no mesênquima dental e epitélio dental nos estágios iniciais da odontogênese de ratos (até o estágio de capuz), coincidindo em grande parte com a expressão dos genes *Msx 1* e *Msx 2*. Além disso, os genes *Dlx 1* e *Dlx 2* são expressos tanto na mandíbula quanto na maxila, tendo a provável função de participar da odontogênese de dentes molares. É interessante acrescentar que em ratos transgênicos onde os genes *Dlx 1* e *Dlx 2* estão deletados, ocorre o desenvolvimento dos dentes molares mandibulares somente. Procura-se explicar esse fato pela presença dos genes *Dlx 5* e *Dlx 6* no arco mandibular, de forma que seria necessária a expressão de algum gene *Dlx* na região para o desenvolvimento dos dentes molares (Maas & Bei, 1997; Weiss *et al.*, 1998). Com relação ao grupo *Gsc* (Goosecoid), as referências bibliográficas consultadas não forneciam maiores informações a respeito, limitando-se praticamente a mencioná-lo.

Um outro grupo de genes homeóticos é o *Pax*, cujo nome também advém da homologia com um gene chamado *paired* em *Drosophila*. Esse grupo é formado por nove membros em mamíferos, sendo que os membros mais estreitamente ligados à odontogênese são os *Pax 1* e *Pax 9*. Por meio de hibridização *in situ* em embriões de ratos, foi observada a expressão da proteína PAX 1 nos estágios iniciais da odontogênese de molares (até a fase de botão). O gene *Pax 9* é abundantemente expresso no mesênquima dental no estágio de capuz. Além disso, em experimentos com ratos em que o gene *Pax 9* foi deletado, a odontogênese de molares apresentou-se interrompida na

fase de botão, o que é fenotipicamente similar aos resultados em ratos transgênicos para o gene *Msx 1* (Maas & Bei, 1997; Strachan & Read, 1994). Recentemente também foi mostrado que mutação no gene *PAX 9* está associada com a oligodontia em humanos, afetando principalmente os dentes posteriores da dentição permanente (Stockton *et al.* 2000).

Durante o desenvolvimento embrionário, muitos fatores de crescimento têm demonstrado função como sinalizadores entre as camadas dos tecidos embrionários. A interação tissular, também chamada indução embrionária, tem uma importância central na regulação do desenvolvimento embrionário. Os fatores de crescimento estão agrupados em famílias, e aquelas que atuam claramente na organogênese são o TGF- β (fator de crescimento transformante - beta) e FGF (fator de crescimento fibroblástico). Um mecanismo pelo qual os fatores de crescimento regulam o desenvolvimento é pela estimulação dos genes homeóticos. Assim como eles, os fatores de crescimento têm sido conservados durante a evolução e parecem ter funções similares em todo o reino animal.

A família de fatores de crescimento mais estudada até agora é a TGF- β , e pertence a ela uma classe de proteínas denominada BMP (Proteína Morfogenética do Osso) que regulam o desenvolvimento de ossos e cartilagens. A proteína BMP 4 tem sido identificada como um sinal indutivo do epitélio na formação dos dentes. Ela é produzida no epitélio dental (lâmina dental) e regula a expressão de genes mais diretamente envolvidos na odontogênese, incluindo o *Msx 1*. Expresso no mesênquima portanto, a atividade da BMP 4 é um importante sinal indutivo nas fases iniciais da odontogênese, estimulando o mesênquima a prosseguir o processo (Ihesleff,

1995). A proteína BMP 2 guarda uma homologia de 95% com a BMP 4 e é expressa somente no epitélio dental. A expressão da BMP 2 indica forte correlação com o gene *Msx 2*, de maneira que pode haver uma regulação recíproca entre eles (Maas & Bei, 1997).

A outra família de fatores de crescimento citada, o FGF, também atua na odontogênese. O FGF 4 é expresso especificamente no órgão do esmalte e acredita-se que ele induza a proliferação de células do epitélio dental auxiliando a formação das cúspides (estudos realizados em dentes molares). Além disso, o FGF 4 induz a expressão da proteoglicana sindecan-1, um componente da matriz extracelular, no mesênquima dental, o qual estimula também a proliferação celular. Portanto, moléculas de sinalização, como o TGF- β e FGF, não estão freqüentemente difusas no mesênquima dental; ao invés disso, muitas vezes estão interagindo com moléculas da matriz extracelular, o que dá a oportunidade para um nível adicional de regulação (Maas & Bei, 1997).

Os processos regulatórios envolvidos na odontogênese são extremamente complexos, envolvendo muitos fatores de transcrição, fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, de maneira que muitos estudos ainda se fazem necessários para a completa compreensão deles.

Outro fator de transcrição relacionado à formação dos dentes é o fator de transcrição LEF 1. Combinações experimentais de epitélio e mesênquima de embriões de ratos normais e mutantes para *Lef 1*, permitiram a determinação do tipo de tecido e estágio do desenvolvimento em que este gene é crítico para a morfogênese dos dentes. Estes experimentos indicam que a expressão de LEF 1 é requerida transientemente em um tecido para induzir eventos específicos de morfogênese em outro tecido (Kratowil *et al.*, 1996).

Este fator é expresso no epitélio e mesênquima dental durante o estágio de botão. A expressão deste gene parece ser essencial para o crescimento do epitélio dental e indução do mesênquima. Em camundongos “knockout” onde este gene foi deletado, a odontogênese é bloqueada na fase de botão, resultando em agenesia de todos os dentes, semelhante ao gene *Msx 1* (Kratochwil *et al.*, 1996).

Experimentos com camundongos “knockout” mostraram que a deleção de outros genes como a *activina* e genes *Gli 1* e *Gli 2* também causam agenesia dental, e portanto estão envolvidos na odontogênese (Peters & Bailing, 1999). Um resumo dos genes cujo envolvimento na odontogênese foi comprovado por experimentos em camundongos “knockout” é mostrado na tabela 2.

TABELA 2 - Sumário das principais alterações na dentição causado pela deleção de genes em camundongos. + : presença; - : ausência; S: dentes pequenos; F: dentes fusionados; ++ : dente extranumerário; () : achado ocasional

Genes	Incisivos maxilares	Incisivos mandibulares	Molares maxilares	Molares mandibulares	Estágio paralizado
<i>Gli 3</i> -/-	+	+	+	+	
<i>Gli2</i> -/-	+ (F)	+ (+)	+	+	
<i>Gli2</i> +/- <i>Gli3</i> +/-	+	+	+	+	
<i>Gli2</i> -/- <i>Gli3</i> +/-	-	+ S	+	+ S	Botão
<i>Gli2</i> -/- <i>Gli3</i> -/-	-	-	-	-	Botão
<i>Msx1</i> -/-	-	-	-	-	Botão
<i>Msx2</i> -/-	+	+	+	+	
<i>Msx1</i> +/- <i>Msx2</i> -/-	+	+	+	+	
<i>Msx1</i> -/- <i>Msx2</i> +/-	-	-	-	-	Botão
<i>Msx1</i> -/- <i>Msx2</i> -/-	-	-	-	-	lamina
<i>Dlx1</i> -/-	+	+	+	+	
<i>Dlx2</i> -/-	+	+	+	+	
<i>Dlx1</i> -/- <i>Dlx2</i> -/-	+	+	-	+ (-)	lamina
<i>Pax9</i> -/-	-	-	-	-	Botão
<i>Activin βA</i> -/-	+	-	+	-	Botão
<i>EDA X/Y</i>	+ S	+ S	+ S	+ S	
<i>Lef1</i> -/-	-	-	-	-	Botão
<i>Pax6</i>	++	+	+	+	

O gene *LEF 1*

A proteína LEF 1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1) é um fator de transcrição expressa em linfócitos de ratos adultos, em células da crista neural, germes dentais, folículos pilosos, e outros lugares durante a embriogênese (Travis *et al.* 1991; Waterman *et al.* 1991; Oosterwegel *et al.* 1993; vanGenderen *et al.* 1994; Zhou *et al.* 1995). O gene que codifica essa proteína foi mapeado no cromossomo humano 4 (q23-q25) e em ratos no cromossomo 3, perto do *Egf*. A LEF 1 é uma proteína nuclear de 54-KDa que se liga em um lugar funcionalmente importante em receptores de células T (T-cell receptor alpha enhancer) e contribui para um máximo aumento da atividade (Milatovich *et al.* 1991).

Esta proteína é um membro da família de proteínas HMG (high mobility group proteins) que têm a capacidade de induzir uma dobra na dupla hélice do DNA (Giese *et al.* 1992; Love *et al.* 1995). No entanto, a LEF 1 ativa a transcrição somente com a colaboração de outras proteínas ligantes do DNA (Carlsson *et al.* 1993). No contexto do receptor de célula T (T-cell receptor), a proteína LEF 1 aparece tendo um papel arquitetural, participando da formação de um complexo nucleoproteico, promovendo a justaposição de sítios de transcrição não adjacentes. (Love *et al.*, 1995).

A LEF 1 reconhece uma seqüência específica de nucleotídeos através do domínio HMG (high-mobility-group). Estudos revelaram que o domínio HMG se liga ao sulco menor de uma dupla hélice curvada e distorcida. A região básica se liga de forma cruzada ao estreitado sulco maior e contribui para o reconhecimento do DNA. A estrutura central da proteína LEF 1 é formada por um arranjo característico em forma de L de três hélices e uma

região estendida vista previamente em estruturas de domínios HMG-1 e HMG-D na ausência do DNA. As hélices 1 and 2 (resíduos 8-24 e 28-43, respectivamente) formam um braço do L; a hélice 3 (resíduos 46-66) e a estendida região N-terminal, o outro (Love *et al.*, 1995).

As proteínas com domínios HMG podem ser classificadas em duas subfamílias. Membros de uma subfamília, que incluem o HMG-1 e o HMG-2, têm múltiplos domínios HMG, se liga ao DNA com pouca ou nenhuma especificidade e são encontradas em todos tipos de células. Membros da outra subfamília, que incluem a LEF 1 (lymphoid enhancer binding factors), contêm um único domínio HMG, ligam-se em seqüências específicas do DNA e são expressos em poucos tipos celulares (Love *et al.*, 1995).

O gene *Lef 1* e a morfogênese

O desenvolvimento dos dentes tem sido extensivamente estudado (Slavkin 1974; Sengel 1976; Thesleff and Humerinta 1981; Thesleff *et al.* 1995). Neste desenvolvimento, um epitélio derivado da ectoderme (epitélio oral) interage com um mesênquima originado das células da crista neural no primeiro arco branquial (LeDouarin 1982; Lumsden 1988; Noden 1988). O epitélio invaginado abraça parte do mesênquima condensado que forma uma papila mesenquimal. Estudos sobre mecanismos do desenvolvimento do dente têm focado na expressão de genes regulatórios, que codificam fatores de transcrição, moléculas da superfície celular e fatores de crescimento (Panaretto 1993; Thesleff *et al.* 1995). Muitos destes genes são expressos em regiões e tempo definidos, o que reflete a interação indutiva dos tecidos

(Jones *et al.* 1991; Lyons *et al.* 1991; MacKenzie *et al.* 1991; Hogan *et al.* 1994; Parr and McMahon 1994). Alguns fatores de crescimento, como a Proteína Morfogênica Óssea 4 (BMP 4) e o Fator de Crescimento Fibroblástico 4 (FGF 4) têm a capacidade de induzir a expressão de genes específicos no mesênquima de germes dentais *in vitro* (Jernvall *et al.* 1994).

Recentemente, mutações experimentais induzidas nos genes dos fatores de transcrição *Msx 1* e *Lef 1*, revelaram um papel destes genes no desenvolvimento do dente (Satokata and Maas 1994; vanGenderen *et al.* 1994; Kratochwil *et al.*, 1996).

Três mecanismos têm sido propostos para a transmissão indutiva dos sinais na interação dos tecidos durante a organogênese: fatores difusíveis, contato célula-célula, e interação mediada pela matriz extracelular (Grobstein 1967; Sexén *et al.* 1976).

A inativação do gene *Lef 1* em ratos resultou em um fenótipo em que o desenvolvimento dos dentes, folículos pilosos e glândulas mamárias foram severamente prejudicados (vanGenderen *et al.* 1994). O desenvolvimento do dente é iniciado em embriões *Lef 1* *-/-*, no entanto, ele pára antes da formação do capuz dental. Igualmente, o desenvolvimento dos pêlos do corpo e glândulas mamárias é incompleto ou anulado antes da morfogênese. Todos os órgãos que são afetados pela mutação no gene *Lef 1* compartilham uma necessidade da interação dos tecidos, epitélio e mesênquima. Então, o fenótipo destes ratos mutantes origina a interessante possibilidade que o gene *Lef 1* tenha um papel regulatório geral na interação epitélio-mesênquima (vanGenderen *et al.* 1994). Além disso, a super expressão forçada da LEF 1 nas células ectodermais de ratos transgênicos foi recentemente testada resultando em formação aberrante de folículos pilosos e estruturas parecidas

com dentes na região do sulco labial (Zhou *et al.* 1995, Kratochwil *et al.*, 1996).

Combinações experimentais de epitélio e mesênquima de embriões de ratos normais e mutantes para *Lef 1* (*Lef 1 -/-*), permitiram determinar o tipo de tecido e o estágio do desenvolvimento em que este gene é crítico na morfogênese dos órgãos. Estes experimentos indicam que a expressão de *Lef 1* é necessária somente transientemente em um tecido para induzir um evento morfogenético específico em outro tecido. A expressão de *Lef 1* é ativada no mesênquima dental por BMP 4, sugerindo que esse fator de transcrição atua em um caminho sinalizador mediado por BMPs (Kratochwil *et al.*, 1996).

O gene *Lef 1* é expresso no epitélio dental entre os estágios embrionários E10 e E11 em ratos (Ooterwegel *et al.* 1993, Kratochwil *et al.*, 1996). Em E12, a expressão de *Lef 1* muda para o mesênquima condensado em volta do botão dental (epitélio invaginado). A iniciação da morfogênese em E13 é acompanhada pela expressão de *Lef 1* na condensação mesenquimal e nas células basais imediatamente adjacentes do epitélio. Estas células epiteliais diferem em sua proliferação e propriedades sinalizadoras das outras células epiteliais e formam o futuro nó do esmalte (Jernvall *et al.* 1994; Vaahtokari *et al.* 1996). Durante os estágios subsequentes de capuz e sino (E14-E16), transcritos de *Lef 1* são continuamente detectados em vários tecidos, incluindo a papila mesenquimal, pré-odontoblastos, e nos pré-ameloblastos derivados do epitélio (Kratochwil *et al.*, 1996).

Embora a expressão de *Lef 1* esteja presente nos primeiros estágios do desenvolvimento do dente, embriões de ratos mutantes para *Lef 1* iniciam a formação do germe dental (vanGenderen *et al.* 1994). O primeiro defeito visível no desenvolvimento do dente em embriões *Lef 1* deficientes pode ser

detectado mais tarde no estágio em botão, por volta de E13. Em particular, o epitélio dental mutante não forma o nó do esmalte e pára de crescer no estágio de botão (vanGenderen *et al.* 1994). Este fenótipo mutante sugere que E 13 possa ser o estágio crítico para a ação de *Lef 1* no desenvolvimento do dente (Kratochwil *et al.*, 1996).

A mudança da expressão do gene entre epitélio e mesênquima e a parada do desenvolvimento do dente no estágio em botão sugere um papel regulatório de *Lef 1* na odontogênese. Experimentos mostraram que a combinação de epitélio normal e mesênquima de camundongos *Lef 1* mutantes produz dentes, independente do estágio do embrião doador. A morfogênese foi normal em todos os tecidos, com completa citodiferenciação, incluindo a secreção de dentina por odontoblastos mutantes e esmalte por ameloblastos. Em contraste, a odontogênese na associação de epitélio mutante e mesênquima normal foi dependente do estágio do embrião doador. Nos dentes desenvolvidos de tecidos embrionários em E10-E12, o epitélio mutante forma somente um cisto queratinizado e o mesênquima normal, osso alveolar. A recombinação de tecidos dentais em E13 desenvolveu muito poucas estruturas semelhantes a dentes, menos que aqueles de E14-E17, que produziram dentes morfológicamente normais e em alta freqüência. Essa combinação de tecido indica que a expressão de *Lef 1* é necessária só no epitélio para permitir o desenvolvimento morfológico normal do dente. No entanto, o mesênquima dental de embriões normais em E14 ou embriões mais velhos que foram expostos à expressão epitelial de *Lef 1* antes da separação dos tecidos foi capaz de desenvolver dentes em associação com o epitélio mutante. Juntos, estes resultados sugerem que a expressão epitelial de *Lef 1* é necessária para a indução do mesênquima, presumivelmente para a formação da papila dental,

mais é dispensável para a citodiferenciação (Kratochwil *et al.*, 1996).

Experimentos que envolveram recombinações de tecidos normais indicam que as formas dos dentes incisivos e molares são determinadas pelo mesênquima depois de E11 (Kollar and Baird 1969, Lumsden 1979; Kollar and Mina 1991). Para examinar a participação de *Lef 1* na determinação da forma do dente, foram feitos experimentos que combinaram epitélio normal de incisivo no estágio E13 com mesênquima mutante de molar em E13 e vice-versa. Em ambos os tipos de recombinação, o mesênquima deficiente foi ainda capaz de determinar a forma final do dente, indicando que a especificação do tipo da papila dental é independente de *Lef 1* (Kratochwil *et al.*, 1996).

Muitos genes que codificam fatores de transcrição, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular são expressos em espaço e tempo consistente com a indução interativa dos tecidos durante a organogênese (Vainio *et al.* 1989, 1993; Jones *et al.* 1991; Lyons *et al.* 1991; Mackenzie *et al.* 1991; Jowett *et al.* 1993; Bitgood and McMahon 1995). Transcritos do fator de transcrição *Msx 1*, cuja inativação também resulta no seqüestro do desenvolvimento do dente no estágio E13 (Satokata and Maas 1994), foram detectados em níveis similares em germes normais e mutantes para *Lef 1*^{-/-}. Então, *Msx 1* pode atuar antes do *Lef 1* em uma hierarquia genética ou, alternativamente, em um caminho diferente (Kratochwil *et al.*, 1996).

O *Lef 1* é expresso durante os estágios iniciais do desenvolvimento do dente em um caminho similar para BMP 2 e BMP 4, sugerindo que estes genes possam participar em um caminho regulatório comum (Vainio *et al.* 1993; vanGenderen *et al.* 1994). A expressão aparentemente normal de ambos BMP 2 e BMP 4 em embriões *Lef 1*-deficientes, no entanto, sugerem que as

BMPs podem não ser reguladas por LEF 1. Por essa razão, foi examinada a possibilidade das BMPs regularem a expressão de *Lef 1*. O fator de crescimento BMP 4 é expresso no epitélio dental em embriões no estágio E10 e mesênquima no estágio E13 e embriões mais velhos, enquanto que células do epitélio dental do nó do esmalte expressam ambos BMP 2 e BMP 4 em E13/E14 (Vaahtokari *et al.* 1996). Embora estudos de recombinação de tecidos indiquem que a função da LEF 1 é restrita ao epitélio, não é possível examinar os efeitos de vesículas contendo BMPs na expressão epitelial da LEF 1 porque esse tecido não pode ser cultivado na ausência de mesênquima (Kratochwil *et al.*, 1996). Foi então examinado o potencial da BMP 4 para induzir a expressão da LEF 1 no mesênquima dental de embriões em E11. Transcritos de *Lef 1* foram detectados por hibridização *in situ* na área em volta das vesículas embebida em de BMP 4. A LEF 1 não foi detectada em cultura de mesênquima de E11 contendo vesículas com BSA, indicando que os efeitos de BMP 4 na expressão de *Lef 1* são específicos. Para examinar a relação entre *Lef 1* e *Msx 1* neste caminho sinalizador mediado por BMP 4, foi analisado a expressão de MSX1 induzida por BMP 4 no mesênquima dental de embriões normais e *Lef 1* deficientes, obtendo-se transcritos de *Msx 1* induzidos independente do genótipo do embrião. Estes detalhes sugerem que LEF 1 atue depois de BMP 4 e pode ser ativado via *Msx 1* ou por uma via independente.

Sabe-se então, que a formação do dente é dependente de LEF 1 em somente um tecido, embora a proteína possa ser detectada no epitélio e no mesênquima até o final da organogênese. O desenvolvimento dos dentes depende da expressão de *Lef 1* no epitélio. Sabe-se também que, depois do estágio crítico da expressão de *Lef 1* no tecido, o tecido adjacente adquire a capacidade para formar o órgão normal na combinação com o tecido mutante.

Sugere-se então que o efeito deste fator de transcrição tenha sido transmitido de um tecido para o outro. No entanto, os eventos dependentes da LEF 1 no desenvolvimento do dente, que é a formação da papila dental, ocorrem no tecido em que o gene *Lef 1* endógeno é dispensável para a organogênese (mesênquima). Finalmente, a expressão de LEF 1 é requerida somente transientemente durante eventos específicos de indução na iniciação do desenvolvimento do órgão e/ ou morfogênese, mais é dispensável para a citodiferenciação do tecido.

Uma função essencial da expressão da LEF 1 seria demonstrada somente no epitélio dental entre E13 e E14, que coincide com a presença de transcritos de *Lef 1* nas células mais basais do botão epitelial, o futuro nó do esmalte. Então esta estrutura tem sido proposta com a função de um centro sinalizador na morfogênese do dente (Jernvall *et al.* 1994; Vaahtokari *et al.* 1996).

Experimentos de recombinação de tecidos indicam que a LEF 1 regula um processo indutivo na organogênese do dente embora a elucidação precisa do mecanismo da ação deste gene terá que aguardar a identificação de alvos genéticos de *Lef 1*. Trabalhos sugerem que *Lef 1* possa funcionar em um caminho sinalizador mediado por BMP e tem-se formalmente identificado LEF 1 como um fator de transcrição que regula a interação indutiva dos tecidos em um sistema derivado do epitélio-mesênquima, o dente.

OBJETIVOS

Polimorfismos genéticos podem ser entendidos como variações genéticas que ocorrem naturalmente em uma população. Estas variações podem ter um efeito direto sobre a expressão genética e/ou afetar a função protéica. Estudos recentes têm mostrado que polimorfismos em regiões reguladoras da transcrição (regiões promotoras) parecem ser freqüentes, e que estas variações são responsáveis por características fenotípicas individuais. Estudos recentes têm mostrado também que polimorfismos genéticos em regiões promotoras estão correlacionados com suscetibilidade a processos patológicos como o câncer (Dunleavey *et al.*, 2000), doença coronária arterial em homens (Humphries *et al.*, 1998) e o lupus eritematoso (Lazarus *et al.*, 1997). No entanto, ainda pouco se sabe sobre o papel de polimorfismos genéticos na determinação das características morfológicas de um indivíduo. Um dos principais desafios da genética moderna é identificar e entender os mecanismos genéticos responsáveis pela diversidade fenotípica que existe em uma população. Em última análise as características morfológicas seriam causadas por polimorfismos genéticos atuando durante o desenvolvimento embrionário. É importante salientar que pequenas alterações durante o processo embrionário podem levar a grandes alterações no indivíduo adulto. Da mesma maneira, entende-se que as alterações que levaram a diferenciação das espécies durante a evolução são resultantes de alterações sutis que ocorreram durante a embriogênese. Desta maneira, a agenesia dental pode ser entendida como um “erro” da morfogênese que ocorreu nas fases iniciais da odontogênese. No entanto, a agenesia dental 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. Desta maneira a agenesia dental (quando aparece como uma forma isolada) é um modelo particularmente interessante para estudos que visam correlacionar variações genéticas com variações morfológicas do desenvolvimento (Line 2001). O objetivo do presente estudo foi de mapear a região promotora do gene *LEF 1* em 38 indivíduos com hipodontia e 39 indivíduos normais, na intenção de detectar polimorfismos genéticos, e correlacioná-los com a agenesia dental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

A casuística foi composta pelo DNA genômico de 38 indivíduos (a maioria não aparentados) portadores de agenesia dental congênita de terceiros molares, pré-molares e incisivos, e 39 indivíduos normais. Os indivíduos que compuseram a amostra eram de ambos os sexos e de várias idades. Entre os portadores de agenesia dental não havia um caráter uniforme dos dentes ausentes (Tabela 3). Indivíduos portadores de síndromes e malformações de qualquer natureza foram excluídos deste estudo.

Obtenção do DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de bochecho de solução de glicose a 3% autoclavada (5 mL) por cerca de 2 min. Essa concentração foi escolhida para que as células fossem mantidas intactas até que os procedimentos de extração do DNA fossem executados, diminuindo o índice de degradação molecular através da liberação de enzimas catalíticas. Além disso, foi executada leve raspagem de células da mucosa jugal com espátula de madeira, a qual foi mergulhada e agitada na solução bochechada na intenção de se recolher as células. Cada solução bochechada foi imediatamente centrifugada por 10 min a 2.000 rpm (raio da centrífuga de 15 cm). Ao precipitado de material celular foi acrescentado 500 µL de

tampão de extração (pH 8,0), contendo Tris.Cl a 10 mM (pH 8,0), EDTA a 0,1 M (pH 8,0) e SDS a 0,5%. A solução foi homogeneizada e armazenada a -20°C até o momento de extração do DNA.

Extração do DNA

Após descongeladas, as amostras em tampão de extração foram incubadas a 56°C com 100 ng/mL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sob agitação constante por toda a 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 de 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 as amostras por 15 seg. a 12.000 g 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 poderiam contaminar o DNA, foi realizado um último banho com clorofórmio. A seguir, o DNA foi precipitado adicionando-se 1/10 (v/v) de acetato de sódio a 3,0 M (pH 5,2), mais o dobro do volume de etanol absoluto gelado, segundo Maniatis *et al.*, 1989. O DNA precipitado (seco) foi ressuspensão em 60 µL de tampão TE (Tris.Cl

10 mM, EDTA 1 mM pH 7,8) à temperatura ambiente durante uma noite. A concentração do DNA genômico das amostras foi determinada por leitura OD²⁶⁰ e o índice de pureza foi estimado pela razão OD²⁶⁰/OD²⁸⁰, com o auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator – Pharmacia Biotech). As amostras de DNA foram armazenadas a -20° C.

Amplificação do seguimento do Gene *LEF 1* por PCR (Reação em Cadeia da Taq DNA Polimerase)

A região promotora do gene *LEF 1* foi amplificada pela técnica de PCR. Baseando-se na seqüência do gene disponível na “internet” (gene-bank), foi requisitada a síntese de iniciadores da reação de PCR (primers) através da empresa GIBCO BRL.

Os Primers utilizados para amplificar a região promotora do gene *LEF 1* foram:

F- 5' GTG GGT TAT AAG CAG CCC CGG TCC T 3'

R- 5' CTC CTC CGC GCC CTG CCC CGC AG 3'

Estes primers amplificaram fragmento de 350 pares de bases na região promotora do gene. Para as reações de PCR utilizou-se “HOT START”, procedimento onde a enzima Taq polimerase é adicionada quando a reação está a 95°C. Foram utilizadas quantidades entre 300 e 600 ng de DNA num volume de 50 µL, contendo Tris.Cl a 10 mM (pH 8,3), KCl a

50 mM, MgCl₂ na concentração final de 1,5 mM, deoxinucleotídeos (200 μM cada), 2 U de Taq DNA Polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) e 1 pmol de cada primer. O DNA genômico de cada amostra foi desnaturado a 95°C por 5 min e submetido a 35 ciclos de 95°C por 1 min, 72°C por 1 min e, 72°C por 1 min. Finalizou-se a reação com uma extensão final na mesma temperatura por 7 min. As reações de PCR foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Eletroforese das Amostras

As seqüências amplificadas foram submetidas à eletroforese (Amersham Pharmacia Biotech - Electrophoresis Power Supply EPS 301) em géis de poliacrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 7,5%. O volume de DNA aplicado em gel foi de 4 μL, acrescidos de 5 μL de água (bidestilada-deionizada) e 3 μL de tampão carreador (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30% em água bidestilada-deionizada). Foi utilizado como padrão o marcador de massa molecular φX174-RF Hae III (1 μl em 8μl de água e 3μl de tampão carreador). As eletroforeses foram feitas em cubas verticais sob corrente elétrica de 20mA utilizando tampão TBE 1X (89 mM de Tris-Cl, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA) com duração de duas (2) horas em média. Após eletroforese, os géis foram corados pela técnica do Nitrato de Prata (BLUM *et al.*, 1987), e fotografados através do sistema de documentação digital (Scientific Digital

Documentation System – Kodak) e processadas pelo programa Photo Enhancer for Kodak 2.1.

TÉCNICA PARA ANÁLISE DE POLIMORFISMOS

Análise de SSCP

Quantidades variáveis do produto de PCR de cada amostra foram desnaturados a 98°C por 5 min com 7µl de tampão desnaturante (formamida a 95%, xilenocianol a 0,05%, azul de bromofenol a 0,05%, EDTA a 20 mM). A seguir as amostras foram conservadas à temperatura de 0°C enquanto foram aplicadas em gel de poliacrilamida/bis-acrilamida (29:1) e submetidas a eletroforese realizada a 4° C e a 10 mA. A concentração do gel foi padronizada em 7% e o tempo de corrida foi de 3 horas em média. Após eletroforese, os géis foram corados pela técnica do Nitrato de Prata (BLUM *et al.*, 1987).

RESULTADOS

Obtenção do DNA

A quantidade de DNA extraída foi variável entre as diferentes amostras, como pode-se observar nas tabela 4. No material obtido dos indivíduos com agenesia dental a quantidade de moléculas de DNA esteve entre 50 e 930 ng/ μ l, e dos indivíduos normais a quantidade mínima foi de 30 ng/ μ l. O índice de pureza do DNA de cada amostra foi estimado pela razão OD^{260}/OD^{280} , e o resultado apresenta-se indicado na tabela. O DNA obtido de cada amostra mostrou-se suficientemente puro e em quantidade satisfatória para a utilização em técnicas de Biologia Molecular.

Amplificação do Segmento da região promotora do Gene *LEF 1* por PCR

A amplificação do segmento do gene *LEF 1* através da técnica de PCR, com o procedimento “HOT START”, foi muito superior a técnica convencional.

O par de primer amplificou a região promotora do gene *LEF 1* para os indivíduos com agenesia dental e para os indivíduos normais.

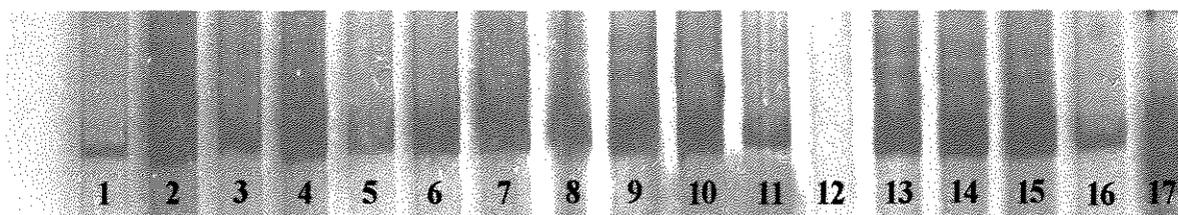


Figura 9 – Eletroforese dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida/TBE a 7,5%, corado pela prata. Canaletas de 1 a 16: fragmentos de 350 pb da região promotora do gene *LEF 1* amplificados por PCR, portadores e não portadores de agenesia. A canaleta 17 contém o padrão de peso molecular.

SSCP

Os segmentos amplificados pelos primers foram submetidos à técnica de SSCP, a qual revelou um padrão semelhante de bandas em todos os indivíduos analisados, ou seja, não houve indicação de qualquer polimorfismo ou mutação nas amostras.

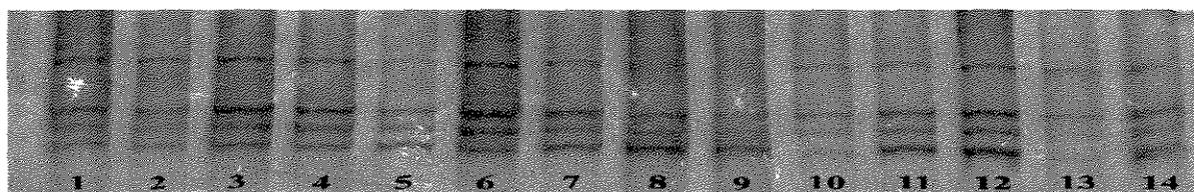


Figura 10 – Eletroforese dos produtos submetidos a análise por SSCP em gel de poliacrilamida/TBE a 7%, corado pela prata. Canaletas de 1 a 14: fragmentos de 350 pb da região promotora do gene *LEF 1* amplificados por PCR (amostras de indivíduos normais e portadores de agenesia) e submetidos as condições da análise de SSCP.

Embora não tenhamos colocado as figuras correspondentes a todas as amostras, as reações de PCR aconteceram com sucesso e não houve diferenciação nas bandas das amostras submetidas a análise de SSCP, independente se a amostra era de paciente normal ou portador de agenesia.

TABELAS

TABELA 3 – Relação dos pacientes, suas idades, Sexo e padrão de agenesia – (FDI) Federação Dentária Internacional

Paciente	Idade em anos	Sexo	Agenesia (sistema de dois dígitos – FDI)
C1	25	F	18, 28, 38 e 48
C2	25	M	15 e 28
C3	27	F	38 e 48
C4	24	M	31 e 41
C5	18	F	12 e 22
C6	12	M	15, 25, 35 e 45
C7	17	M	32
C8	18	F	35
C9	18	F	28, 38 e 48
C10	18	M	38
C11	18	F	18 e 28
C12	18	F	38, 45 e 48
C13	18	F	28, 38 e 48
C14	18	M	42
C15	18	F	25
C16	18	F	18, 28, 38 e 48
C17	11	F	12, 22, 31, 32, 41 e 42
C18	21	F	12 e 22
C19	18	M	12 e 22
C20	50	F	12 e 22
C21	29	M	12 e 22
C22	25	F	12 e 22
C23	23	F	12 e 22
C24	22	M	12, 18, 22, 38 e 48
C25	24	F	12, 18, 28 e 48
C26	20	F	32 e 42
C27	20	M	12 e 22
C28	20	F	18, 28, 35, 38 e 48
C29	20	F	12 e 22
C30	20	F	15 e 25
C31	20	F	12 e 18
C32	22	F	18 e 28

C33	21	F	45
C34	25	F	28, 38 e 48
C35	22	F	13 e 23
C36	31	M	18, 28, 38 e 48
C37	20	F	38 e 48
C38	30	F	38
C39	23	M	18, 28, 38 e 48
C40	28	F	17, 28, 38, 47 e 48
C41	23	F	12 e 22
C42	25	F	Indivíduos Normais
C43	25	F	Indivíduos Normais
C44	33	F	Indivíduos Normais
C45	25	M	Indivíduos Normais
C46	23	M	Indivíduos Normais
C47	28	F	Indivíduos Normais
C48	25	M	Indivíduos Normais
C49	29	F	Indivíduos Normais
C50	18	F	Indivíduos Normais
C51	19	F	Indivíduos Normais
C52	30	F	Indivíduos Normais
C53	27	F	Indivíduos Normais
C54	26	M	Indivíduos Normais
C55	19	M	Indivíduos Normais
C56	20	F	Indivíduos Normais
C57	22	F	Indivíduos Normais
C58	21	M	Indivíduos Normais
C59	25	M	Indivíduos Normais
C60	27	F	Indivíduos Normais
C61	29	F	Indivíduos Normais
C62	25	F	Indivíduos Normais
C63	27	F	Indivíduos Normais
C64	29	M	Indivíduos Normais
C65	21	F	Indivíduos Normais
C66	24	F	Indivíduos Normais
C67	22	F	Indivíduos Normais
C68	19	M	Indivíduos Normais
C69	24	M	Indivíduos Normais
C70	25	F	Indivíduos Normais

C71	21	F	Indivíduos Normais
C72	20	M	Indivíduos Normais
C73	26	M	Indivíduos Normais
C74	25	M	Indivíduos Normais
C75	25	F	Indivíduos Normais
C76	22	M	Indivíduos Normais
C77	23	F	Indivíduos Normais
C78	29	F	Indivíduos Normais
C79	25	F	Indivíduos Normais
C80	27	M	Indivíduos Normais
C81	25	F	Indivíduos Normais
C82	33	M	Indivíduos Normais
C83	26	F	Indivíduos Normais
C84	23	F	Indivíduos Normais
C85	24	M	Indivíduos Normais
C86	27	F	Indivíduos Normais
C87	24	F	Indivíduos Normais

TABELA 4 – Leitura em espectrofotômetro do grau de pureza e da quantidade do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa jugal

a) Indivíduos com Agenesia dental

Paciente/Amostra	OD 260/OD 280	[] em ng/μl
C1	1,8	170
C2	1,8	750
C3	1,8	190
C4	1,8	570
C5	1,5	250
C6	1,8	930
C7	1,7	500
C8	2,1	100
C9	2,2	140
C10	1,9	100
C11	2,0	90
C12	1,9	110
C13	2,2	120
C14	1,7	100
C15	2,2	90
C16	2,1	320
C17	2,1	90
C18	4,0	170
C19	2,3	440
C20	2,2	350
C21	1,9	240
C22	1,7	280
C23	1,9	190
C24	2,3	80
C25	2,1	110
C26	1,9	50
C27	1,8	110
C28	1,8	100
C29	2,2	70
C30	3,0	230
C31	1,9	180
C32	1,7	240
C33	1,6	680

C34	1,5	160
C35	1,4	140
C36	1,6	210
C37	1,2	140
C38	1,7	390
C39	1,5	630
C40	Amostra não amplificada por PCR	
C41	Amostra não amplificada por PCR	

b) Indivíduos Normais

Paciente/Amostra	OD 260/OD 280	[] em ng/ μ l
C42	1,5	240
C43	2,0	80
C44	1,8	240
C45	1,8	220
C46	2,2	70
C47	1,7	260
C48	1,9	190
C49	1,9	110
C50	1,9	130
C51	1,8	220
C52	1,9	120
C53	1,7	220
C54	2,0	190
C55	1,9	220
C56	1,8	170
C57	1,9	140
C58	2,0	90
C59	1,8	140
C60	1,6	70
C61	2,0	200
C62	1,9	300
C63	1,9	260
C64	1,9	260
C65	2,0	390
C66	1,9	140
C67	1,8	550

C68	4,7	30
C69	2,1	420
C70	1,3	170
C71	1,6	810
C72	1,4	490
C73	1,6	470
C74	1,6	360
C75	1,4	230
C76	1,5	1030
C77	1,2	140
C78	1,6	1280
C79	1,6	650
C80	1,6	770
C81	Amostra não amplificada por PCR	
C82	Amostra não amplificada por PCR	
C83	Amostra não amplificada por PCR	
C84	Amostra não amplificada por PCR	
C85	Amostra não amplificada por PCR	
C86	Amostra não amplificada por PCR	
C87	Amostra não amplificada por PCR	

DISCUSSÃO

Ausência de polimorfismo no promotor do LEF1

A hipodontia é uma das anomalias mais comuns no desenvolvimento do homem. Hipodontias severas são usualmente encontradas em desordens herdadas e síndromes como a displasia ectodermal e o querubismo (Lyngstadaas *et al.*, 1996). De acordo com Graber (1978), a hipodontia severa é resultado de defeitos em um sistema poligênico que regula o desenvolvimento dos tecidos dentais. No entanto, a hipodontia ocorre também em pessoas que não têm sinais detectáveis de doenças hereditárias. Nestes casos não sindrômicos, normalmente um ou mais dentes estão ausentes, e a hipodontia pode estar ligada a outras anormalidades dentais como a microdontia (Brook, 1984) e o taurodontismo (Stoy, 1960).

Recentes estudos têm mostrado que a odontogênese é um processo complexo que é regulado por vários fatores. Fatores de transcrição, como o *MSX2*, o *Dlx1*, o *Dlx2*, o *Gsc*, e o *Pax9*, foram mostrados expressos durante o desenvolvimento da mandíbula (Shape 1995; Neubuser *et al.*, 1997). Efeitos sinérgicos e antagônicos de moléculas sinalizadores, incluindo os FGFs e BMPs (Neubuser *et al.*, 1997; Peters and Balling, 1999), regulam a expressão destes fatores. Porém, uma molécula que participa da interação epitélio-mesênquima pode ter diferentes papéis, dependendo da localização e interação com outras moléculas.

A complexidade e a dinâmica da formação do dente pode ser exemplificada observando as mudanças nas dentições ocorridas durante o curso da evolução dos vertebrados. Dentes cônicos formam a dentição de vertebrados inferiores, e não há oclusão entre as mandíbulas opostas.

A função é usualmente limitada para a apreensão e perfuração de comida. O estabelecimento da oclusão dental em mamíferos permitiu um melhor processamento da comida e um conseqüente aumento na eficiência da entrada de nutrientes no sistema digestivo. O desenvolvimento da mastigação foi, no entanto, um passo-chave que permitiu aos mamíferos competir com o aumento da demanda de energia necessária para suportar os altos níveis de atividade. O dente é usualmente o fator mais significativo de controle da oclusão, porque o ajuste entre maxila e mandíbula durante a mastigação é principalmente regulado pelos contatos oclusais entre as cúspides, depressões, e fissuras dos dentes opostos das mandíbulas. Embora o mecanismo básico da interação celular epitélio-mesênquima, que guia a diferenciação dos tecidos odontogênicos seja altamente preservado, a passagem de répteis para mamíferos implicou na mudança da dentição. Muitos répteis são homodontes, tendo todos os dentes com forma similar, e são polifodontes, significando que os dentes são continuamente repostos até o final da vida. O aparecimento da heterodontia e difiodontia nos mamíferos foi um processo gradual porque essas características apareceram durante o Permiano e o Triássico (Kemp, 1982).

Durante o curso da evolução dos mamíferos a mudança na forma dos molares mostra a mudança da capacidade do dente de perfurar e cortar, para aquela de esmagar e moer, e há uma tendência a redução do número de dentes (Stock *et al.*, 1997). Neste cenário, a agenesia dental em humanos pode ser entendida como uma tendência evolutiva, e a LEF 1 é uma das moléculas que tem um papel durante a evolução da dentição.

Nossos resultados suportam a hipótese de que a hipodontia ocorre como conseqüência de ambas, mutação de genes envolvidos na organogênese dos

dentos e mudanças epigenéticas, que podem ser influenciadas por fatores ambientais alterando o caminho da expressão e o campo de ação desses genes.

A análise pelo método de SSCP dos produtos de PCR não mostraram nenhum polimorfismo ou mutação na região promotora do gene *LEF 1*. Em um estudo prévio, transversões de bases em genes homeobox, comandando a substituição de aminoácidos, foram identificadas como causas de agenesia de segundo pré-molares e terceiros molares em humanos (Vastardis *et al.*, 1996). Outros resultados indicam que possíveis alterações do gene *LEF 1* em humanos tem efeito altamente seletivo na dentição, e que evidentemente, muitos outros genes estão envolvidos na etiologia da hipodontia em humanos.

Obtenção de DNA

Nossos resultados mostram que células do epitélio bucal são viáveis para pesquisa de DNA através da técnica de PCR. Este procedimento é fácil e simples e pode ser usado em larga escala amostrando uma população. O resultado satisfatório da quantidade e pureza do DNA genômico obtido neste trabalho, pode ser atribuído aos três banhos da mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (modificado de MANIATIS *et al.*, 1989, que indica dois banhos). A variabilidade entre as quantidades de DNA e dos diversos índices de pureza (Tabela 4 pág. 41 a 43), pode ser devido às diferentes taxas de descamação da mucosa, do vigor com que o bochecho foi executado, e até mesmo pela presença de enzimas catalíticas (proteases e nucleases). O índice de pureza do DNA foi estimado pela razão OD^{260}/OD^{280} , e o resultado igual ou maior a 1,8 considera o DNA puro (Maniatis *et al.*, 1989). Se essa relação for inferior, significa que a quantificação acurada do DNA não será possível, devido à contaminação da amostra de DNA com proteínas ou fenol.

Algumas amostras de DNA utilizadas neste trabalho apresentaram índices de pureza inferior a 1,8, no entanto, não foram desprezadas e se prestaram às finalidades de amplificação e análise por SSCP. De qualquer forma, a pureza do DNA genômico indica redução das chances de ocorrerem dificuldades em amplificar uma seqüência por PCR.

Amplificação do segmento do gene LEF 1 por PCR

É possível notar na figura 9, que algumas amostras amplificaram muito pouco (representadas por uma banda tênue como na amostra 5) ou não amplificaram (como na amostra 12), apesar de terem sido submetidas à mesma reação de PCR que foi eficiente para outras amostras. Os experimentos com PCR foram sendo otimizados, chegando-se a observação de que o DNA de alguns indivíduos não amplificava quando a quantidade de DNA genômico utilizado na reação era inferior a 300 ng. Tal fato ocorria independente dos primers utilizados. Determinou-se que a concentração do DNA final de 500 ng era a mais eficiente. Determinou-se também que devido a grande quantidade de bases citosina (C) e guanina (G) do fragmento a ser amplificado, a técnica de PCR com “HOT START” era a mais eficiente. Assim, as condições da PCR foram padronizadas na amplificação do segmento utilizando-se aproximadamente 500 ng e o “HOT START”. Dessa maneira, a reação foi eficiente como pode-se notar na figura 9.

Purificação dos Produtos Amplificados por PCR

A otimização das condições da reação de PCR produziu produtos de

amplificação do fragmento desejado. No entanto, ainda observou-se em gel de poliacrilamida a presença de discretas bandas inespecíficas nas amostras, por mais que se insistisse na otimização. Para a técnica de SSCP, entretanto, os produtos amplificados não foram purificados. Tal procedimento foi tomado ao constatar-se que as bandas inespecíficas, quando presentes, não interferiam na interpretação do polimorfismo.

SSCP

Esta técnica permite a desnaturação da dupla fita de DNA, impedindo a renaturação imediata dessa molécula (DNA associado a uma substância desnaturante e submetido à temperatura de 98° durante 5 minutos – desnaturação - e então submetidos à temperatura de 0°C - desnaturação mantida) para que, quando submetidas a eletroforese, as fitas separadas pudessem ter mobilidades diferentes no gel caso existissem diferenças entre as bases que as compunham. Assim seria possível detectar polimorfismos. No entanto, somente a técnica de seqüenciamento de DNA poderia confirmar a inexistência de polimorfismos (ou mutações), além de identificar qual a base (ou seqüência) que se mostra alterada. Não foi identificado polimorfismo nas amostras através de SSCP (fig. 10).

CONCLUSÕES

1. O DNA extraído a partir de células descamadas da mucosa jugal, além de ser um método simples, indolor e de baixo custo, forneceu material íntegro e de boa qualidade para o emprego de técnicas de Biologia Molecular, como a PCR e a SSCP.
2. A técnica de PCR com o “HOT START” foi o método indicado para a amplificação da região promotora do gene *LEF 1*, pois promoveu a otimização da reação para segmentos ricos em citosina (c) e guanina (g), bases possuidoras de três ligações tipo ponte de hidrogênio, o que dificulta a desnaturação da dupla fita de DNA, e o conseqüente aproveitamento da reação.
3. Não foram identificados polimorfismos ou mutações na região promotora do gene *LEF 1*, através da técnica de SSCP. Assim, a causa genética da hipodontia nos indivíduos abordados não tem relação com a região promotora do gene *LEF 1* investigada, mas pode existir relação com outras regiões deste gene ou com outros genes envolvidos na odontogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTE, S. *et al.* Gene defect in hypodontia: exclusion of *EGF*, *EGFR*, and *FGF-3* as candidate genes. *J Dent Res*, v. 75 (6), p. 1346-52, 1996.

BITGOOD, J.J. AND P. MCMAHON. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* v. 172, p.126-138, 1995.

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.

BROOK, A.H. A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size. *Arch Oral Biol*, v.29, p.373-378, 1984.

CARLSSON, P., M.L. WATERMAN, AND K.A. JONES. The LEF/TCF-1a HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCRA enhancer in T cells. *Genes & Dev.* v.7, p.2418-2430, 1993.

COHN, S. A. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am. J. Anat.*, p.295-320, 1957.

CUA-BENWARD, A. *et al.* The prevalence of congenitally missing teeth in class I, II, III malocclusions. *J Clin Ped Dent*, v.17, p.15-17, 1992.

DAVIDSON, D. The function and evolution of *Msx* genes: pointers and paradoxes. *TIG*, v.11, n.10, p.405-411, 1995.

DUNLEAVEY L. *et al.* Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biol* v.19, p. 175-177, 2000.

ERWIN, W.G., COCKERN, R.W. A pedigree of partial anodontia. *J Hered*, v.40, p.215-218, 1949.

GIESE, K., J. COX, AND R. GROSSCHEDL. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*, v.69, p.185-195, 1992.

GRABER, L. W. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns. *JADA*, v.96, p.266-275, 1978.

GROBSTEIN, C. Mechanisms of organogenetic tissue interaction. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* v.26, p.279-299, 1967.

GURDON, J.B. (1992). The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* v. 68, p.185-199, 1967.

HARDY, M. H. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* v. 8, p.55-61, 1992.

HOGAN, B.L., M. BLESSING, G.E. WINNIER, N. SUZUKI, AND C.M. JONES. Growth factors in development: The role of TGF-B related polypeptide signalling molecules in embryogenesis. *Development (Suppl.)* v. 120, p.53-60, 1994.

HUMPHRIES S. E. *et al.* The 5A/6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the LOCAT gemfibrozil study. *Atherosclerosis* v. 139, p. 49-56, 1998

HUNT, P. *et al.* The branchial *Hox* code and its implications for gene regulation, patterning of the nervous system and head evolution. *Development*, suppl.2, p.63-77, 1991.

JAHODA, C. A. Induction of follicle formation and hair growth by vibrissa dermal papillae implanted into rat ear wounds: Vibrissa-type fibres are specified. *Development* v. 115, p.1103-1109, 1992.

JERNVALL, J., KETTUNEN, P., KARAVANOVA, IL, MARTIN, L. B., AND THESLEFF, I. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: Non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int. J. Dev. Biol* v.38, p.463-469, 1994.

JONES, C.M., K.M. LYONS, AND B.L. HOGAN. Expression of TGF-B-related genes during mouse embryo whisker morphogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* V.642, p. 339-344, 1991.

JONES, C.M., LYONS, K. M., AND HOGAN, B. L. Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* v.111, p.531-542, 1991.

JOWETT, A. K., VANIO, S., FERGUSON, M. W., SHARPE, P. T., AND THESLEFF, I. Epithelial-mesenchymal interactions are required for *msx 1* and *msx 2* gene expression in the developing murine molar tooth. *Development* **117**, 461-470, 1993.

KEMP, T.S. (1982) *Mammal-like reptiles and the origin of mammals*.(NewYork: academic Press).

KOLLAR, E. J. The induction of hair follicles by embryonic dermal papillae. *J. Invest. Dermatol.* v. 55, p.374-378, 1970.

KOLLAR, E. J., AND BAIRD, G. R. The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* v. 21, p.131-148, 1969.

KOLLAR, E. J., AND BAIRD. G. R. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* v. 24, p.159-186, 1970.

KOLLAR, E.J. AND M. MINA. Role of the early epithelium in the patterning of the teeth and Meckel's cartilage. *J. Cranio-facial Genet. Dev. Biol.* v. 11, p.223-228, 1991.

KRATOCHWIL, K. Tissue combination and organ culture studies in the development of the embryonic mammary gland. In *Developmental biology: A comprehensive synthesis* (ed. L.W. Browder and R.B.L. Gwatkin), v. 4, p.315-333, 1986. Plenum Press, New York, NY.

KRATOCHWIL, K., DULL, M., FARINAS, I., GALCERAN, J., AND GROSSCHEDL, R. *Lef1* expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev.* v. 10, p.1382-1394, 1996.

LAZARUS M *et al.*, Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erithematous *J Rheumatol* v.24, p. 2314-2317, 1997.

LE DOUARIN, N.M. *The neural crest.* Cambridge University Press, Cambridge, UK 1982.

LEFKOWITZ, W., BODECKER, C. F., AND MARDFIN, D. F. Odontogenesis of the rat molar. *J. Den. Res.* v. 32, p.749-771, 1953.

LINE, S.R.P. Molecular morphogenetic fields in the development of human dentition. *J Theoret Biol* 2001. (aceito para publicação).

LOVE, J.J., X. LI, D. A. CASE, R. GROSSCHEDL, AND P.E. WRIGHT. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature* v. 376, p. 791-795, 1995.

LUMSDEN, A.G.S. Pattern formation in the molar dentition of the mouse. *J. Biol. Buccale* v. 7, p. 77-103, 1979.

LUMSDEN, A. G. S. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* v. 103, p. 155-169, 1988.

LYNGSTADAAS, S. P. *et al* , On the genetics of hypodontia and microdontia: synergism or allelism of major genes in a family with six affected members. *J Med Genet*, v. 33, p. 137-142, 1996.

LYONS, K.M., C.M. JONES, AND B.L.M. HOGAN. The DVR gene family in embryonic development. *Trends Genet.* v. 7, p. 408-412, 1991.

MAAS, R., BEI, M. The genetic control of early tooth development. *Crit Ver Oral Biol Med*, v.8, n.1, p.04-39, 1997.

MACKENZIE, A. *et al*. The homeobox gene *Hox7.1* has specific regional and temporal expression patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development in vivo and in vitro. *Development*, v.111, p.269-285, 1991a.

MACKENZIE, A. FERGUSON, M.W.J., SHARPE, P.T. *Hox-7* expression during murine craniofacial development. *Development*, v.113, p.601-611, 1991b.

MILATOVICH, A., A. TRAVIS, R. GROSSCHEDL, U. FRANCKE. Gene for lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF-1) mapped to human chromosome 4 (q23-q25) and mouse chromosome 3 near *Egf*. *Genomics* 1991 Dec; 11 v. 4, p.1040-8, 1991.

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

NEUBUSER, A. *et al.* (1997) Antagonistic Interactions between FGF and BMP Signaling Pathways. *Cell*, .90, 247-255.

NODEN, D.M. Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development (Suppl.)*. v. 103, p. 121-140, 1988.

OOSTERWEGEL, M., M. VAN DE WETERING, J. TIMMERMAN, A. KRUIS-BEEK, O. DESTREE, F. MEIJLINK, AND H. CLEVERS. Differential expression of the HMG boxfactors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* v. 118, p. 439-448, 1993.

PANARETTO, B.A. Gene expression of potential morphogens during hair follicle and tooth formation: A review. *Reprod Fertil. Dev.* **5**: 345-360, 1993.

PARR, B.A. AND ^aP. MCMAHON. wnt genes and vertebrate development. *curr. opin. genet. dev.* 4: 523-528, 1994.

PETERS, H. AND BALLING, R. Teeth – where and how to make them. *Trends Genet.* v. 15, p. 59-65, 1999.

SAKAKURA, T. Mammary embryogenesis. In “The Mammary Gland: Development, Regulation and Function”(M. N. and A. C. W. Daniel, Eds.), p. 37-66, 1987. Plenum Press, New York.

SATOKATA, I., MAAS, R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*, v.6, p.348-356, 1994.

SAXÉN, L. Directive versus permissive induction: A working hypothesis. In cell and tissue interactions (ed. J.W. Lash and M.M. Burger), p. 1-9, 1977. Raven Press, New York, NY.

SAXÉN, L., M. KARKINEN-JÄÄSKELÄINEN, E. LEHTONEN, S. NORDLING, AND J. WARTIOVAARA. Inductive tissue interactions. In the cell surface in animal embryogenesis and development (ed. G. Poste and G. L. nicholson), p. 331-407, 1976.

North Holland, Amsterdam, the Netherlands.

SCHALK VAN DER WEIDE, Y. *et al.* Symptomatology of patients with oligodontia. *J Oral Rehab*, v.21, p.247-261, 1994.

SENGEL, P. Morphogenesis of the skin. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1976.

SHAFER, W.G., HINE, M.K., LEVY, B.M. Tratado de patologia bucal. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.41-42, 1958.

SHARPE, P.T. Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res*, v.32, p.17-25, 1995.

SLAVKIN, H. C. Embryonic tooth formation: A tool for development biology. In oral sciences reviews (ed. A. H. Melcher and G. A. Zarb), p. 1-136, 1974. Munksgaard, Copenhagen, Denmark.

STEWART, R.E., POOLE, A.E. The orofacial structures and their associations with congenital abnormalities. *Ped Clin North Am*, v.29, p.547-585, 1982.

STOCK, D.W., WEISS, K.M., ZHAO-ZHIYONG, Z. Patterning of the mammalian dentition in development and evolution. *BioAssays*, v.19, p.481-490, 1997.

STOCKTON, D.W., PARIMAL, D., GOLDENBERG, M., D'SOUZA, R.N., PATEL, P.I. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nature Genet*. V. 24, p. 18-19, 2000.

STOY, P.J. Taurodontism associated with other dental abnormalities. *Dent Pract Dent Rec*, v.10, p.202-205, 1960.

STRACHAN, T., READ, A.P. *PAX* genes. *Curr Opin Genet Dev*, v.4, p.427-438, 1994.

THESLEFF, I. Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis. *Acta Odontol Scand*, v.53, p.129-134, 1995.

THESLEFF, I. Two genes for missing teeth. *Nature Genetics*, v.13, p.379-380, 1996

THESLEFF, I. AND HURMERINTA. Tissue interaction in tooth development. *Differentiation* v.18, 75-88, 1981.

THESLEFF, I., J. JERNVALL,. Reiterative signaling and patterning during Mammalian tooth morphogenesis, 2000.

TRAVIS, A., A. AMSTERDAM, C. BELANGER, AND R. GROSSCHEDL. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor a enhancer function. *Genes & Dev*. v. 5, p. 880-894, 1991.

VAAHTOKARI, A., ABERG, T., JERNVALL, J., KERANEN, S., AND THESLEFF, I. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech. Dev.* v.54, p.39-43, 1996.

VAINIO, S., M. JALKANEN, AND I. THESLEFF. Syndecan and tenascin expression is induced by epithelial-mesenchymal interactions in embryonic tooth mesenchyme. *J. Cell Biol.* **108**: 1945-1954, 1989.

VAINIO, S., I. KARAVANOVA, A. JOWETT, AND I. THESLEFF. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cll* **75**: 45-58, 1993.

VANGENDEREN, C., R.M. OKAMURA, I. FARIÑAS, R-G. QUO, T.G. PARSLOW, L. BRUHN, AND R. GROSSCHEDL. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & Dev.* v.8, p.2691-2703, 1994.

VASTARDIS, H. *et al.* A human *MSX1* homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nature Genetics*, v.13, p.417-421, 1996.

WATERMAN, M.L., W.H. FISCHER, AND K.A. JONES. A thymus specific member of the HMG protein family regulates the human T-cell receptor Ca enhancer. *Genes & Dev.* v. 5, p. 656-669, 1991.

WEISS, K. *et al* Perspectives on genetic aspects of dental patterning. *Eur J Oral Sci*, v.106, suppl.1, p.55-63, 1998.

WEISS, K., STOCK, D. AND ZHAO, Z.,. Dynamic interactions and the evolutionary genetics of dental patterning. *Crit. Ver. Oral Biol. Med.* v. 9, p.369-398, 1998.

ZHOU, P., C. BYRNE, J. JACOBS, AND E. FUCHS. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes & Dev.* v. 9 p. 700-713, 1995.