

RAQUEL MANTUANELI SCAREL

**Análise de Polimorfismo no gene *MSX1* em
Indivíduos com Agenesia Dental**

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

Piracicaba 2000



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

1500/117

RAQUEL MANTUANELI SCAREL



1150041621



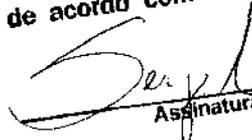
FOP

T/UNICAMP Sca72a

Análise de Polimorfismo no gene *MSX1* em Indivíduos com Agenesia Dental

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

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 28/04/2000


Assinatura do Orientador

Orientador

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

Piracicaba 2000

L. 1473

DATA: FOP
CHAMADA:
UNICAMP
Sca 72a
BR/ 41621
278/00
R\$ 11,00
14-07-00
CPD
Id: 0397661

CM-00142752-9

Ficha Catalográfica

Sca72a Scarel, Raquel Mantuaneli.
Análise de polimorfismo no gene *MSX1* em indivíduos com agenesia dental. / Raquel Mantuaneli Scarel. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
85p. : il.

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

1. Genes. 2. Dentes. 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 22 de Fevereiro de 2000, considerou a candidata RAQUEL MANTUANÉLI SCAREL aprovada.

1. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

2. Profa. Dra. CHRISTINE HACKEL

3. Prof. Dr. LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

DEDICATÓRIA

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

À minha querida mãe, Verônica, 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, pelos seus bons conselhos e exemplos, que fizeram de mim o que eu sou hoje.

Ao meu esposo, Celio, dedico com todo o meu amor, este trabalho que ele acompanhou com paciência todos os dias, apoiando-me, incentivando-me e auxiliando-me em tudo que lhe era possível.

SALMO 137 (de Davi) – Reconhecimento a Deus Compassivo

Eu vos louvarei de todo coração, Senhor, porque ouvistes as minhas palavras.

Ante vosso santo templo prostar-me-ei, e louvarei vosso nome, pela vossa bondade e fidelidade,

Porque acima de todas as coisas, exaltastes o vosso nome e a vossa promessa.

Quando vos invoquei, vós me respondestes; fizestes crescer a força de minha alma.

Hão de vos louvar, Senhor, todos os reis da Terra, ao ouvirem as palavras de vossa boca.

E celebrarão os desígnios do Senhor: “Verdadeiramente, grande é a glória do Senhor.”

Sim, excelso é o Senhor, mas olha os pequeninos, enquanto seu olhar perscruta os soberbos.

Em meio à adversidade vós me conservais a vida, estendeis a mão contra a cólera de meus inimigos; salva-me a vossa mão.

O Senhor completará o que em meu auxílio começou. Senhor, eterna é a vossa bondade: não abandoneis a obra de vossas mãos.

AGRADECIMENTOS

Em Especial:

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, meu orientador, por ser sempre solícito e compreensivo. Obrigada pela maneira humilde e respeitosa com que me corrigiu quando necessário, pelos estímulos e bons exemplos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, pela utilização de suas instalações desde a minha graduação e por ter me proporcionado tantos conhecimentos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) – UNICAMP, pela acolhida e oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa que me foi concedida e pelo auxílio financeiro que permitiram a boa execução desta pesquisa e apresentação dos resultados em Congressos (Proj. 97/13755-5).

Ao Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Diretor da FOP – UNICAMP pela sua cordialidade e ótima administração.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da FOP – UNICAMP, pela sua competência e a confiança que inspira aos pós-graduandos.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Hoppe Fortingüerra, Chefe do Departamento de Morfologia da FOP – UNICAMP, pela amabilidade e profissionalismo.

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

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

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

Aos alunos e professores do Departamento de Microbiologia pela cooperação que demonstraram.

Às funcionárias do Departamento de Morfologia, que se mostraram tão prestativas e alegres no dia-a-dia.

À minha colega Paula Cristina Trevilatto, que se tornou uma grande amiga, pois me ensinou as primeiras técnicas e acompanhou-me de forma particular em todo o trabalho, incentivando-me e amparando-me sempre. Muito obrigada!

Às companheiras do Laboratório de Biologia Molecular, Raquel Gerlach, Ana Paula e Cristina, pela cooperação diária e oportunidade de aprender bastante com cada uma.

À minha amiga, desde o dia da prova de admissão ao Mestrado, Silvana Pasetto, por todo companheirismo, paciência e compreensão que demonstrou em todos os momentos.

Aos demais colegas do Curso de Biologia e Patologia Bucodental, muito obrigada pela boa convivência diária, e em especial à Mitsue, quem admiro desde o início.

Ao Marquinho do CRA e ao amigo Edirlei Pizzol, pelo freqüente auxílio prestado, melhorando meus conhecimentos de informática.

À Érica, da Secretaria de Pós-Graduação, pela solicitude e simpatia.

À Rosa Scalco, da Triagem pela efetiva colaboração com este trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca, pelo bom atendimento a qualquer hora.

Aos indivíduos que contribuíram com a execução de bochechos na cessão de material de estudo.

Ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ – USP, em especial ao Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo, que tão gentilmente ofereceu-me a possibilidade de utilizar os avançados equipamentos presentes no Laboratório de Genética Molecular, que tanto enriqueceram este trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Genética Molecular (ESALQ – USP), por toda colaboração, e à Daniela Truffi, pelo seu importantíssimo auxílio no seqüenciamento das amostras.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai e à pós-doutoranda. Marília Caixeta Franco da Seção de Biologia Celular e Molecular do CENA – USP, por compartilharem o valioso protocolo de seqüenciamento, eficiente para seqüências ricas em bases Citosina e Guanina.

À Profa. Dra. Christine Hackel do Departamento de Genética Médica do CBMEG – UNICAMP, pelas gentis orientações, interesse e incentivo. Obrigada pela humanidade que sempre demonstrou, a qual abrilhanta ainda mais sua admirável competência.

Ao Prof. Dr. Luis L. Coutinho do Departamento de Produção Animal da ESALQ – USP, pelas gentis orientações e disponibilização do Laboratório de Biotecnologia Animal para execução de parte deste trabalho.

À doutoranda Lúcia Elvira Alvarez, do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ – USP, que me deu a grata satisfação de acompanhá-la e aprender muito sobre Biologia Molecular. Admiro seu exemplo de competência, profissionalismo e altruísmo.

Aos pós-doutorandos Humberto Madeira e Cláudia Vitorello, bem como a todos os alunos e funcionários do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ – USP, pela ótima acolhida, por toda paciência e colaboração neste trabalho. Obrigada pelo muito que aprendi com cada um.

À mestranda Elaine Souza e ao pós-doutorando Eduardo Delgado do Departamento de Produção Animal da ESALQ – USP, pela forma simpática e solícita com que me auxiliaram em uma das dificuldades experimentais deste trabalho.

Ao meu pai, José Félix Scarel, obrigada por amparar minha existência.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTAS

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

Lista de tabelas.....3

Lista de figuras.....4

RESUMO.....5

ABSTRACT.....6

INTRODUÇÃO.....7

REVISÃO DA LITERATURA

Agenesia Dental.....11

O Gene *MSX1*, sua Proteína e Função.....14

Expressão das Proteínas Homeóticas.....15

Genes Homeóticos e sua Correlação com Agenesia Dental.....18

Outros Genes Envolvidos na Odontogênese.....21

Aspectos Filogenéticos dos Genes Homeóticos e Evolutivos da

Dentição.....26

PROPOSIÇÃO.....	31
-----------------	----

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística.....	33
Obtenção do DNA.....	33
Extração do DNA.....	34
Amplificação dos Segmentos do Gene <i>MSX1</i> por PCR.....	35
Eletroforese das Amostras.....	37
Purificação dos Produtos Amplificados por PCR.....	38
Técnicas para Análise de Polimorfismo.....	39

RESULTADOS

Obtenção do DNA.....	43
Amplificação dos Segmentos do Gene <i>MSX1</i> por PCR.....	43
Heteroduplex.....	44
Seqüenciamento Automático.....	45

DISCUSSÃO

Obtenção do DNA.....	61
----------------------	----

Amplificação dos Segmentos do Gene <i>MSX1</i> por PCR.....	62
Purificação dos Produtos Amplificados por PCR.....	63
Heteroduplex.....	66
Seqüenciamento Automático.....	66
CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	83

LISTAS

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

aa: aminoácido

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

C: citosina

CpG: dinucleotídeo citosina, guanina

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

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: deoxinucleotídeo

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

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

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

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

G: guanina

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

Hox: antiga denominação do grupo de genes homeóticos *Msx*

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

MSX: grupo de genes homeóticos humanos (“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

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

SDS: dodecil sulfato de sódio

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

TE: Tris/EDTA

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

U: unidade(s)

4p16.1: localização do gene *MSX1* humano no braço curto do cromossomo 4.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Síndromes que apresentam ausência congênita de dentes (pág. 47).

Tabela 2: Genes relacionados ao *msh* em diferentes espécies (pág. 49).

Tabela 3: Manifestação clínica da Hipodontia (pág. 51).

Tabelas 4 e 5: Leitura em espectrofotômetro do grau de pureza e da quantidade do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa jugal (pág. 53).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do gene *MSX1* e os *primers* que amplificam cada segmento (pág. 36).

Figura 2. Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata para visualização dos produtos de amplificação do 1º segmento do exon 2 do gene *MSX1*, obtidos pelos *primers* MSX 15/17. **A)** Indivíduos com agenesia dental. **B)** Indivíduos normais (pág. 55).

Figura 3. Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata para visualização dos produtos de amplificação do 2º segmento do exon 2 do gene *MSX1*, obtidos pelos *primers* MSX 16/18. **A)** Indivíduos com agenesia dental. **B)** Indivíduos normais (pág. 57).

Figura 4. Eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5% corados pela prata ilustrando a não formação de bandas características de Heteroduplex. **A)** Amostras de indivíduos com agenesia dental e normais, amplificadas pelos *primers* MSX 15/17. **B)** Amostras de indivíduos com agenesia dental e normais, amplificadas pelos *primers* MSX 16/18 (pág. 59).

RESUMO

ABSTRACT

RESUMO

A agenesia dental ou hipodontia é a ausência congênita de um a seis dentes permanentes e/ou decíduos. Esta é uma das mais freqüentes alterações da dentição humana, que embora não represente um problema de saúde pública, pode causar disfunções mastigatória e da fala, além de problemas estéticos. Uma mutação única na região homeobox do gene *MSX1*, foi associada à hipodontia de segundos pré-molares e terceiros molares em humanos. Contudo, outro estudo excluiu esse gene como responsável pela agenesia de dentes incisivos e pré-molares. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de mutações/polimorfismos no segundo exon do gene *MSX1* (que contém a região homeobox) e correlacioná-las com a agenesia dental. Através do DNA obtido de células epiteliais (em processo de descamação) da mucosa bucal de 20 indivíduos com diferentes padrões de hipodontia, o segundo exon do gene *MSX1* foi amplificado pela técnica de PCR. Os produtos de PCR purificados foram submetidos à técnica de seqüenciamento automático e não revelaram alterações na região do gene estudado. Esse resultado indica que a inativação do gene *MSX1* em humanos deve ter um efeito altamente seletivo na dentição, e outros genes devem estar envolvidos na etiologia da hipodontia.

ABSTRACT

Tooth agenesis or hypodontia is the congenital absence of one or a few deciduous and/or permanent teeth. This is one of the most frequent alterations of the human dentition, that although does not represent a public health problem, may cause both speech and masticatory dysfunction as well as esthetic problems. A missense mutation in the homeobox region of the *MSX1* gene was associated with hypodontia of second premolars and third molars in humans. However, another study excluded this gene as causative loci for hypodontia of incisors and premolars. The aim of this work was to investigate the presence of polymorphisms/mutations in the second exon of the *MSX1* gene (that contains the homeobox) and to establish a relationship with tooth agenesis. Through the DNA obtained from epithelial cells of the buccal mucosa of 20 individuals with different patterns of hypodontia, the second exon of *MSX1* gene was amplified by PCR technique. The purified PCR products were submitted to automatic sequencing and did not reveal any alterations in that region of the gene studied. This results indicate that inactivation of *MSX1* gene in humans must have a highly selective effect on dentition, and other genes must be involved in the etiology of hypodontia in humans.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos foram caracterizados vários genes responsáveis pelo desenvolvimento e estrutura do dente. A maior parte destes genes foi descoberta devido a sua implicação em doenças hereditárias, onde alterações no número ou na estrutura dental ocorrem como característica principal ou secundária.

A agenesia dental ou hipodontia é a ausência congênita de um a seis dentes permanentes e/ou decíduos. 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.

A hipodontia 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).

Estudo envolvendo 28 membros de uma família com um padrão agenesia dental semelhante, transmitida como caráter autossômico dominante, mostrou que uma mutação no gene *MSX1* era responsável pela ausência dos segundos pré-molares e terceiros molares da mandíbula e maxila (VASTARDIS *et al.*, 1996).

O gene *MSX1* está localizado no braço curto do cromossomo quatro e é composto por dois exons, que determinam a seqüência de aminoácidos da proteína. No segundo exon, composto por 441 pares de base (pb), há uma seqüência de 183 pb denominada Homeobox, que codifica uma região da proteína que interage com o DNA. Devido à essa peculiaridade da proteína sintetizada a partir do gene *MSX1*, ela é dita homeótica e atua como fator de transcrição (HEWITT *et al.*, 1991).

O gene *MSX1* pertence à uma família de genes homeóticos, os quais codificam diferentes fatores de transcrição. Estes são expressos principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, modulando a transcrição de outros genes (MAAS & BEI, 1997). As proteínas codificadas pelos genes homeóticos são evolutivamente conservadas, estando presentes desde o filo dos celenterados até os mamíferos, inclusive o gênero *Homo*, ao qual pertence a espécie humana (DAVIDSON, 1995).

A proteína *MSX1*, composta por 297 aminoácidos, é intensamente sintetizada pelas células mesenquimais que circundam o botão dental, onde desempenha um papel importante na indução das células epiteliais do órgão dental. A ausência da expressão desta proteína faz com que a odontogênese seja interrompida na fase de botão (SATOKATA & MAAS, 1994).

REVISÃO DA LITERATURA

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)

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 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 europeias 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). Os terceiros molares mostram-se ausentes em aproximadamente 20% da população, demonstrando uma tendência evolutiva, que será discutida adiante.

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 à 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 à 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; que apresenta nos indivíduos afetados rareamento de cabelos (hipotricose), inabilidade de transpirar devido à falta ou menor quantidade de glândulas sudoríparas (anidrose ou hipoidrose), entre outras. Com relação à dentição, esta síndrome apresenta número variável de dentes ausentes, indo da hipodontia até completa anodontia, 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 (KURISU & TABATA, 1997; THESLEFF, 1996).

Algumas das síndromes em que a agenesia dental é uma característica importante estão relacionadas na Tabela 1 – pág. 50 (SHALK-VAN DER WEIDE *et al.*, 1994), embora não exista interesse no presente estudo em aprofundar esse tópico.

O Gene *MSXI*, sua Proteína e Função

O gene humano *MSXI* está localizado no braço curto do cromossomo 4, mais precisamente na região 16.1 (4p16.1) e é composto por dois exons (regiões do gene que codificam proteína). O intron é composto aproximadamente por 1.600 pb localizado entre os dois exons, e não codifica proteína. O exon 1 contém 451 pb sendo rico em bases Citosina (C) e Guanina (G), cerca de 75% dos nucleotídeos. Neste exon é frequente o dinucleotídeo CpG que está sub-representado no genoma humano, e dificulta sobremaneira algumas técnicas de biologia molecular. O segundo exon com 441 pb, também rico em bases C e G, contém uma região chamada “Homeobox”, importante para a codificação da proteína funcional. Genes que possuem uma seqüência homeobox determinam proteínas ditas homeóticas. O intron está posicionado a 40 pb acima do Homeobox, numa posição comparável à encontrada em outros genes que codificam proteínas homeóticas (HEWITT *et al.*, 1991).

A estrutura tridimensional das proteínas homeóticas é hélice-giro-hélice e atuam como fatores de transcrição. A proteína codificada a partir do gene *MSXI* contém 297 aminoácidos (aa.), sendo os primeiros 151 aa. determinados pelo exon 1. Devido ao rico conteúdo de bases C e G a proteína codificada pelo gene *MSXI* apresenta abundância dos aa Alanina

(13%), Prolina (11%) e Glicina (11%), sendo os dois primeiros hidrofóbicos. Sua estrutura tridimensional possui três estruturas em forma de hélice. Depois do processo de maturação da proteína homeótica acontecer normalmente no citoplasma, esta dirige-se para o núcleo penetrando através dos poros nucleares. Assim, sua função de fator de transcrição ocorre pela integração da proteína homeótica ao DNA regulando a transcrição de outros genes. A porção da proteína *MSX1* que contacta o DNA (no sulco maior) é a terceira hélice, disposta perpendicularmente às duas primeiras. O braço amino-terminal da proteína contacta o DNA em seu sulco menor. Vale acrescentar que a região Homeobox do gene *MSX1* é responsável pela codificação da porção proteica que representa o domínio de ligação da proteína homeótica ao DNA (VASTARDIS *et al.*, 1996).

As proteínas homeóticas desempenham função na regulação gênica, como fatores de transcrição, sendo expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

Expressão das Proteínas Homeóticas

O gene *MSX1* pertence a um grupo de genes altamente conservados dentro da escala evolutiva, incluída em uma grande família

chamada de genes homeóticos (genes *Hox*). Em humanos existem os genes *MSX1* e *MSX2* que não localizam-se no mesmo cromossomo (DAVIDSON, 1995), e estão estreitamente envolvidos na odontogênese (MAAS & BEI, 1997).

A grafia dos genes homeóticos varia conforme o organismo, de acordo com uma norma estabelecida na última década de 90. Em camundongos existem três membros da família de genes *Msx* (análoga àquela presente em humanos). As informações a respeito das funções das proteínas *Msx1* e *Msx2* foram obtidas a partir de estudos realizados em embriões de ratos, pois esses genes são expressos durante a embriogênese e organogênese (DAVIDSON, 1995). Eles são primeiramente expressos na mesoderme da linha primitiva e então na região dorsal do tubo neural, coincidente com o modelamento e emigração da crista neural e em regiões pré-cardíacas. Durante a gestação, os genes *Msx1* e *Msx2* expressam-se em quase todos os sítios onde há interação epitélío-mesênquima (MAAS & BEI, 1997), incluindo o desenvolvimento de germes de dentes incisivos e molares (MACKENZIE *et al.*, 1991 a, b, 1992).

O gene *Msx1* é expresso amplamente e em altos níveis no mesênquima do processo mandibular e maxilar desde o estágio de

iniciação, num gradiente distal-a-proximal, principalmente na região em contato com o botão dental (epitélio invaginado) até o estágio de capuz, sendo menos expresso no estágio de sino. O gene *Msx2* tem expressão no mesênquima no estágio de iniciação, passando para a ectoderme na placa dental e depois para a porção epitelial do botão dental. No estágio de capuz, existem dois domínios para o gene *Msx2*, sendo um no mesênquima abrangendo a região em torno do folículo dental, e o outro domínio (que guarda maior expressão) no epitélio restrito ao órgão do esmalte. É importante reconhecer que ambos os genes *Msx1* e *Msx2* têm modelos de expressão altamente dinâmicos e distintos em tempo e espaço, de acordo com o estágio de desenvolvimento do germe dental (MAAS & BEI, 1997).

Os padrões de expressão de muitos genes homeóticos têm sugerido sua atuação no desenvolvimento de muitos órgãos, mas a confirmação disso para alguns desses genes surgiu nos últimos anos com o advento das técnicas de manipulação genética (animais transgênicos) e de análise de mutações.

Experimentos realizados em 1994 com ratos transgênicos em que o gene *Msx1* 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 *Msx1* e *Msx2* e sua co-expressão em muitos sítios. Comprova-se esse dado por um outro experimento com ratos transgênicos em que os genes *Msx1* e *Msx2* eram não-funcionais; os animais apresentaram, além de anodontia, sérios defeitos no desenvolvimento de muitos órgãos. Conclui-se a importância indubitável da proteína *Msx1* na odontogênese, e compreende-se o fato de ratos transgênicos para o *Msx1* não terem sido compensados pelo gene *Msx2*, já que este expressa-se principalmente nos estádios da odontogênese mais avançados ao de botão. Tal padrão de expressão foi comprovado em ratos transgênicos para o gene *Msx2*, 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).

Genes Homeóticos e sua Correlação com Agenesia Dental.

A identificação do gene homeótico *Hox-7.1* no cromossomo 5 de ratos (HILL *et al.*, 1989) e a observação de sua expressão na

embriogênese craniofacial, especialmente na odontogênese, propiciou um interesse mais particular sobre esse gene (MACKENZIE *et al.*, 1991a). A seguir foi seqüenciado o gene humano homólogo ao Hox-7 e sua localização foi identificada no braço curto do cromossomo 4 (HEWITT *et al.*, 1991). Cabe esclarecer que a abreviação *Hox* vem de Homeobox, ou seja, os genes assim denominados possuem uma região homeobox dentro do gene. Devido à descoberta de vários genes homeóticos houve a necessidade de identificarem-se esses genes de acordo com as suas funções em grupos e sua posição dentro do grupo. Assim, o gene anteriormente identificado como *Hox-7* (rato) ou *HOX-7* (humano) passou a denominar-se *Msx1* e *MSX1*, respectivamente (SCOTT, 1992). A partir de 1993 já podem ser encontrados trabalhos na literatura científica com a nova denominação (JOWETT *et al.*, 1993).

Em 1990, Alasdair Ivans e colaboradores investigaram o genoma de indivíduos portadores da Síndrome Wolf-Hirschhorn (SWH) através de técnicas citogenéticas, e concluíram que o locus *HOX-7* estava deletado em alguns indivíduos com SWH. Essa síndrome caracteriza-se por um atraso no crescimento e anomalias congênitas na região labial e no palato. Assim, foi comprovada a importância do gene *HOX-7* no desenvolvimento craniofacial em humanos. Embora a deleção do gene

HOX-7 não ocorresse em todos os indivíduos com SWH, os autores discutiram que uma mutação pontual no gene, ou em outro membro do mesmo grupo, poderia levar à uma inativação dele e portanto à uma alteração fenotípica característica da SWH.

A investigação genética da hipodontia foi realizada pela primeira vez em 1995 através da técnica de análise de ligação por meio de microssatélites (região de intron). Os genes investigados foram o *MSX1* e *MSX2* em uma amostra composta por 5 famílias finlandesas, abrangendo 20 indivíduos com agenesia de dentes incisivos e pré-molares. Os resultados, no entanto, excluíram esses genes como causadores da agenesia (NIEMINEN *et al.*, 1995). Os autores discutiram que esse resultado poderia ser diferente se fosse utilizada uma outra técnica que se detivesse à análise da seqüência codificadora dos genes, ou seja os exons.

Tal hipótese foi confirmada no ano seguinte, quando a presença de polimorfismo nos exons do gene *MSX1* foi investigada em 28 membros de uma família que apresentavam padrão semelhante de agenesia dental. Este envolvia todos os segundos pré-molares e terceiros molares, além de agenesia de outros dentes em alguns indivíduos. A amostra era composta por homens e mulheres de várias idades com dentição decídua normal, entretanto, o traço da agenesia nos dentes

permanentes era transmitida como um caráter autossômico dominante. Através de seqüenciamento do gene *MSXI* e RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*), foi detectado em todos os indivíduos, no exon 2, uma mutação da base Guanina (G) na posição 2125 (de acordo com HEWITT *et al.*, 1991) para uma base Citosina (C). Assim, ocorria uma transversão de G→C que provocou uma substituição do aa. Arginina número 31 para Prolina (Arg31Pro) dentro da região homeobox do gene. Essa mutação de ponto foi colocada pelos autores como a causa determinante da hipodontia na família estudada, pois afeta a interação da proteína homeótica *MSXI* com outras proteínas e o DNA. Desta forma, a regulação gênica é prejudicada, produzindo o fenótipo de agenesia dental via um mecanismo negativo dominante (VASTARDIS *et al.*, 1996).

Outros Genes Envolvidos na Odontogênese

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)*, *Gooseoid (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. Nos humanos existem os genes *MSX1* e *MSX2*, que também localizam-se em cromossomos diferentes. O domínio mais primitivo dos genes *Msx* está no tubo neural em sua porção dorsal, que talvez exclua a crista neural, refletindo a função do gene ancestral. No genoma de ratos, o gene *Msx3* tem expressão restrita inteiramente àquele domínio, o que o torna o gene mais próximo do gene ancestral (WANG *et al.*, 1996). Essa idéia leva a questionar como as funções dos genes *Msx* surgiram nos vertebrados. Uma explicação possível é que, seguinte à duplicação do gene ancestral, mudanças nas seqüências regulatórias expandiram os domínios de expressão para a região lateral da placa neural, abrangendo a crista neural. Assim teriam surgido os outros

membros do grupo *Msx*, desempenhando novas funções como o desenvolvimento de ossos e dentes (DAVIDSON, 1995).

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 *Dlx3* e *Dlx7* 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 *Msx1* e *Msx2*. Em particular os genes *Dlx1* e *Dlx2* são expressos respectivamente no mesênquima dental e epitélio dental nos estádios iniciais da odontogênese de ratos (até o estágio de capuz), coincidindo em grande parte com a expressão dos genes *Msx1* e *Msx2*. Além disso, *Dlx1* e *Dlx2* 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 *Dlx1* e *Dlx2* estão deletados, ocorre o desenvolvimento dos dentes molares mandibulares somente. Procura-se explicar esse fato pela presença no arco mandibular

dos genes *Dlx5* e *Dlx6*, 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*, 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 *Pax1* e *Pax9*. Por meio de hibridização *in situ* em embriões de ratos, foi observada a expressão da proteína *Pax1* nos estádios iniciais da odontogênese de molares (até a fase de botão). Recentemente, *Pax9* teve sua forte expressão no mesênquima dental notada no estágio de capuz. Além disso, em experimentos com ratos em que o gene *Pax9* 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 *Msx1* (MAAS & BEI, 1997; STRACHAN & READ, 1994).

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 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 cartilagem. 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 presentes no mesênquima dental, incluindo o *Msx1*. Portanto, a atividade da BMP-4 é um importante sinal indutivo nas fases iniciais da odontogênese, estimulando o mesênquima a prosseguir o processo. (THESLEFF, 1995). A proteína BMP-2 guarda uma homologia de 95% com a BMP-4 mas que é expressa

somente no epitélio dental. A expressão da BMP-2 indica forte correlação com o gene *Msx2*, de maneira que pode haver uma regulação recíproca entre eles (MAAS & BEI, 1997).

A outra família de fatores de crescimento citada, a FGF, também atua na odontogênese. A FGF-4 é expressa especificamente no órgão do esmalte e acredita-se que ela induza a proliferação de células do epitélio dental auxiliando a formação das cúspides (estudos realizados em dentes molares). Além disso, a FGF-4 induz a expressão do proteoglicano sindecan-1, um componente da matriz extracelular, no mesênquima dental, o qual estimula também a proliferação celular.

Portanto, moléculas de sinalização como 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 adicional nível 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.

Aspectos Filogenéticos dos Genes Homeóticos e Evolutivos da Dentição.

O processo básico do desenvolvimento da dentição parece ser tão antigo quanto o desenvolvimento dos vertebrados em si. A evolução, contudo, tem imposto subseqüentemente vários níveis hierárquicos de moléculas envolvidas nesse processo.

Os genes homeóticos foram identificados inicialmente em *Drosophila melanogaster* como sendo responsáveis pela diferenciação dos segmentos do corpo das larvas e pelo seu modelamento no eixo ântero-posterior (McGINNIS *et al.*, 1984; SCOTT & WEINER, 1984). Mutações nos genes homeóticos, afetam a identidade do segmento do corpo da larva de forma que um segmento pode ser transformado em outro, como o desenvolvimento de patas em lugar de antenas, ou a formação de dois pares de asas em lugar de um par normal (SUZUKI *et al.*, 1992).

A descoberta de genes homeóticos em vertebrados, como ratos e até mesmo humanos, provocou grande sensação entre os pesquisadores da Biologia do Desenvolvimento. Com o aprimoramento das técnicas de Biologia Molecular, foi possível identificar vários genes homeóticos e determinar a localização deles no genoma de filos diferentes.

As seqüências Homeobox apresentam-se conservadas no genoma de organismos pertencentes a diferentes filos, que vão desde celenterados até cordados (Tabela 2) – pág. 51. Por exemplo, em *Drosophila* (artrópode) há o gene *msh* que é homólogo ao *Msx* dos cordados. A homologia entre proteínas homeóticas é maior quanto mais próximos forem os organismos filogeneticamente. Na Tabela 2 deve-se observar também que os invertebrados possuem somente um gene *msh*, e os vertebrados possuem dois ou mais genes relacionados ao *msh*, os genes *Msx*. Sabe-se que organismos mais complexos advêm de um genoma maior, com genes que desempenham funções mais específicas. Durante a evolução dos cordados, eventos de amplificação do gene primitivo *msh* têm provavelmente ocorrido, pois ascídias (protocordados) têm somente um gene *msh*, enquanto a maioria dos cordados têm dois ou três genes homólogos a ele (HOLLAND, 1991; AKIMENKO *et al.*, 1995).

A complexidade e a dinâmica da odontogênese pode ser exemplificada pelas mudanças no padrão dental que têm ocorrido ao longo da evolução dos vertebrados. A maioria dos vertebrados inferiores (peixes, anfíbios e répteis) não apresenta oclusão entre as arcadas dentais, além disso são homodontes, ou seja, todos os dentes têm padrão cônico semelhante. Desta forma, sua função é limitada à preensão e dilaceração

dos alimentos em grandes fragmentos. Embora os mecanismos básicos de interação epitélio-mesênquima, que levam à diferenciação dos tecidos odontogênicos, sejam altamente preservados, a passagem dos répteis aos mamíferos implicou em modificações no padrão dental. Estas mudanças resultaram na redução do número de dentições (polifiodontia→difiodontia), na localização restrita dos dentes às margens das arcadas dentais e nas formas dentais de incisivos, caninos e molares (heterodontia). O surgimento da heterodontia e difiodontia foi um processo gradual que começou a se desenvolver em répteis semelhantes a mamíferos (Cinodontes), durante o Permiano e o Triássico (KEMP, 1982). Nos mamíferos foi estabelecida a oclusão dental, permitindo melhor processamento do alimento com conseqüente aumento da eficiência nutricional. O desenvolvimento da mastigação foi, portanto, um passo-chave que possibilitou aos mamíferos arcar com a alta demanda de energia necessária para suportar seus altos níveis de atividade. O dente é o fator mais significativo que controla a oclusão, uma vez que o ajuste entre maxila e mandíbula durante a mastigação é principalmente regulado pelo contato oclusal entre cúspides e fissuras dos dentes nas respectivas arcadas dentais (STOCK *et al.*, 1997).

Com relação à agenesia de terceiros molares em humanos, esta é uma tendência natural da espécie (*Homo sapiens sapiens*). Os homínídeos mais adaptados, sobreviventes a intempéries, como glaciações e outras adversidades ambientais, tiveram seus genes transmitidos às gerações futuras. Estes genes passaram por eventos de mutação e recombinação genética, que podem explicar as diferenças morfológicas dos ossos do crânio e da face dos homínídeos em relação ao homem moderno, como arcadas dentais encurtadas, e diminuição da protusão. Além disso, mecanismos epigenéticos, como interações gene-ambiente, podem ter contribuído para a redução do complexo mastigatório. A ausência congênita dos terceiros molares, ou seus tamanhos reduzidos quando presentes, revelam uma estratégia natural a fim de ajustá-los à mandíbula e maxila mais curtas. Em concordância com a redução do complexo mastigatório, dentes menores e morfológicamente mais simples, como número de cúspides reduzidas, têm sido selecionados (MACHO & MOGGI-CECCHI, 1992).

Portanto, o ser humano vem evoluindo como espécie, e possui seqüências genéticas altamente conservadas em outros organismos, que datam de aproximadamente 500 milhões de anos.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar o exon 2 do gene MSX1, em 20 indivíduos com hipodontia e 30 indivíduos normais, na intenção de detectar mutações ou polimorfismos e correlacioná-los com a agenesia dental.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

A casuística foi composta pelo DNA genômico de 20 indivíduos (a maioria não-aparentados) portadores de agenesia dental congênita e 30 indivíduos normais. Os indivíduos que compunham 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) – pág. 52.

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 recolherem as células.

Cada solução bochechada foi imediatamente centrifugada por 10 min a 2.000 rpm (raio da centrifuga de 15 cm). Ao precipitado de material celular acrescentou-se 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), SDS a 0,5% e 600.000 U/L de Garamicina (Gentamicina). 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 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 à 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 homogeneizada, centrifugou-se 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, procedeu-se à precipitação do DNA com 1/10 (v/v) de acetato de sódio 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 dos Segmentos do Gene *MSX1* por PCR (Reação em Cadeia da *Taq* DNA Polimerase)

O segundo exon do gene *MSX1* foi amplificado pela técnica de PCR. Baseando-se na sequência do gene descrita por HEWITT *et al.* em 1991, foi requisitada a síntese de iniciadores da reação de PCR

(*primers*) através da empresa GIBCO BRL. Visando o emprego da técnica do Heteroduplex para análise de polimorfismo, o segundo exon do gene *MSX1* foi dividido em dois segmentos (Figura 1). O primeiro segmento, amplificado pelo par de *primers* MSX 15/17, compunha 256 pb. O par de *primers* MSX 16/18 amplificava o segundo segmento com o mesmo tamanho. Para a técnica do seqüenciamento, foi utilizado o par de *primers* MSX 15/18 na intenção de amplificar inteiramente o segundo exon do gene *MSX1*.

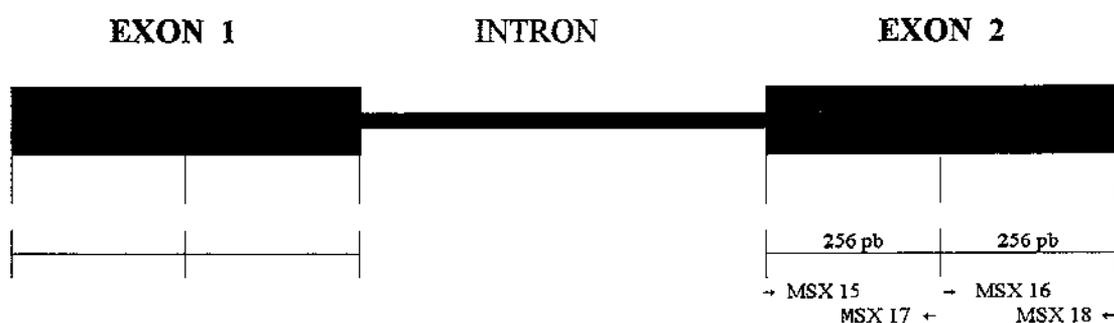


Figura 1 – Os dois exons e o intron do gene *MSX1* e os *primers* que amplificam cada segmento

Os *Primers* utilizados para amplificar o gene *MSX1* foram:

MSX 15 – 5' TTT CTT TCG GCC CCT CAG GCG G 3'

MSX 16 – 5' GCC GCG CCA AGG CAA AGA GA 3'

MSX 17 – 5' CTA CAA GAG GCA GAG CTG GAG 3'

MSX 18 – 5' CTG ACA TAG AGG GTC CCA GG 3'

Para as reações de PCR foram utilizadas quantidades entre 300 a 600 ng de DNA num volume de 50 μ L, contendo Tris.Cl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50 mM, MgCl₂ na concentração final de 4 mM, deoxinucleotídeos (200 μ M 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, 60°C (para os *primers* MSX 16/18), 61°C (*primers* MSX 15/18) ou 65°C (*primers* MSX 15/17) por 1 min, 72°C por 1 min; finalizando 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 em géis de poliacrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 5%. O volume de DNA aplicado em gel foi de 10 μ L, acrescidos de 10 μ L de água (bidestilada-deionizada) e 4 μ L de tampão carreador (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30% em água -

bidestilada-deionizada). Utilizou-se como padrão o marcador de massa molecular ϕ X174-RF *Hae III* (1 μ L em 15 μ L de água e 4 μ L de tampão carreador). As eletroforeses foram feitas em cubas verticais sob corrente elétrica de 20 mA utilizando tampão TBE 1X (89 mM de Tris-Cl, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA) com duração de 2 horas em média. Os géis foram corados pela técnica do Nitrato de Prata (BLUM *et al.*, 1987), fotografados através do sistema de documentação digital (*Scientific Digital Documentation System – Kodak*) e processadas pelo programa *Photo Enhancer for Kodak 2.1*.

Purificação dos Produtos Amplificados por PCR

Os produtos amplificados pelos *primers* MSX 15/18 passaram por um processo de purificação para retirada de segmentos amplificados não específicos, assim como de reagentes da PCR que provavelmente estariam em excesso. O processo consistiu em submeter as amostras amplificadas à eletroforese em gel de agarose a 2% e corar com Brometo de Etídio a 5 μ g/mL. A seguir, as bandas de interesse foram excisadas, e o DNA foi extraído do gel utilizando o *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit - Amersham*

Pharmacia Biotech conforme instruções do fabricante. O método foi capaz de recuperar cerca de 60% do DNA presente na banda de gel.

TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE POLIMORFISMO:

1 - Heteroduplex

Foi empregada para amostras amplificadas pelos *primers* MSX 15/17 e MSX 16/18. O volume de 8 μ L de cada amostra, adicionada a 100 mM de NaCl e 30 mM de EDTA foi desnaturada a 95°C por 10 min. A seguir, as amostras foram deixadas por 2 horas em estufa a 37°C para renaturação das fitas simples de DNA. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida: bis-acrilamida (49:1) na concentração de 7,5% sem glicerol, e a eletroforese foi feita em temperatura ambiente a 15 mA. Os géis foram corados pela técnica do Nitrato de prata (BLUM *et al*, 1987).

2 – Seqüenciamento Automático

O segundo exon do gene *MSX1*, amplificado pelos *primers* MSX 15/18 e purificado conforme descrição anterior, foi submetido à técnica do seqüenciamento automático. O seqüenciamento de toda a amostra foi feito utilizando o *primer* MSX 18 (*primer* reverso).

Algumas amostras tiveram sua seqüência confirmada por outro seqüenciamento no qual foi utilizado o *primer* direto, ou seja, o MSX 15.

Para cada amostra foi feita uma reação de PCR contendo aproximadamente 300 ng de DNA, 3,2 pmol de *primer* (apenas um do par), 8 µL do *Big Dye Terminator Kit* (Perkin Elmer) e água Milli-Q para o volume final de 20 µL. Tal reação foi executada da seguinte forma: o DNA diluído em água passou por uma desnaturação inicial à 96°C por 10 min; a seguir, com o tubo em meio gelado, foi adicionado o *primer* e o *Kit* (que contém a enzima *AmpliTaq* DNA Polimerase, os dNTPs marcados com corantes fluorescentes específicos, além do tampão necessário à reação). A mistura foi desnaturada à 98°C por 5 min, e foram feitos 25 ciclos de 98°C por 20 seg, 59°C por 20 seg e 52°C por 3 min em termociclador *GeneAmp® PCR System 9600* (Perkin Elmer). Terminada a amplificação, o produto foi precipitado com isopropanol a 60%, por 20 min à temperatura ambiente. A seguir, nova precipitação do produto foi realizada, desta vez através do etanol a 70%, para retirar o excedente de dNTPs marcados e *primer*. O precipitado foi submetido à 40°C por 5 min para volatilização de resquícios de etanol. Para ressuspensão do

precipitado foram utilizados 6 μL de tampão carreador de DNA constituído por 500 μL de formamida deionizada mais 100 μL de *Blue Dextran*/ EDTA (50 mg/mL de *Blue Dextran*, 25 mM de EDTA pH 8.0). O precipitado ressuspendido foi desnaturado à 95°C por 3 min e mantido em gelo. O volume de 1,5 μL foi aplicado no gel de seqüenciamento. Esse gel foi constituído por acrilamida: bis-acrilamida (49:1) a 10% acrescido de uréia ultra pura a 9% em tampão TBE (1x). A eletroforese programada para transcorrer em 7 horas realizou-se em aparelho *ABI Prism 377 DNA Sequencer*TM, sendo as seqüências obtidas (cerca de 470 pb) processadas pelo programa *Sequencing Analysis*.

Devido ao fato de cada dideoxinucleotídeo ser marcado por um corante fluorescente específico que emite luz em um determinado comprimento de onda, o seqüenciador automático é capaz de transformar o sinal luminoso em sinal gráfico, onde a somatória deles compõe um Eletroferograma. Nele, cada “pico” é determinado por uma base nucleotídica caracterizada por uma cor específica para cada um dos quatro tipos de base (Anexo 2). Assim, cada amostra foi representada em um eletroferograma. Para análise das seqüências foi necessário alinhá-las através do programa *Sequencher*TM (*Gene code*

Corporation). Assim foi obtida a seqüência consenso que foi submetida à comparação com o banco de dados internacional *GenBank* através do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> para confirmar que as seqüências em análise tratavam-se do gene de interesse.

Devido a suspeita de existirem heterozigotos em nossa amostra, utilizamos o programa *FacturaTM*, através do site <http://www.pebio.com/ga/Factura/update.html>. Durante o processamento, o programa mede a altura de cada pico (que se refere a uma base) e determina se a razão dos picos menores em relação ao pico maior alcança o valor limiar (determinado pelo pesquisador, em porcentagem). Se a razão é igual ou maior que o valor do limiar, o programa identifica a posição da base com um código específico da *IUB (International Union of Biochemists)* que indica a presença de bases misturadas numa dada posição na seqüência. O valor limiar deve ser de 50%, no entanto utilizou-se posteriormente também o valor de 30%, para uma análise menos rigorosa, que talvez indicasse a presença de heterozigotos.

RESULTADOS

RESULTADOS

Obtenção do DNA

A quantidade de DNA extraída foi variável entre as diferentes amostras, como pode-se observar nas Tabelas 4 e 5 – pág. 53. No material obtido dos indivíduos com agenesia dental a quantidade de moléculas de DNA esteve entre 60 e 1720 ng/ μ L, e dos indivíduos normais a quantidade mínima foi de 100 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 nas Tabelas 4 e 5. O DNA obtido de cada amostra mostrou-se suficientemente puro e em quantidade satisfatória para a utilização em técnicas de Biologia Molecular.

Amplificação dos Segmentos do Gene *MSX1* por PCR

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

O par de *primers* MSX 15/17 amplificou o primeiro segmento de 256 pb do segundo exon do gene *MSX1*, como pode-se observar na Figura 2A (indivíduos com agenesia dental) e Figura 2B (indivíduos normais) – pág. 55.

A Figura 3 representa géis de poliacrilamida a 5% com os produtos da amplificação dos *primers* MSX 16/18 (Fig. 3A – indivíduos com agenesia dental, Fig. 3B – indivíduos normais) pág. 56.

A amplificação do segundo exon inteiro (473 pb) do gene *MSX1* a partir dos *primers* MSX 15/18 obteve êxito para todas as amostras. Vale esclarecer que o tamanho do exon 2 amplificado contava de 473 pb devido à sobreposição dos *primers* MSX 16 e MSX 17. A visualização destas bandas foi em gel de agarose a 2% utilizado para purificação do DNA, para posterior emprego da técnica de seqüenciamento.

Heteroduplex

Os segmentos amplificados pelos *primers* MSX 15/17 e MSX 16/18 foram submetidos à técnica do Heteroduplex, a qual revelou padrão semelhante de bandas, ou seja, não houve indicação de qualquer polimorfismo ou mutação na amostra (Fig. 4 – pág. 57).

Para confirmar tal resultado, foi empregada a técnica do seqüenciamento desenvolvida a partir de produtos purificados da amplificação do 2º exon inteiro (*primers* MSX 15/18).

Seqüenciamento Automático

A partir da seqüência consenso obtida pelo programa *Sequencher*TM a comparação com o *GenBank* confirmou serem as amostras seqüenciadas pertencentes ao exon 2 do gene *MSX1* (que foi previamente denominado *HOX7*), como pode ser observado no Anexo 3.

Todas as seqüências foram exaustivamente analisadas na intenção de detectarem-se polimorfismos ou mutações. Atenção especial foi dada à provável existência de mutação pontual, como apresentou o trabalho de VASTARDIS *et al.* em 1996. Contudo, nas amostras pertencentes a este estudo, não foram encontradas alterações na seqüência do exon 2 do gene *MSX1*. O Anexo 2 apresenta um trecho do eletroferograma obtido do seqüenciamento da amostra 3A (indivíduo 3 com agenesia dental), onde está destacado o início e o final da região de Homeobox e a base Citosina normal (mutada para Guanina em VASTARDIS *et al.*, 1996). A utilização do programa *Factura*TM demonstrou a inexistência de indivíduos heterozigotos.

TABELAS

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.

TABELA 2 – Genes relacionados ao *msh* em diferentes espécies

ESPÉCIE	FILO – CLASSE	GENE
Homem	Cordados – Mamíferos	<i>MSX1</i> <i>MSX2</i>
Rato	Cordados – Mamíferos	<i>Msx1</i> <i>Msx2</i> <i>Msx3</i>
Galinha	Cordados – Aves	<i>Msx1, Msx2</i>
Codorna	Cordados – Aves	<i>Msx2</i>
Xenopus	Cordados – Anfíbios	<i>Msx1, Msx2</i>
Peixe-zebra	Cordados (superclasse) Peixes	<i>msxA – msxD</i>
Ascídia (<i>Ciona intestinalis</i>)	Protocordados (subfiló) Tunicados	<i>Msh</i>
Anfioxo	Protocordados (subfiló) Cefalocordados	<i>Msh</i>
Drosophila (mosca das frutas)	Artrópodes – Insetos	<i>Msh</i>
Ouriço do mar (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	Equinodermos - Equinóides	<i>Msh</i>
Hidra (<i>Chlorohydra viridissima</i>)	Celenterados Hidrozoários	<i>Msh</i>

Fonte: Davidson D. The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. *TIG* 11: 405, 1995

TABELA 3 – Manifestação Clínica da Hipodontia

AMOS -TRA	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
1							*			*						
2	?												*			?
3	?			*									*			?
4							*			*			*			
5				*									*			
6				*									*			
7													*			
8								*	*							
9	?			*									*			?
10	?			*									*			?
11	?						*	*	*	*						?
12	?						*			*						?
13	*											*	*			*
14	?						*			*						?
15							*			*						?
16	*						*			*						*
17													*			*
18	*												*			*
19				*												
20				*									*			

Legenda: Os 32 dentes da cavidade oral estão divididos em 4 quadrantes: Direito Superior (┌), Esquerdo Superior (└), Direito Inferior (┐) e Esquerdo Inferior (┘). (*) = dente ausente e (?) = incapacidade de prever formação do dente devido à idade do indivíduo.

TABELAS 4 e 5 - Leitura em espectrofotômetro do grau de pureza e da quantidade do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa jugal.

4) Indivíduos com Agenesia Dental

Amostra	OD 260/ OD 280	[] em ng/ul
01	1,847	320
02	1,879	400
03	1,766	1720
04	1,879	390
05	1,540	250
06	1,794	770
07	1,854	290
08	1,712	360
09	1,958	100
10	1,433	60
11	1,721	180
12	1,602	120
13	1,727	590
14	1,657	350
15	1,663	210
16	1,754	1270
17	1,635	170
18	1,705	350
19	1,843	110
20	1,861	160

5) Indivíduos Normais

Amostra	OD 260/ OD 280	[] em ng/ul
01	1,746	130
02	1,839	240
03	1,793	480
04	1,281	910
05	1,642	340
06	1,757	280
07	1,778	130
08	1,723	220
09	1,759	350
10	1,761	400
11	1,626	1230
12	1,800	360
13	1,793	690
14	1,800	210
15	1,750	310
16	1,760	1010
17	1,729	370
18	1,751	260
19	1,787	200
20	1,700	150
21	1,713	120
22	1,783	260
23	1,877	400
24	1,807	1090
25	1,760	380
26	1,752	390
27	1,956	6260
28	2,238	100
29	1,762	430
30	1,830	390

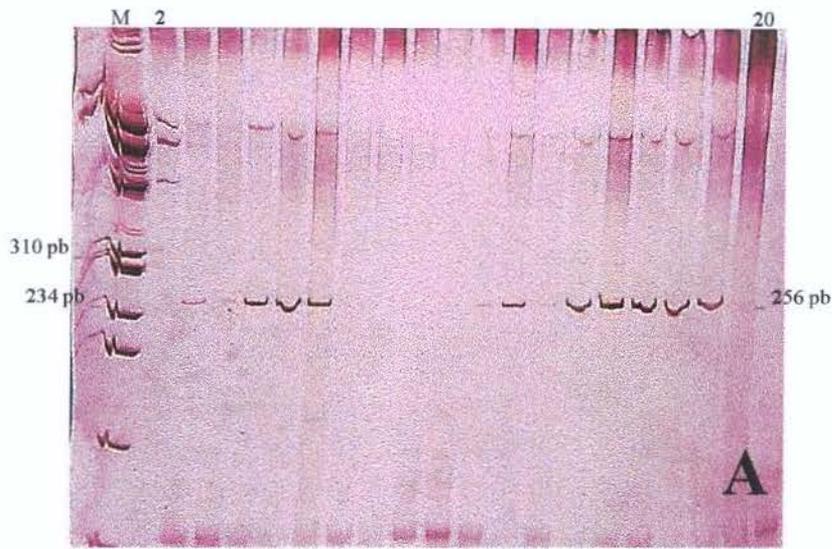


Fig. 2 - Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata. **M**: marcador de massa molecular ϕ X-174-RF DNA *Hae* III digest.

A) Canaletas 2 a 20: produto amplificado pelos *primers* MSX 15/17 dos indivíduos 1 a 19 com agenesia dental.

B) Canaletas 4 a 20: produto amplificado pelos *primers* MSX 15/17 dos indivíduos 14 a 30 normais.

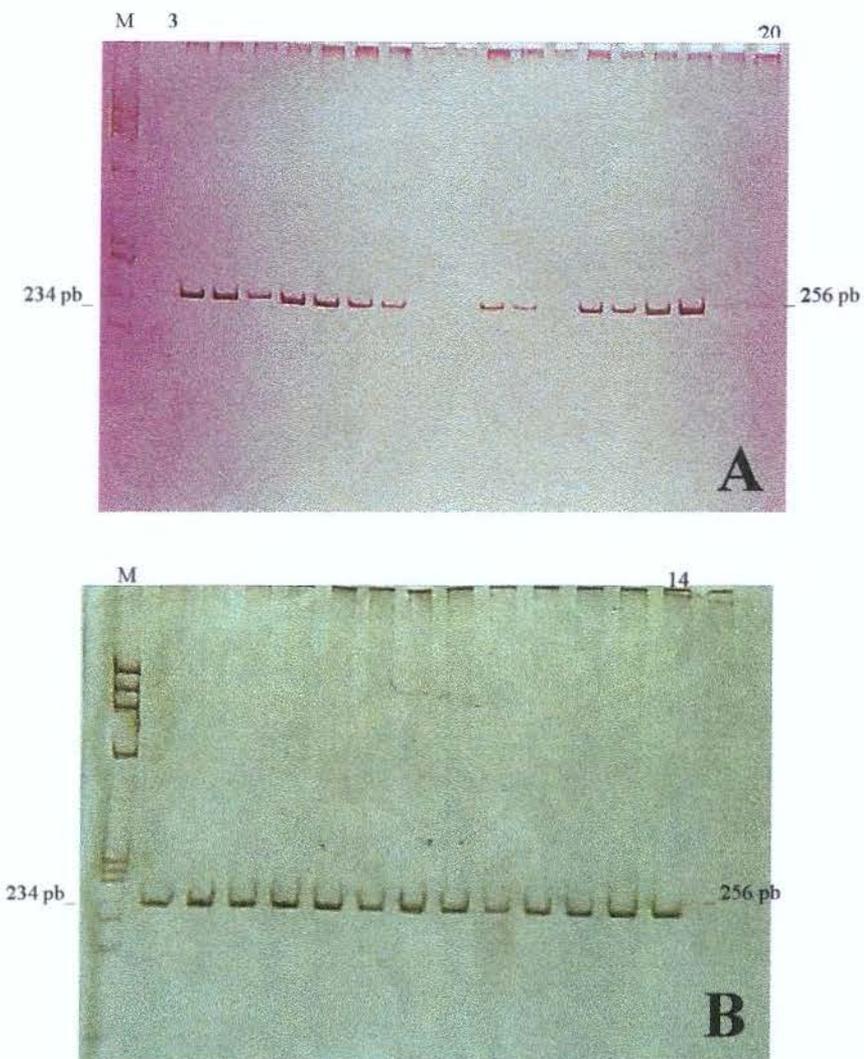


Fig. 3 - Eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata. **M**: marcador de massa molecular ϕ X-174-RF DNA *Hae* III digest.

A) Canaletas 3 a 20: produto amplificado pelos *primers* MSX 16/18 dos indivíduos 1 a 18 com agenesia dental.

B) Canaletas 2 a 14: produto amplificado pelos *primers* MSX

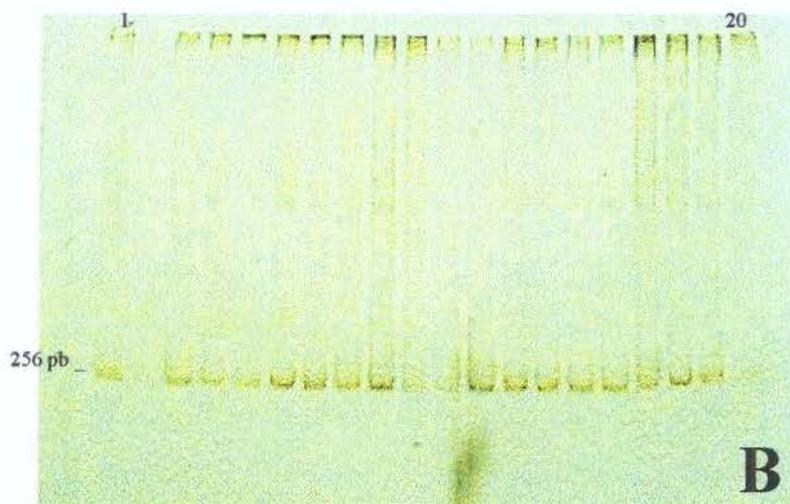
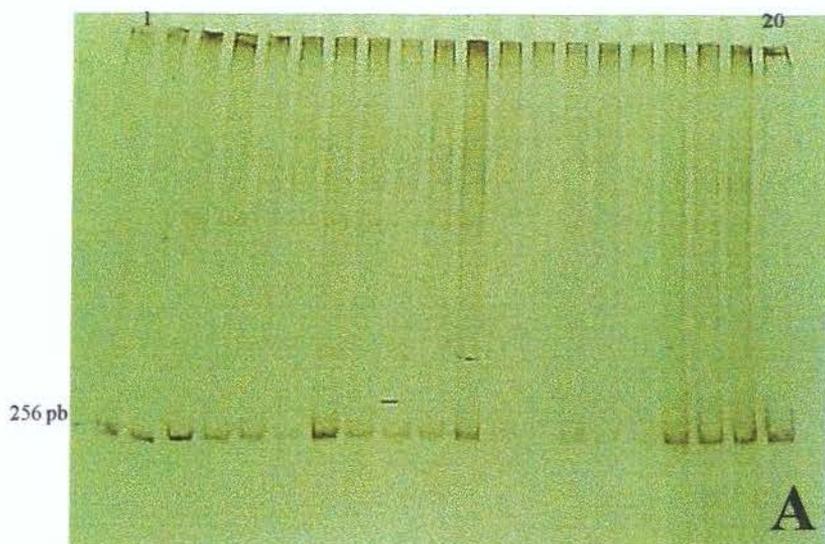


Fig. 4 - Eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5%, corados pela prata. Canaleta 1 de cada gel: amostra não submetida às condições de formação de heteroduplex. **A)** amostras amplificadas pelos *primers* MSX 15/17 submetidas às condições de formação de heteroduplex. Canaletas 3 a 11, amostras amplificadas de indivíduos com agenesia dental. Canaletas 12 a 20, amostras amplificadas de indivíduos normais. **B)** amostras amplificadas pelos *primers* MSX 16/18 submetidas às condições de formação de heteroduplex. Canaletas 3 a 11, amostras amplificadas de indivíduos com agenesia dental. Canaletas 12 a 20, amostras amplificadas de indivíduos normais. Notar a não-formação de bandas características de heteroduplex em nenhum dos géis.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Obtenção de DNA

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 (Tabs. 4 e 5), pode ser devido às diferentes taxas de descamação da mucosa, do vigor com que o bochecho era 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 com proteínas ou fenol. Algumas amostras de DNA utilizadas neste trabalho apresentaram índice de pureza inferior a 1,8, no entanto, não foram desprezadas e se prestaram às finalidades de amplificação e até mesmo seqüenciamento, que exige DNA de boa qualidade. De qualquer forma, a pureza do DNA genômico indica redução das chances de ocorrerem dificuldades em amplificar uma seqüência por PCR.

visualização dos produtos de amplificação. Observou-se também que a purificação dos segmentos de 256 pb, que seriam submetidos à técnica do Heteroduplex, parecia recuperar menos moléculas de DNA em relação aos segmentos maiores (473 pb) que seriam seqüenciados. Assim, as moléculas de DNA recuperadas da purificação do produto de uma única reação de PCR não eram suficientes para o emprego da Heteroduplex, pois proporcionavam bandas muito fracas, impossíveis de analisar. Mostrou-se necessário realizar duas ou mais reações de PCR de cada amostra, em seguida precipitá-las com etanol, para então purificar o DNA que seria utilizado na Heteroduplex. Por esses motivos não pareceu razoável a purificação dos segmentos que seriam submetidos à Heteroduplex.

Já a técnica do Seqüenciamento automático necessita de DNA “molde” de boa qualidade, ou seja, sem contaminantes nem seqüências inespecíficas. A purificação do produto de uma única reação de amplificação do segmento de 473 pb forneceu DNA suficiente para o seqüenciamento.

O manual da *Perkin-Elmer Corporation*, fabricante do *Kit* de seqüenciamento, preconiza que quando o seqüenciamento for a partir de um produto de PCR este deve ser previamente purificado. Desta

maneira *primers*, desoxirribonucleotídeos (dNTPs) e sais (do tampão) em excesso na reação de PCR, seriam retirados, bem como produtos de amplificação não específicos. Excesso de *primers* da reação de amplificação competem com os *primers* do seqüenciamento pelos sítios de anelamento na seqüência de DNA molde. O excesso de dNTPs da reação de amplificação pode afetar o balanço da reação de seqüenciamento e resultar em seqüências “encurtadas” devido à incorporação de um dNTP não marcado. Vale lembrar que no Kit utilizado para o seqüenciamento, os dNTPs são marcados com corantes fluorescentes. Estes são incorporados na seqüência em extensão, onde os diferentes comprimentos de onda que emitem são captados pelo laser do equipamento, de forma que a seqüência é determinada. Produtos de amplificação não específicos, que também prejudicam o seqüenciamento, comportam-se como um DNA molde que são seqüenciados, gerando um resultado falso.

Heteroduplex

Essa técnica permite que as duplas fitas de DNA desnaturadas renaturem-se à temperatura ambiente para que, quando submetidas a eletroforese, tenham mobilidade diferente no gel se existirem

diferenças entre as bases que as compõem. Assim, é possível detectarem-se polimorfismos ou indivíduos heterozigotos (PROSSER, 1993). No entanto, somente a técnica de seqüenciamento confirma o polimorfismo (ou mutação), além de identificar qual a base (ou seqüência) que se mostra alterada. Não foi identificado polimorfismo nas amostras através da Heteroduplex, mas para comprovação deste resultado foi executado o seqüenciamento.

Seqüenciamento Automático

Essa técnica promove a identificação das bases nucleotídicas que compõem a fita de DNA na intenção de detectarem-se ou confirmarem-se polimorfismos/ mutações. O seqüenciamento pode ser executado a partir de DNA clonado, que é mais usual, ou a partir de produto de PCR. No seqüenciamento a partir de produto de PCR são produzidas rapidamente as seqüências desejadas, pois não é executado o complexo procedimento de clonagem. No entanto, para serem obtidas seqüências de qualidade é necessário antes purificar o produto de PCR. O exon 2 do gene *MSX1* é rico em bases C e G, tornando-o de difícil seqüenciamento. Para contornar o problema muitas adaptações podem ser feitas no protocolo básico. Neste trabalho as principais

adaptações executadas para obterem-se seqüências com picos definidos foram: desnaturação rígida do DNA molde e uso de grande quantidade da enzima *AmpliTaq* DNA Polimerase. Observa-se em Materiais e Métodos, a desnaturação inicial do DNA (96°C por 10 min) de modo a romperem-se efetivamente as três pontes de hidrogênio que unem as bases C e G da dupla fita de DNA. No DNA molde separado em duas fitas simples, o *primer* consegue anelar. Somente um *primer* participa da reação, pois deve ser amplificada uma só das fitas simples, a qual será seqüenciada. Depois de adicionado o *primer* e o *Kit*, em meio gelado, ocorre nova desnaturação (98°C por 5 min) para que as fitas simples mantenham-se separadas quando iniciarem-se os ciclos de amplificação, onde o *primer* será anelado e a seqüência estendida. Devido à rígida desnaturação do DNA molde é necessário fornecer quantidade adequada de enzima à reação. A enzima *AmpliTaq* DNA Polimerase é muito resistente à altas temperaturas (94 – 96°C), mas é bastante consumida quando participa de um protocolo como o que foi desenvolvido. Assim, numa seqüência não rica em bases C e G, 2 µL do Kit de seqüenciamento chegam a ser suficientes, mas no caso do exon 2 do gene *MSX1*, foram necessários 8µL.

Na seqüência de algumas amostras o aspecto de determinados picos levou à suspeita de se tratarem de heterozigotos. O seqüenciamento a partir de produtos de PCR possibilita tal fato; já quando é feito a partir de DNA clonado, as seqüências dos diferentes clones demonstram a heterozigoze imediatamente. O programa *FacturaTM* revelou não existirem indivíduos heterozigotos para o gene *MSX1*. Assim, apesar da análise minuciosa das seqüências obtidas, não foram identificados polimorfismos ou mutações, confirmando o resultado obtido pela técnica do Heteroduplex. A inexistência de alterações na seqüência do exon 2 do gene *MSX1* reforçam a idéia de que outros genes estão implicados na odontogênese. Portanto alterações na seqüência desses genes, não estudados neste trabalho, seria a causa genética da hipodontia nos indivíduos abordados.

No trabalho de VASTARDIS *et al.* (1996), em que foi identificada uma relação genética para a hipodontia, a amostra foi composta por indivíduos aparentados que apresentavam o mesmo padrão de agenesia dental. Os voluntários com hipodontia, que participaram do estudo tema desta tese, eram na grande maioria não aparentados com padrão heterogêneo de dentes ausentes (Tabela 3). Além disso, grande parte deles apresenta agenesia de dentes incisivos,

para a qual busca-se ainda uma relação genética. Esperava-se confirmar a mutação descrita por VASTARDIS *et al.* (1996) nas seqüências dos indivíduos 9A e 10A, já que possuem o mesmo padrão de hipodontia da amostra que compôs o referido trabalho. Acredita-se que isso não ocorreu porque a agenesia dental (não ligada a síndromes) é determinada por vários genes com penetrância incompleta e expressividade variável. Além disso, a regulação de tais genes não é bem conhecida, e provavelmente existem outros genes e fatores envolvidos na odontogênese que ainda não foram identificados. Portanto, mesmo que dois indivíduos não aparentados apresentem igual padrão de agenesia dental, a determinação genética pode ser completamente diferente de um para o outro. A inativação do gene *MSX1* tem um efeito altamente seletivo na dentição mas não é o único fator que explica a etiologia da hipodontia. Quando forem identificadas as seqüências promotoras e codificantes de todos os genes envolvidos na odontogênese, bem como o padrão de expressão esclarecido, talvez seja possível até mesmo prever quando um indivíduo irá apresentar hipodontia, e quais dentes seriam afetados.

No entanto, não parece sensato desconsiderar-se a possível influência ambiental na odontogênese. Estudos paleo-antropológicos

enfocando os aspectos evolutivos da dentição, referem a potencial contribuição de fatores ambientais ao longo do processo. Mecanismos epigenéticos, como interações gene-ambiente, podem ter contribuído para a redução do complexo mastigatório, por exemplo. A contínua tendência na redução do número de dentes (terceiros molares) pode ser vista como uma tendência evolutiva, onde o gene *MSX1* seria uma das moléculas mais relacionadas em tal efeito. Aliando-se a perspectiva evolutiva com técnicas de biologia molecular seria possível compreender mais amplamente a odontogênese. Assim, não só os fatores genéticos seriam considerados, mas seria investigado o provável papel que interações gene-ambiente tenham desempenhado ao longo do processo.

Nossos resultados indicam a hipótese de que a hipodontia ocorre como consequência de mutações em genes envolvidos na odontogênese, assim como mudanças epigenéticas, que podem ser influenciadas por fatores ambientais, alterando o padrão de expressão e o campo de ação destes genes.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. O DNA extraído a partir de células descamadas da mucosa jugal, além de ser um método simples, indolor e de baixo custo, fornece material íntegro e de boa qualidade para emprego de técnicas de Biologia Molecular, como o Seqüenciamento Automático.
2. O Seqüenciamento a partir de produto de PCR é uma ótima estratégia, alternativa ao DNA clonado, pois promove a obtenção rápida das seqüências de interesse, desde que o produto da amplificação seja previamente purificado.
3. Não foram identificados polimorfismos ou mutações no exon 2 do gene MSX1, (inclusive na região homeobox) através das técnicas de Heteroduplex e Seqüenciamento Automático. Assim, a causa genética da hipodontia nos indivíduos abordados não tem relação com o gene MSX1, mas pode existir em outros genes envolvidos na odontogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMENKO, M.A. *et al.* Differential induction of four *Msx* homeobox genes during fin development and regeneration in *zebrafish*. *Development*, v.121, p.347-357, 1995.
- 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.
- 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.
- BURZYNSKI, N.J., ESCOBAR V.H. Classification and genetics of numeric anomalies of dentition. *Birth Defects*, v.19, p.95-106, 1983.

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.

DNA SEQUENCING – CHEMISTRY GUIDE. The Perkin-Elmer Corporation, 1995

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

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

HEWITT, J.E., CLARK, L.N., IVENS, A., WILLIAMSON, R. Structure and sequence of the human homeobox gene *HOX7*. *Genomics*, v.11, p.670-678, 1991.

HILL, R.E. *et al.* A new family of mouse homeo box containig genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes Dev*, v.3, p.26-37, 1989.

HOLLAND, P.W.H. Cloning and evolutionary analysis of *msh*-like homeobox genes from mouse, *zebrafish* and *ascidian*. *Gene*, v.98, p.253-257, 1991

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.

IVENS, A. *et al.* The human homeobox gene *HOX7* maps to chromosome 4p16.1 and may be implicated in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Hum Genet*, v.84, p.473-476, 1990.

JOWETT, A.K. *et al.* Epithelial-mesenchymal interactions are required for *Msx1* and *Msx2* gene expression in the developing murine molar tooth. *Development*, v.117, p.461-470, 1993.

KEMP, T.S. **Mammal-like reptiles and the origin of mammals.** New York, EUA: Academic Press, 1982.

KURISU, K., TABATA, M. J. Human genes for dental anomalies. *Oral Diseases*, v.3, p.223-228, 1997.

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.

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

MACHO, G., MOGGI-CECCHI, J. Reduction of maxillary molars in *Homo sapiens sapiens*: a different perspective. *Am J Phys Anthropol*, v.87, p.151-159, 1992.

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, v.601-611, 1991b.

MACKENZIE, A. FERGUSON, M.W.J., SHARPE, P.T. Expression patterns of the homeobox gene, *Hox-8*, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development*, v.115, p.403-420, 1992.

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

McGINNIS, W. *et al.* A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*, v.37, p.403-408, 1984.

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

NIEMINEN, P. *et al.* Gene defect in hypodontia: exclusion of *MSX1* and *MSX2* as candidate genes. *Hum Genet*, v.96, p.305-308, 1995.

PETERS, H., BALLING, R. Teeth: Where and how to make them. *TIG*, v.15, p.59-64, 1999.

PROSSER, J. Detecting single base mutations. *TIBTECH*, v.11, p.238-246, 1993.

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.

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

SCOTT, M.P. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell*, v.71, p.551-553, 1992.

SCOTT, M.P., WEINER, A.J. Structural relationships among genes that controls development: sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabitorax* and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci*, v.81, p 4115-4119, 1984.

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

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

SIMONS, A.L., STRITZEL, F., STAMATIOU, J. Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisors and second premolar. *J Clin Pediat Dent*, v.17, p.109-111, 1993.

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.

STIMSON, J.M. *et al.* Features of oligodontia in three generations. *J Clin Pediatr Dent*, v.21, n.3, p.269-75, 1997.

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.

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.

SUZUKI, *et al.* Introdução à Genética. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan, 1992. cap.22, p.511-513.

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

TREVILATTO, P. & LINE, S.R.P. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatology* [in press]

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

WANG, W. *et al.* *Msx-3*: a novel murine homologue of the *Drosophila Msh* homeobox gene restricted to the dorsal embryonic central nervous system. *Mech Dev*, v.58, p.203-215, 1996.

WEISS, K. *et al* Perspectives on genetic aspects of dental patterning.

Eur J Oral Sci, v.106, suppl.1, p.55-63, 1998.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética da FOP – UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CEP — COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER DO CEP — FOP/UNICAMP

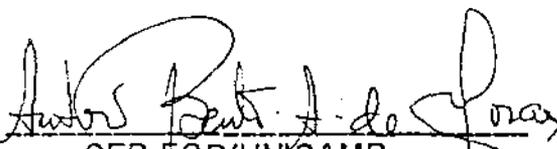
Comunicamos que o Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto N.º 01/97:

Título do Projeto de Pesquisa: Análise do polimorfismo gênico MSX 1 em indivíduos com agenesia dental

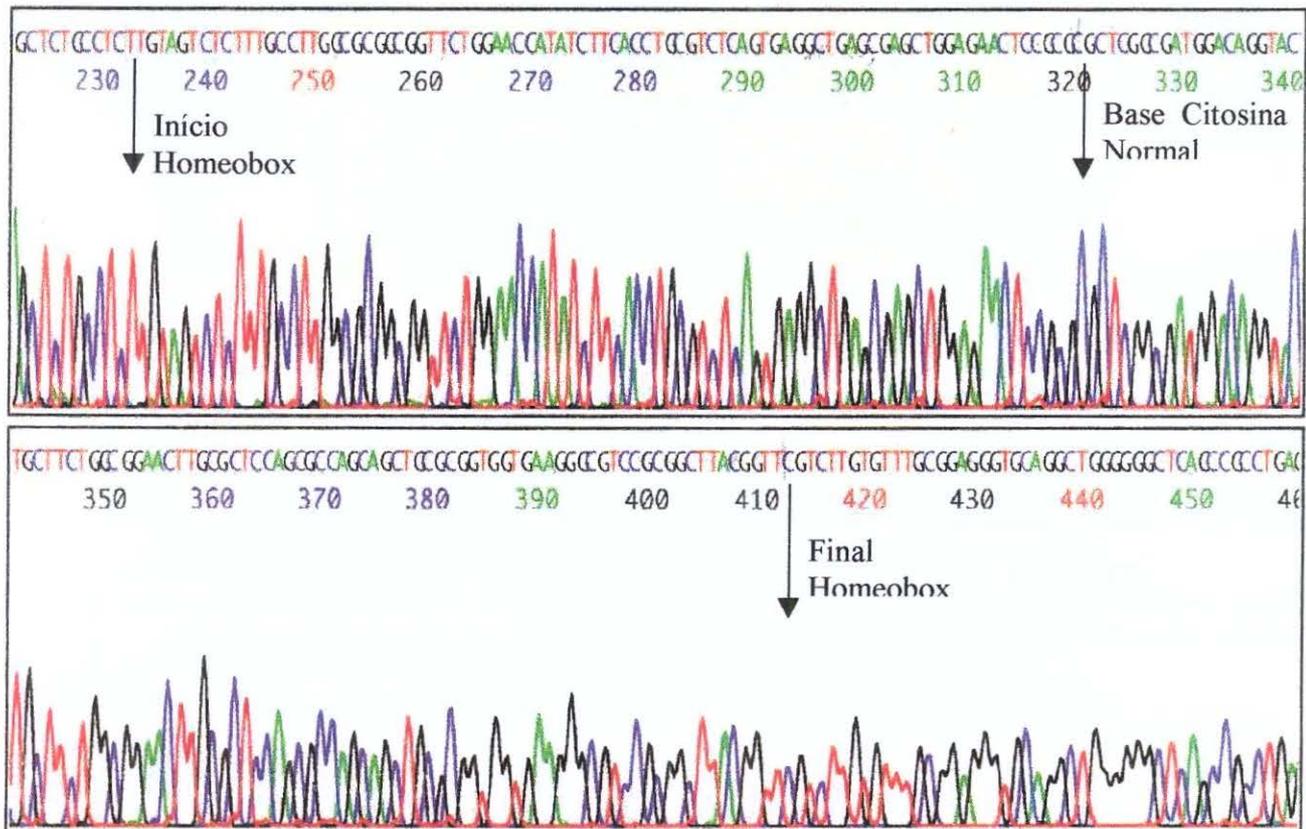
Pesquisador Orientador/Orientado: Sérgio Roberto Peres Line / Raquel Mantuanelli Scarel

apresentado a este Comitê para análise ética, segundo a Resolução CNS 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, de 10/10/96, e de acordo com cópia do projeto arquivada em nossa secretaria, foi considerado Aprovado.

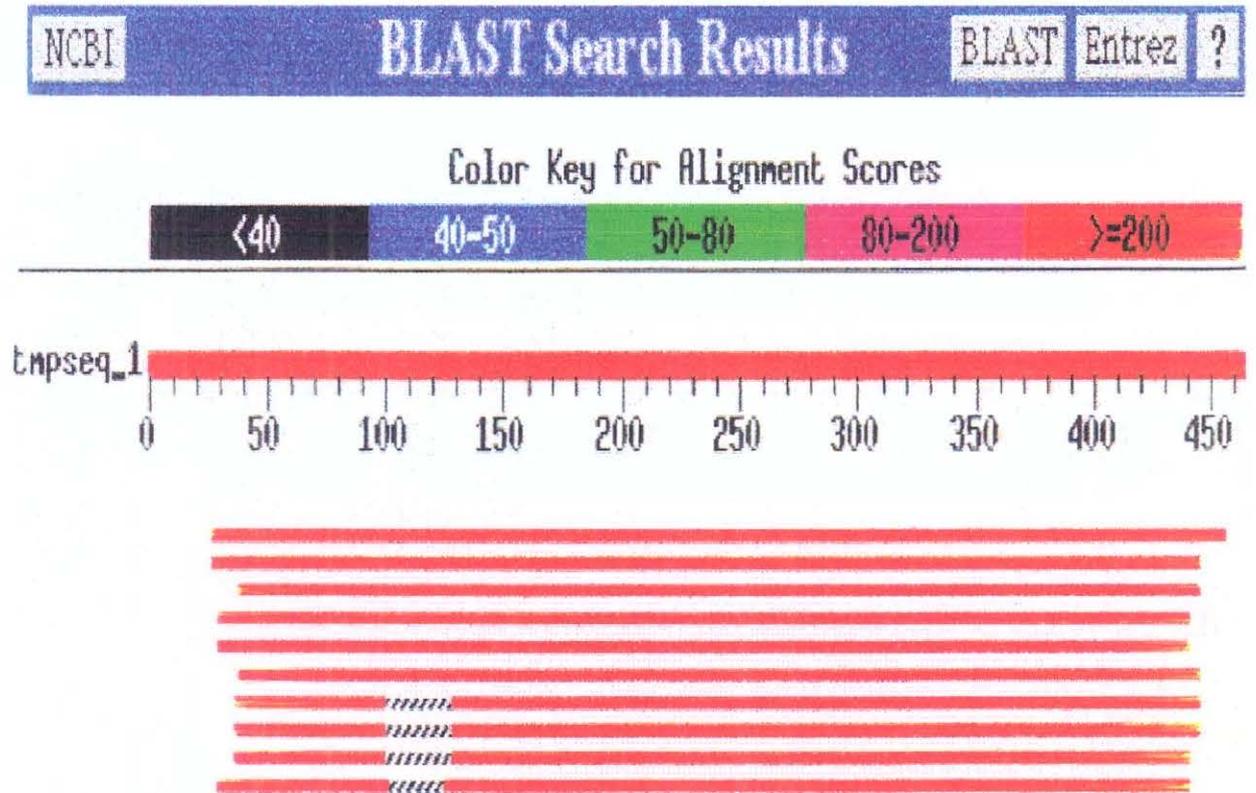
Piracicaba, 03 de dezembro de 1.997


CEP-FOP/UNICAMP
Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador
CEP-FOP/UNICAMP

Anexo 2 - Eletroferograma (parte da seqüência de DNA do exon 2 do gene *MSX1* do indivíduo 3 com agenesia dental)



Anexo 3 – Comparação da sequência com o Banco de Dados *GenBank*



gb M76732 HUMHOX702	Human HOX7 gene, exon 2 and complete cds.	815	0.0
ref NM_002448.1 MSX1	Homo sapiens msh (Drosophila) homeo b..	793	0.0
dbj D30750 BOVBMSX1	Bovine mRNA for Msx-1, complete cds	500	e-139