



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

Camila da Silva Menezes

**Análise comparativa de assinaturas genéticas em
genes relacionados à amelogênese e dentinogênese
em vertebrados**

**Piracicaba
2017**

Camila da Silva Menezes

Análise comparativa de assinaturas genéticas em genes relacionados à amelogenese e dentinogênese em vertebrados

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA CAMILA DA SILVA MENEZES E ORIENTADA PELO PROFESSOR DOUTOR SÉRGIO ROBERTO PERES LINE

Piracicaba

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/21277-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

M524a Menezes, Camila da Silva, 1994-
Análise comparativa de assinaturas genéticas em genes relacionados à
amelogênese e dentinogênese em vertebrados / Camila da Silva Menezes. –
Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Sérgio Roberto Peres Line.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Amelogênese. 2. Dentinogênese. 3. Processamento alternativo. 4.
Vertebrados. I. Line, Sérgio Roberto Peres, 1963-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Amelogenesis
Dentinogenesis
Alternative splicing
Vertebrates

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 02-10-2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Adriana e Reginaldo, que tanto se sacrificaram para que fosse possível minha formação, sempre com amor e carinho se mostrando presentes.

A minha tia, Janaína, que sempre me apoiou e me escutou nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e paciência para conseguir seguir em frente e completar essa etapa

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line pela confiança, pelo exemplo que sempre se mostrou como docente e pela paciência durante todos esses anos, um agradecimento especial

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba, que me proporcionou minha formação como Cirurgiã-Dentista.

Ao meu companheiro, Giovani, que sempre esteve ao meu lado.

Aos meus queridos amigos, Aline, Ana, Bruna, Karen, Sabrina, Talita, Ederaldo, Guilherme e Johny, pois sem eles não seria possível chegar até aqui e por tornarem esse momento inesquecível.

RESUMO

O sistema mastigatório é uma das partes mais complexas do organismo humano. O aperfeiçoamento deste sistema ocorreu de forma gradual durante a evolução dos vertebrados por aproximadamente 450 milhões de anos. As alterações na forma e número de dentes foram fatores cruciais que contribuíram para o desenvolvimento da mastigação, tendo em vista que o ajuste entre maxila e mandíbula durante a mastigação é regulado principalmente por contatos oclusais das cúspides dentais. O esmalte e dentina são os principais tecidos que formam os elementos dentários. Enquanto que as características microscópicas da dentina são extremamente conservadas nos vertebrados, o esmalte dentário exibe uma ampla gama de variações microestruturais. Desta maneira, o objetivo do presente projeto é comparar a variação de características associadas à eficiência da transcrição e tradução e de características estruturais de proteínas de genes relacionados à formação do esmalte e dentina em vertebrados.

Palavras-chave: amelogênese; dentinogênese; vertebrados; splicing alternativo

ABSTRACT

Masticatory system is one of the most complex parts of the human organism. The enhancement of this system occurred gradually during vertebrates evolution by approximately 450 millions of years. Changes in form and number of teeth were crucial factors that contributed to develop mastication, considering that adjustments between upper and lower jaws are regulated primarily by occlusal contacts of the dental cusps. Enamel and dentin are extremely conserved in vertebrates. Tooth enamel exhibits a wide set of micro structural variations. Thereby, the aim of this project is to compare the variation of characteristics associated to transcription and translation efficiencies, and structural characteristics of proteins from genes related to enamel and dentin formation in vertebrates.

Keywords: amelogenesis; dentinogenesis; vertebrates; alternative splicing

SUMÁRIO

1 Introdução	10
2 Revisão da Literatura	14
3 Proposição	15
4 Material e métodos	16
4.1 Obtenção das assinaturas genéticas relacionadas ao esmalte e dentina.	16
4.2 Comparação do número de sequências codificantes	16
4.3 Comparação das assinaturas genéticas.....	17
4.4 Comparação da hidrofobicidade protéica.....	17
5 Resultados	19
6 Discussão	19
7 Conclusão	27
Referências	29
Anexo 1	x

1 INTRODUÇÃO

Todas as características biológicas de um organismo vivo são, em última análise, determinadas pela expressão genética de suas células. O controle da expressão genética é um dos mais importantes processos biológicos, que pode ser regulado em diferentes etapas. A expressão genética é o processo energeticamente mais caro dentro de uma célula e um uso eficiente da maquinaria de expressão do gene é de fundamental importância para o funcionamento adequado das células. As taxas de expressão do gene são principalmente determinadas pelas sequências de DNA que modulam a transcrição e a tradução, e a seleção para o uso eficiente do ribossomo eficiente parece ser uma importante força que molda a evolução das sequências de genes no sentido de melhorar a expressão do gene (Line et al. 2013). A expressão otimizada pode ser entendida como a razão máxima entre o benefício devido à expressão do gene e os custos da sua produção. A expressão ótima requer uma contribuição equilibrada dos diversos processos que participam da maquinaria da expressão. Assim, um gene que é transcrito a taxas elevadas, deve também ser traduzido de forma eficaz. Portanto, espera-se que as características genéticas de sequência que participam dos diferentes aspectos da expressão do gene irão trabalhar de forma integrada e co-evoluir no sentido de lidar com as demandas para o uso do ideal dos ribossomos celulares (Stark et al. 2005). Desta maneira, características específicas ou assinaturas genéticas das sequências que regulam a transcrição e tradução como o tamanho do gene, tamanho da sequência codificante, estrutura secundária do RNA, frequência de códons, tamanho da região 3'UTR e número de exons podem servir como parâmetros para estimação da capacidade de expressão de um gene.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esmalte

O esmalte dentário é o tecido mais duro e calcificado dos vertebrados, contendo aproximadamente 95% de conteúdo mineral, constituído principalmente por cristais de hidroxiapatita de cálcio. A superfície externa do esmalte é formada por uma camada fina e homogênea onde os cristais de hidroxiapatita são paralelos entre si. Esta camada é dita aprismática (sem prismas). A maior parte do esmalte é formada por prismas ou bastões. Cada prisma se origina na junção entre a dentina e o esmalte (junção amelodentária) e segue até a região próxima a superfície do esmalte. Os prismas são formados devido à variação na orientação dos cristais de hidroxiapatita. A diferença de orientação dos cristais entre dois prismas vizinhos faz com que o limite entre estes seja visível (Nanci, 2008).

Acredita-se que a estrutura prismática foi uma aquisição importante para o desenvolvimento da mastigação nos mamíferos que apareceram há aproximadamente 250 milhões de anos. Os dentes dos répteis, dos quais os mamíferos originaram, são pouco exigidos. Os répteis trocam a dentição muitas vezes durante sua vida (polifiodontes) e não mastigam, usam os dentes apenas para aprisionar e engolir os alimentos. Já os dentes dos mamíferos são muito exigidos, pois estes animais possuem um estilo de vida bastante ativo. O processamento dos nutrientes pela mastigação é uma etapa importante para o seu aproveitamento eficiente. Os mamíferos precisam alimentar-se com frequência e maximizar o aproveitamento da energia e nutrientes contidos nos alimentos. Como consequência os dentes são freqüentemente submetidos a forças de impacto e abrasão pelo contato oclusal entre os dentes opostos durante a mastigação. Além disso, os dentes dos mamíferos são usados durante longos períodos, pois estes possuem somente uma (monofiodontes) ou duas (difiodontes) dentições durante toda a vida (os humanos possuem duas dentições enquanto que os roedores possuem apenas uma). O desenvolvimento da mastigação só foi possível graças a adaptações evolutivas na estrutura do esmalte. A variação da orientação dos cristais de hidroxiapatita ajuda a distribuir as forças mastigatórias que incidem sobre o esmalte, melhorando as propriedades físicas desta estrutura. Nos mamíferos primitivos os prismas eram paralelos entre si e seguiam retos da junção amelodentária até a superfície do esmalte. Na maioria dos mamíferos modernos o esmalte possui uma

estrutura mais complexa, onde os prismas seguem um trajeto tortuoso, além disto, grupos de prismas seguem direções distintas formando as bandas de Hunter-Schreger. Evidências experimentais mostram que as bandas de Hunter-Schreger melhoram as propriedades físicas do esmalte dentário, tornando-o mais resistente a fraturas e abrasão. Estas bandas apareceram pela primeira vez há aproximadamente 60 milhões de anos, num período que coincide com a diversificação das espécies de mamíferos (Line e Novaes 2005). Até este período os mamíferos eram seres pequenos e desprezíveis que se alimentavam de insetos e viviam à sombra dos grandes dinossauros, que dominavam o nosso planeta. A extinção dos dinossauros há 65 milhões de anos permitiu aos mamíferos ocupar os territórios deixados pelos antigos donos do planeta. Novas espécies surgiram, animais maiores e com novos tipos de dietas apareceram em um período relativamente curto. O aumento do tamanho causou um conseqüente aumento na força mastigatória (animal maior possui maior força mastigatória). Associado a este fator, dietas baseadas em fibras vegetais nos animais herbívoros ou a necessidade de triturar ossos nos animais carnívoros aumentaram o esforço sobre o esmalte dentário aumentando a possibilidade de fratura neste tecido. Desta maneira, as bandas de Hunter-Schreger conferiram uma importante vantagem seletiva. Dentes com estas estruturas puderam permanecer funcionais por mais tempo, melhorando as chances de sobrevivência das espécies na qual estavam presentes (Line e Bergqvist, 2005)

A formação do esmalte é um processo complexo que envolve eventos biológicos importantes. O esmalte é formado pelos ameloblastos que se originam a partir das células do epitélio interno do órgão dentário. A diferenciação das células do epitélio interno ocorre devido à influência das células da papila dentária subjacentes. Esta diferenciação é regulada pela expressão de fatores como *Shh*, *Smo*, além da interação das células com proteínas da matriz extracelular. A matriz extracelular que origina o esmalte é sintetizada, secretada e organizada por células especializadas do órgão dentário, os ameloblastos. O desenvolvimento do esmalte é caracterizado por interações complexas entre componentes desta matriz extracelular em fase orgânica, fase mineral e fase aquosa. Estas interações ocorrem em três estágios: o *secretório* com deposição de uma matriz predominantemente orgânica pelos ameloblastos; 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. No final desse processo o esmalte torna-se o material mais duro do organismo. 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 constituição orgânica (Nanci 2008).

As principais proteínas envolvidas na formação do esmalte são a amelogenina, meloblastina e enamelinina. As amelogeninas são um grupo heterogêneo de proteínas que constituem 90% do total de proteínas da matriz no estágio secretório. As amelogeninas são altamente hidrofóbicas, e em solução, formam agregados conhecidos como “nanosferas”. As nanosferas interagem com os cristais extremamente finos dos estágios precoces da formação do esmalte modulando seu crescimento. 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 amelogenese imperfeita ligada ao cromossomo X, doença em que há formação de esmalte pouco mineralizado e bastante desorganizado; 2) por resultados *in vitro* mostrando que inibidores da degradação da amelogenina promovem mineralização deficiente no esmalte dentário. A remoção das amelogeninas durante a maturação parece um passo crítico para a mineralização do esmalte e parece ser dependente de proteinases presentes na matriz orgânica do mesmo. Durante o desenvolvimento dentário, proteinases são secretadas pelos ameloblastos e clivam as proteínas do esmalte. Diferentes proteinases 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. A metaloproteinase da matriz-20 (MMP-20) é também conhecida como enamelinina. A função da MMP-20 parece ser a remoção gradual da amelogenina na fase secretória, alterando o comportamento físico químico da molécula. O gene da MMP-20 humano localiza-se no braço longo do cromossomo 11 (11q22.3) e possui 9 exons. Outra enzima que participa no processamento da matriz do esmalte é uma serino-proteinase, conhecida como calicreína-4 ou KLK-4. Ela é secretada como uma pré-enzima (zimógeno) com 230 aminoácidos que é então ativada por clivagem proteolítica, sendo encontrada no tecido em duas formas com massas moleculares de 30 e 34 kDa. A KLK-4 é expressa no final do estágio de transição e durante todo

o estágio de maturação. Ela parece ter uma função digestiva, clivando a amelogenina e as outras proteínas da matriz do esmalte durante o início da fase de maturação. A degradação e remoção da matriz protéica do esmalte dentário permite um rápido crescimento dos cristais de hidroxiapatita durante esta fase. O gene *KLK-4* localiza-se no braço longo do cromossomo 19 (19q13.41) e possui 6 exons.

2.2 Dentina

A dentina é o tecido mineralizado de natureza conjuntiva que constitui a maior parte da estrutura do dente, sendo recoberto pelo esmalte na porção coronária e pelo cemento na porção radicular. A dentina suporta o esmalte, amortecendo as forças da mastigação. Sem o apropriado suporte da dentina, o esmalte tende a fraturar e facilmente soltar-se da dentina. Embora a dentina tenha conteúdo orgânico e propriedades mecânicas similares ao osso, a matriz dentinária tem uma microestrutura única considerando os longos processos odontoblásticos.

A dentina, secretada pelos odontoblastos, tem sua matriz orgânica composta em parte por proteínas colagênicas e parte não-colagênicas. A principal proteína não-colagênica secretada pelos odontoblastos para formação da dentina é a sialofosfoproteína da dentina (*DSPP*, 8).

Após a secreção da proteína *DSPP* pelos odontoblastos, esta é clivada em três proteínas menores por múltiplas proteases extracelulares: sialoproteína da dentina (*DSP*), glicoproteína da dentina (*DGP*) e fosfoproteína da dentina (*DPP*). *DSP* e *DPP* são as duas principais proteínas não-colagênicas da matriz dentinária, mas que têm papéis distintos na dentinogênese. *DSP* é um proteoglicano que forma dímeros covalentes ligados por pontes dissulfeto, *DGP* é uma glicoproteína fosforilada e a *DPP* (também conhecida como fosforina) é uma proteína altamente fosforilada (ácida). Por ser altamente hidrofílica, a proteína *DPP* expressa pelos odontoblastos interage com as fibrilas do colágeno da matriz dentinária e contribui para a nucleação de cristalitos minerais. Tem sido sugerido que a *DPP* atua como um iniciador da mineralização da pré-dentina, bem como no controle da mineralização da dentina. Contudo, estudos recentes têm mostrado que *DSP* é suficiente para iniciar a mineralização, enquanto que *DPP* é importante para maturação da dentina. Os principais tipos de alterações genéticas que acometem a dentina são as Dentinogênese Imperfeitas e as Displasias Dentinárias, que

apresentam herança autossômica dominante e afetam as dentições decíduas e permanentes (Nanci 2008).

2.3 Hidrofobicidade das proteínas da matriz do esmalte

Delgado et al. (2005) realizaram uma análise evolutiva da amelogenina em mamíferos. A amelogenina é uma proteína importante na formação do esmalte e o estudo demonstrou que a região hidrofóbica central, em sua maioria a região do exón 6, é mais variável, no entanto, conservaram grande quantidade de prolina e glutamina, mostrando que esses aminoácidos desempenham papéis importantes nessa região. As proteínas ancestrais analisadas continham as mesmas características das sequências modernas. A amelogenina possui resíduos de aminoácidos muito conservados nas suas extremidades amino e carboxi-terminal. As regiões altamente conservadas estão sujeitas a fortes pressões seletivas, no entanto, a região hidrofóbica central é menos restrita e, conseqüentemente, evolui mais rapidamente.

Jin et al. (2009) mostram que a variação do número de resíduos prolina hidrofóbicos na porção carboxi-terminal parece estar correlacionada com o alongamento dos cristais de hidroxiapatita e também se relaciona com a complexidade e espessura do esmalte em vertebrados.

Kyte et al. (1982) sugerem um método de avaliação das estruturas proteicas através de um programa que avalia progressivamente a hidrofobicidade e hidrofobicidade das proteínas ao longo de sua cadeia de aminoácidos.

2.4 Região 3'UTR e micro RNA's

Lai (2002) sugeriu uma função mais geral dos micro RNAs na regulação do gene. Os micro RNAs se demonstraram complementares a da região 3'UTR, que medeiam a regulação negativa pós traducional.

Liu et al. (2012) realizaram uma análise comparativa em diferentes espécies de eucariotos das regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3' analisando características básicas de três reinos: Plantae, Fungi e Protista. Os resultados do estudo sugere que a evolução das espécies acompanha o aumento da complexidade regulatória das regiões UTR.

Stark et al. (2005) sugerem que uma gama de genes relacionados aos processos celulares básicos não realizam a regulação de microRNAs devido a

regiões 3'UTR curtas. O mesmo acontece aos microRNAs individuais quando são expressos em tecidos vizinhos, o que confere exatidão a expressão genética.

3 PROPOSIÇÃO

Haja vista a grande variabilidade dos padrões microestruturais do esmalte dentário, o objetivo do presente projeto é comparar a variação de assinaturas genéticas associadas à eficiência de tradução e de comparar a hidrofobicidade de proteínas presentes na matriz do esmalte e dentina em vertebrados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de assinaturas genéticas relacionadas à formação do esmalte e dentina

Os genes relacionados à formação do esmalte e dentina foram obtidos no site <http://bite-it.helsinki.fi/> da base de dados Genecards (www.genecards.org) e foram divididos em dois grupos:

Esmalte: Foram considerados genes relacionados à formação do esmalte dentário aqueles que foram expressos por ameloblastos e/ou presentes na matriz do esmalte dentário. Foram excluídos desta lista genes expressos por odontoblastos, cementoblastos e cuja proteína estiver presente na dentina, pré-dentina ou cimento.

Dentina: Foram considerados genes relacionados à formação da dentina genes expressos por odontoblastos ou presentes na dentina ou pré-dentina.

As sequências codificantes e de proteínas, assim como o tamanho das sequências dos genes e da região 3'UTR destes genes e número de exons, foram obtidas do site "Biomart" (www.biomart.org) em todas as espécies de vertebrados disponíveis no site. Os passos para obtenção foram: "Biomart" (Ensembl) – "Choose database" – "Ensembl Genes 75" – "Choose Dataset" – "Homo sapiens Genes". Entrando na opção "Filters": Selecionar a opção "Wikigene Name" e colar os nomes dos genes em "+ gene". Na opção "Attributes": Com a opção "Features" selecionada, selecionar também, a partir daí, "Ensembl Transcript ID" e "Associated Transcript Name". Assim, obtêm-se os resultados.

4.2 Comparação do número de sequências codificantes

a) Comparação esmalte e dentina: Haja vista que um gene pode ter mais de uma sequência codificante devido ao "splicing" alternativo, o número de sequências codificantes para cada gene (com sequências dos genes de todas as espécies) dos grupos dentina e esmalte foram comparados pelo teste "Mann-Whitney". Isto indicou se o fenômeno de "splicing" alternativo pode estar associado com a variabilidade fenotípica. Além do esmalte e dentina foram coletados também genes expressos no cimento dentário (cementoblastos) e osso (osteócitos e osteoblastos).

b) Comparação esmaltes prismático e aprismático.

Nesta comparação os animais foram divididos em dois grupos, sendo animais que possuem esmalte prismático e animais com esmalte aprismático. O número de sequências codificantes entre os grupos foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Foram feitas análises separadas para os genes do esmalte e dentina, para verificar se as possíveis diferenças encontradas com genes de esmalte são somente associadas às características fenotípicas ou devido a “bias” filogenético, pois a maioria dos animais com esmalte aprismático são não mamíferos.

Os animais usados na comparação foram:

Mustela putorius furo (Furão), *Loxodonta africana* (Elefante), *Ailuropoda melanoleuca* (Panda), *Sarcophilus harrisi* (Diabo da Tasmania), *Felis catus* (Gato), *Xenopus tropicalis* (Rã), *Anolis carolinensis* (Calango), *Tursiops truncatus* (Golfinho), *Dasypus novemcinctus* (Tatu) e *Ornithorhynchus anatinus* (Ornitorrinco).

4.3 Comparação das assinaturas genéticas

a) Comparação esmalte e dentina: Neste caso foram feitas análises de regressão logística das assinaturas genéticas dos transcritos dos genes dos grupos esmalte e dentina usando os seguintes parâmetros: Tamanho do transcrito, tamanho do gene, número de éxons e tamanho da região 3'UTR (Stark et al. 2005, Liu et al. 2012).

b) Comparação esmaltes prismático e aprismático: Nesta comparação os animais foram divididos em 2 grupos, sendo animais que possuem esmalte prismático e animais com esmalte aprismático. As comparações foram feitas análises por regressão logística das assinaturas genéticas dos transcritos dos genes dos grupos prismático e aprismático usando os seguintes parâmetros: Tamanho do transcrito, tamanho do gene, número de éxons e tamanho da região 3' UTR. Foram feitas análises separadas para os genes do esmalte e dentina, para verificar se as possíveis diferenças encontradas com genes de esmalte são somente associadas às características fenotípicas ou devido a “bias” filogenético, pois a maioria dos animais com esmalte aprismático são mamíferos inferiores (i.e. répteis e anfíbios). A discriminação das regressões dos grupos esmalte e dentina foram comparadas usando-se curvas ROC.

4.4 Comparação da hidrofobicidade protéica

a) Comparação entre esmalte e dentina:

Os valores de hidrofobicidade (Kyte et al. 1982) para cada gene (com sequências dos genes de todas as espécies) dos grupos dentina e esmalte foram comparado pelo teste “Mann-Whitney”.

b) Comparação entre esmaltes prismático e aprismático.

Nesta comparação os animais foram divididos em 2 grupos, sendo animais que possuem esmalte aprismático e animais com esmalte prismático. Os valores de hidrofobicidade dos domínios das proteínas foram também comparados pelo teste de Mann-Whitney. Foram feitas análises separadas para os genes do esmalte e dentina, para verificar se as possíveis diferenças encontradas com genes de esmalte prismático e aprismático são somente associadas às características fenotípicas ou devido a “bias” filogenético, pois a maioria dos animais com esmalte aprismático são não-mamíferos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na comparação entre esmalte e dentina, como o valor de $p > 0,05$, conclui-se que a diferença entre os pontos médios é devido ao acaso, de acordo com a figura 1

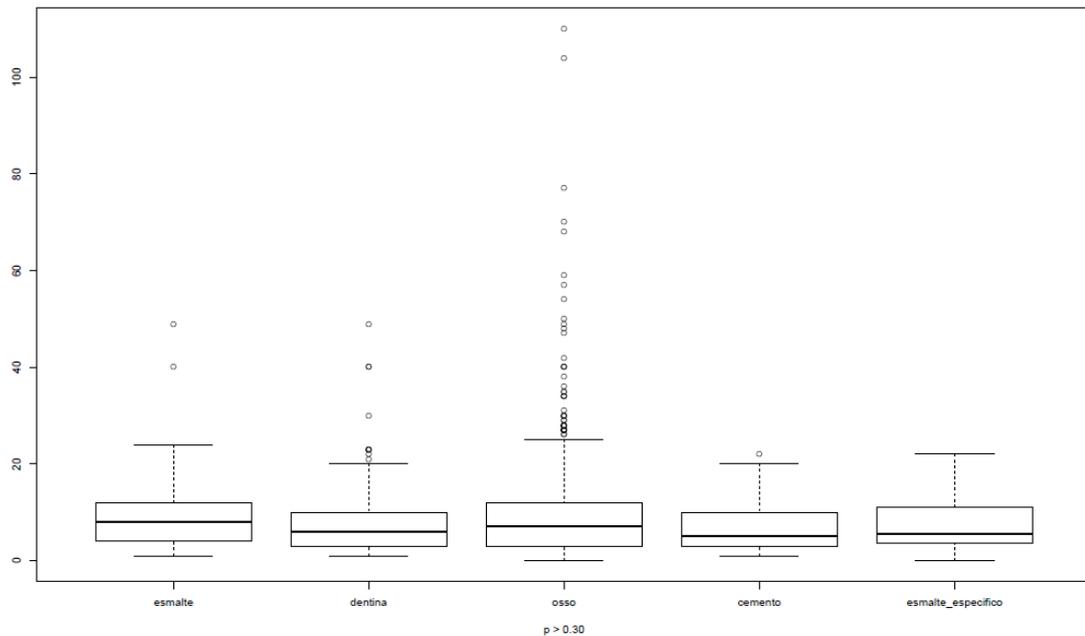


Figura 1. Número de sequências codificantes para genes expressos no esmalte, dentina, osso e cimento humano

Quando os genes expressos no esmalte dentário foram comparados não se obteve uma diferença significativa entre o número de sequencias codificantes presentes nos animais com esmalte prismático e animais com esmalte aprismático ($p > 0.08$, Fig. 2, “Enamel genes”). Da mesma forma, quando os genes expressos na dentina foram comparados não se obteve uma diferença significativa entre o número de sequencias codificantes presentes nos animais com esmalte prismático e animais com esmalte aprismático ($p > 0.24$, Fig. 2, “Dentin genes”). Como pode ser observado na figura 2 a grande maioria dos genes possuía apenas 1 sequência codificante, o que diferiu dos genes humanos (Figura 1), que possuíam em sua maioria mais de uma sequência codificante. Acreditamos que isto não reflete uma verdade biológica e possivelmente reflete a maior cobertura de sequenciamento

para os genes humanos. Assim sendo análises comparativas entre mamíferos devem ser interpretadas com cautela.

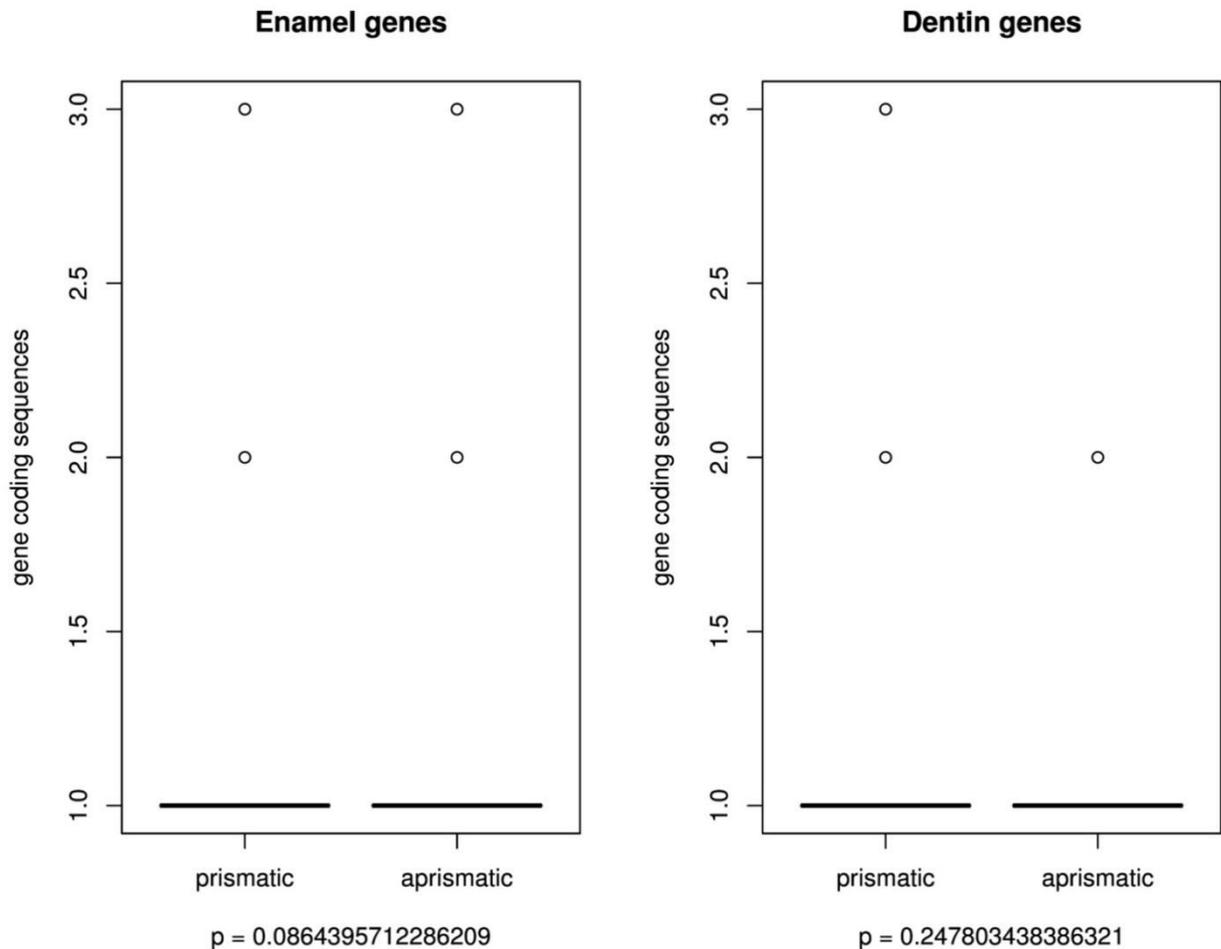


Figura 2. Sequências codificantes nos esmaltes prismático (prismatic) e aprismático (aprismatic) expressas no esmalte (Enamel genes) e dentina (Dentin genes)

Na comparação entre os tamanhos dos genes, sequências codificantes, tamanho da região 3'UTR e número de exons em genes relacionados a síntese do esmalte dentário e dentina em animais com esmalte prismático e esmalte aprismático. Não foram encontradas diferenças nestes parâmetros nos genes expressos na dentina (Figura 3A). No entanto, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0.0001$, Teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni) quando se comparou o tamanho da região 3' não traduzida (3' UTR) nos genes expressos no esmalte dentário de animais com esmalte prismático e esmalte aprismático. Sendo que o tamanho da região 3'UTR foi maior nos genes dos animais com esmalte prismático (Figura 3B). Esta diferença parece ter ocorrido devido ao fato de que

muitos genes dos animais, com esmalte aprismático, não possuíam região 3'UTR (tamanho = 0). Esta tendência pode ter ocorrido devido ao fato de que este grupo incluía não mamíferos, o que não ocorreu no grupo prismático, que era constituído somente por mamíferos. No entanto, o fato de que não existiu diferença neste parâmetro, quando foram comparados os genes da dentina, sugere que a diferença no tamanho da região 3'UTR nos genes do esmalte, não ocorreu devido a presença de não mamíferos.

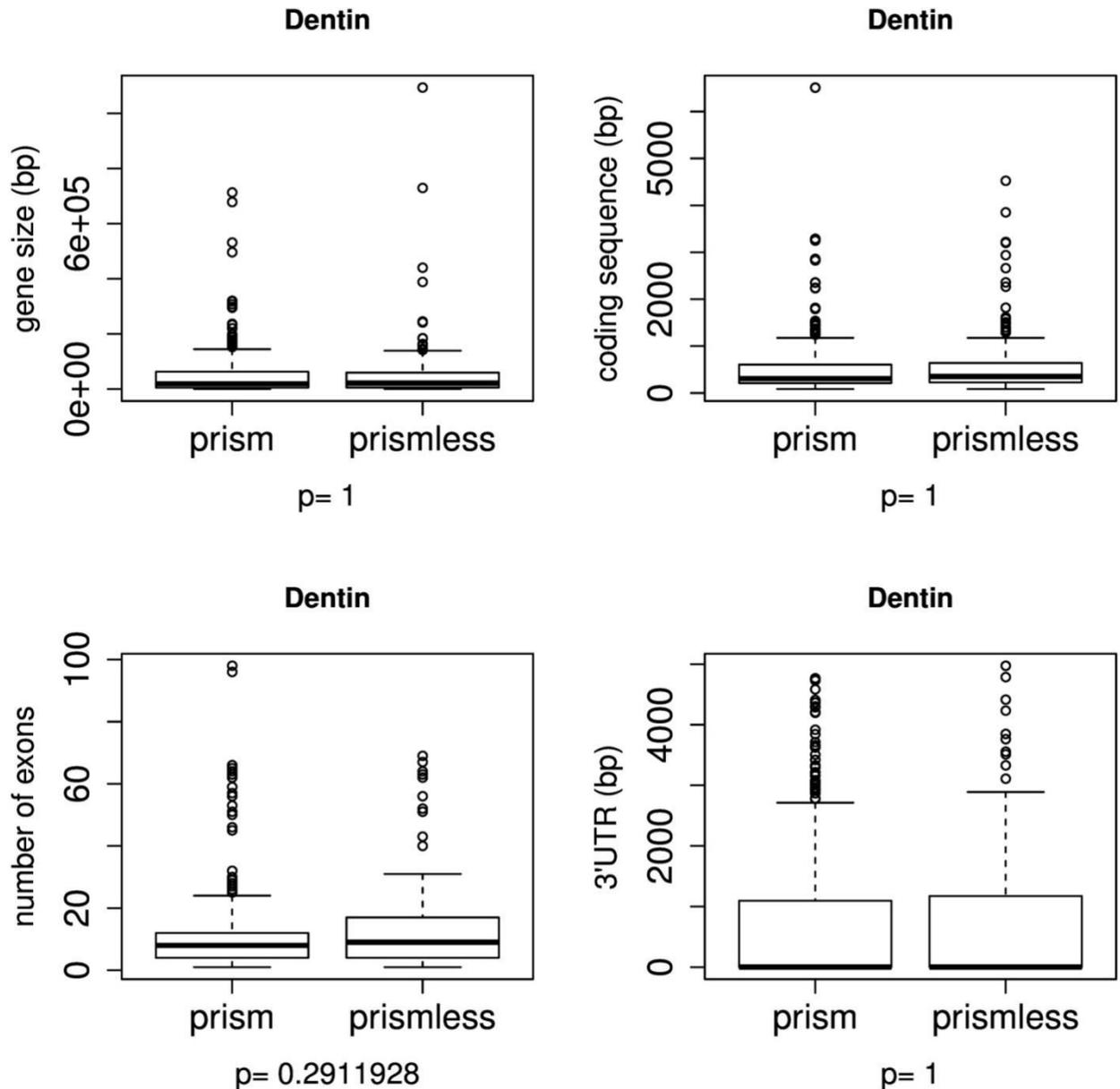


Figura 3A -. Medianas e intervalos inter quartílicos do número de pares de bases (BP) (gene size) e seqüências codificantes (coding sequences) do número de exons (number of exons) e número de pares de bases das regiões 3'UTR dos genes da dentina (I.e. Expressos em odontoblastos) em animais com esmalte prismático e aprismático. As diferenças entre os grupos foram consideradas não significantes ($p > 0.05$, Teste de "Mann-Whitney")

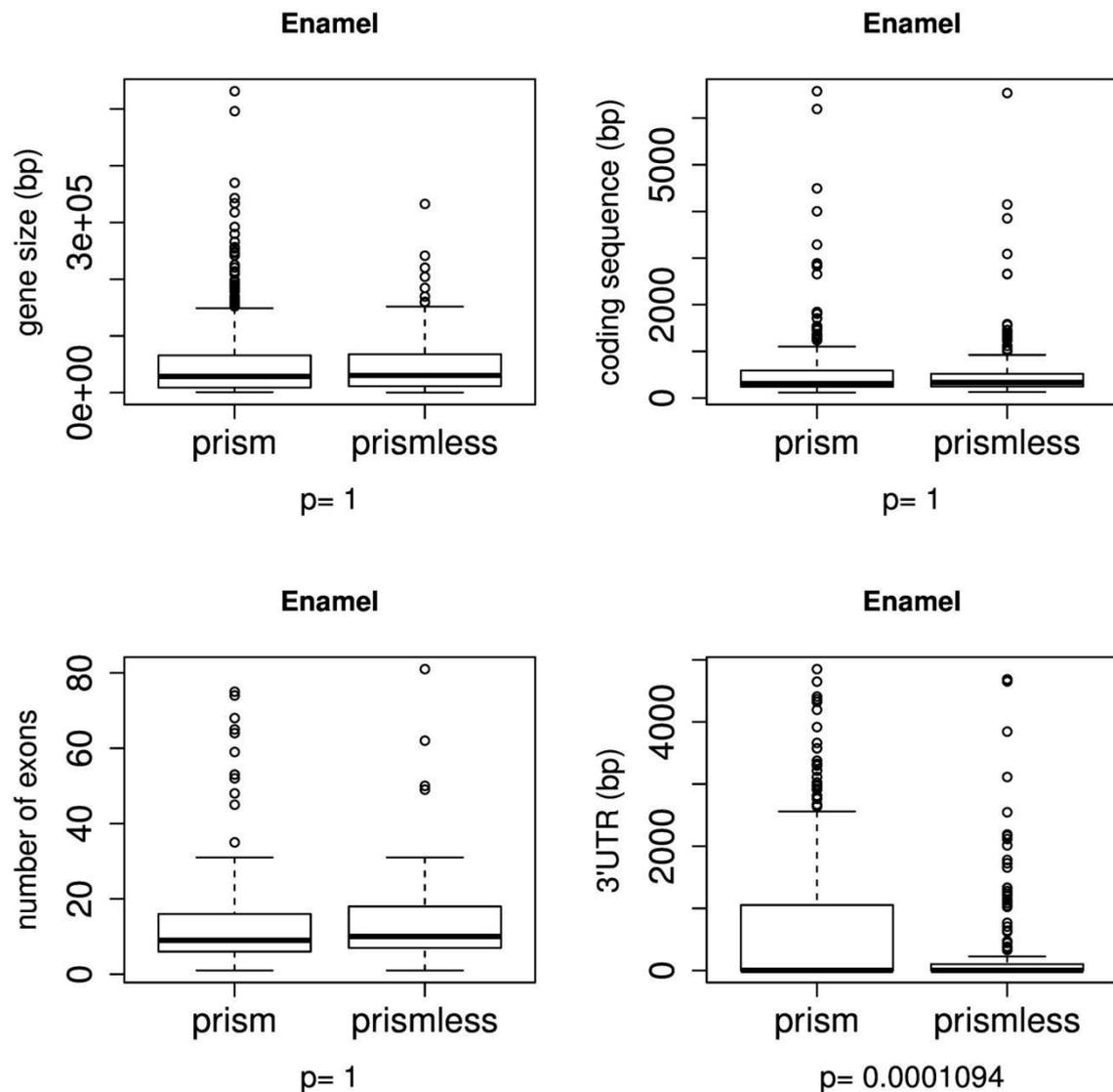


Figura 3B. Medianas e intervalos inter quartílicos do número de pares de bases (BP) (gene size) e sequências codificantes (coding sequences) do número de exons (number of exons) e número de pares de bases das regiões 3'UTR dos genes de esmalte (i.e. Expressos em ameloblastos) em animais com esmalte prismático e aprismático. As diferenças entre os três primeiros grupos foram considerados não significantes ($p > 0.05$, Teste de "Mann Whitney"). Existiu diferença significativa entre o tamanho das regiões 3'UTR entre os dois grupos analisados.

As sequências codificantes obtidas do site Biomart passaram por processo de filtragem onde foram removidas as sequências que possuíam sequências não definidas (N), sequências que não eram iniciadas pelo códon de ATG (metionina) e sem códons de parada (TAA, TAG, TGA). Os genes que possuíam mais de uma sequência codificante foram filtrados de maneira que somente a sequência de maior tamanho foi mantida. As sequências de DNA foram transformadas em sequências de peptídeos e a média da hidrofobicidade foi calculada segundo Kyte e Doolittle

(1982). A figura 4A compara as médias da hidrofobicidades dos polipeptídeos do esmalte e dentina de genes humanos. As diferenças entre os grupos foram consideradas não significantes ($p = 0.1129$, Teste de Mann-Whitney). Estes resultados sugerem que não existem diferenças significantes de hidrofobicidade entre as proteínas do esmalte dentário e dentina.

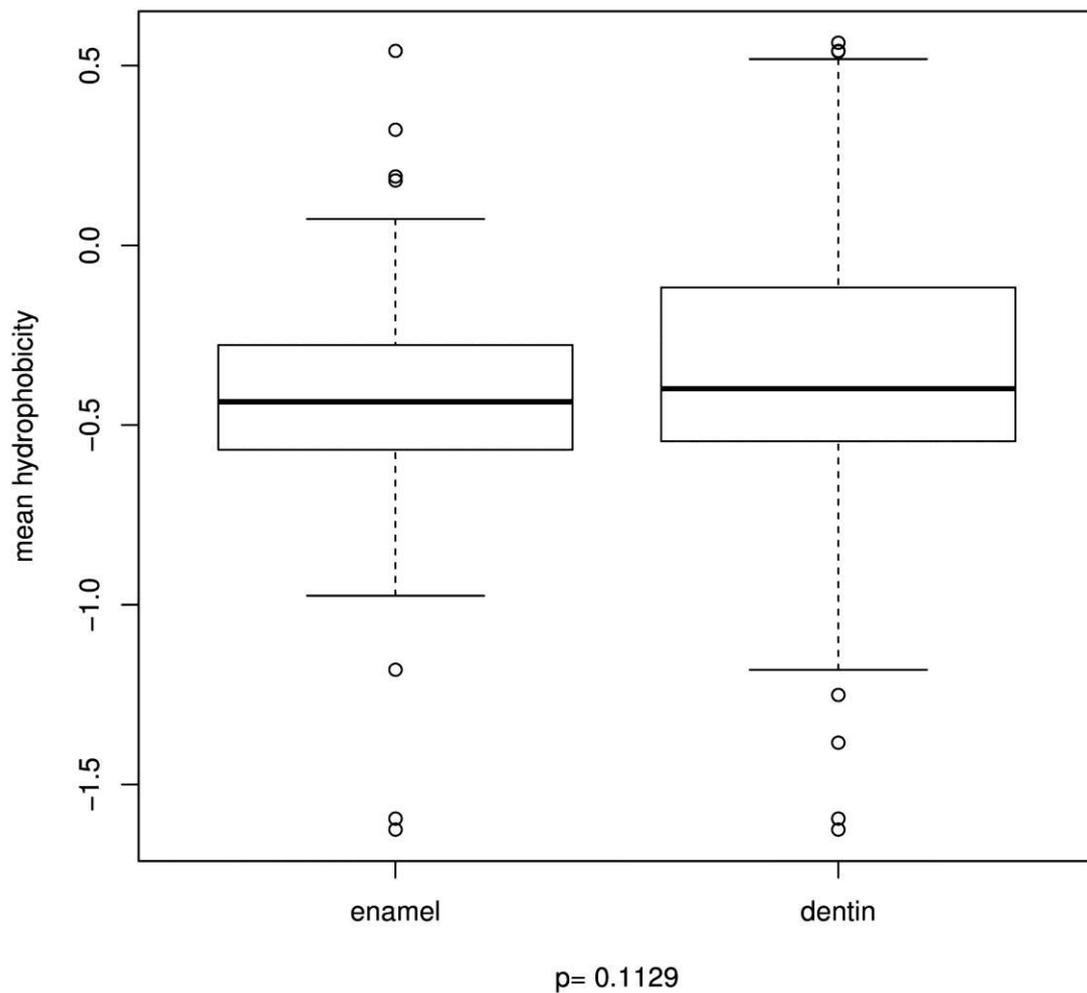


Figura 4A. Comparação das médias da hidrofobicidade dos polipeptídeos do esmalte e dentina de genes humanos. As diferenças entre os grupos foram consideradas não significantes ($p = 0.1129$, Teste de “Mann-Whitney”).

Foram também comparadas os valores de hidrofobicidade das proteínas dos animais que possuem esmalte prismático (Humanos, Panda, Diabo da Tasmânia, Gato, Elefante) e animais que possuem esmalte aprismático (Calando Anolis, Xenopus, Golfinho, Tatu, Ornitorrinco). Como no experimento anterior, não foram encontradas

diferenças significativas de hidrofobicidade das proteínas entre estes grupos (Figura 4B, $p = 0.95$, Teste de Mann-Whitney). Estes experimentos sugerem que a existência de esmalte prismático não ocorreu devido a uma alteração generalizada da hidrofobicidade dos genes do esmalte dentário.

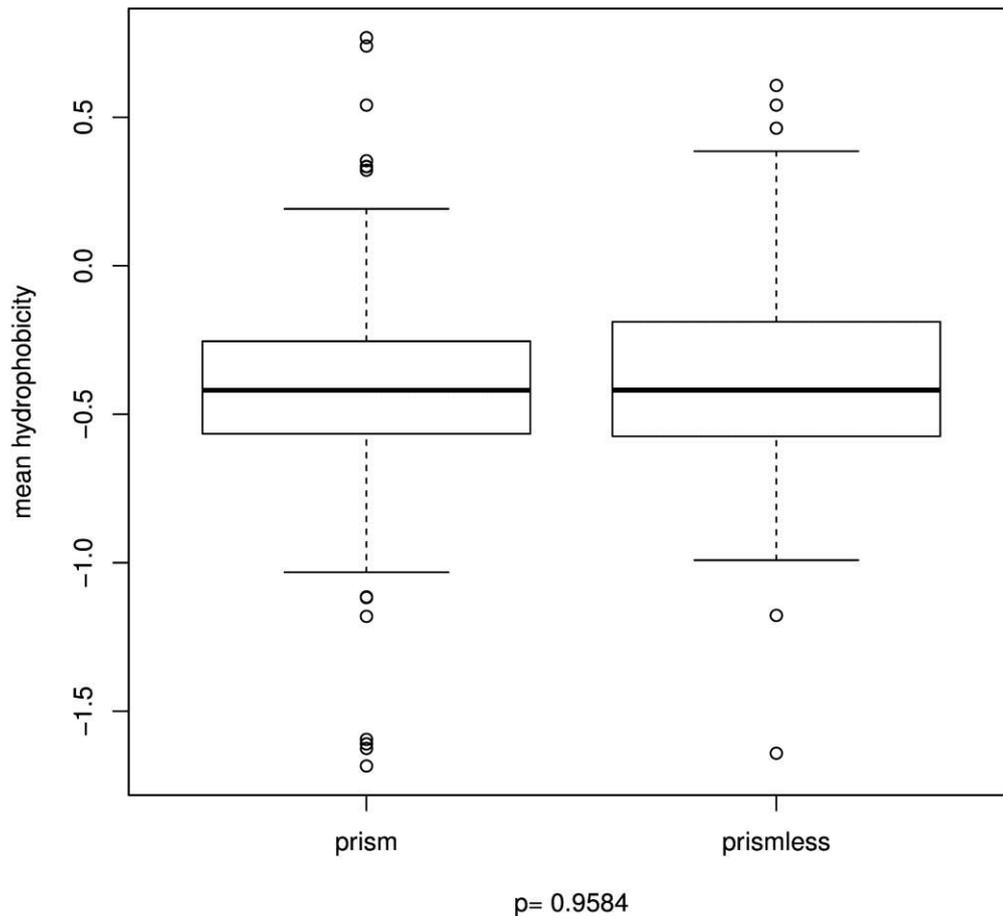


Figura 4B. Comparação das médias da hidrofobicidades dos polipeptídeos entre animais com esmalte prismático e aprismático. As diferenças entre os grupos foram consideradas não significantes ($p = 0.95$, Teste de Mann-Whitney).

6 CONCLUSÃO

Ao comparar o número de sequências codificantes entre esmalte e dentina foi possível concluir que o splicing alternativo não está associado com a variabilidade fenotípica, pois não varia entre os tecidos (Figura 1). A variabilidade da plasticidade evolutiva e variabilidade fenotípica do esmalte não estão associadas com o número de sequências codificantes para os genes deste tecido.

A região 3'UTR geralmente contém elementos envolvidos na regulação pós transcricional da expressão genética. A ligação de proteínas e micro RNAs (miRNAs) nessas regiões, geralmente aumenta a degradação de moléculas de RNA mensageiro. A regulação da expressão genética mediada por miRNAs parece ser mediada pela diminuição do comprimento da porção 3'UTR (Stark et al., 2005). Existe uma correlação significativa entre o tamanho da região 3'UTR e frequência de sequências microsátélites ($r = 0,73$, $p = 0,0001$) (Liu et al. 2012). As regiões 3'UTR são ricas em sítios para ligação de micro RNAs, que se ligam nessas sequências e induzem a degradação do mRNA (Lai, 2002). A variação no tamanho da região 3'UTR é uma estratégia usada para a modulação da expressão genética frente à pressões seletivas. Variações na conformação e tamanho das regiões UTR humanas podem explicar até 14% de variação da expressão de mRNAs (Line et al., 2013). Nossos resultados sustentam a importância biológica de regiões 3' UTR para a expressão eficiente de genes envolvidos com a síntese do esmalte dentário. O aumento do tamanho destas regiões, possivelmente, está relacionado com um maior controle e precisão da expressão genética.

Já as proteínas da matriz extracelular, em geral, possuem caráter hidrofóbico. As amelogeninas e o colágeno que são, respectivamente, as principais proteínas do esmalte e dentina, são proteínas hidrofóbicas. Esta característica se faz necessária para manter baixa a hidrossolubilidade dessas proteínas no meio extracelular. A amelogenina possui resíduos de aminoácidos muito conservados nas suas extremidades amino e carboxi-terminal (Delgado et al., 2005). A variação do número de resíduos prolina hidrofóbicos na porção carboxi-terminal parece estar correlacionada com o alongamento dos cristais de hidroxiapatita e também se relaciona com a complexidade e espessura do esmalte em vertebrados (Jin et al., 2009). Apesar de nossos resultados sugerirem que a existência de esmalte prismático não ocorreu devido a uma alteração generalizada da hidrofobicidade dos

genes do esmalte dentário, é possível que variações na hidrofobicidade tenham ocorrido em grupos específicos de genes, como genes da matriz extracelular.

Em suma, Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$ teste de Mann-Whitney) apenas quando se comparou o tamanho da região 3'UTR (3'UTR) entre esmalte prismático e aprismático, sendo maior em animais com esmalte prismático. Nossos resultados sustentam a importância biológica de regiões 3' UTR para a expressão eficiente de genes envolvidos com a síntese do esmalte dentário. O aumento do tamanho destas regiões, possivelmente, está relacionado com um maior controle e precisão da expressão genética.

REFERÊNCIAS

Delgado S, Girondot M, Sire JY. Molecular evolution of amelogenin in mammals. *J Mol Evol.* 2005 Jan;60(1):12-30.

Jin T, Ito Y, Luan X, Dangaria S, Walker C, Allen M, et al.. Elongated polyproline motifs facilitate enamel evolution through matrix subunit compaction. *PLoS Biol.* 2009 Dec;7(12):e1000262. doi: 10.1371/journal.pbio.1000262.

Kyte J, Doolittle RF. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J Mol Biol.* 1982;157:105-32.

Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, 2002 30:363,364

Line SRP and Novaes PD. The development and evolution of mammalian enamel: structural and functional aspects. *Braz. J. morphol. Sci.* (2005) 22(2), 67-72

Line SRP, Bergqvist LP. Enamel structure of paleocene mammals of the São José de Itaboraí basin, Brazil. 'Condylarthra', Litopterna, Notoungulata, Xenungulata, and Astrapotheria. *Journal of Vertebrate Paleontology* Volume 25, 2005, 25:924-928

Line SRP, Liu X, de Souza AP, Yu F. Translational signatures and mRNA levels are highly correlated in human stably expressed genes. *BMC Genomics.* 2013 Apr 19;14:268. doi: 10.1186/1471-2164-14-268.

Liu H, Yin J, Xiao M, Gao C, Mason AS, Zhao Z, et al.. Characterization and evolution of 5' and 3' untranslated regions in eukaryotes. *Gene.* 2012;507:106–111. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.03.

Nanci A. Ten Cate *Histologia Oral.*; 2008.

Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3' UTR evolution. *Cell*. 2005;123:1133–1146.