

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**Ferdinando De Conto**

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA  
DO GENE BMP-4 EM INDIVÍDUOS COM AGENESIA DENTAL**

**INVESTIGATION OF PROMOTER REGION POLYMORPHISMS IN  
THE BMP-4 GENE IN INDIVIDUALS WITH HYPODONTIA**

200329360

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Ferdinando de conto  
[Signature]  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural  
na área de Anatomia.

**Orientador: Prof.Dr. Sérgio Roberto Peres Line**

i  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp D358i
V	EX
TOMBO BCI	55597
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00188620-5

BIB ID 300655

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**D358i**

**De Conto, Ferdinando**

Investigação de polimorfismos na região promotora do gene BMP-4 em indivíduos com agenesia dental. / Ferdinando De Conto. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Sérgio Roberto Peres Line  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

I. Polimorfismo (genética). I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.


**Campinas, 21 de maio de 2003**

**BANCA EXAMINADORA**

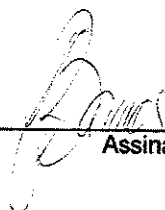
**Prof.Dr. Sergio Roberto Peres Line (Orientador)**

  
Assinatura

**Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello**

  
Assinatura

**Profa.Dra. Silvana Pereira Barros**

  
Assinatura

**Profa.Dra. Paula Cristina Trevilatto**

  
Assinatura

DEDICO ESTE TRABALHO...

## *À minha família*

**Salete e Ivano**, pelo carinho, caráter e determinação a mim transmitidos desde meus primeiros passos na vida;

**Camila e Jefferson**, vocês foram um constante estímulo, esperarei vê-los chegar nesta etapa também.

## *Ao amigo*

**Dr. Roque Rhoden**, pelo incansável apoio, sem este, talvez não tivesse conseguido iniciar esta caminhada, na qual demos ainda o primeiro passo.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao professor **Sérgio Roberto Peres Line** pela confiança, apoio e, sobretudo pela orientação para minha formação; fico grato de ter trabalhado contigo.

A quatro professores que marcaram o início de minha carreira:

Prof. **Heitor Verardi**, exemplo como professor e como homem. Continuarei seguindo teus passos;

Prof. **Romeo Rieguel**, pelos ensinamentos transmitidos e pela confiança depositada;

Prof. **Idalmir Nicolini**, por guiar o início da minha profissão;

Profa. **Nayme**, tive o privilégio de ter sido teu aluno e recebido tua amizade.

## AGRADECIMENTOS

Ao magnífico Reitor da UNICAMP, **Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz**.

Ao **Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho**, Diretor da FOP - UNICAMP.

Ao **Prof. Dr. Mohamed Ezz El Din Mostafa Habib**, Diretor do IB – UNICAMP.

À **Profª. Drª Shirlei Maria Recco Pimentel**, Coordenadora geral do programa de Pós – Graduação em Biologia Celular e Estrutural do IB – UNICAMP, pela figura constante de apoio e prestatividade demonstrada durante minha passagem pela UNICAMP.

À **Profª. Drª. Darcy de Oliveira Tosello**, Professora do programa de Pós – Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pelas oportunidades de aprendizado científico e pelo tratamento dado a minha pessoa.

Ao **Prof. Dr. Edson Pimentel**, pela disponibilidade em todas ocasiões para esclarecer dúvidas e pela amizade feita.

Ao **Prof. Dr. José Meciano Filho**, carinhosamente chamado de Nino, pela recepção quando cheguei na UNICAMP, e suas conversas descontraídas e nas quintas-feiras à tarde.

Ao **Prof. Dr. José Ângelo Camilli**, pelo apoio e atenção fundamentais desde a primeira visita à UNICAMP.

À **Profª. Drª. Evanisi Palomari**, pela amizade conquistada e pelos ensinamentos e incentivo aos estudos de dissecação nos cadáveres.

Aos demais professores do programa de Pós – Graduação em Biologia Celular e Estrutural – UNICAMP, nas áreas de Biologia Celular, Histologia e Anatomia.

Ao **Prof. Dr. Fausto Bérzin** meu agradecimento por ter contribuído em meu crescimento profissional, e acima de tudo por um exemplo de vida, meu respeito e consideração.

Aos demais professores do programa de Pós – Graduação em Odontologia – FOP – UNICAMP.

À **Lílian Panagio**, secretária do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP. Sem tua ajuda, jamais teria chegado à Campinas. Tua presença conosco e teu profissionalismo são imprescindíveis.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de mestrado, importante para o desenvolvimento de meus estudos nesta etapa.

Aos **professores da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo-RS**, pela formação como cirurgião dentista, título pelo qual fico honrado em carregar comigo e lisonjeado por ter recebido de vocês. Mesmo com seus defeitos, como todos temos, aprendi a construir minha figura de profissional. Saibam, que como a maioria de vocês, sou um eterno apaixonado pela minha profissão. Não citarei seus nomes, pois como sabem, teria que citar quase todos, a vocês ofereço o meu sincero *agradecimento*.

Ao **cadáver**, nunca ouvi a tua voz, nem observei teus gestos, sequer soube teu nome, porém me deste numerosas aulas, sempre com o mesmo propósito: me ensinar. Distribuirei teus ensinamentos aos próximos alunos e cobrarei sempre o devido respeito.



Aos técnicos de anatomia, pela paciência, companhia e confiança nas tarefas de dissecação no laboratório de Anatomia da UNICAMP.

Aos tolerantes **voluntários**, sem os quais não teríamos realizado o experimento.

Aos colegas do departamento de Anatomia, **Elaine, Chuchu, Cibele, Juliana, Cândida, Simone, Débora, Noboro, Marcelo e César** sempre atenciosos e prestativos. Agradeço pelo carinho e receptividade em minha chegada.

Aos grandes amigos **César** (Cezão), **Mário** (Marinho) e **Robson** (Zóóóio), que juntos, formamos “os quatro cavaleiros do apocalipse” nas aulas de Biologia Celular na sexta-feira.

À todos **colegas da turma de Biologia Celular** da sexta-feira de manhã. Turma como esta dificilmente encontrarei igual. Temos que nos despedir, porém nossa amizade e lembranças jamais se destruirão.

Aos colegas do laboratório de histologia da FOP – Raquel, Regina, Elisângela, Paula, Ana Paula, Rui, Marco e Marcelo – sempre amigos e atenciosos. Saibam que vocês muito me ensinaram e ficarão para sempre guardados em minha memória.

À **Roberta**, a tua ajuda foi grandiosa para concretizar esta tarefa. Contigo aprendi muito e tuas vitórias me deram estímulo para seguir adiante. Obrigado por tudo.

À **família Lanziotti**, João, Tânia, Thiago e Cristiane. Obrigado pela ajuda, consideração e confiança em mim depositados desde o início de minha carreira. Realmente sou grato a todos vocês e reforço o meu muito obrigado.

À **Andrea**, que me apoiou nesta fase final de trabalho. Obrigado pelo constante apoio, sempre pronto para me fazer seguir confiante.

Aos amigos **Mica, Dudu, Rex, Marcão, Rafa, Elton e Sebben**, amigos e cúmplices de todas ocasiões, agradeço a vocês pela amizade já tão longa e tão sincera. Vocês sempre me serviram com alicerce e incentivo ao longo desta caminhada.

"PARA TER FORÇA, SÊ UM ARTESÃO  
DAS PALAVRAS. A FORÇA DE UM SER  
É SUA LÍNGUA, E AS PALAVRAS SÃO  
MAIS EFICAZES QUE QUALQUER  
FORMA DE LUTA."

MERIKARÊ

## SUMÁRIO

## LISTAS

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

Lista de tabelas	3
------------------	---

Lista de figuras	4
------------------	---

RESUMO	5
--------	---

ABSTRACT	6
----------	---

1. INTRODUÇÃO	7
---------------	---

2. REVISÃO DE LITERATURA	10
--------------------------	----

2.1 Agenesia dental	10
---------------------	----

2.2 O gene <i>BMP-4</i> , sua proteína e função	11
---	----

2.3 <i>BMP-4</i> e a embriogênese dental	13
--	----

2.4 Outros genes envolvidos na odontogênese	14
---	----

3. PROPOSIÇÃO	21
---------------	----

4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
------------------------	----

4.1 Casuística	23
----------------	----

4.2 Obtenção do DNA	25
---------------------	----

4.3 Extração do DNA	25
---------------------	----

4.4 Amplificação da região promotora do gene <i>BMP-4</i> por PCR	26
---	----

4.5 Eletroforese das amostras	27
-------------------------------	----

4.6 Purificação dos produtos amplificados por PCR	28
---	----

4.7 Seqüenciamento automático	28
4.8 Polimorfismo por comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)	30
4.9 Técnica de Heteroduplex	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Obtenção do DNA	32
5.2 Amplificação dos segmentos do Gene <i>BMP-4</i> por PCR	35
5.3 Purificação das amostras	36
5.4 Seqüenciamento automático	37
5.5 Heteroduplex	38
5.6 Análise com RFLP	39
6. DISCUSSÃO	40
6.1 Obtenção do DNA	40
6.2 Amplificação dos segmentos do Gene <i>BMP-4</i> por PCR	41
6.3 Purificação dos produtos amplificados por PCR	42
6.4 Seqüenciamento automático	43
6.5 Polimorfismo por comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)	44
6.6 Técnica de análise com Heteroduplex	45
6.7 <i>BMP-4</i> e a agenesia dental	45
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

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

Aa: aminoácido

BMP: proteína morfogenética do osso ("Bone morphogenetic protein")

C: citosina

Dlx: grupo de genes homeóticos em ratos ("Distal-less homeobox")

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeo

E 11.5: onze dias e meio do estágio de desenvolvimento do embrião

E 12.5: doze dias e meio do estágio de desenvolvimento do embrião

E 13.5: treze dias e meio do estágio de desenvolvimento do embrião

EDTA: ácido etileno diaminotetracético

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

FGF: fator de crescimento fibroblástico ("fibroblast growth factor")

$\phi$ 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

Loading buffer: tampão de amostra para eletroforese

Msx: grupo de genes homeóticos em ratos ("Muscle segment homeobox")

MSX: grupo de genes homeóticos em humanos ("Muscle segment homeobox")

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")

Tampão *one-phor-all*: tampão utilizado na digestão das enzimas de restrição

TBE: tampão tris-borato, para corrida de eletroforese

TE: Tris/EDTA

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante – beta ("transforming growth factor –  $\beta$ ")

U: unidade (s)

22q-23q: região de localização do gene BMP4 humano no braço longo do cromossomo 14.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Distribuição da amostra de indivíduos agênicos, de acordo com idade, sexo e elemento dental indicativo de agenesia.

**Tabela 2:** Leitura em espectrofotômetro do grau de pureza e da quantidade do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa jugal de pacientes com agenesia.

**Tabela 3:** Leitura em espectrofotômetro do grau de pureza e da quantidade do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa jugal de pacientes sem agenesia (controle).



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Eletroforese em gel de poliacrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 7,5% indicativa da amplificação dos segmentos do gene *BMP-4* após o primeiro processo de extração do DNA.

**Figura 2:** Eletroforese em gel de poliacrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 7,5% indicativa do sucesso do processo de reextração dos DNAs.

**Figura 3:** Sequenciamento automático demonstrando polimorfismo na base -40 nos pacientes 18, 14 e 12 (grupo controle) e 10, 08 e 03 (grupo com agenesia).

**Figura 4:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% indicativa da digestão do DNA pelas enzimas da técnica de RFLP.

## RESUMO

A 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 mastigatórias e da fala, além de problemas estéticos. Trabalhos recentes mostraram que mutações no gene *Msx1* estão associadas com hipodontia de segundos pré-molares e terceiros molares em humanos. A proteína *BMP-4* tem sido identificada como um sinal indutivo do epitélio na formação dos dentes. 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*. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de polimorfismos na região promotora do gene *BMP-4* em indivíduos com formas isoladas de agenesia dental (formas não sindrômicas e sem padrão mendeliano de transmissão). A partir do DNA obtido de células epiteliais (em processo de descamação) da mucosa bucal de 50 indivíduos com agenesia nos segundos pré-molares ou terceiros molares e de 50 indivíduos controle, a região promotora do gene *BMP-4* foi amplificada pela técnica de PCR. Os produtos de PCR purificados foram então submetidos à técnica de seqüenciamento automático e não revelaram alterações na região do gene estudado. Estes resultados indicam que outros genes, ou outras regiões do gene *BMP-4*, devem estar envolvidos na etiologia da hipodontia.

## ABSTRACT

Hypodontia is the congenital absence of one to six deciduous and/or permanent teeth. This is one of the most frequent alterations of the human dentition. Although it does not represent a problem of public health, it may cause masticatory and speech dysfunctions, as well as aesthetic problems. Recent studies showed that mutations in the gene *Msx1* are associated with hypodontia of second premolars and third molars in humans. The protein *BMP-4* has been identified as an inductive sign of the epithelium in the formation of the teeth. It is produced in the dental epithelium where it regulates the expression of genes directly involved in tooth morphogenesis. The aim of this study was to investigate the presence of polymorphism in the promoter region of the gene *BMP-4* in individuals with isolated forms of dental agenesis. Genomic DNA was obtained from buccal epithelial cells of 50 individuals with agenesis in the second premolars or third molars and 50 control individuals. The promoter region of the *BMP-4* gene was amplified by the technique of PCR. The products of purified PCR were submitted to automatic sequencing and did not reveal any alterations in that region of the gene studied. These results indicate that other genes or regions of *BMP-4* must be involved in the etiology of hypodontia in humans.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo da genética de desenvolvimento do embrião humano é utilizado há alguns anos na busca da etiologia da agenesia dental. Muitos pesquisadores têm se empenhado para descobrir a relação entre determinados genes responsáveis pelo desenvolvimento e estrutura dental e a hipodontia (VAINIO *et al.*, 1993; THESLEFF, 1995; VASTARDIS *et al.*, 1996; ABERG *et al.*, 1997; MAAS & BEI, 1997).

A agenesia dental, ou hipodontia é a ausência congênita de um a seis dentes permanentes e/ou decíduos (SCHALK-VAN DER WEIDE *et al.*, 1994). Por ser uma alteração freqüente na dentição humana, hipóteses sobre sua relação genética e evolução têm sido questionadas. O fato é que, independente disto, esta condição pode causar alterações no aparelho mastigatório e fonético, além de ocasionar, eventualmente, desconforto estético e social ao indivíduo (LINE, 2001).

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).

Estudos envolvendo membros de duas famílias com um padrão de agenesia dental semelhante, transmitida como caráter autossômico dominante, mostraram que mutações no gene *Msx1* eram responsáveis pela ausência dos segundos pré-molares e terceiros molares da mandíbula e maxila (VASTARDIS *et al.*, 1996; VAN DEN BOOGAARD *et al.*, 2000).

O gene *Msx1* pertence a 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).

Durante o desenvolvimento embrionário, muitos fatores de crescimento têm demonstrado função como sinalizadores entre as camadas dos tecidos embrionários (VAINIO *et al.*, 1993). A interação tissular, também chamada indução embrionária, tem uma importância central na regulação do desenvolvimento do embrião. Os fatores de crescimento estão agrupados em famílias, e aquelas que atuam claramente na organogênese são TGF- $\beta$  (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 (MAAS & BEI, 1997).

A família de fatores de crescimento mais estudada até agora é a TGF- $\beta$ , e pertence a ela uma classe de proteínas denominada BMP (proteína morfogenética do osso) que regula 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 na mesênquima dental, incluindo o *Msx1*. Portanto, a atividade da *BMP-4* é um importante sinal indutivo nas fases iniciais da odontogênese, estimulando a mesênquima a prosseguir o processo de crescimento e diferenciação (THESLEFF, 1995).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Agenesia dental

A alteração do número dos elementos dentários ocasionada pela falta congênita de dentes é definida na literatura como agenesia dental ou hipodontia. As variações em número de dentes em desenvolvimento são comuns. Vários termos são úteis na discussão das variações numéricas dos dentes. Anodontia refere-se à ausência completa de desenvolvimento do dente. Hipodontia denota a falta de desenvolvimento de um ou mais dentes; oligodontia (subdivisão da hipodontia) indica a falta de seis ou mais dentes. Definições como anodontia completa (todos os elementos dentários ausentes) e parcial (um ou vários dentes ausentes) são antigas e consideradas obsoletas (SHAFER *et al.*, 1987).

Os indivíduos que possuem oligodontia, além de apresentar número consideravelmente reduzido de dentes, os possuem de tamanho menor e em forma muitas vezes anômala. Observa-se também a erupção dental tardia, fato mais evidente em indivíduos do sexo masculino (SCHALK-VAN DER WEIDE *et al.*, 1994).

A ausência de dentes na dentição permanente não é rara, sendo os terceiros molares os mais comuns, com uma prevalência que varia nas diferentes raças entre 2,5 a 35% (NEVILLE *et al.*, 1998). Depois dos molares, os segundos

pré-molares e incisivos laterais superiores são os mais freqüentes (CUA BENWARD *et al.*, 1992). A anodontia é uma patologia rara e muitas vezes associada a uma síndrome conhecida como displasia ectodérmica hereditária (SHAFFER *et al.*, 1987). A agenesia pode ser atribuída a fatores ambientais como radiações, tumores, rubéola, infecções locais, entre outros (NEVILLE *et al.*, 1998). GORLING & GOLDMAN (1980) também sugeriu o fator genético como provável causa das anodontias. A agenesia dental pode ocorrer como uma entidade isolada. Neste caso, 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).

## 2.2 O gene *BMP-4*, sua proteína e função

O gene humano *BMP-4* está localizado no braço longo do cromossomo 14, mais precisamente na região 22-23 (22q-23q). 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- $\beta$  (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.

Dentre os fatores de crescimento importantes na embriogênese destaca-se a super família de fatores de crescimento, a TGF- $\beta$ , e pertence a ela uma classe de proteínas denominada BMP (proteína morfogenética do osso) que regula o desenvolvimento de ossos e cartilagem. As BMPs são moléculas sinalizadoras essenciais para o desenvolvimento embrionário, e desempenham um papel regulador na embriogênese. Em mamíferos, ao menos 12 BMPs (incluindo as relatadas na família GDF – Fator de crescimento e diferenciação) têm sido clonadas, e estão divididas em distintos subgrupos. As proteínas *BMP-4* e *-2* apresentam função sinalizadora no epitélio-mesênquima durante a organogênese (VAINIO *et al.*, 1993); *BMP-4* e *-7* participam da formação do tubo neural (HOGAN, 1996). MABIE *et al.* (1999) identificaram a atuação de BMPs no desenvolvimento do sistema nervoso periférico promovendo a diferenciação do precursor neuronal do cordão espinhal e córtex cerebral. As BMPs parecem participar da interação célula-célula durante o desenvolvimento de vários órgãos e estruturas (BITGOOD & MACMAHON, 1995). A proteína *BMP-2* guarda uma homologia de 95% com a *BMP-4*, mas 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).

### 2.3 *BMP-4* e a embriogênese dental

No início do desenvolvimento dentário do embrião de camundongo, no décimo dia, o *BMP-4* transcrito já pode ser detectado no epitélio (ABERG *et al.*, 1997), e passa a atuar no mesênquima no dia seguinte. No E11.5, com a formação da lâmina dental, o primeiro sinal morfofisiológico de desenvolvimento dentário aparece como um espessamento do epitélio dental. É possível ainda perceber a expressão de alguns genes e fatores de crescimento no epitélio dental como o FGF8 e 9, *BMP-2*, 4 e 7, Shh, Wnt10a e 10b (para a observação da expressão destes e outros genes no desenvolvimento dental consulte o site <http://bite-it.helsinki.fi>). Esta sinalização molecular no epitélio é responsável pela indução da expressão dos genes no adjacente mesênquima dental, incluindo *MSX1* e *MSX2*, *Lef1*, *Dlx1*, *Dlx2*, Patched (Ptc), Gli I e II (revisões abrangentes sobre este assunto foram publicadas recentemente por JERVALL & THESLEFF, 2000, e STOCK, 2001). MINA & KOLLAR, em 1987, realizaram uma recombinação destes tecidos e mostraram que o potencial de desenvolvimento dentário reside no epitélio dental neste estágio. Nesta fase, o *BMP-4* atua tanto no epitélio como no mesênquima até a fase de botão, quando passa a atuar exclusivamente no mesênquima (ABERG *et al.*, 1997).

A fase seguinte é denominada de botão, no E12.5 – 13.5, onde o espessamento do epitélio dental invagina para o subjacente mesênquima para formar o botão dental por condensação das células mesenquimais (ZHAO *et al.*,

2000) e apresenta *BMP-4* condensado no mesênquima em torno do epitélio do botão, estando mais concentrado em sua face bucal. A expressão do *BMP-4* passa do epitélio para o mesênquima neste estágio provavelmente pela influência do mesênquima sobre o epitélio (VAINIO *et al.*, 1993). Esta troca de expressão do *BMP-4* está associada com a mudança do potencial de desenvolvimento dentário do epitélio para o mesênquima quando este inicia sua atuação sobre a odontogênese (MINA & KOLLAR, 1987).

Após este estágio, segue a fase de capuz, onde uma intensa expressão continua na papila dental mesenquimal e reaparece no epitélio na porção distal do órgão do esmalte. A proliferação de células diferenciadas do epitélio dental causa a formação das cúspides dos dentes. Moléculas de Shh, *BMP-2*, 4 e 7, FGF4 e 9 são expressas nesta fase (ZHAO *et al.*, 2000).

Por último, na fase de sino, a expressão do *BMP-4* desaparece do epitélio dental com a remoção do órgão do esmalte e parece ter atuação nas cúspides da papila dental incluindo a camada de células pré-odontoblásticas. A região central da papila revela pouca ou nenhuma expressão (ABERG *et al.*, 1997).

## 2.4 Outros genes envolvidos na odontogênese

O desenvolvimento dos dentes envolve uma série de interações entre o epitélio e o mesênquima subjacente. Esta interação é desempenhada por várias moléculas cuja função vem sendo estudada nos últimos anos.

A expressão combinada de membros de grupos da família de genes homeóticos (genes *Hox*) reguladores desempenha 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 camundongos consiste de três membros cromossomicamente não ligados. Nos humanos existem os genes *MSX1* e *MSX2*, que também se localizam em cromossomos diferentes. O gene *MSX1* pertence a um grupo de genes altamente conservados dentro da escala evolutiva, incluído em

uma grande família chamada de genes homeóticos (genes *Hox*) (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 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 epitélio-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).

Experimentos realizados em 1994, por SATOKATA & MAAS, com ratos transgênicos, em que o gene *Msx1* foi tornado não-funcional, geraram animais com palato fendido e anodontia completa, 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. Esse dado foi comprovado por um outro experimento com ratos transgênicos (THESLEFF, 1996) 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 partir desses estudos (SATOKATA & MAAS, 1994; MAAS & BEI, 1997; THESLEFF, 1996), 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 se expressa principalmente nos estágios 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.

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 estágios 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).

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

estritamente 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 estágios iniciais da odontogênese de molares (até à 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). Recentemente também foi mostrado que a mutação no gene *PAX9* está associada com a oligodontia em humanos, afetando principalmente os dentes posteriores da dentição permanente (STOCKTON *et al.* 2000).

A família FGF dos fatores de crescimento 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 (CHEN *et al.*, 1996). Portanto, moléculas de sinalização como TGF- $\beta$  e FGF não estão freqüentemente difusas no mesênquima dental; ao invés disso, muitas vezes estão interagindo com moléculas da matriz extracelular. Os processos regulatórios envolvidos na odontogênese são extremamente complexos, envolvendo muitos fatores de transcrição, fatores de crescimento e componentes



da matriz extracelular, de maneira que muitos estudos ainda se fazem necessários para a completa compreensão de sua função (BEI & MAAS, 1998).

Outro fator de transcrição pertencente à família homeobox é o gene *Lef-1*. Este fator é expresso no mesênquima dental e no epitélio durante o estágio de botão. A expressão deste gene parece ser essencial para o crescimento do epitélio dental. Em camundongos "knockout", nos quais este gene foi deletado, a odontogênese é bloqueada na fase de botão resultando em agenesia de todos os dentes. Experimentos com camundongos "knockout" mostraram que a deleção de outros genes como a activina e genes *Gli1* e *Gli2* também causa agenesia dental e, portanto, tais genes estão envolvidos na odontogênese (PETERS & BAILING, 1999).

### 3 . PROPOSIÇÃO

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 parecem ser freqüentes, e que estas variações são responsáveis por características fenotípicas individuais. E ainda, polimorfismos genéticos em regiões promotoras estão correlacionados a suscetibilidade a processos patológicos como câncer (DUNLEAVEY *et al.*, 2000), doença coronária arterial em homens (HUMPHRIES *et al.*, 1998) e lúpus 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 modificações que levaram à diferenciação das espécies durante a evolução são resultantes de alterações sutis que ocorreram durante a embriogênese. Deste modo, 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. Sendo assim, 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 trabalho será estudar a região promotora do gene *BMP-4* para a identificação de possíveis polimorfismos genéticos, assim como correlacionar tais polimorfismos com a agenesia dental em humanos pelos métodos de Sequenciamento automático, RFLP-PCR e Heteroduplex.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

A casuística foi composta pelo DNA genômico de 50 indivíduos (não aparentados) portadores de agenesia dental principalmente de terceiros molares, segundos pré-molares e incisivos laterais superiores (tabela 1), e de 50 indivíduos normais. Os indivíduos eram de ambos os sexos e de idades entre 11 e 50 anos. Indivíduos portadores de síndromes, malformações de qualquer natureza ou com formas mendelianas de agenesia dental foram excluídos deste estudo. Pacientes que não apresentavam agenesia dental foram selecionados entre alunos de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, que porventura quisessem colaborar com o estudo.

É importante ressaltar que se quis aqui avaliar o risco conferido por polimorfismos genéticos. Não se excluíram pacientes pertencentes a qualquer grupo étnico-racial, pois a tentativa de se isolar determinadas características raciais é de pouco valor em um país altamente miscigenado racialmente.

Todos os indivíduos assinaram um termo de participação na pesquisa de acordo com as normas do Comitê de Ética desta Instituição, o qual requereu (dentre outros): A) descrição das medidas para a proteção ou minimização de qualquer risco eventual; B) descrição dos procedimentos para o monitoramento da coleta de dados para prover a segurança dos indivíduos, incluindo as medidas de

proteção à confidencialidade; C) previsão de ressarcimento de gastos aos sujeitos da pesquisa.

Tabela 1. Distribuição da amostra de indivíduos agênicos, de acordo com idade, sexo e elemento dental indicativo de agenesia.

Amostra	Idade	Sexo	Agenesia	Amostra	Idade	Sexo	Agenesia
1	25	F	18/28	26	20	F	12/18/28/48
2	25	M	15/28	27	20	F	32/42
3	27	F	38/48	28	20	M	12/22
4	24	M	31/41	29	20	F	18/28/38/48/35
5	18	F	12/22	30	20	F	12/22
6	14	F	34/35	31	20	F	15/25
7	12	M	15/25/35/45	32	22	F	18/28
8	17	M	32	33	28	F	17/47/28/38/48
9	18	F	35	34	23	F	12/22
10	18	F	28/38/48	35	21	F	45
11	18	M	48	36	25	F	28/38/48
12	18	F	18/28	37	22	F	13/23
13	18	F	38/48/45	38	31	M	18/28/38/48
14	18	F	28/38/48	39	20	F	38/48
15	18	M	42	40	30	F	38
16	18	F	25	41	23	M	18/28/38/48
17	18	F	18/28/38/48	42	20	F	48
18	11	F	12/22/31/32/41/42	43	18	F	18/28/48
19	21	F	12/22	44	19	F	18
20	18	M	12/22	45	22	F	18/28
21	50	F	12/22	46	27	M	18/28/38/48
22	29	M	12/22	47	23	F	12/22
23	25	F	12/22	48	21	F	18/28/38/48
24	18	F	12/22	49	21	F	18/28/38/48
25	27	M	18/38/48/12/22	50	21	M	18/28/14/24

## 4.2 Obtenção do DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de bochecho, por cerca de 2 min, de solução de glicose a 3% autoclavada (5 mL). Essa concentração foi escolhida para que as células fossem mantidas intactas, diminuindo o índice de degradação molecular, através da liberação das enzimas catalíticas. Além disto, 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 estas células.

Cada solução bochechada foi então imediatamente centrifugada por 10 min a 2.000 rpm (raio da centrifuga de 15 cm). Ao precipitado de material celular foram acrescentados 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%. A solução foi homogeneizada e armazenada a -20°C até o momento de extração do DNA.

## 4.3 Extração do DNA

Depois de descongeladas, as amostras em tampão de extração foram incubadas a 37°C com 100 ng/ml de proteinase K (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), sob agitação constante durante 16 h. Tal procedimento é necessário para desnaturar as proteínas antes de proceder a extração do DNA. A purificação do DNA genômico foi feita pela extração com mistura de fenol equilibrado, clorofórmio e álcool isoamílico (25: 24: 1) (MANIATIS *et al.*, 1989), seguido de

banho com clorofórmio. A seguir, o DNA foi precipitado adicionando-se 1/10 (v/v) de acetato de sódio 3,0 M (pH 5,2) mais o dobro do volume de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi ressuspenso em 60  $\mu$ L 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 OD<sup>260</sup> e o índice de pureza estimado pela razão OD<sup>260</sup>/OD<sup>280</sup>, com o auxílio de um espectrofotômetro (*GeneQuant RNA/DNA Calculator – Pharmacia Biotech*). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

#### **4.4 Amplificação da região promotora do gene *BMP4* por PCR (Reação em Cadeia da *Taq* DNA Polimerase)**

Os *Primers* utilizados para amplificar a região promotora do gene *BMP4* foram:

**5' CGGATGCCACACTCACCTAGCTTC 3' (primer Forward)**

**5' AGTGAGCTCATTACTGGGTCTACC 3' (primer Reverse)**

Estes primers amplificaram um fragmento de 744 pares de bases que compreendem 632 pares de base da região 5' e 112 pares de base do primeiro exon do gene. Para as reações de PCR foram utilizadas quantidades aproximadas de 500 ng de DNA num volume de 50  $\mu$ L, contendo Tris.Cl a 10 mM (pH 8,3), KCl

a 50 mM, 0.5 U de *Taq* DNA Polimerase (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) e 5  $\mu$ L de cada *primer*. O DNA genômico de cada amostra foi desnaturado a 95°C por 6 min e submetido a 35 ciclos de 95°C por 1 min, 68°C (para os *primers BMP-4*), 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)*.

Às reações de PCR foi acrescido o método de "Hot Start" que consiste em aplicar a enzima *Taq* polimerase um minuto após o início da reação em temperatura de 95° C. Acredita-se que, por esta técnica, é possível otimizar a reação da enzima, pois nesta situação, a fita de DNA já está aberta.

#### 4.5 Eletroforese das amostras

As seqüências amplificadas foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 7.5%. O volume de DNA aplicado em gel era de 4  $\mu$ L, acrescidos de 3  $\mu$ L de tampão carreador (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30%). Foi utilizado como padrão o marcador de massa molecular  $\phi$ X174-RF *Hae III* (0.5  $\mu$ L em 2.5  $\mu$ L de tampão carreador e 5  $\mu$ L de água). 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 duas horas em média. Os géis



foram corados pela técnica do nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987) e fotografados pelo sistema de documentação digital (MAVICA – SONY).

#### **4.6 Purificação dos produtos amplificados por PCR para análise de sequenciamento automático:**

Selecionou-se vinte pacientes cujas amostras apresentaram boa qualidade na reação de PCR, sendo dez para o grupo controle e dez do grupo com agenesia dental. Os produtos amplificados destes pacientes pelos *Primers BMP-4* passaram por um processo de purificação para retirada de segmentos amplificados não específicos, assim como de reagentes da PCR que provavelmente estariam em excesso. As bandas amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% e coradas com Brometo de Etídio a 5 µg/ml. As bandas de interesse foram excisadas e o DNA foi extraído do gel utilizando o *GFX™ 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.

#### **4.7 Seqüenciamento automático**

Para cada amostra foi feita uma reação de PCR contendo aproximadamente 100 ng de DNA, 2 µL de *primer* (apenas um do par), 4 µL de

tampão carreador (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30%), 4  $\mu$ L do *Big Dye Terminator Kit* (Perkin Elmer) e água Milli-Q para o volume final de 20  $\mu$ L. A suspensão foi desnaturada a 95°C por 6 min e submetido a 35 ciclos de 95°C por 1 min, 68°C (para o *primer R BMP4*), por 1 min, 72°C por 1 min; finalizando a reação com uma extensão final na mesma temperatura por 7 min. A reação de PCR foi feita utilizando o método de “Hot Start”. 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 pelo etanol a 70%, para retirar o excedente de dNTPs marcados e *primer*. O precipitado foi então submetido à 40°C por 5 min para volatilização de resquícios de etanol. Para ressuspensão do precipitado foram utilizados 6  $\mu$ L de tampão carreador de DNA constituído por 5  $\mu$ L de formamida deionizada mais 1  $\mu$ L 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  $\mu$ L foi aplicado no gel de seqüenciamento. Esse gel é 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*<sup>TM</sup>, sendo as seqüências obtidas (cerca de 390 pb) processadas pelo programa *Sequencing Analysis*.

#### 4.8 Polimorfismo por comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)

A seqüência amplificada, produto da PCR dos 80 pacientes restantes, foi submetida à digestão com enzimas de restrição para análise de RFLP, da forma descrita abaixo:

*Hha I* (GCG↓C) – 3,0 µl de DNA amplificado eram adicionados a 1,5 µl de tampão *one-phor-all* 10X (Tris-acetato a 20 mM, pH 7.5, acetato de magnésio a 20 mM e acetato de potássio a 100 mM – *Pharmacia – Biotech*), contendo 2 U da enzima (0,2 µl). As amostras eram colocadas em estufa a 37°C por pelo menos 5h, para garantia de uma boa digestão, apesar de que em uma hora já se pode obter resultados.

*Rsa I* (GT↓AC) – 3,0 µl de DNA amplificado eram adicionados a 1,5 µl de tampão *one-phor-all* 2X (Tris-acetato a 20 mM, pH 7.5, acetato de magnésio a 20 mM e acetato de potássio a 100 mM – *Pharmacia – Biotech*), contendo 2 U da enzima (0,2 µl). As amostras eram colocadas em estufa a 37°C por pelo menos 5h, para garantia de uma boa digestão.

*Hpa I* (C↓CGG) – 3,0 µl de DNA amplificado eram adicionados a 1,5 µl de tampão *one-phor-all* 2X (Tris-acetato a 20 mM, pH 7.5, acetato de magnésio a 20 mM e acetato de potássio a 100 mM – *Pharmacia – Biotech*), contendo 2U da enzima (0,2 µl). As amostras eram colocadas em estufa a 37°C por 5h.

*Mnl I* (CCGG↓n7) – 6,0 µl de DNA amplificado eram adicionados a 1,0 µl de BSA e 2,0 µl de tampão carreador (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30%), contendo 2 U da enzima (0,4 µl) . As amostras eram colocadas em estufa a 37°C por pelo menos 5h. A justificativa de sua escolha é que sua seqüência de corte correspondia à região de um suposto polimorfismo encontrado no seqüenciamento.

#### **4.9 Técnica de HETERODUPLEX, utilizada para análise de polimorfismo**

A técnica de heteroduplex foi empregada para as amostras digeridas pelas enzimas *Hha I*, *Hpa II*, *Rsa I* e *Mnl I*. Ao volume total da digestão, foi acrescido tampão carreador em uma proporção de 4:1 (produto da digestão: tampão carreador), sendo, portanto, de 5 µl. O conteúdo do eppendorf foi desnaturado a 95°C por 10 min e resfriado a 0°C imediatamente. As amostras foram então 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 20 mA. Os géis foram corados pela técnica de nitrato de prata (BLUM *et al*, 1987), e fotografados pelo sistema de documentação digital (MAVICA – SONY) (figura 4).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Obtenção do DNA

A quantidade de DNA extraída foi variável entre as diferentes amostras. Esta quantidade variou de 50 a 1100 ng/ $\mu$ L. O índice de pureza estimado em densidade ótica pela razão  $OD^{260}/OD^{280}$  esteve em torno de 1.5 para todas as amostras, o que foi considerado suficientemente puro para as reações de PCR. Estes resultados podem ser observados nas tabelas 2 e 3.

Alguns DNAs não apresentaram amplificação, o que pode ser evidenciado pela figura 1, porém foram submetidos a processo de reextração e revelaram resultados positivos em uma segunda tentativa, o que não aconteceu com o DNA do paciente 39. A amostra 39 do grupo controle não pôde ser utilizada devido à impossibilidade de realizar a reação de amplificação, sugerindo más condições de extração (DNA parcialmente degradado, co-precipitação de proteínas inibidoras).

Tabela 2. Leitura em espectrofotômetro do grau de pureza e da quantidade do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa jugal de pacientes com agenesia.

Amostra	OD 260/OD 280	[ ] em ng/ $\mu$ L	Amostra	OD 260/OD 280	[ ] em ng/ $\mu$ L
01	1,8	1,7	26	2,1	1,1
02	1,8	7,5	27	2,0	0,5
03	1,8	1,9	28	1,9	1,1
04	1,8	5,7	29	1,9	1,0
05	1,5	2,5	30	2,2	0,7
06	1,9	2,0	31	3,0	1,0
07	1,9	9,3	32	1,8	1,8
08	1,4	3,3	33	1,6	11,0
09	2,1	1,0	34	0,6	0,6
10	2,2	1,4	35	1,3	6,8
11	2,0	1,0	36	1,5	1,6
12	2,0	0,9	37	1,4	1,4
13	2,0	1,1	38	1,6	2,1
14	2,2	1,2	39	1,2	1,4
15	1,7	1,0	40	1,7	3,9
16	2,2	0,9	41	1,5	6,3
17	2,1	4,6	42	1,4	3,3
18	2,1	0,8	43	1,6	6,5
19	4,0	0,9	44	1,4	1,4
20	2,3	3,9	45	1,1	0,8
21	2,2	3,1	46	1,6	9,3
22	1,9	1,0	47	1,4	1,3
23	1,7	3,8	48	1,4	2,2
24	1,9	1,7	49	1,4	2,4
25	2,3	1,7	50	1,6	9,8

Tabela 3. Leitura em espectrofotômetro do grau de pureza e da quantidade do DNA genômico extraído a partir de células da mucosa jugal de pacientes sem agenesia (controle).

Amostra	OD 260/OD 280	[ ] em ng/ $\mu$ l	Amostra	OD 260/OD 280	[ ] em ng/ $\mu$ l
01	1,5	2,4	26	1,9	5,5
02	2,0	1,2	27	2,6	1,3
03	1,8	2,4	28	4,7	2,6
04	1,8	2,2	29	2,1	2,3
05	2,2	0,5	30	1,3	1,7
06	1,7	2,6	31	1,2	1,6
07	1,9	1,9	32	0,7	0,3
08	1,9	1,1	33	1,1	1,2
09	2,0	1,3	34	1,4	3,7
10	1,9	1,5	35	1,6	8,1
11	1,9	1,2	36	1,4	4,9
12	1,8	2,2	37	0,7	0,4
13	2,1	1,5	38	1,6	4,7
14	1,9	2,2	39	-	-
15	1,8	1,8	40	1,4	2,3
16	1,9	1,4	41	1,5	10,3
17	2,0	0,9	42	1,2	1,4
18	1,8	1,4	43	1,6	12,8
19	1,6	0,7	44	1,6	6,5
20	2,0	2,0	45	1,6	7,7
21	2,0	3,0	46	1,5	5,1
22	1,9	2,6	47	1,6	6,3
23	1,9	3,5	48	1,6	9,4
24	2,0	3,9	49	1,5	7,8
25	1,9	1,4	50	1,6	9,8

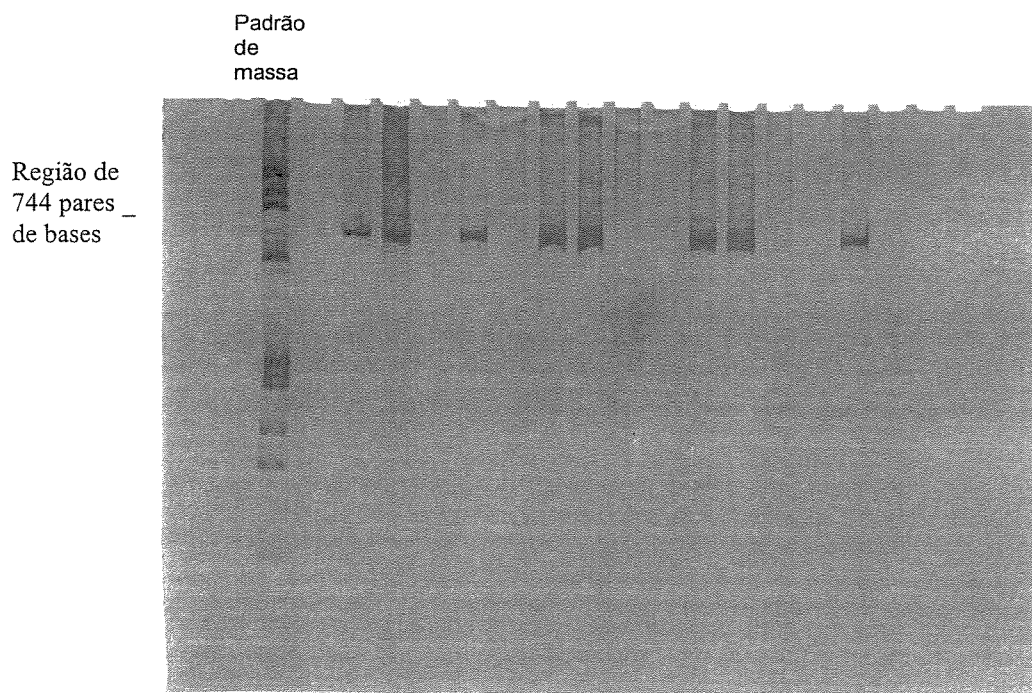


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 7.5% indicativa da amplificação dos segmentos do gene *BMP-4* após o primeiro processo de extração do DNA.

## 5.2 Amplificação dos segmentos do gene *BMP-4* por PCR

A amplificação dos segmentos do gene *BMP-4* obteve 99% de sucesso tanto para indivíduos com agenesia dental como para o grupo controle. A sequência de 744 pares de bases amplificada pode ser observada na figura 2.



Padrão  
de massa

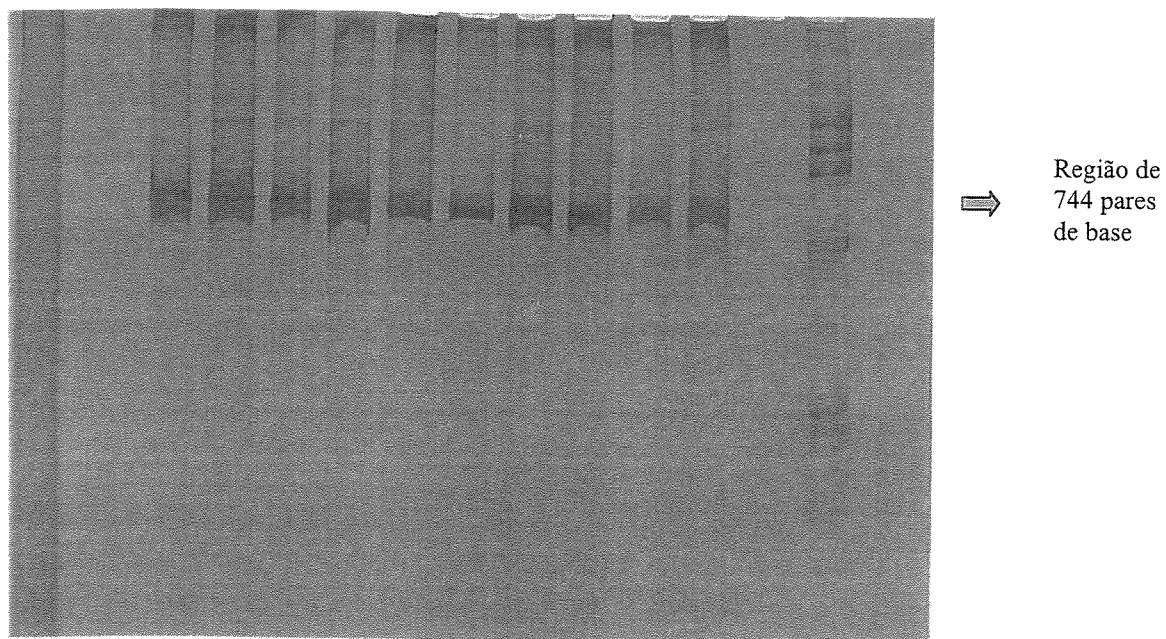


Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 7.5% indicativa do sucesso do processo de reextração dos DNAs.

### 5.3 Purificação das amostras

Os produtos do PCR que foram purificados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio apresentaram excelente quantidade de DNA e foram utilizados para as reações de seqüenciamento automático.

#### 5.4 Seqüenciamento automático

A partir da seqüência consenso obtida pelo programa *Sequencher*<sup>TM</sup>, a comparação com o *GenBank* confirmou serem as amostras seqüenciadas pertencentes à região promotora do gene *BMP-4*.

Todas as seqüências foram alinhadas e analisadas pelo programa *Clustalw* ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)), por meio do qual foi detectado polimorfismo na base -40 do gene em seis pacientes, sendo 3 do grupo controle e três do grupo com agenesia (Figura 3).

A técnica para análise do polimorfismo por seqüenciamento automático foi realizada apenas em 20 (vinte) pacientes, sendo encontrada uma região de polimorfismo no gene. O achado foi considerado conclusivo e optou-se por analisar as amostras restantes (outros 80 indivíduos) com utilização de enzimas de restrição.

DNA	Região seqüenciada	Base - 40	Seqüência das bases	Nº de bases
02.	30_419	-----	CTCCTTCCCTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	52
20.	22_526	GCTCCGCGCTCCTTCCCTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	60	
04.	45_294	-----	CCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	42
13.	42_336	-----	CCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	42
07.	34_357	-----	TCCTTCCCTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
11.	34_459	-----	TCCTTCCCTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
15.	32_469	-----	TCCTTCCCTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
17.	32_501	-----	TCCTTCCCTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
09.	33_520	-----	TCCTTCCCTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
19.	32_524	-----	TCCTTCCCTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
06.	43_468	-----	CTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	40
16.	44_411	-----	CTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	40
18.	33_498	-----	CCTTCCCTTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	50
10.	33_500	-----	CCTTCCCTTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	50
08.	30_506	-----	TCCTTCCCTTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
14.	30_508	-----	TCCTTCCCTTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
03.	32_399	-----	TCCTTCCCTTCCCTCCCTCCTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	51
12.	34_291	-----	CTTCCCTTCCCTCCCTACTCCTCTGCCTTCTCGCATCTTCCTTCCTCCTC	49
05.	01_301	-----	CTCCTC	6

Figura 3: Sequenciamento automático demonstrando polimorfismo na base -40 nos pacientes 18, 14 e 12 (grupo controle) e 10, 08 e 03 (grupo com agenesia).

### 5.5 Heteroduplex

Os segmentos amplificados pelo *primer BMP-4* foram submetidos à técnica de heteroduplex, a qual revelou padrão semelhante de bandas, ou seja, não houve indicação de qualquer polimorfismo ou mutação na amostra (figura 4).

## 5.6 Análise de RFLP

A seqüência amplificada dos pacientes que apresentaram ou não agenesia dental, foi submetida à digestão com enzimas de restrição Hha I, Hpa II, Rsa I e Mnl I.

A digestão com as enzimas Hha I, Rsa I, Hpa II, e Mnl I não acusou polimorfismo na região promotora do gene *BMP-4* (Figura 4).

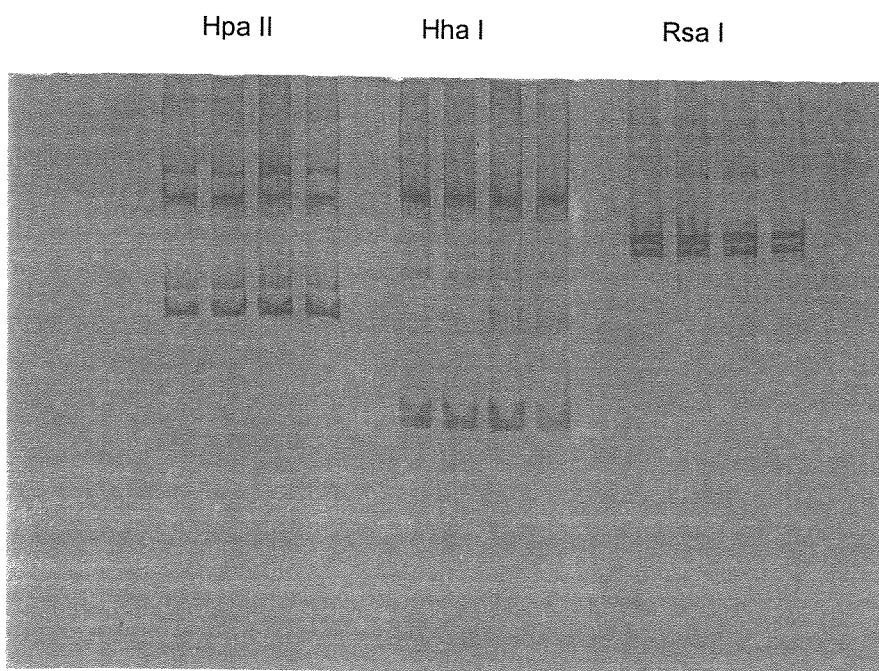


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% indicativa da digestão do DNA pelas enzimas da técnica de RFLP. É importante observar que a técnica de Heteroduplex também foi aplicada nesta mesma ocasião.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Obtenção do DNA

Os processos de amplificação e seqüenciamento no estudo de polimorfismos genéticos requerem DNA genômico em quantidade e nível de pureza satisfatórios para o sucesso das reações.

Suficientes índices foram obtidos neste trabalho, o que pode ser atribuído aos três banhos da mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (modificado de MANIATIS *et al.*, 1989, que indicam dois banhos); e também ao processo de reextração das amostras a fim de otimizar a qualidade do DNA genômico extraído. A variabilidade entre as quantidades de DNA e dos diversos índices de pureza (tabelas 2 e 3) pode ser devida às diferentes taxas de descamação da mucosa, ao vigor com que o bochecho era executado, e até mesmo à 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, livre de contaminação com proteínas ou fenol (MANIATIS *et al.*, 1989). Algumas amostras de DNA utilizadas neste trabalho apresentam índice de pureza inferior a 1,8; no entanto, não foram desprezadas e se prestaram às finalidades de amplificação e até mesmo de 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. Vale destacar a importância da extração adicional por fenol/clorofórmio (quarta extração) das amostras que inicialmente não renderam produtos nas reações de PCR.

## 6.2 Amplificação dos segmentos do gene *BMP-4* por PCR

A figura 1 demonstra algumas variações nos níveis de amplificação (diferença de tonalidade entre as bandas), e até mesmo amostras que não amplificaram, apesar de terem sido todas submetidas às mesmas reações de PCR.

Modificações no protocolo inicial são indicadas a fim de se obter homogeneidade nos resultados, sendo assim, mudanças nas concentrações dos componentes da reação foram executadas isoladamente, tendo-se o cuidado, inclusive, de se adicionar  $MgCl_2$  [1,5 mM], [2,5 mM] e [4,0 mM] às reações, tendo-se obtido sempre a mesma diferença entre as bandas.

Um ponto importante observado foi a adoção de quantidades de 450 ng de DNA genômico para todas as amostras. Novamente é destacada a importância da reextração das amostras, o que sem dúvida foi o principal motivo do sucesso nesta etapa.

### 6.3 Purificação dos produtos amplificados por PCR

Para uma confiável análise de polimorfismo nos segmentos amplificados, é necessário purificar os produtos da PCR. O processo de reação de amplificação pode revelar bandas não específicas, e a técnica do seqüenciamento automático necessita de DNA de boa qualidade, ou seja, sem contaminantes, ou seqüências inespecíficas.

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 desta reação 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, e 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 e são seqüenciados, gerando um resultado falso (SCAREL, 2000).

#### **6.4 Seqüenciamento automático**

Esta 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 um produto de PCR. No seqüenciamento a partir de um 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 polimorfismo relatado na base -40 da região seqüenciada não foi considerado conclusivo por se tratar de uma região de baixa qualidade para leitura do programa de sequenciamento em todos os seis pacientes que apresentaram tal alteração. Além disto, deve-se considerar que a alteração de base ocorreu tanto em 3 pacientes do grupo controle como em três pacientes com agenesia, não determinando assim relação direta com a manifestação da patologia. Diante desta situação, optou-se por análise de polimorfismo com enzimas de restrição para o restante dos pacientes.



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

A RFLP-PCR é útil em uma análise preliminar na busca de polimorfismos, principalmente na investigação de grandes seqüências. Existem, no entanto, limitações técnicas em termos de resolução na observação dos resultados. Por exemplo, se o sítio de reconhecimento da enzima se encontrar nas extremidades ou se sítios de restrição estiverem muito próximos e houver mutação, não há discriminação suficiente para a precisa interpretação do que realmente está ocorrendo em nível molecular. Além disto, mesmo que se utilize um número considerável de enzimas de restrição, as seqüências reconhecidas por estas, na maior parte das vezes, perfazem apenas uma porcentagem pequena de todo o segmento estudado (TREVILATTO, 1999).

No caso do uso da enzima Mnl I, utilizada para identificação do sítio polimórfico detectado na técnica de sequenciamento, acredita-se que não houve diferenças entre os pacientes devido à existência de uma seqüência de restrição idêntica à procurada iniciando na base -41, ou seja, possivelmente mascarando qualquer possível alteração.

## 6.6 Técnica de análise com Heteroduplex

Esta técnica permite que as duplas fitas de DNA desnaturadas renaturem-se à temperatura ambiente para que, quando submetidas à 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). É importante observar que a técnica de análise heteroduplex não substitui o seqüenciamento, pois somente esta última técnica identifica o polimorfismo (ou mutação), pois demonstra qual a base (ou seqüência) que se mostra alterada.

Neste trabalho, foi associada esta técnica à análise com RFLP nas mesmas amostras; com e sem heteroduplex. Os resultados foram os mesmos, não evidenciando assim nenhum tipo de alteração com indivíduos heterozigotos para o *BMP-4* e a agenesia dental (figura 4).

## 6.7 *BMP-4* e a agenesia dental

A inexistência de alterações na seqüência da região promotora do gene *BMP-4* reforça a idéia de que outros genes estão implicados na odontogênese. Portanto, alterações na seqüência destes genes não estudados neste trabalho, seria a causa genética da hipodontia nos indivíduos abordados.

Os voluntários com hipodontia, que participaram do estudo tema desta tese, não eram aparentados e apresentavam padrão heterogêneo de dentes ausentes (tabela 1). A mutação não foi evidenciada, possivelmente porque a agenesia dental é determinada por vários genes com penetrância incompleta e expressividade variável. Além disto, 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 (SCAREL, 2000)

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 serão 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 (SCAREL, 2000). 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 (terceiro molar) pode ser vista como um processo evolutivo, onde o gene *BMP-4* seria uma das moléculas mais relacionadas com 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 um provável papel que interações gene-ambiente tenham desempenhado ao longo do processo (MACHO & MOGGI-CECCHI, 1992).

## 7. CONCLUSÕES

1. A extração do DNA a partir de células descamadas da mucosa jugal é um método simples, de baixo custo e inofensivo ao paciente, e que permite obtenção de um material intacto e de boa qualidade para técnicas de biologia molecular, como no caso, a pesquisa de existência de polimorfismos genéticos.

2. Não foi detectado polimorfismo significativo na região promotora do gene *BMP-4*, tanto com as técnicas de seqüenciamento, heteroduplex e RFLP-PCR.

3. Sugere-se então que polimorfismos presentes em outros genes ligados à odontogênese ou em outras regiões do gene *BMP-4* estejam relacionados à agenesia dental em humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERG, T., WOZNEY, J., THESLEFF, I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (*Bmps*) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. **Developmental Dynamics**, n.210, p.383-396, 1997.
- BEI, M., MAAS, R. FGFs and BMP4 induce both *Msx1*-independent and *Msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. **Development** n. 125, p. 4325-4333, 1998.
- 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.
- BITGOOD, M.J., MACMAHON, A.P. Hedgehog and BMP genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interactions in the mouse embryo. **Developmental Biology**, n.172, p.126-138, 1995.
- CHEN, Y. *et al.* *Msx1* controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. **Development**, n. 122, p. 3035-3044, 1996.
- 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.

GORLIN, R.J., GOLDMAN, H.M. **Patologia oral**. 2ª ed, Barcelona, Salvat Editores AS, 1980.

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

HOGAN, B.L. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. **Genes Dev**. n.10, p.1580-1594, 1996.

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.

JERWALL, J., THESLEFF, I., Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. **Mechanisms of Development**, n.92, p.19-29, 2000.

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

- 
- LINE, S.R.P. Molecular morphogenetic fields in the development of human dentition. **J Theoret Biol** 2001 (no prelo).
- MAAS, R., BEI, M. The genetic control of early tooth development. **Crit Ver Oral Biol Med**, v.8, n.1, p.04-39, 1997.
- MABIE, P.C., MEHLER, M.F., KESSLER, J.A. Multiple roles of Bone Morphogenetic Protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. **The Journal of Neuroscience**, n.19, v.16, p.7077-7088, 1999.
- 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. 2<sup>nd</sup> Edition. USA: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545p.

MINA, M., KOLLAR, E.J. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. **Arch. Oral. Biol.**, v.32, n.2, p.123-127, 1987.

NEVILLE, B.W. *et al* **Patologia Oral e Maxofacial**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1998.

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. **Nature Genet**, v.6, p.348-356, 1994.

SCAREL, R. M. **Análise de polimorfismo no gene MSX1 em indivíduos com agenesia dental**. Piracicaba 2000. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

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

SHAHER, W.G., HINE, M.K., LEVY, B.M. **Tratado de patologia bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1987. p.41-42.

---

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

STOCK D.W., The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. **Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B- Biological Sciences.** 356: (1414) 1633-1653 Oct 29 2001.

STOCKTON, D.W. *et al.* Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. **Nature Genet.** V. 24, p. 18-19, 2000.

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.

TREVILATTO, P.C. **Análise de polimorfismo do gene da amelogenina X.** Piracicaba 1999. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

VAINIO S., *et al.* Identification of BMP-4 as a Signal Mediating Secondary Induction between Epithelial and Mesenchymal Tissues during Early Tooth Development. **Cell** v. 75, p. 45-58, October 8, 1993.

VAN DEN BOOGAARD, M.-J.H. *et al.* *MSX1* mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. **Nature Genetics**, v. 24, p. 342-343, 2000.

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

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

ZHAO, X. *et al*, Transgenically ectopic expression of BMP-4 to the *MSXL* mutant dental mesenchyme restores downstream gene expression but represses *Shh* and *Bmp2* in the enamel knot of wild type tooth germ. **Mechanisms of Development** n.99, p.29-38, 2000.