

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS

**ANÁLISE DE GENE RELACIONADOS À FORMAÇÃO
DO ESMALTE DENTAL EM FAMÍLIAS COM
AMELOGÊNESE IMPERFEITA**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do
Título de Doutora em Biologia Buco-Dental
Orientador: Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line

Piracicaba 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Sa59a

Santos, Maria Cristina Leme Godoy dos.

Análise de gene relacionados à formação do esmalte dental em famílias com amelogenese imperfeita. / Maria Cristina Leme Godoy dos Santos. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientador: Sergio Roberto Peres Line.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Mutação. I. Line, Sergio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Analysis of known gene for enamel development in families with amelogenesis imperfecta

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Mutation

Área de Concentração: Histologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Sergio Roberto Peres Line, Ana Paula de Souza Pardo, Darcy de Oliveira Tosello, Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga, Reginaldo Bruno Gonçalves

Data da Defesa: 15-12-2006

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 15 de Dezembro de 2006, considerou a candidata MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS aprovada.

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

PROFa. DRa. ANA PAULA DE SOUZA PARDO

PROFa. DRa. RAQUEL MANTUANELLI SCAREL CAMINAGA

PROF. DR. REGINALDO BRUNO GONCALVES

PROFa. DRa. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO

DEDICATÓRIA

**Ao meu querido irmão,
Fernando.**

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), na pessoa do diretor pela utilização de suas instalações desde a minha graduação e por tudo o mais que me foi oferecido.

Ao Prof. Dr. **Sergio Roberto Peres Line**, meu mestre e orientador, que me ensina a crescer com paciência, dedicação e carinho. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. **Francisco Haiter Neto**, atual Diretor da FOP-UNICAMP.

Ao Prof. Dr. **Mario Alexandre Coelho Sinhoreti**, Coordenador Geral da Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e a Prof. Dr. **Fausto Bérzin**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pela amizade e prontidão em ajudar.

Ao Prof. Dr. **Pedro Duarte Novaes**, Chefe do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, por ser tão solícito em nos atender a qualquer tempo, e por permitir a utilização dos laboratórios durante o desenvolvimento de nossas pesquisas.

Aos demais professores do Departamento de Morfologia, especialmente a Profa Dra. **Darcy de Oliveira Tosello**, ao Prof. Dr. **José Merzel** e ao Prof. Dr. **Paulo Henrique F. Caria**, o meu muito obrigado pela contínua disponibilidade e simpatia.

Profa. Dra. **Siu Mui Tsai** por possibilitar a realização desse trabalho disponibilizando os equipamentos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP.

Prof. Dr. **Thomas C. Hart** e Profa. Dra. **Suzanne Hart** por possibilitarem a realização de parte desse trabalho no *National Institutes of Health* – NIH/NIDCR e compartilharem preciosos conhecimentos científicos e pessoais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo patrocínio oferecido para execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo patrocínio oferecido para execução de parte deste trabalho no exterior.

Aos voluntários que gentilmente cederam aos apelos da ciência e contribuíram com a coleta de DNA na cessão do material de estudo.

À **Érica, Raquel e Tatiane**, secretárias da Pós-Graduação, pelo auxílio durante todo o curso.

Às funcionárias do Departamento de Morfologia, **Eliene, Cidinha, Suzete, Ivani, Gustavo e Joelma** pela simpatia e ajuda.

Aos amigos do Programa de Biologia Buço-Dental **Cristiane Salmon, Alexandre, Isabel, Cristiane Borges, Daniel, Marco Antonio, Eduardo, Lisa, Fabio, Tiago, Nádia, Juliana, Carol, Gláucia** pelo gostoso convívio do dia a dia. Em especial **Marisi e Marcelo**, amigos de toda vida.

Aos amigos do NIH **Cris, John, Fabiola, Edgar, Claudia, Rô, Manfred, Mook, Jung, Eunzin, Sungkon, Powel**. Em especial a **Ana Paola, Andréia e Michel** pelo carinho que me dedicaram.

Jorge, pela amizade e disposição em auxiliar no inglês.

Aos amigos **Rê, Ramiro, Pimenta e família, Bru e Lu** por poder dividir com vocês minhas alegrias e tristezas.

A **Pri** pela importância que tem em minha vida.

Ao **Fi**, meu amor, por compartilhar de meus sonhos e tornar meu caminhar mais feliz.

Aos meus *avos, tios, tias, primos e primas* por participarem de todos meus passos, a vocês dedico todo meu carinho.

Ao *Tutu*, meu sobrinho, que reina soberano em meu coração.

Aos meus irmãos *Rafa, Deco, Juba e Nando* por serem meus heróis, meus eternos amores.

A *mamãe* e ao *papai* pelo amor com que me guiaram até aqui.

RESUMO

Amelogênese imperfeita (AI) representa um grupo de doenças hereditárias que causa defeito na formação do esmalte dental. Esse distúrbio afeta o esmalte em diferentes intensidades, promovendo desde a deficiência na formação do esmalte até defeitos no conteúdo mineral e protéico. O desenvolvimento do esmalte envolve a expressão de múltiplos genes necessários para controlar o complexo processo de mineralização. Distintos tipos de amelogênese imperfeita apresentam diferentes padrões de herança, incluindo autossômicos dominante, autossômicos recessivo e ligados ao X. Mutações nos genes de proteínas e proteases do esmalte são associadas à AI. O objetivo desse trabalho foi investigar a ocorrência de mutações nos seis principais genes candidatos à AI em duas famílias brasileiras com AI autossômica recessiva e AI ligada ao X. O DNA obtido de cada paciente foi amplificado e seqüenciado para os exons da AMELX, AMBN, ENAM, MMP-20, KLK-4 e Amelotin. Também foi realizada a técnica de genotipagem em regiões conhecidas por conter importantes genes para o desenvolvimento do esmalte. O presente trabalho mostrou que a AI nas duas famílias estudadas não é causada por mutações nos conhecidos *loci* relacionados à AI, nem nos principais genes candidatos propostos na literatura.

Palavras chaves: **amelogênese imperfeita, mutação, esmalte.**

ABSTRACT

Amelogenesis imperfecta (AI) is a genetically heterogeneous group of diseases that result in defective development of tooth enamel. Enamel findings in AI are highly variable, ranging from deficient enamel formation to defects in the mineral and protein content. Enamel formation requires the expression of multiple genes needed to control the complex process of crystal growth and mineralization. Different inheritance patterns such as autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked types have been reported. Mutations in genes coding for enamel structural proteins and proteases have been associated with AI. The object of this study was to evaluate evidence for linkage of the six major candidate *gene* loci in two Brazilian families with AI. DNA was obtained from normal and affected family members and exons of AMELX, AMBN, ENAM, MMP-20, KLK-4 and Amelotin were amplified and sequenced. Each family was evaluated for linkage to chromosome regions known to contain *genes* important in enamel development. The present study indicates that the autosomal recessive and X-linked hypomineralized form of AI in these two families is not caused by any of the known loci for AI or any of the candidate *genes* proposed in the literature.

Keywords: Amelogenesis Imperfecta, mutation, enamel

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA LITERATURA	2
PROPOSIÇÃO.....	14
MATERIAIS E MÉTODO.....	15
RESULTADOS.....	25
DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÕES.....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	48
Anexo 1: Certificado Comitê de Ética em Pesquisa	57
Anexo 2: Lista de artigos extraídos desta tese	58

INTRODUÇÃO

Defeitos na formação do esmalte dental estão entre as alterações mais comuns da dentição humana. Apesar de não compreenderem um problema de saúde pública esses defeitos podem causar alterações estéticas graves, além de comprometerem a estrutura do esmalte dental. As formas severas podem levar à perda precoce do esmalte causando desgaste acentuado com prejuízo da função do órgão dental. Além disso, está bem estabelecida a relação entre os defeitos do esmalte e a cárie dental - o esmalte menos mineralizado ou com superfície irregular pode se tornar mais suscetível ao desenvolvimento da cárie dental (Infante & Gillespie, 1977; Matee *et al.*, 1992; Matee *et al.*, 1994). As hipoplasias são causadas por falhas durante a formação do esmalte dental de origem genética ou por interferência de fatores ambientais. Estas alterações podem causar disfunções no metabolismo dos ameloblastos ou ainda interferir diretamente na matriz do esmalte dental em formação.

Amelogênese imperfeita (AI) é um grupo de doenças hereditárias que causa defeito na formação do esmalte dental. É um distúrbio exclusivamente ectodérmico, uma vez que os componentes mesodérmicos dos dentes encontraram-se basicamente normais (Shafer *et al.*, 1985).

Esse distúrbio, também conhecido como odontogênese imperfeita e displasia hereditária do esmalte, afeta o esmalte em vários graus de intensidade. Sua forma menos intensa consiste em coroas de forma normal, mas com esmalte de pobre qualidade, friável, áspero e com alterações de coloração. Quando severa apresenta um esmalte

hipomineralizado que leva ao desgaste do dente logo que ele emerge na cavidade bucal (Wright *et al.*, 1995), caracterizando-se por coroas das quais se desprendeu parcial ou totalmente o esmalte. Os dentes apresentam coloração amarelo-castanho a castanho escura, como resultado da translucidez do esmalte remanescente e da absorção de pigmentos pela dentina exposta. Devido a uma intensa atividade odontoblástica, causada por estímulos diretos sobre a dentina exposta, os canais radiculares e a câmara pulpar aparecem parcialmente obliterados. O dente, ainda, pode desenvolver hipersensibilidade, particularmente a variações térmicas (Tommasi, 2000).

REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento do órgão dental é um processo complexo que envolve eventos biológicos importantes, como a interação epitélio-mesênquima. A matriz extracelular que origina o esmalte é sintetizada, secretada e organizada por células especializadas do órgão dental chamadas ameloblastos. O desenvolvimento do esmalte é caracterizado por interações complexas entre componentes desta matriz extracelular em fase orgânica, fase mineral e fase aquosa (Simmer & Fincham, 1995). Estas interações ocorrem em três estágios: o **secretório** com deposição de uma matriz orgânica pelos ameloblastos, na qual predominam dois tipos de proteína: a amelogenina, e a enamelina; o **de transição**, em que se inicia a degradação protéica e aumenta muito a fase aquosa da matriz; o **de maturação**, em que há extensa degradação da matriz orgânica e substituição por componente mineral (Bronckers *et al.*, 1995; Shore *et al.*, 1995). No final desse processo o esmalte torna-se o tecido mais duro do organismo (Robinson *et al.*, 1998). Enquanto os outros tecidos

mineralizados como osso, dentina e cimento, possuem em torno de 20% de material orgânico, o esmalte possui menos de 1% de seu peso constituído de material orgânico (Caterina *et al.*, 2002).

Em consequência do desenvolvimento do esmalte ocorrer em diversas etapas, distintos tipos de amelogenese imperfeita podem ser reconhecidos. Pelo menos, quatro tipos diferentes já foram descritos: hipoplásica, hipocalcificada ou hipomineralizada, com hipomaturação e com taurodontismo (Witkop Jr., 1989). Esses tipos de amelogenese imperfeita, ainda, apresentam diferentes padrões de herança, incluindo oito tipos autossômicos dominante, quatro tipos autossômicos recessivo e dois tipos ligados ao X, reorganizando a AI em 14 subtipos (Li *et al.*, 2001).

AMELOGENINA

As principais proteínas envolvidas na formação do esmalte são a amelogenina, ameloblastina e enamelinina. As amelogeninas são um grupo heterogêneo de proteínas que constitui 90% do total de proteínas da matriz no estágio secretório (Termine *et al.*, 1980). As diferenças entre as amelogeninas ocorrem por três razões principais: 1) as cópias do gene que codifica este grupo de proteínas são diferentes. Uma se localiza no cromossomo X e outra, no cromossomo Y, sendo esta última mais curta (Salido *et al.*, 1992); 2) Existem vários mRNAs de amelogeninas que são produzidos por *splicing* alternativo (Lau *et al.*, 1992); 3) Há processamento proteolítico das formas de maior massa molecular (Catalano-Sherman *et al.*, 1993).

A amelogenina é secretada por ameloblastos inicialmente com 25 kDa, mais sua forma estável apresenta 20 kDa e seu acúmulo no estágio secretório indica uma diminuição

na velocidade de sua hidrólise (Robinson *et al.*, 1998). Esse fragmento é clivado em um peptídeo insolúvel da amelogenina rico em tirosina (TRAP) e um fragmento solúvel de 13 kDa (Robinson *et al.*, 1998). A amelogenina é degradada resultando em pequenos peptídeos que formam um esqueleto para a mineralização e para formação dos cristais do esmalte.

Dentre as propriedades físicas das amelogeninas está o fato de serem altamente hidrofóbicas, com exceção de uma porção hidrofílica na região carboxiterminal, a qual é removida rapidamente por proteólise processada por endoproteases e/ou carboxiproteases para formar moléculas intermediárias (Fincham & Moradian-Oldak, 1996). É através desta região hidrofílica que as amelogeninas interagem com os cristais de hidroxiapatita; e é interessante salientar que esta região também é necessária para a inibição do crescimento dos cristais em soluções contendo amelogeninas (Aoba *et al.*, 1987).

Em solução, as amelogeninas formam agregados, as chamadas “nanosferas”. As implicações biológicas destas características poderiam estar relacionadas com a habilidade das amelogeninas de maior massa molecular, organizadas em nanosferas, de interagir com os cristais extremamente finos dos estágios precoces da formação do esmalte e protegê-los de fusões prematuras, além de criar canais de transporte de íons (Fincham *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1998; Fincham *et al.*, 1999).

A localização da amelogenina contendo a região carboxiterminal também é distinta da localização das demais amelogeninas geradas por proteólise, sendo a marcação da porção carboxiterminal restrita aos 40 µm superficiais de esmalte em desenvolvimento (Uchida *et al.*, 1991). Localizações distintas para a amelogenina de maior massa molecular e seus produtos de degradação sugerem funções distintas.

Acredita-se que a amelogenina forma um esqueleto para os cristais do esmalte e participa de seu crescimento (Robinson *et al.*, 1990; Fincham *et al.*, 1992; Simmer & Fincham, 1995); entretanto, permanece desconhecida sua exata função (Hart *et al.*, 2002). O papel fundamental das amelogeninas na mineralização do esmalte pode ainda ser verificado: 1) pelo fato do gene da amelogenina estar alterado nos casos de amelogênese imperfeita ligada ao cromossomo X (Lagerström-Fermer *et al.*, 1995), doença em que há formação de esmalte pouco mineralizado e bastante desorganizado; 2) por resultados de um ensaio que usa uma ribozima sintética para degradar especificamente amelogenina, o qual demonstrou que os animais em que a ribozima foi injetada não desenvolveram dentes com esmalte perfeitamente mineralizado (Lyngstadaas *et al.*, 1995).

A amelogenina é produzida por dois genes AMELX Xq22 e AMELY Yp11 (Salido *et al.*, 1992). Diversas mutações no gene da amelogenina do cromossomo X estão associadas à AI; entretanto, nenhuma mutação no gene do cromossomo Y foi associada à amelogênese imperfeita (Hart *et al.*, 2002).

AMELOBLASTINA

A ameloblastina, também conhecida como amenila, é uma glicoproteína específica do órgão dental expressa por ameloblastos (Fong *et al.*, 1996a). Baixos níveis de ameloblastina são expresso pelo epitélio de Hertwigs (Fong *et al.*, 1996b) e preodontoblastos (Fong *et al.*, 1998). Entretanto, seu papel na formação da dentina e do cemento ainda não foram estabelecidos. Essa proteína é encontrada na porção distal do corpo da célula e próximo ao pólo secretor dos ameloblastos (Mardh *et al.*, 2001). Ela também está presente na junção amelodentinária (MacDougall *et al.*, 2000).

Identificação imunológica da ameloblastina durante o estágio secretório revela que a distribuição desta proteína segue o delineamento dos ameloblastos. A ameloblastina contém um domínio DGEA identificado com sítio de α -2 β -1 integrina (Cerny *et al.*, 1996) e um sítio de adesão celular trombospondina VTKG, sugerindo que a ameloblastina está envolvida na adesão de ameloblastos à matriz extracelular do esmalte (Cerny *et al.*, 1996). Sabe-se que a ameloblastina liga-se especificamente a ameloblastos e inibe a proliferação de células mutantes (Fukumoto *et al.*, 2004).

O gene da ameloblastina está localizado no cromossomo 4, o qual aloja uma região crítica para AI hipoplásica (MacDougall *et al.*, 1997). Recentemente foi reportado que a sobreexpressão de ameloblastina em ratos transgênicos causa alterações no esmalte semelhante à AI (Paine *et al.*, 2003). Por outro lado, em ratos nulos para ameloblastina, o epitélio dental consegue se diferenciar em ameloblastos secretores; entretanto, as células liberadas da superfície da matriz perdem sua polaridade. Mutação no gene da ameloblastina produz uma proliferação e acúmulo de múltiplas camadas de células anormais, não estruturadas e calcificadas. Esses resultados indicam que a ameloblastina é a chave da adesão molecular para a formação do esmalte e sugere um papel importante da ameloblastina na ligação e manutenção dos ameloblastos no estágio secretório (Fukumoto *et al.*, 2004).

ENAMELINA

Enamelina, a maior proteína da matriz extracelular do esmalte, foi inicialmente identificada por Fukae *et al.* (1993). Ela é produzida por ameloblastos, durante o estágio secretório concentrando-se próximo ao processo de Tomes (Fincham *et al.*, 1999). Nível muito baixo de enamelina também foi observado em polpa dental, presumidamente secretado por odontoblastos, e envolvido na formação da raiz (Hu *et al.*, 2003).

Imunocitoquímica combinada com *Western blot* mostrou que a enamelina intacta (186 kDa) e seus grandes fragmentos clivados (155 kDa, 142 kDa e 89 kDa) estão somente presentes próximos à superfície do esmalte e não acumulados na matriz. Todas essas proteínas contêm as porções originais N-terminal, desde que a enamelina, à semelhança da amelogenina, é processada por sucessivas clivagens da porção C-terminal (Rajpar *et al.*, 2001). Os pequenos polipeptídios da porção C-terminal sofrem sucessivas clivagens ou são reabsorvidos pelos ameloblastos, prevenindo seu acúmulo nas camadas de esmalte. O fragmento 32 kDa enamelina é resistente à digestão proteolítica e acumula-se no esmalte provavelmente ligado a minerais, enquanto a extremidade N-terminal não se liga a minerais e concentra-se na bainha, juntamente com os polipeptídios da ameloblastina (Rajpar *et al.*, 2001).

A proteólise permite que a enamelina clive produtos para acumulá-los em diferentes partes da matriz do esmalte, e assim determine sua relativa abundância. Alguns produtos de clivagem da enamelina parecem ser insolúveis. A 32 kDa enamelina pode ser liberado da massa insolúvel das proteínas do esmalte pela clivagem proteolítica, ficando livre para ligar-se aos cristalitos de esmalte, potencialmente regularizando sua forma (Brookes *et al.*, 2002).

A metaloprotease da matriz 20 (MMP-20) tem predominante atividade proteolítica no estágio secretório (Ryu *et al.*, 1999), e é responsável pela catálise da enamelinina. Entretanto, a MMP-20 é inativa contra o fragmento 32 kDa enamelinina, o qual pode ser degradado pela calicreína-4 (KLK-4), a principal enzima de degradação expressa durante o estágio de maturação (Yamakoski *et al.*, 2006).

A enamelinina está presente em pequenas quantidades e sobre a forma de uma série de produtos clivados para gerar vários polipeptídios que participam da enucleação e extensão dos cristais de esmalte, bem como da relugarização desses cristais (Fukae *et al.*, 1993).

O gene da enamelinina foi mapeado no cromossomo quatro, somente 15 kb separa esse do gene da ameloblastina, sugerindo que essa região contém um conjunto de genes codificadores das proteínas do esmalte (Mardh *et al.*, 2002).

Além das proteínas, a fase orgânica da matriz contém várias proteases (Overall & Limeback, 1988). As amelogeninas normalmente são hidrolisadas e removidas da matriz de modo mais lento no estágio secretório e de modo bastante intenso no estágio de transição/maturação na formação do esmalte (Smith *et al.*, 1996; Smith, 1998). A remoção das amelogeninas durante a maturação é um passo crítico para a mineralização do esmalte e parece dependente de proteases (Bartlett & Simmer, 1999). Primeiramente, porque até hoje não se demonstrou, consistentemente, a atividade fagocitária de ameloblastos (Smith, 1998). Em segundo lugar, porque a digestão de proteínas estruturais íntegras *in vitro* pelas proteases (particularmente a MMP-20) produz os mesmos produtos de clivagem já isolados a partir da matriz do esmalte (Ryu *et al.*, 1999). Finalmente, porque quando se acompanha a degradação de proteínas presentes em extratos de matriz de esmalte percebe-se a

degradação gradual das formas de maior massa molecular, exceto em situações em que a matriz é fervida (Smith & Chen, 1998). Estes achados tornam a inibição das proteases presentes na matriz do esmalte uma hipótese atrativa para explicar defeitos do esmalte com características histológicas de mineralização deficiente, e achados bioquímicos de acúmulo de proteínas.

PROTEASES DA MATRIZ DE ESMALTE

Durante o desenvolvimento dental, proteases são secretadas pelos ameloblastos e clivam as proteínas do esmalte. Diferentes proteases são expressas durante os estágios de formação do esmalte exercendo funções distintas. Essas enzimas parecem ter papel essencial na formação do esmalte modificando e/ou degradando proteínas da matriz e conseqüentemente afetando a interação entre as proteínas e o desenvolvimento dos cristais de hidroxiapatita (Simmer & Hu, 2002). As principais proteases da matriz de esmalte já identificadas pertencem às famílias de metaloproteases e de serino-proteases (Carter *et al.*, 1989; Denbesten & Heffernan, 1989; Moradian-Oldak *et al.*, 1994; Coletta, 1996; Fukae *et al.*, 1998).

MMP-20

As metaloproteases da matriz (MMPs) compreendem uma família de enzimas que apresentam especificidade pelas macromoléculas da matriz extracelular.

As metaloproteases são secretadas na forma de zimogênio e como um complexo enzima-inibidor (Emonar & Grimaud, 1990), sendo que sua ativação se dá em duas etapas:

clivagem proteolítica e autodigestão (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o aminoácido cisteína e o íon zinco, que bloqueia o sítio ativo da molécula. Outra característica comum entre as metaloproteases é a dependência dos íons zinco e cálcio. A interação do zinco com dois resíduos de histidinas presentes no domínio catalítico da molécula tem importância crucial para o funcionamento adequado das metaloproteases. Os dois átomos de cálcio conferem uma estabilidade para a estrutura terciária da proteína (Dioszegi *et al.*, 1995). As metaloproteases da matriz se organizam em três distintos e bem conservados domínios estruturais: pró-peptídeo amino terminal, domínio catalítico e domínio carboxi-terminal, e apesar de possuírem grande semelhança estrutural apresentam diferentes subclasses, como: colagenases intersticiais, gelatinases, estromelinas, MMP de membrana, além da matrilisina, estromelina e enamelinina. Esta classificação baseia-se na especificidade ao substrato (Kerrigan *et al.*, 2000).

A metaloprotease da matriz-20 (MMP-20), também conhecida como enamelinina, foi primeiramente identificada por Bartlett *et al.* (1996). Ela representa o único membro da família das MMPs que tem um padrão de expressão altamente restrito, podendo ser observada em ameloblastos do órgão do esmalte e odontoblastos da papila dental (Caterina *et al.*, 2000). Já foi detectado nível muito baixo de expressão de MMP-20 no órgão pulpar (Bartlett *et al.*, 1998), porém nenhum outro tecido fisiologicamente normal tem demonstrado expressão de enamelinina (Grant *et al.*, 1998), sendo a MMP-20 considerada uma metaloprotease específica de células que formam o dente (Caterina *et al.*, 2002). Sua expressão ainda pode ser observada em tecidos patológicos como cistos odontogênicos

calcificados (Takata *et al.*, 2000a), tumores odontogênicos (Takata *et al.*, 2000b) e carcinoma de língua (Väänänen *et al.*, 2001).

A MMP-20 é a protease do esmalte mais bem caracterizada e se apresenta em zimograma com as formas de 41 e 45 kDa (Bartlett *et al.*, 1998; Bartlett & Simmer, 1999). Fragmentos correspondentes ao domínio catalítico da MMP-20 também já foram descritos com massas moleculares de 21 e 25 kDa (Denbesten *et al.*, 1998). A autólise descrita em ensaios utilizando a MMP-20 recombinante produzida em bactérias também indica que sua autodegradação pode ser intensa (Ryu *et al.*, 1999). Uma vez que a MMP-20 está presente no início do processo de mineralização, acredita-se que ela inicia a hidrólise da matriz protéica do esmalte, permitindo que os cristais cresçam em comprimento, mais não em largura ou espessura (Bartlett & Simmer, 1999).

A função da MMP-20 parece ser a remoção gradual da porção carboxi-terminal da amelogenina na fase secretória. Esta clivagem parece levar à mudança no comportamento físico químico da molécula, gerando o fragmento TRAP (Ryu *et al.* 1999; Palosaari *et al.*, 2003). Ela também degrada gelatina, caseína, agrecanas, proteínas da cartilagem oligomérica (Fukae *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1999), fibronectina, colágeno tipo IV, laminina-1, laminina-5 e tenascina-C (Väänänen *et al.*, 2001). A MMP-20 parece ter uma alta atividade em pH neutro e em altas concentrações de cálcio (10mM) (Fukae *et al.*, 1998). O gene da MMP-20 humano localiza-se no braço longo do cromossomo 11 (Unigene# *HS 129737*).

KLK-4

Outra enzima que participa no processamento da matriz do esmalte é uma serino-protease clonada a partir da varredura de bibliotecas de cDNA de órgão do esmalte como *primers* degenerados. Esta protease é atualmente conhecida como calicreína-4 (KLK-4).

Durante a formação do esmalte, a KLK-4 é secretada tanto por ameloblastos quanto por odontoblastos (Simmer *et al.*, 1998; Nagano *et al.*, 2003), na forma de um zimógeno com 230 aminoácidos e então ativada por clivagem proteolítica, sendo encontrada no tecido com duas formas: 30 e 34 kDa (Simmer & Hu, 2002).

A KLK-4 é expressa no final do estágio de transição e durante todo o estágio de maturação. Ela parece ser a enzima predominante na degradação de proteína durante o início da fase de maturação, e tem uma função digestiva, clivando a amelogenina e as outras proteínas da matriz do esmalte (Ryu *et al.*, 2002; Simmer and Hu, 2002).

A degradação e remoção da matriz protéica do esmalte dental permitem um rápido crescimento dos cristais de hidroxiapatita durante esta fase (Simmer & Hu, 2002). Dessa maneira, parece que a KLK-4 exerce um papel importante na mineralização do esmalte e seu funcionamento deficiente produzirá, teoricamente, uma matriz do esmalte não eficientemente reabsorvida e os cristais de hidroxiapatita não crescerão em espessura, podendo resultar numa forma de amelogênese imperfeita (Simmer & Hu, 2002). O gene da KLK-4 localiza-se no braço longo do cromossomo 19 (Unigene # *HS 218366*).

AMELOTIN – Uma nova proteína descrita

Em 2005 uma nova proteína ameloblastos específica foi identificada e inicialmente caracterizada por Iwasaki *et al.* (2005). A então chamada *amelotin* é eficientemente

secretada e contém múltiplos sítios de fosfolização de serina e tirosina à semelhança de outras proteínas estruturais do esmalte, como a amelogenina, ameloblastina e enamelin. Entretanto, contrariamente a essas proteínas, uma pequena diferença entre o peso da *amelotin* intracelular e extracelular indica que essa proteína possui pouca ou nenhuma modificação pós-transcricional, como ocorre na KLK-4. Isso sugere que a *amelotin* esteja envolvida no processo proteolítico no estágio de maturação e nas características biomecânica do esmalte (Iwasaki *et al.*, 2005).

O gene da *amelotin* está localizado no cromossomo quatro próximo aos genes ENAM e AMBN e de genes envolvidos na formação e manutenção de outros tecidos mineralizados, como dentina e osso (Iwasaki *et al.*, 2005).

A investigação entre a expressão de *amelotin* e sua função na formação do dente, bem como a conservação desse conjunto de genes do cromossomo 4 entre as espécies, pode elucidar o entendimento da evolução molecular dos dentes e outros tecidos mineralizados. A associação do gene da *amelotin* com AI necessita ser investigada, uma vez que algumas formas de AI não tem sido associadas a gene ameloblastos específicos previamente conhecidos.

Desde que a amelogênese imperfeita pode estar relacionada a diferentes mutações localizadas nos diversos genes envolvidos na formação do esmalte dental, a investigação dos genes que transcrevem as principais proteínas e proteases do esmalte torna-se essencial para uma melhor compreensão dessa displasia.

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi investigar a ocorrência de mutações em importantes genes relacionados à formação do esmalte dental (AMELX, AMBN, ENAM, MMP-20, KLK-4 e *Amelotin*) em famílias brasileiras com amelogênese imperfeita recessiva e com amelogênese imperfeita ligada ao X. Os membros das famílias também foram avaliados através da técnica de genotipagem nas principais regiões genéticas relacionadas ao desenvolvimento do esmalte dental e/ou tecidos mineralizados, envolvendo o cromossomos 1, 4, 7, 11, 19, 20 e X.

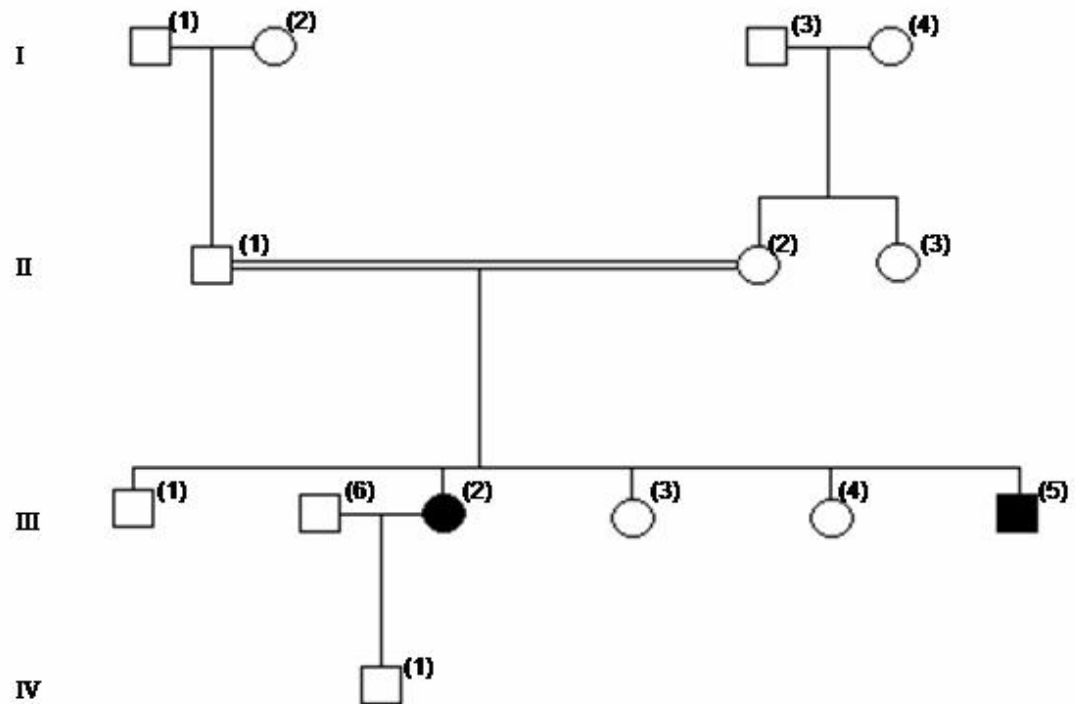
MATERIAL E MÉTODO

A obtenção do material foi realizada mediante consentimento do grupo amostral, após breve explanação dos objetivos do estudo, segundo as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa (127/03) (Anexo 1).

Fizeram parte do estudo duas famílias com amelogênese imperfeita e oito indivíduos não afetados por AI, sendo esses selecionados da seguinte forma: para cada paciente afetado dois indivíduos não afetados do mesmo sexo e grupo étnico foram incluídos como controle. Todos os voluntários apresentaram bom estado de saúde geral.

Na primeira família, com forma recessiva de AI tipo hipomineralizado, os pais não são afetados e são primos em primeiro grau. Dois dos cinco filhos são afetados, sendo um do sexo masculino e outro do sexo feminino. Estes dois indivíduos (III-2 e III-5) possuem todos os dentes afetados nas dentições decídua e permanente e diferença de idade de 12 anos, o que praticamente afasta a possibilidade de fatores ambientais serem os agentes das alterações no esmalte. A Figura 1 representa o heredograma da *Família 1*.

Figura 1: Heredograma da *Família 1*.

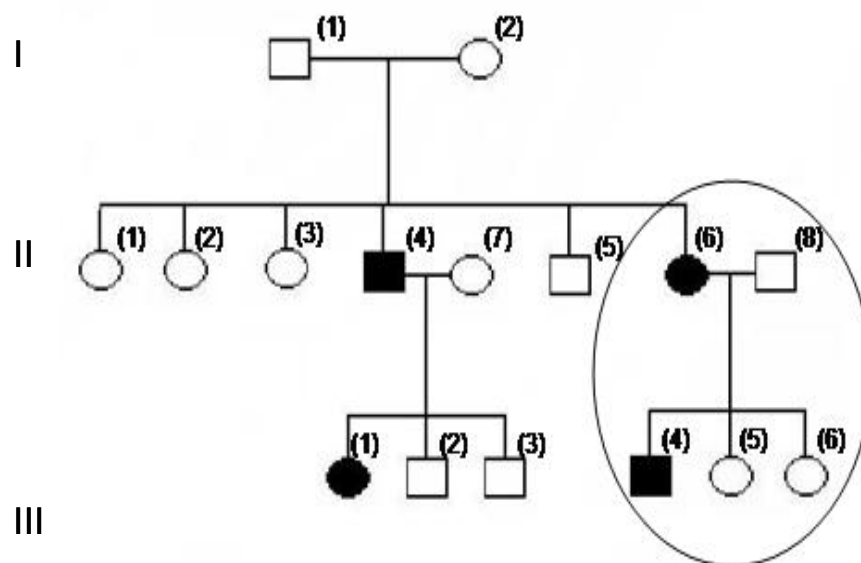


Na segunda família, AI ligada ao X tipo hipoplásica, a mãe é afetada enquanto o pai não apresenta alteração de esmalte. O único filho homem apresenta padrão de AI mais severo que a mãe e as duas filhas mulheres não apresentam AI.

Mãe e filho apresentam todos os dentes afetados nas dentições decídua e permanente.

A Figura 2 representa o heredograma da família, aparecendo em destaque a parte da família estudada - *Família 2*.

Figura 2: Heredograma da *Família 2*.



Obtenção de DNA

O DNA da *Família 1* foi obtido a partir de sangue periférico através de punção venosa (cerca de 10 ml), utilizando-se o sistema *Vacutainer*. O sangue teve sua coagulação inibida pela presença de EDTA no tubo de coleta, de maneira a permitir a eficiente extração de DNA presente no núcleo de leucócitos.

O DNA da *Família 2* e dos oito indivíduos controles foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, através de um bochecho com 5 ml de solução autoclavada de glicose a 3% durante 2 minutos. O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção do material, pois constitui o método menos invasivo e mais prático de obtenção do DNA. A solução foi imediatamente adicionada 1 ml de solução TNE (10 mM TRIS (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) e levada ao laboratório para a extração do DNA.

Extração de DNA

A extração do DNA da *Família 1* foi feita por meio do Kit Puregene (*Gentra Systems*), seguindo as especificações do fabricante. Para a *Família 2* e os oito indivíduos controles foi realizada extração do DNA utilizando acetato de amônio seguindo protocolo desenvolvido em nosso laboratório (Aidar, 2006). Resumidamente, a solução contendo o bochecho foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. Em seguida foi adicionado 1,3 ml de solução de extração de DNA (10 mM Tris (pH 8,0), 0,5% SDS, 5mM EDTA), contendo 200 ng/μl de Protease K (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), sendo colocado a 50°C *overnight* (ON). No dia seguinte 500 μl de solução de acetato de amônio (8 M acetato de amônio, 1 mM EDTA) foi adicionado e a solução submetida à centrifugação a 17000g por 10 min. Em seguida foram adicionados 540 μl de isopropanol e novamente centrifugada a 17000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e 1000 μl de etanol a 70% foram adicionados. Após centrifugação a 17000g por 5 min, o DNA foi seco a 50°C por 10 min e ressuspenso em 50 μl de TE (10 mM Tris (pH 7,8), 1 mM EDTA) à temperatura ambiente (ON). A concentração do DNA genômico de cada amostra foi quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator-*Pharmacia-Biotech*) e sua pureza estimada pela razão OD 260/280 (Maniatis *et al.*, 1989).

Reação da PCR (Polimerase Chain Reaction)

Reações de PCR foram utilizadas para amplificação dos fragmentos das regiões dos exons de cada gene. As reações para gene da MMP-20 e AMELX foram realizadas em um volume final de 50 μl contendo 500 ng de DNA, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50

mM, MgCl₂ a 1.5 mM, desoxirribonucleotídeos (200 µM de cada), *primers* específicos para cada fragmento e 1U de taq polimerase (Amersham *Pharmaci-Biotech*, Uppsala, Sweden). Uma mistura com todos os reagentes, porém sem a taq polimerase, foi submetida a uma desnaturação inicial por 5 min. Após ser acrescentada a taq polimerase foram utilizados trinta e cinco ciclos com desnaturação a 95°C, anelamento a uma temperatura adequada para cada fragmento e extensão a 72°C, sendo cada temperatura mantida por 1 minuto para os fragmentos da MMP-20 e tempos de 1 min 30 s, 1 min 40 s e 2 min 40 s respectivamente para os fragmentos da AMELX. Em seguida as amostras foram submetidas a uma extensão final por 7 minutos. As seqüências gênicas foram amplificadas em um termociclador convencional (*GeneAmp®PCR System 9600*) e analisadas em géis de poliacrilamida a 10% sob coloração pela técnica da prata (Sanguinetti *et al.*, 1994).

Para os genes da KLK-4, ENAM, AMBN e *Amelotin* as reações tiveram um volume final de 20 µl contendo 200ng de DNA, 1 U 4X AccuPrime™ Taq DNA Polymerase Master Mix (2 µl de 10X *concentration AccuPrime™ PCR Buffer II*, 0,40 µL de *AccuPrime™ Taq DNA Polymerase*, 2,60 µL de *DEPC treated ultra pure water*), 1,50 µL de 10X *concentration PCRx Enhancer Solution* (dNTPs, MgCl₂, buffer) e 10 µM de *primers* específicos, submetidos à desnaturação inicial a 94°C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação 94°C por 30 s, anelamento por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. As seqüências gênicas foram amplificadas em um termociclador convencional (*GeneAmp®PCR System 9700*) e analisadas em géis de acrilamida poliacrilamida a 1,8%. Os *primers*, temperatura de anelamento (amplificação) e tamanho dos fragmentos gerados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Condições da reação de PCR

<i>Gene</i>	<i>Primer (5' – 3')</i>	<i>TA pb</i>	<i>Gene</i>	<i>Primer (5' – 3')</i>	<i>TA pb</i>
MMP-20	F: AAGTGCAAACGTGCACTGTC	68°C	ENAM	F: GAGACTTGACTTGACAGCTCCTAT	60°C
<i>Exon 1</i>	R: GGTTTCTAGGGCAGAGGAG	170	<i>Exon 1</i>	R: TCTCTAATACTCACCCAATGCC	413
MMP-20	F: ACTACGCTGTAGACGCGTCA	58°C	ENAM	F: CAAAGACAAGCTAACAAAGTTCAA	58°C
<i>Exon 2</i>	R: CTCTGAATTTGCAAAGACTTG	318	<i>Exon 1-3</i>	R: GCCCTCTCAAGTGTATTTCTGACA	735
MMP-20	F: GAAAACATGTTCCCTCCGTT	58°C	ENAM	F: GCAGCTTGAAAACCTACCAGATGAT	58°C
<i>Exon 3</i>	R: AGATGGAATCCAAGTACCAC	201	<i>Exon 4 e 5</i>	R: ACTTTGCCTCGATTTGAGAGTTTA	573
MMP-20	F: GAAGGACTCAATCTTGTGGC	62°C	ENAM	F: CACTGGGAAGTTCTAAGGTT	58°C
<i>Exon 4</i>	R: CCAGGTTATGGTGAATTGTGC	196	<i>Exon 6</i>	R: AACGGAGTTATCTAGATAAACAAAG	212
MMP-20	F: CCTGTGTTGATCTGTTTTC	60°C	ENAM	F: CAGCCTGAATCACAGCTCTATT	58°C
<i>Exon 5</i>	R: GGGTGGTCATCAAAAGAAG	234	<i>Exon 7</i>	R: TTAAAAGGCAACAGTATTTGGGTA	513
MMP-20	F: CCCGTTACCATTTTGACCAAC	60°C	ENAM	F: TTATCATTATCGTCTTTGCCCTAT	58°C
<i>Exon 6</i>	R: AATGAGAGTCGGTGGCGTGT	210	<i>Exon 8</i>	R: CCCAGTTTCCCCATTACATT	567
MMP-20	F: GTAAATCAATCATTGATCTTG	56°C	ENAM	F: TCGAAGGTGGTTTTCTCCTGTGTT	58°C
<i>Exon 7</i>	R: GCCATTTCTTTCTTTGAGGG	226	<i>Exon 9</i>	R: AGCAGGGGGCGAATGGATTGT	157
MMP-20	F: GGTGCAGAGTTTTCGTAAAC	52°C	ENAM	F: AACACCATGGTGGGAAACAAAG	58°C
<i>Exon 8</i>	R: AAATAAGATAGATAGTAAAAAGG	232	<i>Exon 10.1</i>	R: TTACGTTCCCAAGCAAAAGGTTTC	573
MMP-20	F: CATCTACAACAGTAAAAACC	58°C	ENAM	F: ACAGAATAGGCCCTTTTACAGA	60°C
<i>Exon 9</i>	R: GCAAAGCCAAGATTTCTTATG	223	<i>Exon 10.2</i>	R: ATTGGGTATATTCAGGGTAGAA	787
AMELX	F: GGATTGGTTGTTACAGATGCC	59°C	ENAM	F: CAAGAAGAACATTTACCCCATCCT	60°C
<i>Exon 1</i>	R: TGGGCCAACTAAAAAGTAAC	252	<i>Exon 10.3</i>	R: CATGCCATAGTTCAAATTCTCACC	753
AMELX	F: TGTGTTTTATGGAGCATTCA	65°C	ENAM	F: AGCTGGGCTTCAGAAAAATCCAAT	60°C
<i>Exon 2</i>	R: TTAATCACAGGCATGGCAAAAGCTGC	148	<i>Exon 10.4</i>	R: AGATGGTCTTTGCTGTTGCCTCTC	709
AMELX	F: CCTCCCTGTAAAAGCTACCACC	67°C	ENAM	F: CTCCAATCCAGAAGGCATCCAA	60°C
<i>Exon 3</i>	R: CTTTACAGAGCCCAGGGCATTG	126	<i>Exon 10.5</i>	R: CTCCACCTGGGTCGCTACTCCTAT	510
AMELX	F: GTAGAACTCACATTCTCAGGC	67°C	KLK-4	F: GCAGCTTTGCAGTCACAAGC	58°C
<i>Exon 4 e 5</i>	R: AATGTCTACATACCGGTGGCC	292	<i>Exon 1</i>	R: AGGGACAAGAGAGGGGATGG	150
AMELX	F: GTAGAACTCACATTCTCAGGC	67°C	KLK-4	F: TGAAGCTCTGCTGAACCTCTG	58°C
<i>Exon 6</i>	R: GGCTTCAAAATATACTCACCATTCC	994	<i>Exon 2</i>	R: ATGAGCCTGATATTAGGCC	334
AMELX	F: CATCTACAACCAGTAAAAACC	67°C	KLK-4	F: TTCTCCACCCTTCCCTGAGT	58°C
<i>Exon 7</i>	R: GCAAAGCCAAGATTTCTTATG	223	<i>Exon 3 e 4</i>	R: TGCCACAAAAGTACCTGCC	555
AMBN	F: ATTGCAGGAGCAGAGATTCC	58°C	KLK-4	F: GAATTCTGACTCTCCCTCTC	58°C
<i>Exon 1</i>	R: TGGGTGTTAGGCATGTCATC	395	<i>Exon 5</i>	R: GGTCAATTCATGGGTTCCC	214
AMBN	F: CCTTTATCCCGGTGGTTTTT	58°C	Amelotin	F: CTGCAGCTAATAACCCACCTAATGA	58°C
<i>Exon 2</i>	R: CGCTTTTGGATTGCAAGACT	365	<i>Exon 1 e 2</i>	R: AATTGACCTTTTACCACGATGGA	636
AMBN	F: CTTCTTCATTCTGCCAAGC	58°C	Amelotin	F: GGGCTGGCATTTTTCCACTCTACAT	58°C
<i>Exon 3</i>	R: TGCAGTAGAATTATAAGACAAAGCTC	385	<i>Exon 3</i>	R: TTTTCCCCACTCCCCAACGA	437
AMBN	F: TCCACCTTTTCAGTGATGATTG	58°C	Amelotin	F: CGAGGCTTCATCTTTATTTACCTTC	58°C
<i>Exon 4</i>	R: TTGTTTTTGTTCCTTGTC	376	<i>Exon 4</i>	R: CATTTGTGGATATACGCACCC	306
AMBN	F: CTGGCGACAGAGCAAGATTC	58°C	Amelotin	F: GCAATAGCCCTTGTAGTCGTAC	58°C
<i>Exon 5</i>	R: TCGATTTATTTGGCACGAGA	370	<i>Exon 5</i>	R: GCATGGTCAGTTCTCTGGGTATGTT	496
AMBN	F: TCCTAGCCTCCCTTCCAGAT	58°C	Amelotin	F: GGCATAGTAGCAGGCAACTGT	58°C
<i>Exon 6</i>	R: TTATGCCTGAAGGCTACGATT	452	<i>Exon 6</i>	R: ACAAAGTACATTGGAAACCTCACAA	358
AMBN	F: TTGGGTCATACCTCCCAAAA	58°C	Amelotin	F: ATAGATCATAAGGCAGTTTAACATATT	58°C
<i>Exon 7-9</i>	R: TCATGGATAAATGGGACAATGA	670	<i>Exon 7</i>	R: TAGAAAAGTAGCTGGAGAAGTATAATG	373
AMBN	F: TCATGGATAAATGGGACAATGA	58°C	Amelotin	F: CTCCATCTTTCCATTCTTACCCA	58°C
<i>Exon 10-12</i>	R: CTGAGTCCCATGATCATTTG	950	<i>Exon 8</i>	R: GAGTAAAAATATCCCTCATGTTGCT	527
AMBN	F: CAGCCAACCTCCTATTCTCCA	58°C	Amelotin	F: CTAAAGAATGATATGGATGCTCCTAAT	58°C
<i>Exon 13</i>	R: AAAGCAAGAAGGGGACCTACA	842	<i>Exon 9</i>	R: GAGACCAGAATTTGTCTTCACATTGC	567

F: Primer Forward; R: Primer Reverse; TA: Temperatura de anelamento; pb: pares de bases

Purificação do DNA amplificado por PCR

Os produtos amplificados foram purificados para retirada de segmentos não específicos e excesso de reagentes da PCR. Para isso as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% ou 1,8% e coradas com Brometo de Etídio a 5 µg/ml. Em seguida as bandas de interesse foram incisadas e o DNA extraído do gel utilizando o *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit – Amersham Pharmacia Biotech* ou *Bio 101 Gene Clean Spin Kit – Amersham Pharmacia* conforme instrução dos fabricantes.

Seqüenciamento dos fragmentos

Todas as amostras foram submetidas ao seqüenciamento automático nos dois sentidos para minimizar artefatos do seqüenciamento (*primer forward* e *primer reverse*). Os genes da MMP-20 e AMLEX foram seqüenciados no Brasil (Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA, USP) utilizando reação de PCR contendo aproximadamente 300 ng de DNA, 3,2 pmol de *primer* (apenas um do par), 2 µl de BigDye (Amersham Pharmacia), 2 µl de buffer 2,5X e água Milli-Q para um volume final de 10 µl, preparada com os tubos em meio gelado. As amostras foram submetidas a trinta ciclos com desnaturação a 95°C por 20 s, anelamento a uma temperatura adequada para cada *primer* e extensão a 60°C por 1 min, utilizando termociclador convencional (*GeneAmp®PCR System 9600*).

Em seguida as amostras foram precipitadas utilizando Etanol 95% e Acetato de Sódio-EDTA, por 20 minutos a -20°C. Após centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos e descarte do sobrenadante nova precipitação foi realizada com Etanol 70%. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* depois de seco foi ressuspenso em 6 µL de tampão desnaturante

(Formamida deionizada em 50 mg/ml de *Blue Dextran*, 25 mM de EDTA, pH 8.0). O ressuspenso foi desnaturado a 95°C por 3 min e mantido em gelo. O volume de 1,5 µL foi aplicado no gel de seqüenciamento (acrilamida:bis-acrilamida 49:1 a 10% acrescido de uréia ultrapura a 9% em tampão TBE 1X). A eletroforese foi realizada em aparelho *ABI Prism 377 DNA SequencerTM*, sendo as seqüências obtidas processada pelo programa *Sequencing Analysis*.

O seqüenciamento dos demais genes foram realizados no Estados Unidos (*National Institutes of Health*) utilizando 3,2 pmol de *primer*, 2 µL de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix*, 2 µLs de *5X concentration BigDye® Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer* e 7,5 µl de solução com produto de PCR adicionado a água Milli-Q (proporção conforme tamanho e concentração do fragmento). As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 96°C por 1 min, seguidos de 25 ciclos: 96°C por 10 s, 50°C por 10 s, 60°C por 4 minutos, e então seqüenciadas em *Applied Biosystems ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer*.

Como cada dideoxinucleotídeo estava 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. Para análise das amostras cada seqüência foi alinhada pelo programa *SequencherTM* (*Gene code Corporation*) e comparada com o banco de dados internacional *GenBank* através do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Genotipagem

Microsatélites são curtas repetições de sequência genômica, as quais podem envolver mono, di, tri ou tetra nucleotídeos. Microsatélites ocorrem geralmente em regiões não codificadas do genoma e parecem ser uniformemente distribuídos; entretanto o tamanho das repetições é altamente variada. Isso permite verificar padrões de heranças genéticas. A automatização do processo de genotipagem, através da utilização de sequenciadores possibilitou uma maior agilidade e precisão da genotipagem. Este processo utiliza *primers* com um fluorocromo específico (FAM, NED, VIC, HEX, etc) para identificar o tamanho do fragmento (em pares de base) visualizado em eletroferograma.

Regiões dos cromossomos 1, 4, 7, 11, 19, 20 e X foram genotipadas. PCR foi realizada em volume de 7,5 µl contendo 20 ng de DNA genômico, 3,75 µl de *Amplitaq Gold PCRMaster Mix* e 1,25 µl de solução com *primer* fluorescente e água milli-Q (proporção dependente do marcador). As reações foram submetidas a 95°C por 12 min; 10 ciclos de 94°C por 15 s, 55°C por 15 s, 72°C por 30 s; 20 ciclos de 89°C por 15 s, 55°C por 15 s, 72°C por 30 s; seguida por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Em seguida parte desse produto foi adicionado à solução contendo 0,5 µl de *GeneScan 400HD (ROX Dye) Standard* e 9,5 µl de formamida e submetido a desnaturação a 95°C por 5 minutos. Foi realizado sequenciamento de microsalétites em *ABI Prism 377 DNA SequencerTM*, utilizando gel de poliacrilamida 4% e *ROX GS 500 standard* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os marcadores utilizados e suas características estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Marcadores utilizados na genotipagem.

Marcador	Tipo	ASR	Marcador	Tipo	ASR	Marcador	Tipo	ASR
D1S252	VIC	86-112	D19S902	FAM	237-273	DXS1060	NED	244-268
D1S498	NED	187-209	D19S904	FAM	213-229	DXS8051	NED	104-134
D1S305	FAM	156-176	D19S246	FAM	185-233	DXS987	FAM	267-293
D1S1153	VIC	270-404	D19S571	NED	289-319	DXS1226	NED	280-302
D4S719	FAM	250-300	D20S117	FAM	151-187	DXS1214	VIC	284-298
AMBN	VIC	250-280	D20S889	FAM	87-123	DXS1068	VIC	244-264
922H22	NED	350	D20S115	NED	234-246	DXS993	FAM	267-293
D4S2964	FAM	120	D20S186	VIC	113-139	DXS991	NED	313-341
D7S284	HEX	272-307	D20S112	FAM	213-237	DXS986	FAM	151-181
D7S272	VIC	211-261	D20S195	FAM	128-154	DXS990	FAM	122-132
D7S1837	FAM	193-210	D20S107	FAM	197-221	DXS1106	VIC	126-140
D7S1743	VIC	88-188	D20S178	NED	179-195	DXS8055	VIC	312-324
D11S898	FAM	141-165	D20S196	NED	259-295	DXS1001	VIC	191-211
D11S1391	TET	158-178	D20S100	VIC	209-235	DXS1047	VIC	156-172
D11S1347	HEX	177-203	D20S171	VIC	127-155	DXS1227	FAM	79-99
D11S908	VIC	172-190	D20S173	VIC	128-182	DXS8043	NED	146-180
D11S4090	FAM	161-189				DXS8091	VIC	80-102
						DXS1073	FAM	306-334

ASR: *Allelo Size Range*

RESULTADOS

Os quatro indivíduos afetados desse estudo não mostraram sinais de síndromes ou patologias sistêmicas associadas com defeito no desenvolvimento do esmalte. Nenhum indivíduo não afetado apresentou defeitos generalizados do esmalte ou anomalias dentais.

A Família 1 foi caracterizada com amelogenese imperfeita tipo hipocalficada, onde há mineralização deficiente da matriz formada durante o estágio de mineralização. Quantitativamente o esmalte é normal, mas qualitativamente a matriz é pobremente mineralizada com uma superfície de esmalte friável. O esmalte hipocalficado é mole e frágil e facilmente fraturado, expondo a dentina, que produz uma aparência sem estética amarelo-castanho. Possui a mesma densidade radiográfica da dentina, tornando-se difícil a diferenciação entre os mesmos. Enquanto a Família 2 apresenta amelogenese imperfeita do tipo hipoplásica, onde há formação deficiente da matriz no estágio de histodiferenciação e uma entidade insuficiente de esmalte é formada. O esmalte apresenta espessura reduzida e depressões. Radiograficamente aparecer como uma fina camada, mais evidente sobre as pontas das cúspides e faces interproximais, normalmente vista com auxílio de lupa.

Os membros afetados da *Família 1* apresentaram coloração do dente amarelo-acastanhado similares, enquanto o indivíduo III-4 (filho) da *Família 2* apresentou maior severidade de coloração em relação a sua mãe (indivíduo II-6).

Todos os indivíduos afetados apresentaram evidências patológicas de perda de esmalte devida à fratura ou desgaste e variado grau de hipersensibilidade térmica, além de radiodensidade do esmalte semelhante a da dentina.

As Figuras 3 e 4 mostram as características clínicas e radiográficas da *Família 1* e 2, respectivamente.

Figura 3: Características clínicas e radiográficas dos indivíduos afetados da *Família 1*. A1 e B1: fenótipo e radiografia periapical do indivíduo III-2; A2 e B2: fenótipo e radiografia periapical do indivíduo III-5.



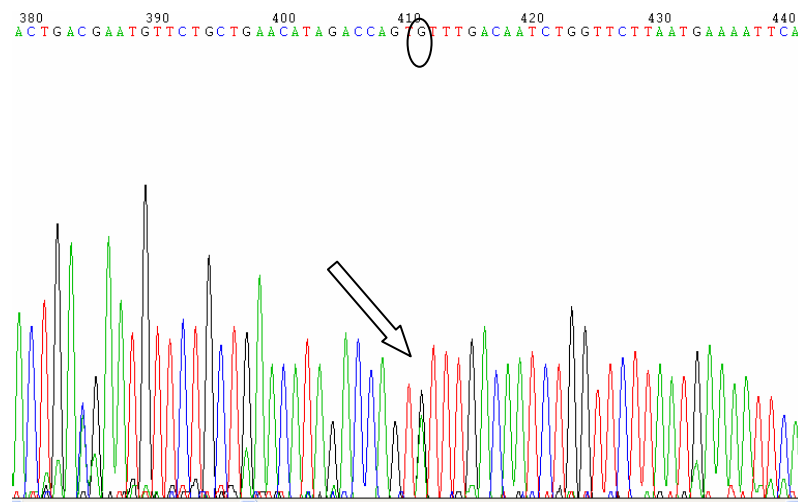
Figura 4: Características clínicas e radiográficas do indivíduo III-4 da *Família 2*. A1: fenótipo; A2: detalhe do molar; B1: radiografia periapical.



As reações de PCR e o seqüenciamento dos fragmentos estudados e seus respectivos controles (8 indivíduos) mostraram em análise comparativa entre si, com os indivíduos controles e com o *GenBank* não possuir diferenças entre as seqüências gênicas dos indivíduos, sugerindo que esses exons não apresentam qualquer mutação. Dessa maneira, as regiões dos exons que transcrevem a MMP-20, AMELX, ENAM, AMBN, KLK-4 e *AMELOTIN* parecem não estar associados com a amelogenese imperfeita nas famílias estudadas.

Durante o seqüenciamento do gene que transcreve a amelotin foi observado um polimorfismo ainda não descrito na literatura, no paciente III-2 da *Família 1*, caracterizado por uma troca de A por G na base 7125 (NCBI35:4:71564458:71579819:1), próximo ao exon 5. Entretanto essa troca parece não mudar a seqüência de aminoácidos da proteína e parece não estar relacionado com a AI nas famílias estudadas. A Figura 5 mostra esse polimorfismo.

Figura 5: Gráfico registrando o polimorfismo detectado no paciente III-2 (afetado) da *Família 1*.



Todos os indivíduos foram genotipados por marcadores de STRP (*Multiple Short Tandem Repeat Polymorphism*) em cada AI locus. A genotipagem dos cromossomos 1, 4, 7, 11, 19, 20 e X também não mostrou padrões de herança que sugerissem envolvimento com a amelogênese imperfeita em ambas as famílias. O indivíduo III-1 da *Família 1* parece não ser consanguíneo do indivíduo II-1, uma vez que possui herança diferente para todas as regiões analisadas. As Figuras de 6 a 18 mostram resumidamente o padrão de genotipagem encontrado nos principais membros das famílias.

Figura 6: Família 1

Cromossomo 1

D1S252
D1S498
D1S305
D1S1153

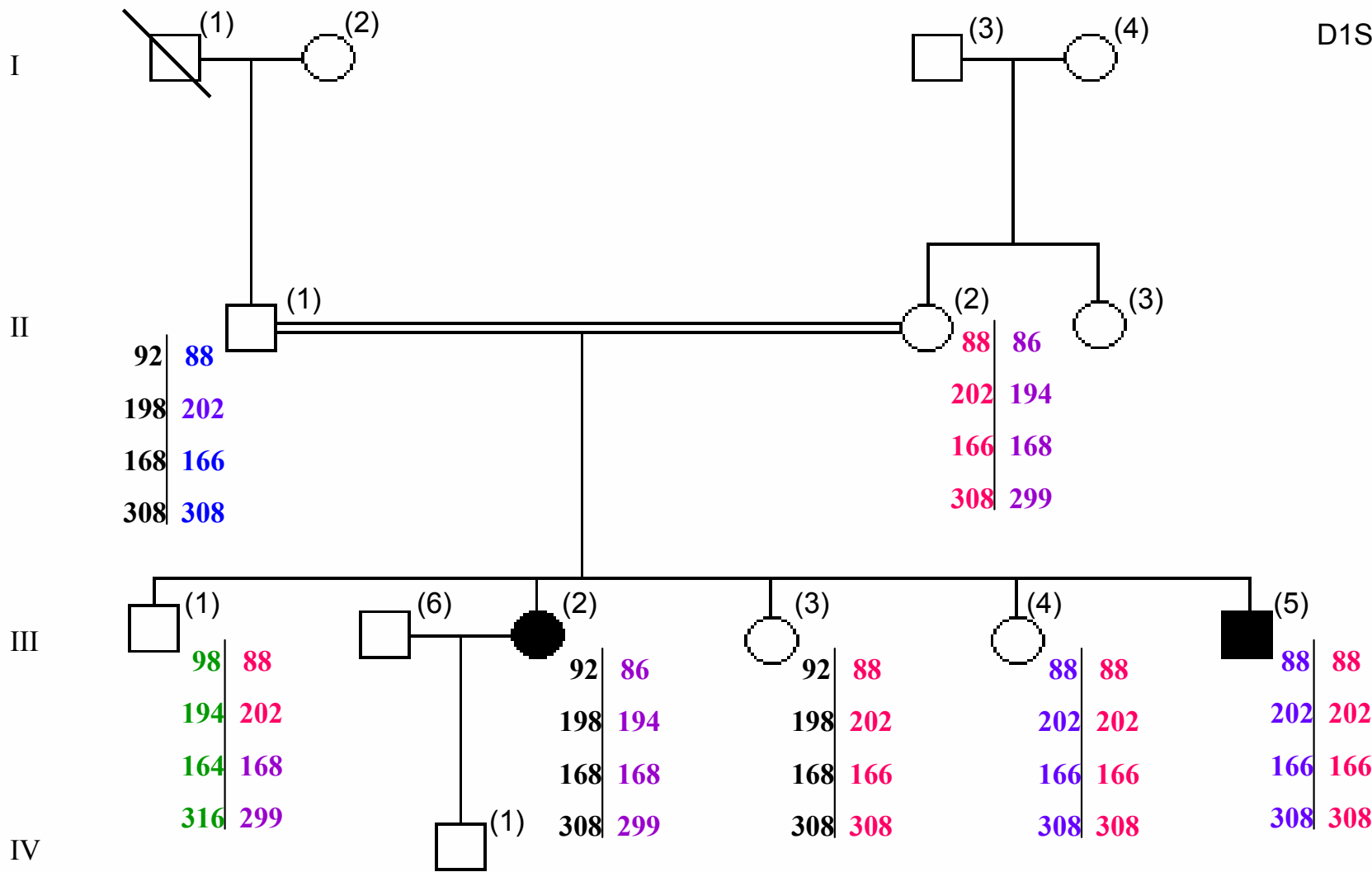


Figura 7: Família 1

Cromossomo 4

D4S719
AMBN
922H22
D4S2964

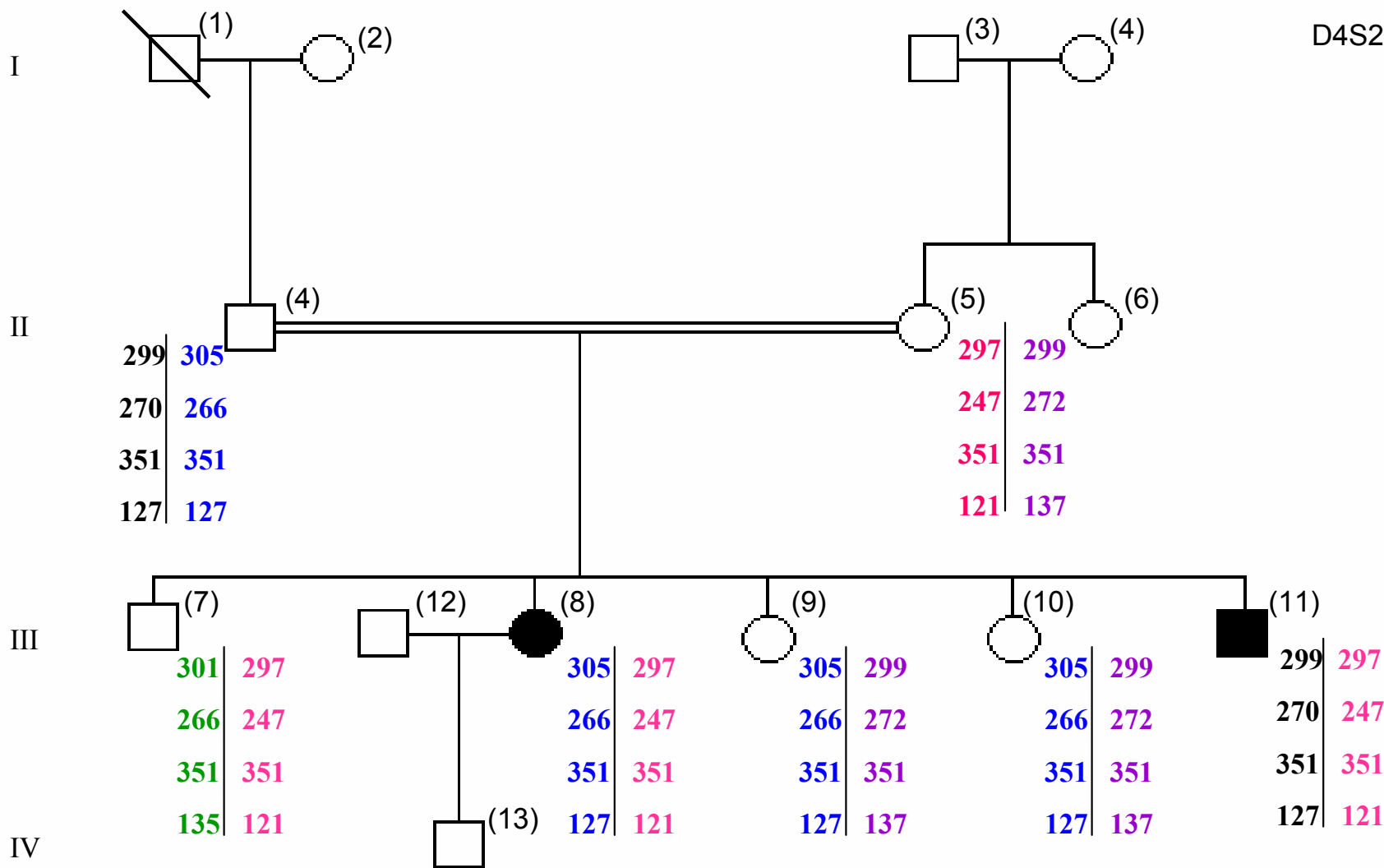


Figura 8: Família 1

Cromossomo 7

D7S284
D7S272
D7S1837
D7S1743

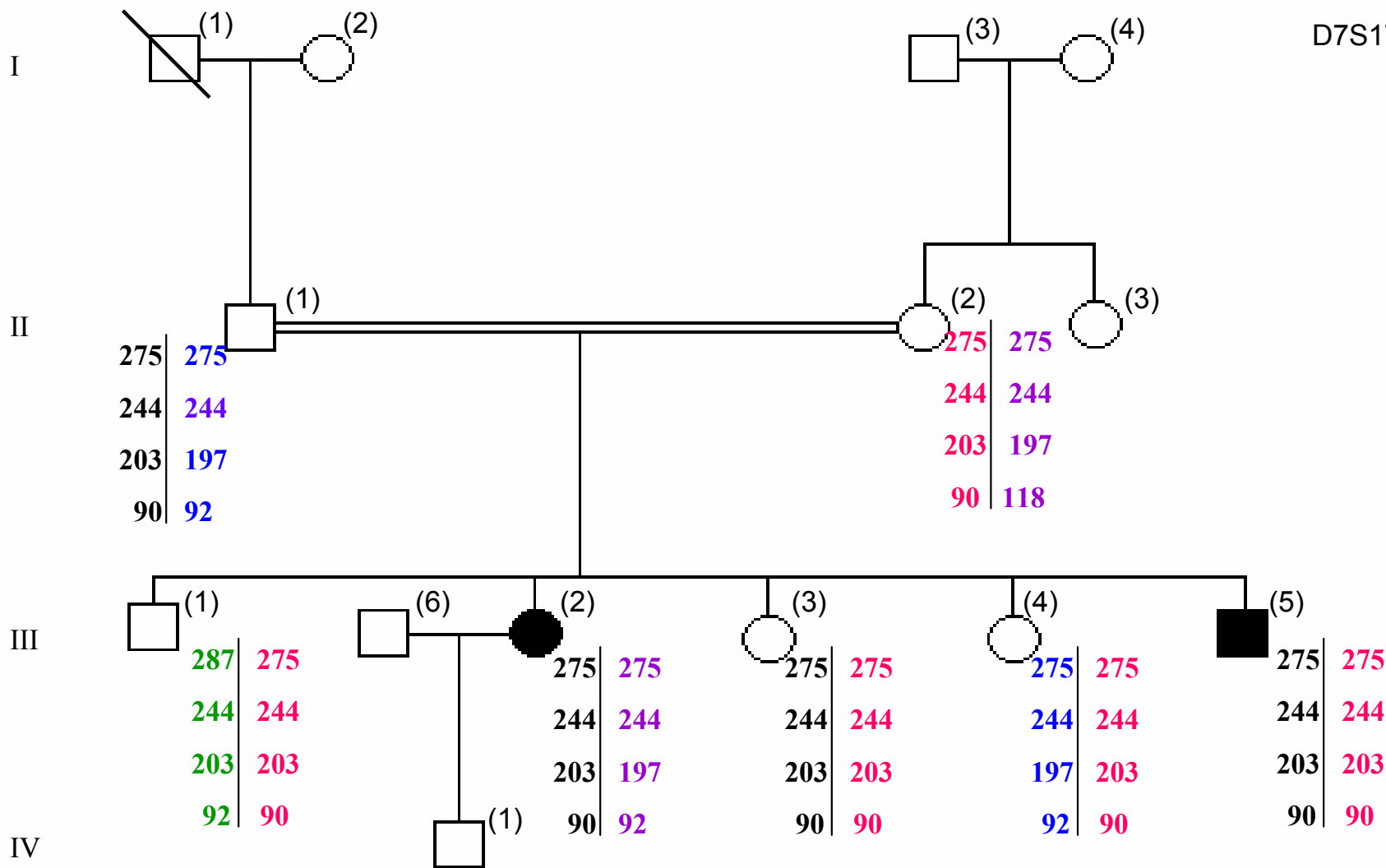


Figura 9: Família 1

Cromossomo 11

D11S898
D11S1391
D11S1347
D11S908
D11S4090

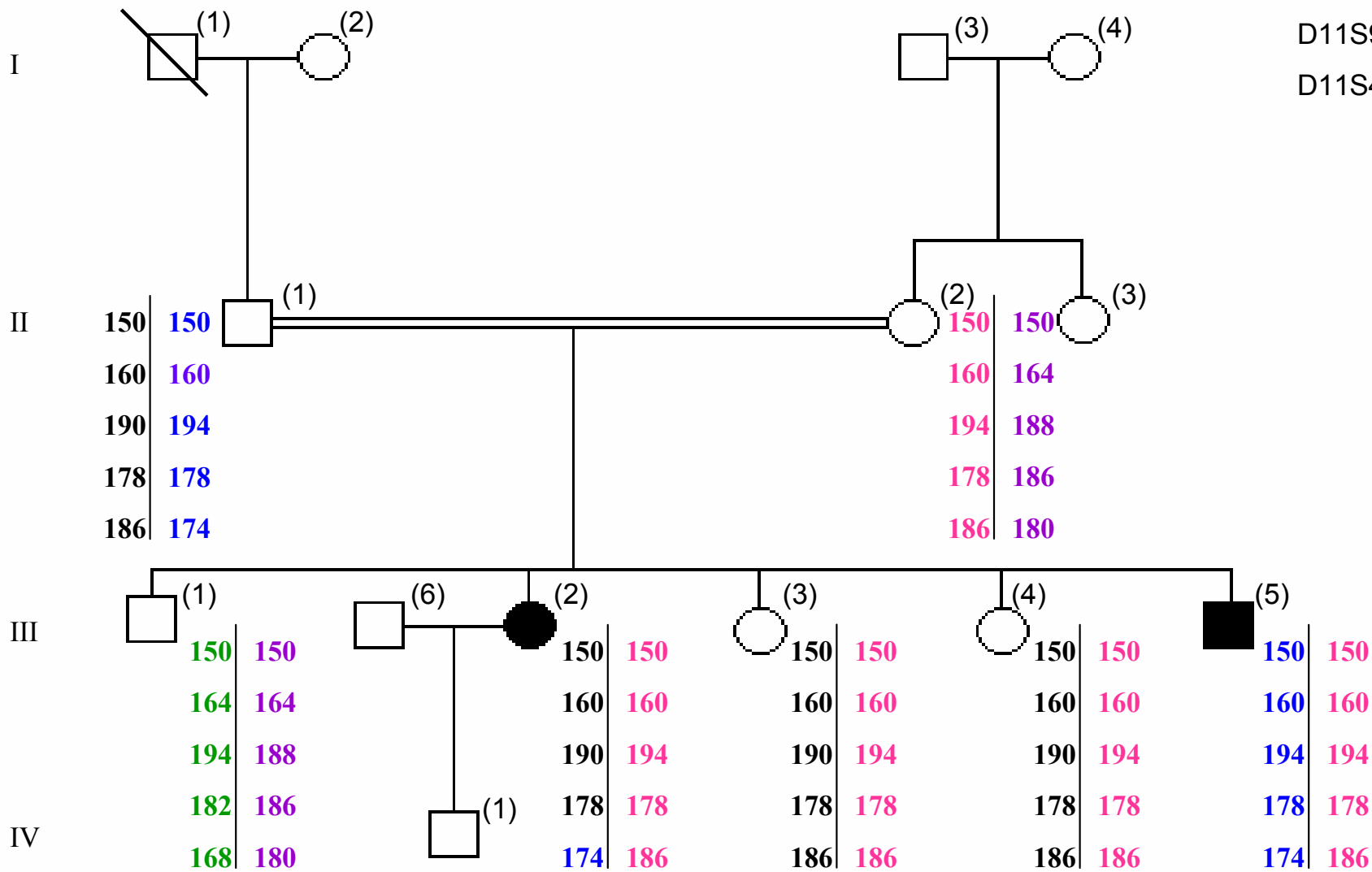


Figura 10: Família 1

Cromossomo 19

D19S902
D19S904
D19S246
D19S571

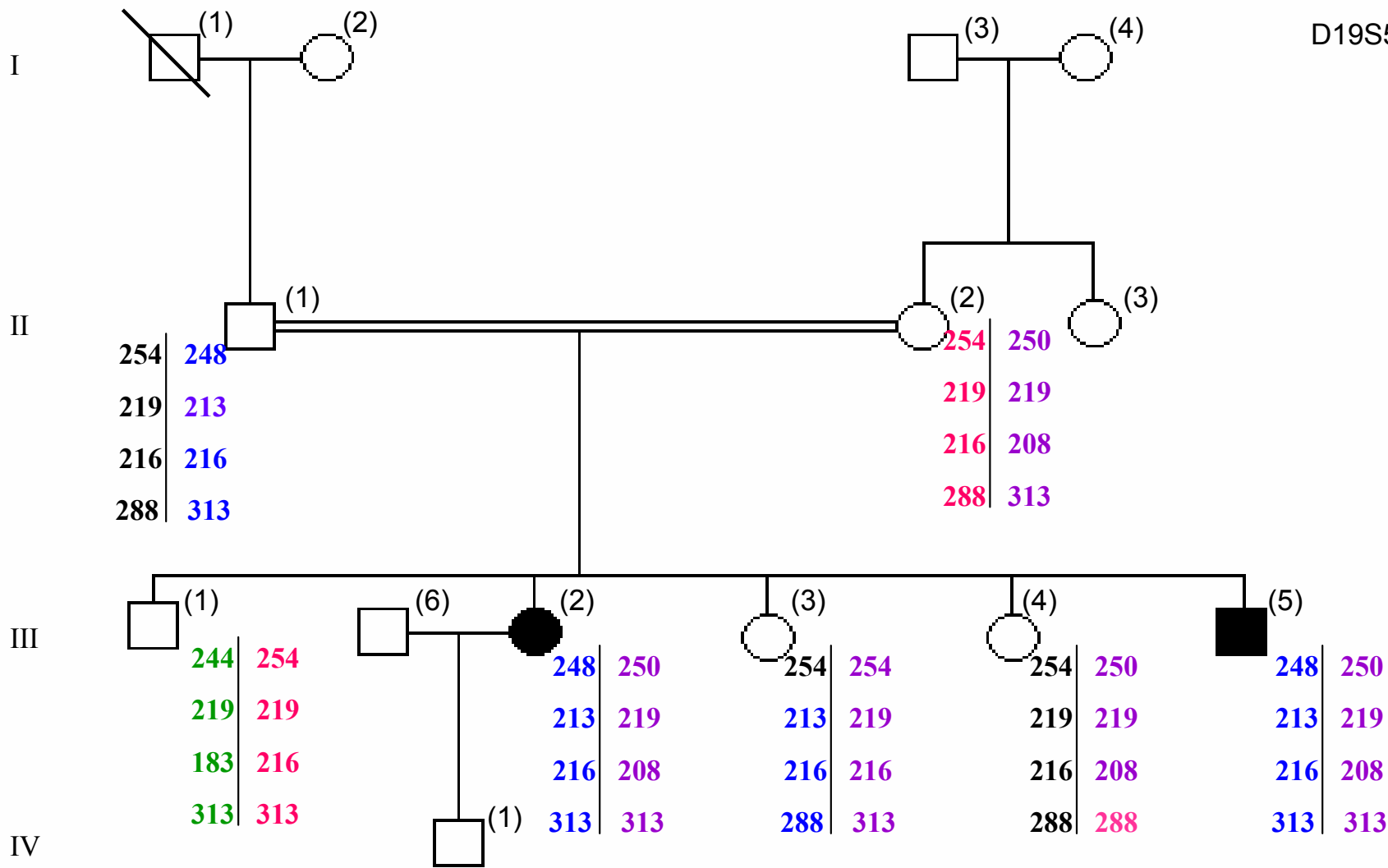


Figura 11: Família 1

Cromossomo 20

- D20S117
- D20S889
- D20S115
- D20S186
- D20S112
- D20S195
- D20S 107
- D20S178
- D20S196
- D20S100
- D20S171
- D20S173

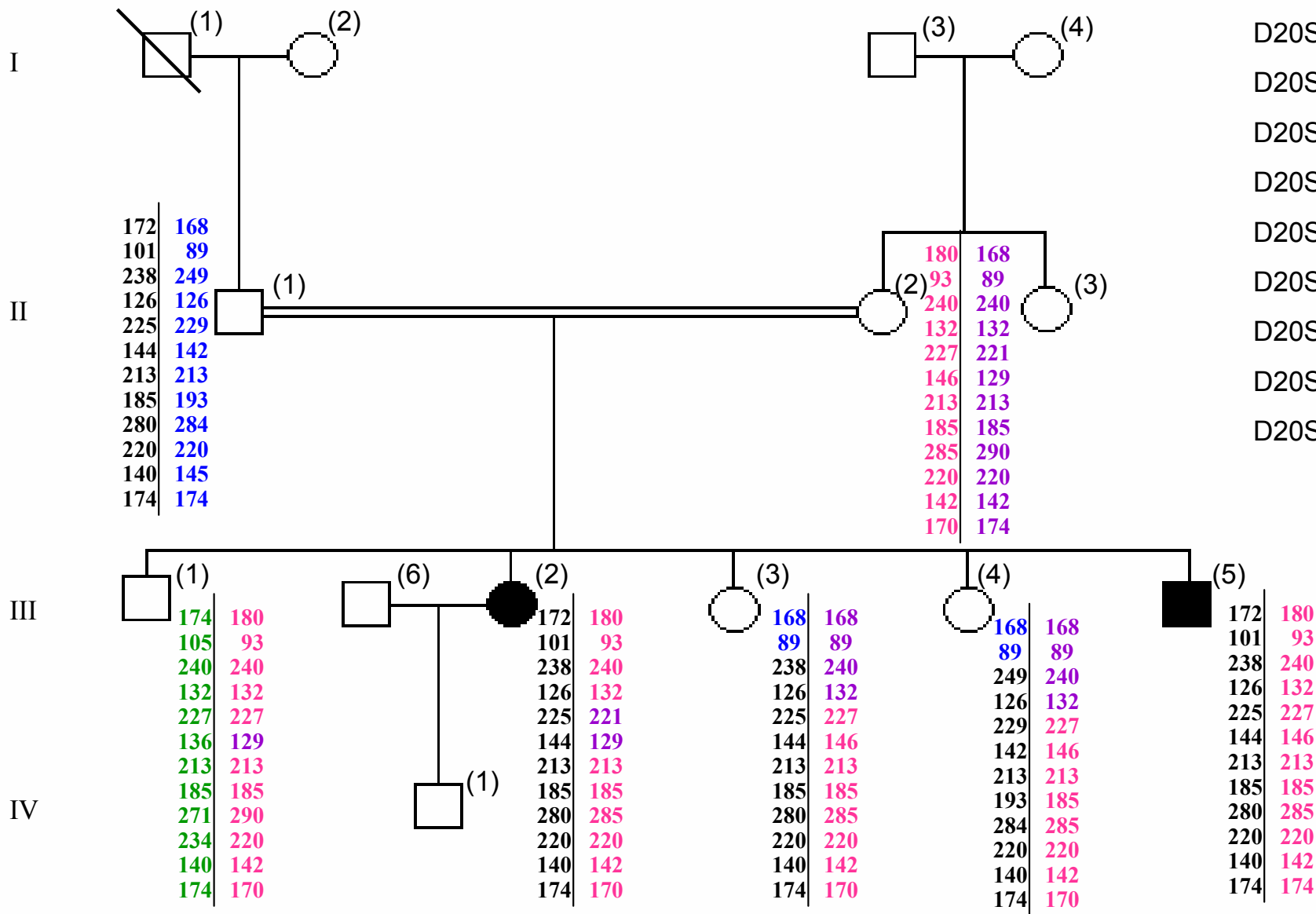


Figura 12: *Família 2*

Cromossomo 1

D1S252
D1S498
D1S305
D1S1153

I

II

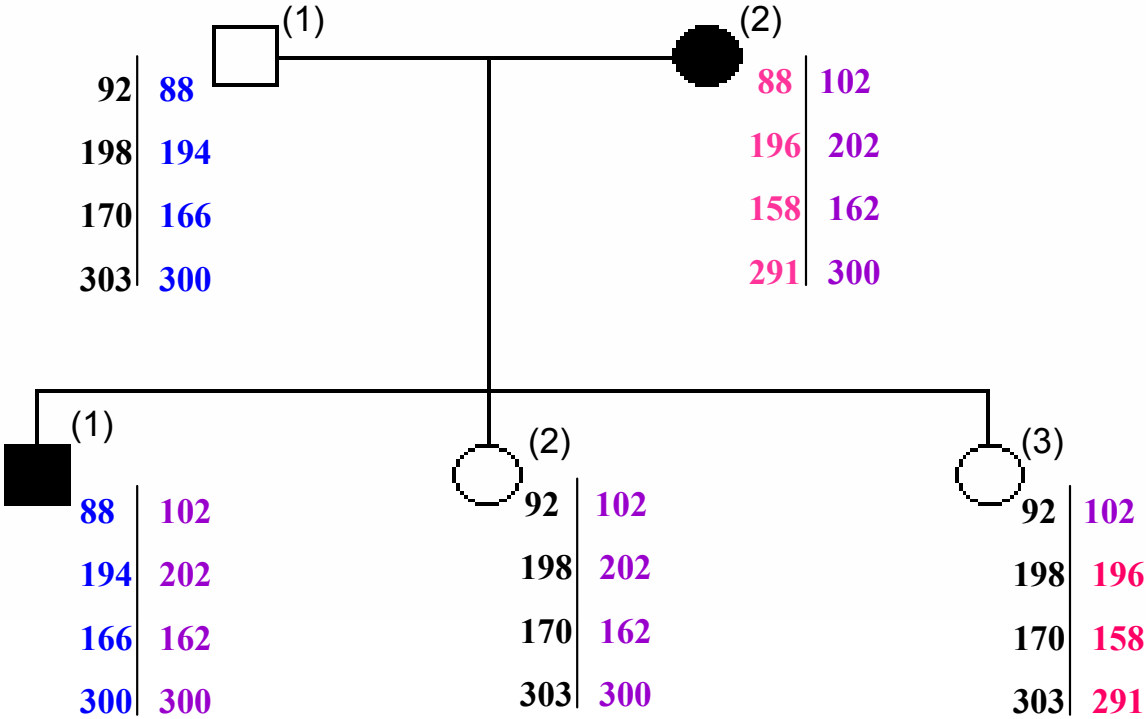


Figura 13: *Família 2*

Cromossomo 4

D4S719
AMBN
922H22
D4S2964

I

II

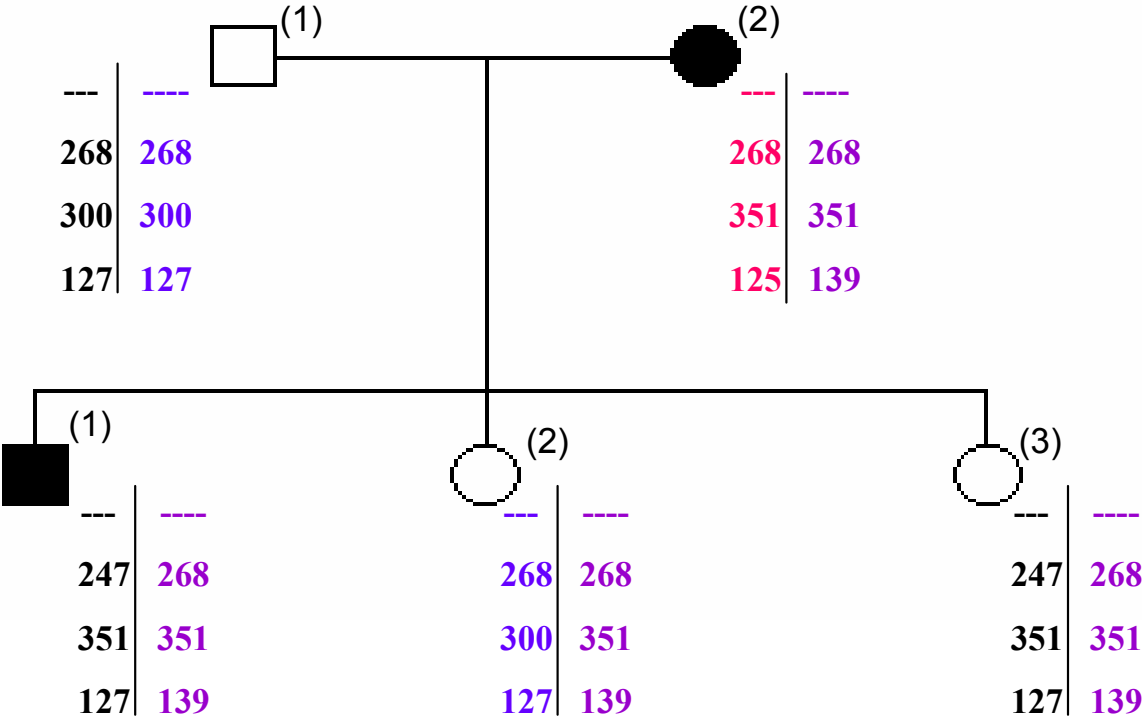


Figura 14: *Família 2*

Cromossomo 7

D7S284
D7S272
D7S1837
D7S1743

I

II

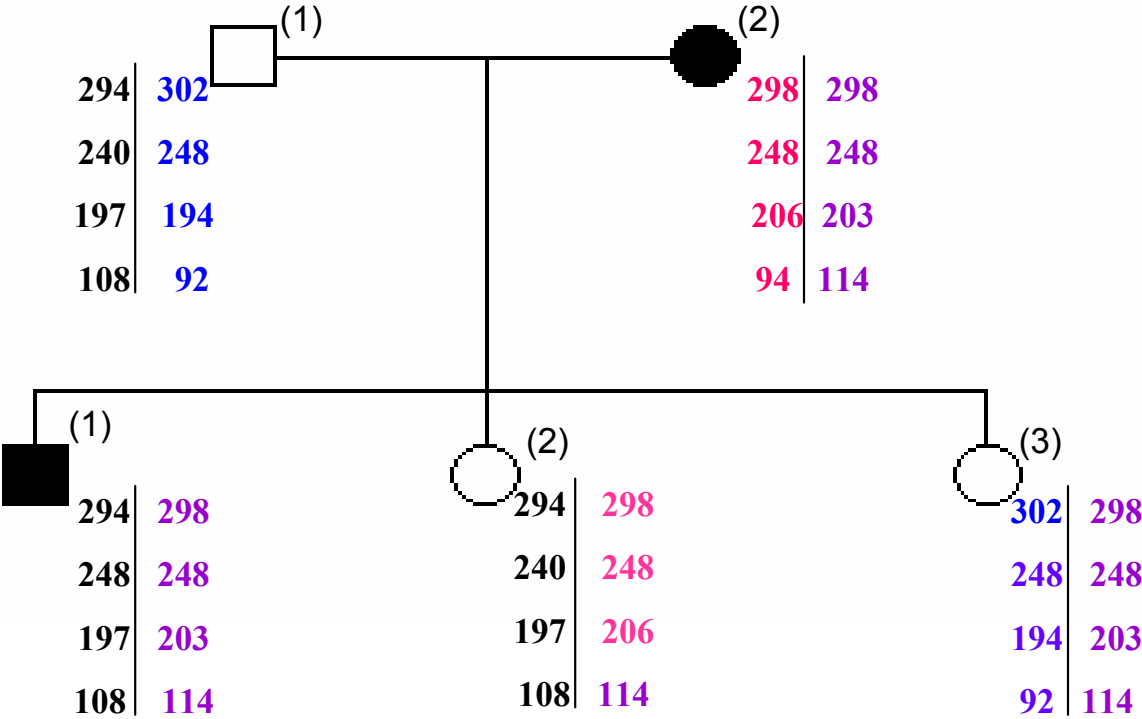


Figura 15: Família 2

Cromossomo 11

D11S898
D11S1391
D11S1347
D11S908
D11S4090

I

II

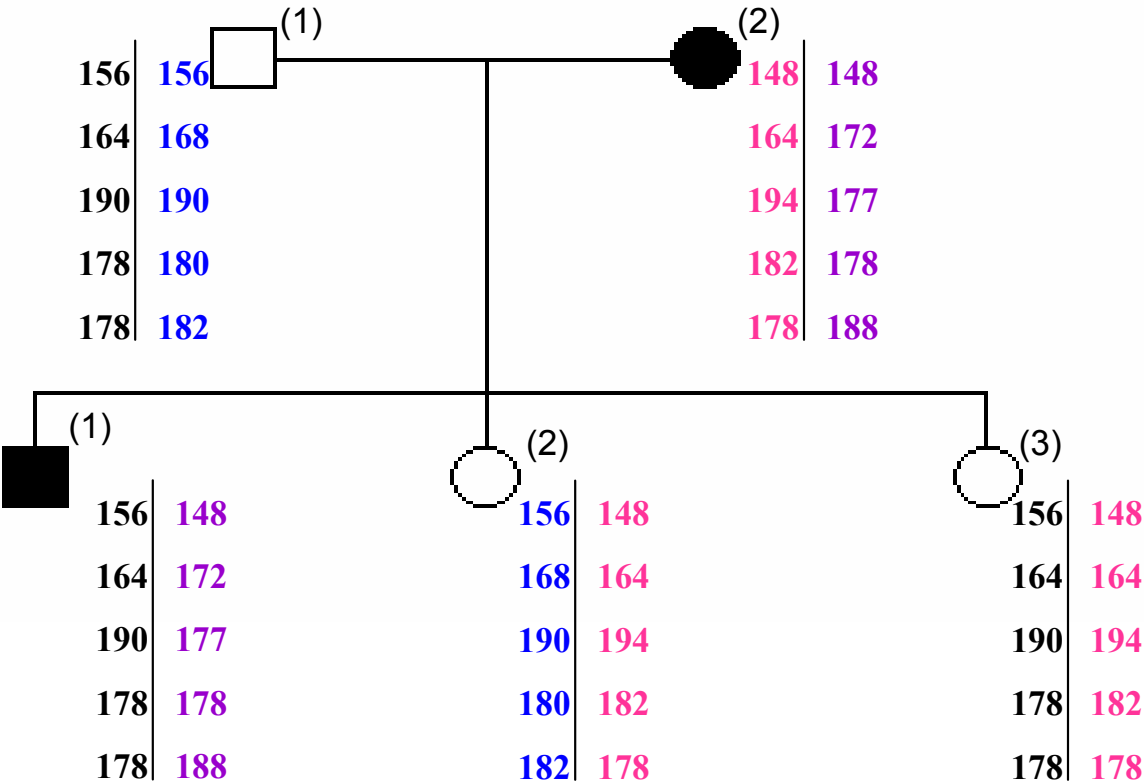


Figura 16: *Família 2*

Cromossomo 19

D19S902
D19S904
D19S246
D19S571

I

II

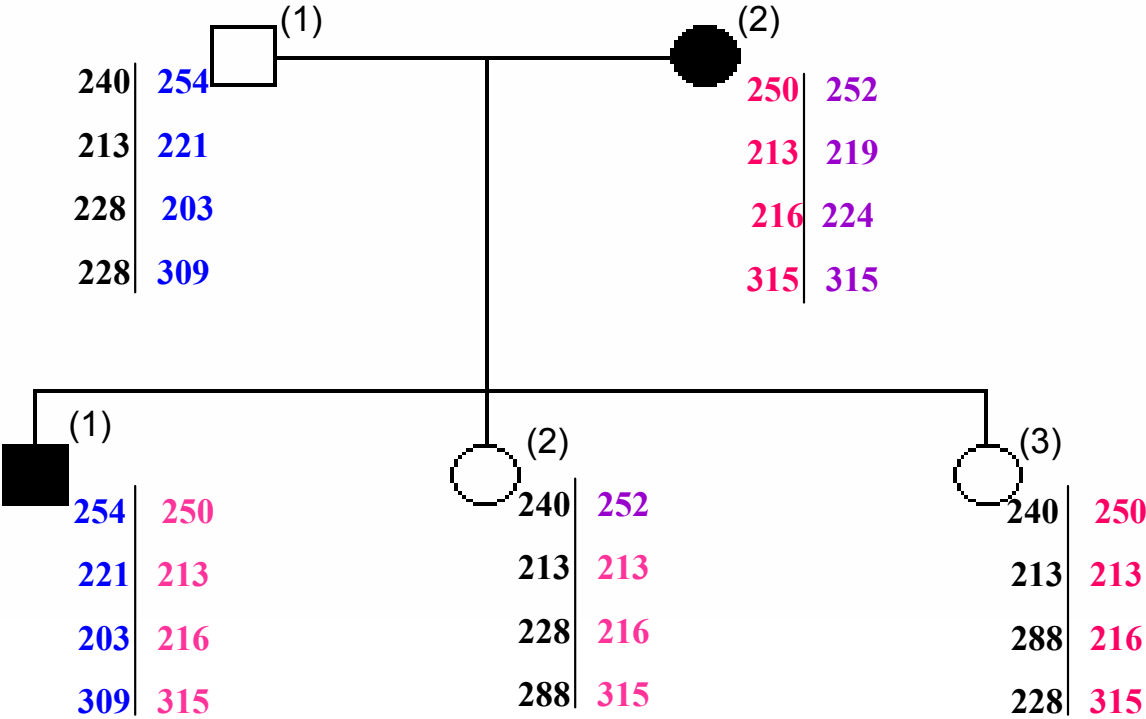


Figura 17: Família 2

Cromossomo 20

- D20S117
- D20S889
- D20S115
- D20S186
- D20S112
- D20S195
- D20S 107
- D20S196
- D20S100
- D20S171
- D20S173

I

II

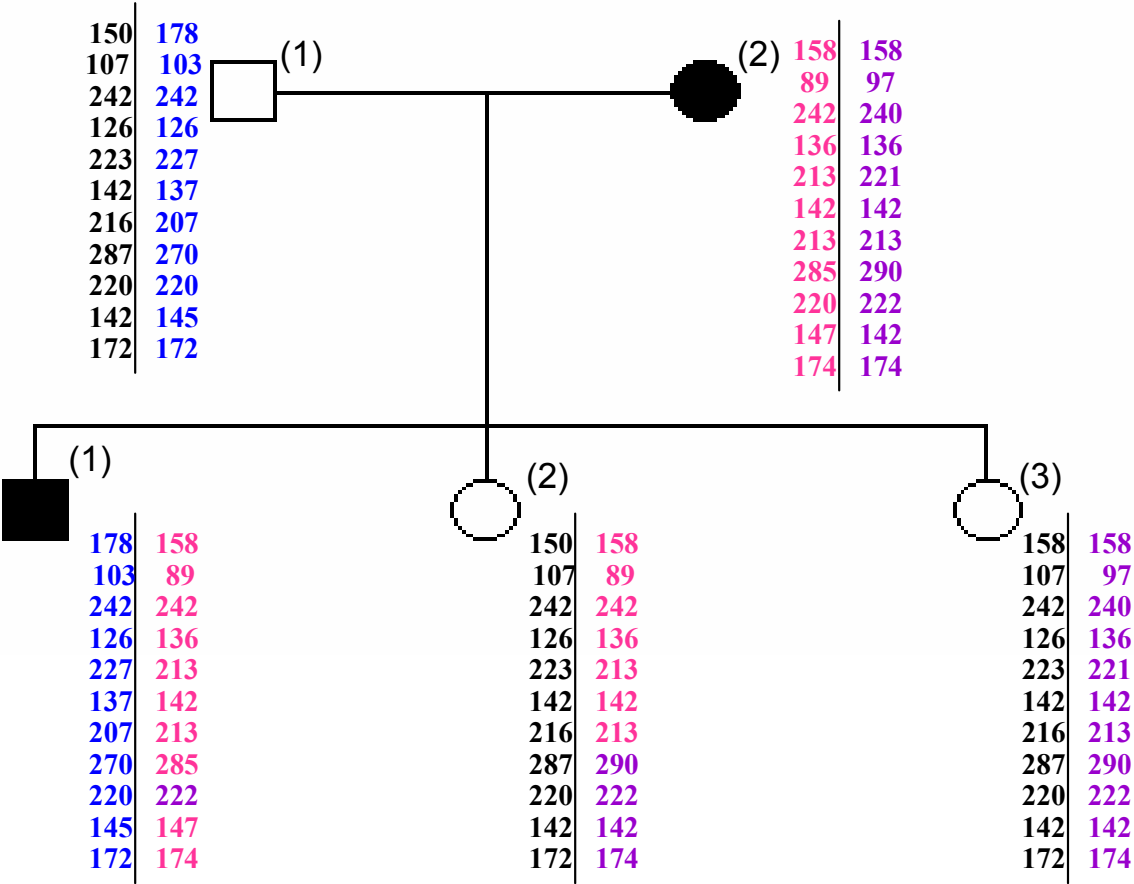


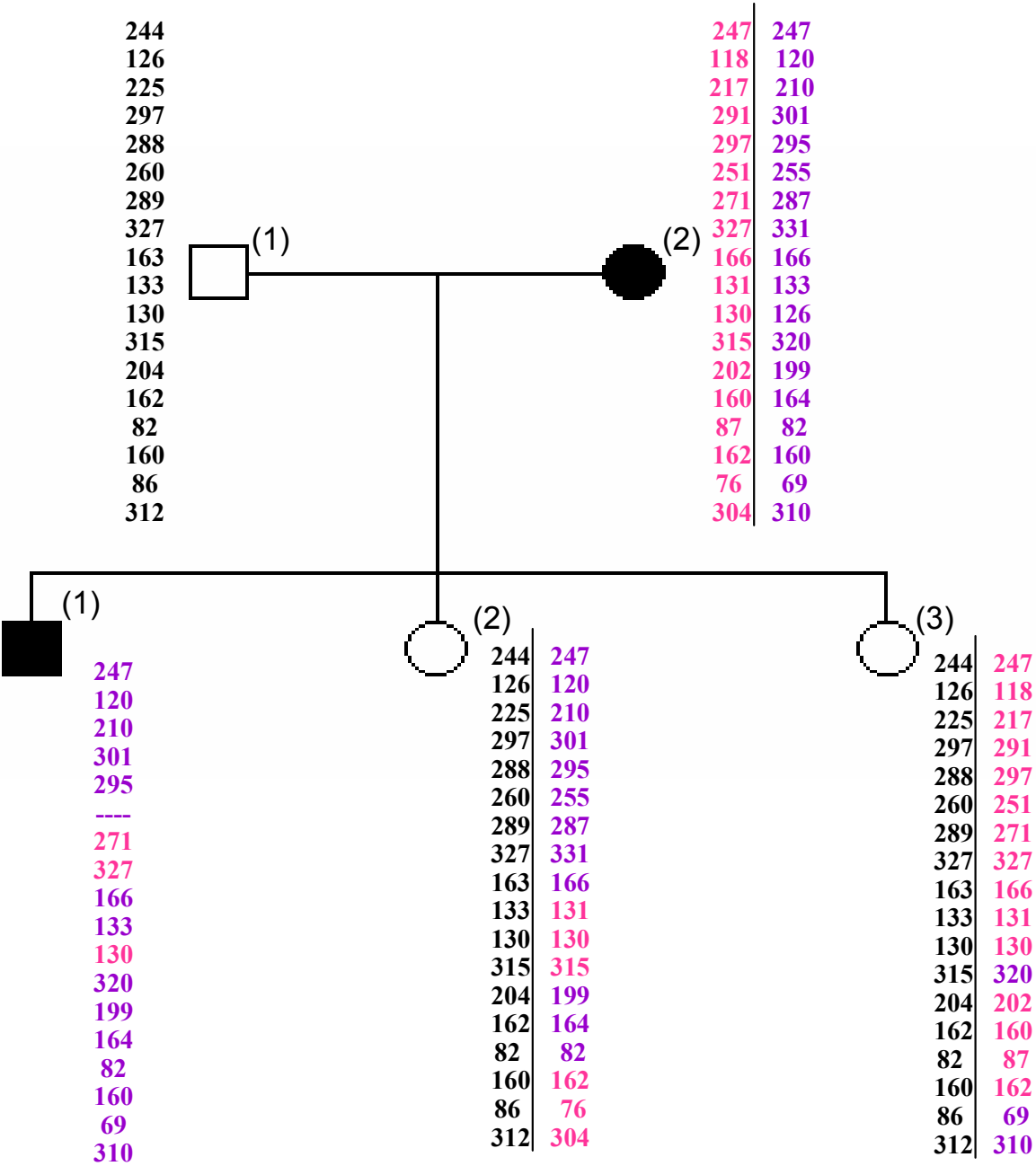
Figura 18: Família 2

Cromossomo X

- DXS1060
- DXS8051
- DXS987
- DXS1226
- DXS1214
- DXS1068
- DXS993
- DXS991
- DXS986
- DXS990
- DXS1106
- DXS8055
- DXS 1001
- DXS1047
- DXS1227
- DXS8043
- DXS8091
- DXS1073

I

II



DISCUSSÃO

Conhecidamente uma diversidade de genes está associada ao desenvolvimento de tecidos mineralizados, isso torna difícil um estudo abrangente de doenças genéticas nesses tecidos, inclusive no esmalte dental. Nesse sentido torna-se importante a utilização da genotipagem no auxílio de estudos envolvendo patologias hereditárias do esmalte. A técnica de genotipagem realiza uma varredura em regiões de diferentes cromossomos e permite detectar diferentes padrões de herança cromossômica. Isso possibilita identificar regiões do DNA que aparecem nos familiares doentes e, portanto, são prováveis regiões portadoras de defeitos genéticos associados à patologia.

A genotipagem realizada nesse estudo envolveu cromossomos portadores de importantes regiões associadas à formação do esmalte dental. O cromossomo 1 aloja o gene da tuftelina, uma proteína do esmalte envolvida na mineralização do esmalte, e gene candidato à AI (Kim *et al.*, 2006). O cromossomo 4 aloja importantes genes envolvidos na formação e manutenção dos tecidos mineralizados, incluindo os genes da enamelinina, ameloblastina, *amelotin* (Iwasaki *et al.*, 2005). As principais proteases do esmalte dental, MMP-20 e KLK-4, possuem seus genes localizados no cromossomo 11 e 19, respectivamente (Llano *et al.*, 1997; Hart *et al.*, 2004); enquanto o cromossomo X aloja o gene da mais importante proteína do esmalte, a amelogenina (Salido *et al.*, 1992). Além disso, sabe-se que o cromossomo 7 e 20 são portadores de importantes genes relacionados a tecidos mineralizados, incluindo: DLX-5, EGFR, LEP, BMP-2 e BMP-7 (Partanen *et al.*, 1998; Bradford *et al.*, 2000; Kishida *et al.*, 2005; Zachos *et al.*, 2006; Rifas L., 2006; Narayanam *et al.*, 2006; Haruyama *et al.*, 2006; Morsczech, 2006).

No presente estudo a genotipagem dos cromossomos 1, 4, 7, 11, 19, 20 e X não mostrou padrão de herança relacionado com a AI nas famílias estudadas. Isso sugere que diferentes regiões, nesses ou em diferentes cromossomos, ainda não analisadas, poderiam estar relacionadas à amelogenese imperfeita. Devido à grande quantidade de mutações nas conhecidas proteínas e proteases do esmalte já terem sido associadas a AI, um estudo mais detalhado, envolvendo o sequenciamento dos genes que transcrevem essas, torna-se significativo.

Sabe-se que mutações no gene da amelogenina (Lagerström-Femer *et al.*, 1995; Line *et al.*, 1996; Aldred & Crowford, 1997), enamelin (Kida *et al.*, 2002), ameloblastina (Paine *et al.*, 2003), MMP-20 (Caterina *et al.*, 2002) e KLK-4 (Hart *et al.*, 2004) podem causar hipoplasia dental grave e generalizada - AI.

Pelo menos 14 mutações já foram descritas no gene da amelogenina relacionadas com AI. Entre elas uma deleção de nove pares de bases no exon dois remove parte da sequência sinal resultando em AI tipo hipoplásica (Lagerström-Fermer *et al.*, 1995). A substituição de uma única base (C para A) no exon seis do gene da amelogenina parece também estar associada a AI (Collier *et al.*, 1997). Essa substituição ocorre próximo ao sítio que sofre ação da MMP-20. Estudos mostraram uma redução na taxa de hidrólise pela MMP-20 da amelogenina com essa mutação - a MMP-20 é 25 vezes menos eficiente nos peptídeos que possuíam a mutação, acarretando uma taxa reduzida de formação TRAP (Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). Os autores sugerem que a redução pode alterar a formação do esmalte e resultar numa amelogenese imperfeita ligada ao cromossomo X, ressaltando a importância da MMP-20 na formação do esmalte saudável.

Mutações no gene da enamelina foram identificadas em pacientes com AI autossômica dominante hipoplásica (Kida *et al.*, 2000; Rajpar *et al.*, 2001; Mardh *et al.*, 2002; Hart *et al.*, 2003). A primeira mutação humana descrita nesse gene é um polimorfismo de base única no *splice donor* do íntron sete, o qual resultou em esmalte hipoplásico fino e liso (Rajpar *et al.*, 2001). Observada em uma família da Grã-Bretanha com AI autossômica dominante, por ocorrer no começo do íntron e seguir até o sexto exon, não se pode prever o efeito dessa mutação na estrutura da enamelina. Uma substituição no exon quatro, introduzindo um prematuro *stop* códon, foi descrita em uma família sueca (Mardh *et al.*, 2002), causando uma suave forma de AI, conhecida clinicamente como AI autossômica dominante hipoplásica local, a qual acomete 27% dos casos autossômicos no norte da Suécia (Hu *et al.*, 2003). Mais recentemente, foi demonstrado que uma mutação em *splice donor* depois do códon 196 da enamelina causa AI autossômica dominante hipoplásica em uma família Japonesa (Kida *et al.*, 2002), os membros afetados mostraram esmalte hipoplásico e manchas nas dentações, resultando em dentes amarelados com hipersensibilidade ao frio. Essa mesma mutação foi também caracterizada em uma família australiana (Hart *et al.*, 2003).

O papel da MMP-20 na formação do esmalte dental foi evidenciado com o uso de camundongos “*knockout*” para o gene desta enzima. Estes camundongos desenvolviam alterações semelhantes a amelogenese imperfeita, que era transmitida como um caráter autossômico recessivo (Caterina *et al.*, 2002). Estes achados estão de acordo com o fato de que a grande maioria das anomalias autossômicas recessivas são causadas por mutações em enzimas, onde o funcionamento de apenas um alelo normal parece ser suficiente para conferir uma função normal nos indivíduos heterozigotos (Thompson *et al.*, 1991). Duas

mutações no gene da MMP-20 foram recentemente relacionada com a AI na forma hipomaturada (Kim *et al.*, 2005; Ozdemir *et al.*, 2005). A primeira mutação foi identificada no final do íntron seis afetando o domínio hemopexin da proteína e a segunda mutação corresponde a uma troca de T por A no exon cinco, provocando uma mudança em um importante sítio catalítico (do aminoácido histidina CAT para guatamina CAA).

Recentemente foi demonstrado que uma mutação no gene da KLK-4 está associado a uma forma de hipomaturação da AI autossômica recessiva (Hart *et al.*, 2004), comprovando que KLK-4 tem um papel crítico na mineralização do esmalte. A perda da função da KLK-4 afeta a maturação do esmalte dificultando o crescimento final dos cristais e sua fusão, o que resulta numa deposição adicional de 15-20% de mineral (Hart *et al.*, 2004).

No presente estudo o seqüenciamento dos exons que transcrevem a amelogenina, ameloblastina, enamelina, MMP-20, KLK-4 e *amelotin* parecem não apresentar mutações associadas com AI nas famílias estudadas. Amelogênese imperfeita autossômica recessiva e ligada ao X nessas famílias brasileiras não são causadas por alterações nos reconhecidos genes envolvidos na formação do esmalte dental. Uma possível explicação seria a ocorrência de mutações em regiões intrônicas e/ou promotoras. Além disso, poder-se-ia cogitar na presença de deleções *encompas*, envolvendo todo um exon e não detectadas no seqüenciamento. Entretanto, a análise de genotipagem sugere que essas regiões não estão envolvidas com a AI nas famílias estudadas.

Sabe-se que defeitos em conhecidos genes envolvidos na formação do esmalte dental não podem explicar todos os casos de AI (Hart *et al.*, 2003). Kim *et al.* (2006) mostrou que a atual lista de gene candidatos a AI é insuficiente para identificar os genes

causadores de AI na maioria das famílias estudadas, sugerindo que permanece desconhecidos genes e proteínas críticas para formação do esmalte. Nosso estudo indica que loci de genes envolvidos na histodiferenciação e/ou função de ameloblastos ainda não foram identificados. De fato, recentemente Mendoza *et al.* (2006) mapeou um novo locus para AI autossômico dominante no braço longo do cromossomo 8 (8q24.3).

A exclusão dos genes candidatos consagrados na literatura sugere que tipos comuns de AI são causados por alterações em gene que não são conhecidos ou pelo menos não são considerados como contribuintes para o processo de formação do esmalte dental. A continuidade de estudos envolvendo análise de mutações em famílias com AI faz-se importante para permitir uma melhor compreensão dessa displasia bem como garantir o estabelecimento de um eficiente sistema de nomenclaturas da AI, incluindo padrões moleculares, hereditários e fenotípicos. Isso seria de um valor clínico inestimável, uma vez que possibilitaria uma identificação mais criteriosa da patologia e facilitaria a utilização de estratégias terapêuticas familiares, visando dessa maneira, atenuar os prejuízos da AI e aumentar a qualidade dos tratamentos.

CONCLUSÕES

- O seqüenciamento dos exons que transcrevem a amelogenina, ameloblastina, enamelina, MMP-20, KLK-4 e *amelotin* parecem não apresentar mutações nas famílias estudadas. Dessa maneira, as regiões dos exons que transcrevem essas proteínas e proteases parecem não estar associados com a amelogênese imperfeita nas famílias estudadas.
- A genotipagem dos cromossomos 1, 4, 7, 11, 19, 20 e X não mostrou padrões de herança que sugerissem envolvimento das respectivas regiões com a amelogênese imperfeita em ambas as famílias, autenticando a ausência de mutações nos genes candidatos à AI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Aidar M. Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando acetato de amônia. Dissertação de Mestrado, FOP-UNICAMP, 2006.
2. Alder MJ, Crawford PJ. Molecular biology of hereditary enamel defects. *Ciba Found Symp.* 1997. 205: 200-209.
3. Aoba T, Moreno EC. The enamel fluid in the early secretory stage of porcine amelogenesis: chemical composition and saturation with respect to enamel mineral. *Calcif Tissue Int.* 1987. 41: 86-94.
4. Bartlett JD, Ryu OH, Xue J, Simmer JP, Margolis HC. Enamelysin mRNA displays a developmentally defined pattern of expression and encodes a protein which degrades amelogenin. *Connect Tissue Res.* 1998. 39: 101-109; discussion 141-149.
5. Bartlett JD, Simmer J. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999. 10: 425-441.
6. Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene.* 1996. 183(1-2): 123-128.
7. Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999. 10(4): 425-441.
8. Bradford PG, Maglich JM, Ponticelli AS, Kirkwood KL. The effect of bone morphogenetic protein-7 on the expression of type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in G-292 osteosarcoma cells and primary osteoblast cultures. *Arch Oral Biol.* 2000. 45(2): 159-166.
9. Bronkers ALJJ, Bervoets TJM, Lyaruu DM, Wöltgens JHM. Degradation of hamster amelogenins during secretory stage enamel formation in organ culture. *Matrix Biol.* 1995. 14: 533-541.
10. Brookes SJ, Lyngstadaas SP, Robinson C, Shore RC, Wood SR, Kirkham J. Enamelin compartmentalization in developing porcine enamel. *Connect Tissue Res.* 2002. 43(2-3): 477-481.

11. Carter J, Smillie AC, Shepherd MG. Purification and properties of a protease from developing porcine dental enamel. *Archs Oral Biol.* 1989. 34: 195-202.
12. Catalano-Sherman J, Palmon A, Burstein Y, Deutsch D. Amino acid sequence of a major human amelogenin protein employing Edman degradation and cDNA sequencing. *J Dent Res.* 1993. 72(12): 1566-1572.
13. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem.* 2002. 277(27): 49598-49604.
14. Caterina J., Shi, J., Sun, X., Qian, Q., Yamada, S., Liu, Y., Krakora, S., Bartlett, J. D., Yamada, Y., Engler, J. A., Birkedal-Hansen, H., and Simmer, J. P. Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin. *J Dent Res.* 2000. 79: 1697-16703.
15. Cerny R, Slaby I, Hammarstrom L, Wurtz T. A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res.* 1996. 11(7): 883-891.
16. Colleta RD. Análise de metalo-proteases no germe dental de ratos. Piracicaba, 1996. Tese (Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental) – Universidade Estadual de Campinas.
17. Collier PM, Sauk JJ, Rosenbloom SJ, Yuan ZA, Gibson CW. An amelogenin gene defect associated with human X-linked amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol.* 1997. 42(3): 235-242.
18. Denbesten PK, Heffernan LM. Enamel proteases in secretory and maturation enamel of rats ingesting 0 and 100 ppm of fluoride in drinking water. *Adv Dent Res.* 1989. 3: 199-202.
19. Denbesten PK, Punzi JS, Li W. Purification and sequencing of a 21 kDa and 25kDa bovine enamel metalloproteinase. *Eur J Oral Sci.* 1998. 106: 345-349.
20. Dioszegi M, Cannon P, Van Wart HE. Vertebrate collagenases. *Methods Enzymol.* 1995. 248: 413-431.
21. Emonard H, Grimaud J-A. Matrix Metalloproteinases. *Cell Molec Biol.* 1990; 36: 131-153.

22. Fincham AG, Lau EC, Simmer J, Zeichner-David M. Amelogenin biochemistry-form and function. Amsterdam: Elsevier Science. 1992. 187-201.
23. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Diekwisch TG, Lyaruu DM, Wright JT, Bringas P Jr, Slavkin HC. Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J Struct Biol.* 1995. 115(1): 50-59.
24. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999. 126(3): 270-299.
25. Fincham AG, Moradian-Oldak J. Comparative mass spectrometric analyses of enamel matrix proteins from five species suggest a common pathway of post-secretory proteolytic processing. *Connect Tissue Res.* 1996. 35: 151-156.
26. Fong CD, Cerny R, Hammarstrom L, Slaby I. Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *Eur J Oral Sci.* 1998. 106: 324-330.
27. Fong CD, Hammarstrom L, Lundmark C, Wurtz T, Slaby I. Expression patterns of RNAs for amelin and amelogenin in developing rat molars and incisors. *Adv Dent Res.* 1996b. 10(2): 195-200.
28. Fong CD, Slaby I, Hammarstrom L. Amelin: an enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *J Bone Miner Res.* 1996a. 11(7): 892-898.
29. Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee SK, Ryu OH, Murakami C, Wakida K, Simmer JP, Yamada Y, Bartlett JD. Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res.* 1998. 77(8): 1580-1588.
30. Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Yamakoshi Y, Shimizu M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int.* 1993. 53(4): 257-261.
31. Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, et al. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol.* 2004. 167(5): 973-983.
32. Grant GM, Giambernardi TA, Grant AM, Klebe RJ. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18 and MMP-20) in cultured human cells. *Matrix Biology.* 1998. 18: 145-148.

33. Hart PS, Aldred MJ, Crawford PJ, Wright NJ, Hart TC, Wright JT. Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. *Arch Oral Biol.* 2002. 47(4): 261-265.
34. Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S, Wright JT. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 2004. 41(7): 545-549.
35. Hart PS, Michalec MD, Seow WK, Hart TC, Wright JT. Identification of the enamelin (g.8344delG) mutation in a new kindred and presentation of a standardized ENAM nomenclature. *Arch Oral Biol.* 2003. 48(8): 589-596.
36. Hart PS, Wright JT, Savage M, Kang G, Bensen JT, Gorry MC, Hart TC: Exclusion of candidate genes in two families with autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci.* 2003, 111(4):326-331.
37. Haruyama N, Thyagarajan T, Skobe Z, Wright JT, Septier D, Sreenath TL, Goldberg M, Kulkarni AB. Overexpression of transforming growth factor-beta1 in teeth results in detachment of ameloblasts and enamel defects. *Eur J Oral Sci.* 2006. 114: 30-34.
38. Hu JC, Yamakoshi Y. Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003. 14(6): 387-398.
39. Infante PF, Gillespie GM. Enamel hypoplasia in relation to caries in Guatemalan children *J. Dent. Res.* 1977. 56: 493-498.
40. Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, Gao Y, Wendel M, Ganss B. Amelotin--a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein. *J Dent Res.* 2005. 84(12): 1127-1132.
41. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. *J Orthod.* 2000. 27(3): 227-233.
42. Kida M, Arida T, Shirakawa T, Oguchi H, Sakiyama Y. Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by enamelin gene mutation at the exon-intron boundary. *J. Dent. Res.* 2002. 81: 738-742.
43. Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD, Hu JC MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 2005. 42(3): 271-275.

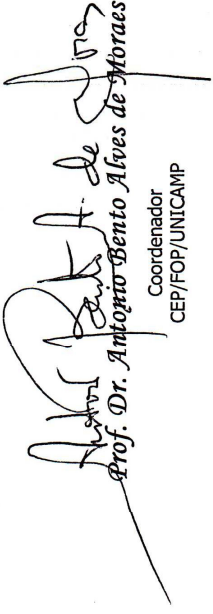
44. Kim JW, Simmer JP, Lin BP, Seymen F, Bartlett JD, Hu JC. Mutational analysis of candidate genes in 24 amelogenesis imperfecta families. *Eur J Oral Sci.* 2006. 114: 3-12.
45. Kishida Y, Hirao M, Tamai N, Nampei A, Fujimoto T, Nakase T, Shimizu N, Yoshikawa H, Myoui A. Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification. *Bone.* 2005; 37(5): 607-621.
46. Langerström-Fermer M, Nilsson, M, Bäckman B, et al.. Amelogenin signal peptide mutation: correlation between mutations in the amelogenin gene (AMGX) and manifestations of X-linked Amelogenesis Imperfecta. *Genomics.* 1995. 26: 159-162.
47. Lau EC, Simmer JP, Bringas P Jr, Hsu DD, Hu CC, Zeichner-David M, Thiemann F, Snead ML, Slavkin HC, Fincham AG. Alternative splicing of the mouse amelogenin primary RNA transcript contributes to amelogenin heterogeneity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992. 188(3): 1253-1260.
48. Li W, Gao C, Yan Y, DenBesten P. X-linked amelogenesis imperfecta may result from decreased formation of tyrosine rich amelogenin peptide (TRAP). *Arch Oral Biol.* 2003. 48(3): 177-183.
49. Li W, Gibson CW, Abrams WR, Andrews DW, DenBesten PK. Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. *Matrix Biol.* 2001. 19: 755-760.
50. Line SRP, Coletta RD, Trevilatto PC. Amelogenina, amelogênese imperfecta e a estrutura do esmalte dental. *Rev Ass Paul Cir Dent.* 1996. 50: 32-35.
51. Llano E, Pendas AM, Knauper V, Sorsa T, Salo T, Salido E, Murphy G, Simmer JP, Bartlett JD, Lopez-Otin C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry.* 1997 Dec 9;36(49):15101-8.
52. Lyngstadaas SP, Risnes S, Sproat BS. A synthetic, chemically modified ribozyme eliminates amelogenin, the major translation product in developing mouse enamel in vivo. *EMBO J.* 1995. 14: 552224-552229.
53. MacDougall M, DuPont BR, Simmons D, Reus B, Krebsbach P, Karrman C, Holmgren G, Leach RJ, Forsman K. Ameloblastin gene (AMBN) maps within the critical region

- for autosomal dominant amelogenesis imperfecta at chromosome 4q21. *Genomics*. 1997. 41(1): 115-118.
54. MacDougall M, Simmons D, Gu TT, Forsman-Semb K, Mardh CK, Mesbah M, Forest N, Krebsbach PH, Yamada Y, Berdal A. Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *Eur J Oral Sci*. 2000. 108(4): 303-310.
 55. Maniatis A, Tsakanikas S, Stamatellou M, Papanastasiou K. Intermediate-dose melphalan for refractory myeloma. *Blood*. 1989. 74(3): 1177.
 56. Mardh CK, Backman B, Simmons D, Golovleva I, Gu TT, Holmgren G, MacDougall M, Forsman-Semb K. Human ameloblastin gene: genomic organization and mutation analysis in amelogenesis imperfecta patients. *Eur J Oral Sci*. 2001. 109(1): 8-13.
 57. Mardh KC, Backman B, Holgren G, Hu JC-C, Simmer JP, Forsman-Semb K. A nonsense mutation in the enamel gene causes local hypoplastic autosomal dominant amelogenesis imperfecta (AIH2). *Hum Mol Genet* 2002. 11: 1069-1074.
 58. Matee M, van't Hof M, Marselle S, Mikx F, van Palenstein Helderman W. Nursing caries, linear hypoplasia, and nursing and weaning habits in Tanzanian infants. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1994. 22: 289-293.
 59. Matee MI, Mikx FH, Marselle SY, van Palenstein Helderman WH. Rampant caries and linear hypoplasia. *Caries Res*. 1992. 26: 205-208.
 60. Mendoza G, Pemberton TJ, Lee K, Scarel-Caminaga R, Mehrian-Shai R, Gonzalez-Quevedo C, Ninis V, Hartiala J, Allayee H, Snead ML, Leal SM, Line SR, Patel PI. A new locus for autosomal dominant amelogenesis imperfecta on chromosome 8q24.3. *Hum Genet*. 2006.
 61. Moradian-Oldak J, Simmer J P, Zeichner-David M, Fincham A G. Specific cleavage of a recombinant amelogenin at the carboxy-terminal region by a proteinase fraction isolated from developing bovine tooth enamel. *Archs Oral Biol*, 1994. 39: 647-656
 62. Morsczeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2006. 78(2): 98-102.

63. Nagano T, Oida S, Ando H, Gomi K, Arai T, Fukae M. Relative levels of mRNA encoding enamel proteins in enamel organ epithelia and odontoblasts. *J Dent Res*. 2003. 82(12): 982-986.
64. Narayanan K, Gajjaraman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2006. 281 (28): 19064-19071.
65. Overall CM, Limeback H. Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. *Biochem J*. 1988. 256: 965-972.
66. Ozdemir D, Hart PS, Ryu OH, Choi SJ, Ozdemir-Karatas M, Firatli E, Piesco N, Hart TC. MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*. 2005. 84(11): 1031-1035.
67. Paine ML, Wang HJ, Luo W, Krebsbach PH, Snead ML. A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfecta related to ameloblastin overexpression. *J Biol Chem*. 2003. 278(21): 19447-1952.
68. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*. 2003. 111(2): 117-127.
69. Partanen AM, Alaluusua S, Miettinen PJ, Thesleff I, Tuomisto J, Pohjanvirta R, Lukinmaa PL. Epidermal growth factor receptor as a mediator of developmental toxicity of dioxin in mouse embryonic teeth. *Lab Invest*. 1998. 78(12): 1473-1481.
70. Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 2001. 10(16): 1673-1677.
71. Rifas L. T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization. *J Cell Biochem*. 2006. 98(4): 406-714.
72. Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci*. 1998. 106: 282-291.
73. Robinson C, Shore RC, Kirkham J, Stonehouse NJ. Extracellular processing of enamel matrix proteins and the control of crystal growth. *J Biol Buccale*. 1990. 18: 355-361.

74. Ryu O, Hu JC, Yamakoshi Y, Villemain JL, Cao X, Zhang C, Bartlett JD, Simmer JP. Porcine kallikrein-4 activation, glycosylation, activity, and expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. *Eur J Oral Sci.* 2002. 110(5): 358-365.
75. Ryu OH, Fincham AG, Hu CC, Zhang C, Qian Q, Bartlett JD, Simmer JP. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *J Dent Res.* 1999. 78(3): 743-750.
76. Salido EC, Yen PH, Koprivnikar K, Yu LC, Shapiro LJ. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 1992. 50(2): 303-316.
77. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994. 17(5): 914-921.
78. Shafer WG, Hine MK, Leny BM. *Tratado de Patologia Bucal.* 4 ed. 1985. Interamericana Editora – São Paulo – Brasil.
79. Shore RC, Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ. Structure of developing enamel. In: Robinson, C; Kirkham, J; Shore, RC. (eds). *Dental Enamel – Formation to Destruction.* CRC press, Boca Raton, 1995. cap. 6: 135-150.
80. Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995. 6: 84-108.
81. Simmer JP, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Uchida T, Xue J, Margolis HC, Shimizu M, DeHart BC, Hu CC, Bartlett JD. Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1. *J Dent Res.* 1998. 77(2): 377-386.
82. Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res.* 2002. 43(2-3): 441-449.
83. Smith CE, Nanci A. Protein dynamics of amelogenesis. *Anat Rec.* 1996. 245: 186-207.
84. Smith EC, Chen W-Y. Degradative changes in whole enamel homogenates incubated in vitro in the presence of low calcium ion concentrations. *Connect Tissue Res.* 1998. 39: 379-391.
85. Takata, T., Zhao, M., Nikai, H., Uchida, T., and Wang, T. Ghost cells in calcifying odontogenic cyst express enamel-related proteins. *Histochem J.* 2000a. 32: 223-229.

86. Takata, T., Zhao, M., Uchida, T., Wang, T., Aoki, T., Bartlett, J. D., and Nikai, H. Immunohistochemical detection and distribution of enamelysin (MMP-20) in human odontogenic tumors. *J Dent Res.* 2000b. 79: 1608-1613.
87. Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ., et al. Properties of dissociatively extracted foetal tooth matrix proteins. I. Principle molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem.* 1980. 255: 9760-9768.
88. Thompsom MW, Mciness RR, Willard HF. *Genetics in Medicine.* 5th Ed, pg 56, 1991.
89. Tommasi AF. *Diagnóstico em Patologia Bucal.* 2 ed. (4 reimpressão). 2000. Pancast Editora Comercio e Repres.Ltda. – São Paulo – Brasil.
90. Uchida T, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M, Yamada M, Miake K, Kobayashi S. Immunochemical and immunohistochemical studies using antisera against porcine 25 kDa amelogenin, 89 kDa enamelin and the 13-17 kDa nonamelogenins, on immature enamel of pig and rat. *Histochemistry.* 1991. 96: 129-138.
91. Väänänen, A., Srinivas, R., Parikka, M., Palosaari, H., Bartlett, J. D., Iwata, K., Grenman, R., Stenman, U. H., Sorsa, T., and Salo, T. Expression and regulation of MMP-20 in human tongue carcinoma cells. *J Dent Res.* 2001. 80: 1884-1889.
92. Van Wart He, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci.* 1990. 87: 5578-5582.
93. Witkop Jr., CJ. Amelogenesis imperfect, dentinogenesis imperfect and dentin displasia revisited: problems in classification. *J.Oral Pathol.* 1989. 17: 547-553.
94. Wright JT, Deaton TG, Hall KI, Yamauchi M. The mineral and protein content of enamel in amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res.* 1995. 32(1-4): 247-252.
95. Yamakoshi Y, Hu JC, Fukae M, Yamakoshi F, Simmer JP. Proteomic analysis of enamel matrix using a two-dimensional protein fractionation system. *Eur J Oral Sci.* 2006. 114: 266-271.
96. Zachos TA, Shields KM, Bertone AL. Gene-mediated osteogenic differentiation of stem cells by bone morphogenetic proteins-2 or -6. *J Orthop Res.* 2006. 24(6): 1279-1291.

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA	
CERTIFICADO		
Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Análise dos genes da MMP-20 e KLK-4 em família com forma recessiva de amelogenese imperfeita", sob o protocolo nº 127/2003, da Pesquisadora Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.		
Piracicaba, 05 de novembro de 2003		
We certify that the research project with title "Analysis of the MMP-20 and KLK-4 genes in a family with recessive form of amelogenesis imperfecta", protocol nº 127/2003, by Researcher Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, responsibility by Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).		
Piracicaba, SP, Brazil, November 05 2003		
 Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes Coordenador CEP/FOP/UNICAMP		

Anexo 2: Lista de artigos extraídos desta tese

1. SANTOS MCLG, HART PS, RAMASWAMI M, KANNO CM, HART TC, LINE SRP. Exclusion of known gene for enamel development in two Brazilian families with Amelogenesis Imperfecta. **Head & Face Medicine**. (enviado para publicação).
2. SANTOS MCLG, LINE SRP. The epigenetics of enamel formation. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, 5(17): 991-995, 2006.
3. SANTOS MCLG, LINE SRP. The genetic of Amelogenesis Imperfecta - a review of the literature. **Journal of Applied Oral Science**, 13(3):212-217, 2005.