
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

BUSCA DE VARIAÇÕES NOS GENES *MSX-1*: RELAÇÃO COM A HIPODONTIA

ELISÂNGELA RIBEIRO DA SILVA

Uberlândia – MG

2007

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

BUSCA DE VARIAÇÕES NOS GENES *MSX-1*: RELAÇÃO COM A HIPODONTIA

ELISÂNGELA RIBEIRO DA SILVA


Orientador: Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

Co-Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA

2007

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

BUSCA DE VARIAÇÕES NOS GENES *MSX-1*: RELAÇÃO COM A HIPODONTIA

ELISÂNGELA RIBEIRO DA SILVA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente : Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

Examinadores: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nobrega

Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Data da defesa: 28/09/2007.

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas da PGGB para o formato da Tese foram contempladas

(Orientador)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586b Silva, Elisângela Ribeiro da, 1974-
Busca de variações nos genes MSX-1 : relação com a
hipodontia / Elisângela Ribeiro da Silva. - 2007.

63 f. : il.

Orientador: Warwick Estevam Kerr.

Co-orientador: Rinaldo Wellerson Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,

Programa

de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Polimorfismo (Genética) - Teses. I. Kerr, Warwick Estevam. II. Pereira, Rinaldo Wellerson. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:

575.113

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

DEDICATÓRIA

À toda minha família...

Todos vocês são especiais, cada um com seu jeitinho todo único de falar, agir e amar. Através de cada um, mudamos diariamente nossos pensamentos e atitudes para vivermos em harmonia e simplesmente sermos felizes!

Aos meus pais *Esperança e Orestes (in memoriam)*,

o meu muitíssimo obrigado pela vida e pela oportunidade de conhecer o verdadeiro sentido da palavra Amor.

As minhas filhas...

Milla e Laura,

que são a razão e força para que eu possa continuar subindo alguns degraus tentando proporcioná-los algo que julgo importante quando se tenta educar alguém: o exemplo. Desculpem a mamãe pela ausência e pela falta de paciência, e “...*Nunca se esqueçam nenhum segundo que eu tenho o amor maior do mundo, como é grande o meu amor por vocês...*”

Ao meu amor...

Sandro,

Companheiro, amigo, namorado, marido, que esteve comigo em todos os momentos, me apoiando e me oferecendo meios para que eu pudesse seguir em frente.

Ao Anjo de Deus...

Dr. Gideon,

Vaso de Deus aqui na terra, bênção na minha vida. Obrigada e que Deus te abençoe e continue te usando para Sua obra.

Ao Poder Judiciário...

Que sem distinção de pessoas trabalha sempre em busca da justiça, anulando assim qualquer tipo de abuso de poder ou de autoridade.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, Por ter sido instrumento da tua vontade, confiando à minha guarda duas lindas criaturas, por ter me concedido a vida para tentar alcançar os meus objetivos no trabalho, como Filha, Amiga e Mãe, por hoje ter tão pouco a pedir e tanto a agradecer!

Aos meus pais **Esperança e Orestes** (*in memorian*), por tudo desde o início até o fim!

Ao **Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr**, pela amizade e paciência, pela oportunidade e pelo convívio agradável, *O meu muitíssimo Obrigada..*

Ao **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**, pelos inúmeros esclarecimentos prestados nesse trabalho, por toda ajuda e solicitude, *O meu muitíssimo Obrigada.*

Ao **Meritíssimo Juiz de Direito**, da 2º vara Federal, na comarca de Uberlândia, que tornou possível a conclusão desse trabalho quando jogou por terra toda injustiça e perseguição, *O meu muitíssimo Obrigada.*

Ao **Douto Procurador da República**, da 2º vara Federal, na comarca de Uberlândia, o *meu muitíssimo Obrigada*, pois sem a intervenção do poder judiciário eu teria sido tolhida de um direito, o de concluir minha pós-graduação.

Ao **Dr. Paulo Almeida e Família**, que sempre me auxiliaram e me ajudaram com a competência pertinente aos excelentes advogados *O meu muitíssimo Obrigada.*

À **Universidade Federal de Uberlândia** (UFU), pela utilização de suas instalações desde a minha graduação e por ter me proporcionado conhecimentos.

Ao grande amigo **Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira**, pessoa ímpar, que merece todo o meu respeito. Sem a ajuda desse grande homem seria impossível a realização desse projeto. Serei eternamente grata.

Aos colegas de laboratório que participaram comigo de todos os sofrimentos e de todas as conquistas.

Aos indivíduos que fizeram parte desse trabalho cedendo gentilmente seu material genético, viabilizando a execução da pesquisa.

A todos os componentes da Banca Examinadora, o meu muito obrigada por participar comigo de um dia tão importante de minha vida,

ÍNDICE

Descrição	Página
Introdução	1
Proposição	5
Capítulo I: Anomalias Dentárias – Agenesias e supranumerários – Revisão Bibliográfica	6
Capítulo II: A genética da Odontogênese	15
Capítulo III: Uso de novo método para extração de DNA genômico de células descamadas da mucosa oral para utilização em estudos genéticos	38
Resumo	39
Introdução	40
Material e Método	41
Resultado	43
Discussão	44
Abstract	45
Referência bibliográfica	46

Capítulo IV: Mutação no gene MSX1 está relacionada a agenesia dental	48
Resumo	49
Introdução	50
Material e Método	52
Resultado	54
Discussão	55
Considerações finais	58
Abstract	59
Referência bibliográfica	60
Referencias	62

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I	Página
Figura 1: Fotografia de paciente com agenesia dental	6
Figura 2: Paciente portador de Displasia Ectodérmica Anidrótica, apresentando Oligodontia característica	8
Figura 2A: Radiografia de paciente com agenesia dental	8
Figura 2B: Fotografia de paciente com agenesia dental	8
Figura 3A-B: Radiografia de paciente com agenesia dental	8
Figura 4: Fotografia de paciente com agenesia dental	9
Figura 5A-B: Radiografia de paciente com agenesia dental	10

Capítulo III

Figura 1: DNA genômico humano. Cada banda que aparece no gel de agarose é DNA de um indivíduo diferente.	43
Figura 2: Reações de PCR. As bandas são de 668 pb, amplificadas por iniciadores referentes ao gene <i>MSX1</i>	43

Capítulo IV

Figura 1: Heredograma que elucida a família estudada 54

Figura 2: Gel apresentando o padrão de migração para a família, sendo o padrão de 4 bandas referente aos indivíduos não-portadores e o padrão de 3 bandas referente aos indivíduos portadores de agenesia dental 54

Introdução

Agenesia dental e hipodontia são termos apropriados para significar a ausência congênita de um ou mais (até seis) dentes permanentes e/ou decíduos (Stewart *et al.*, 1982). Oligodontia é definida como a ausência congênita de seis ou mais dentes, excluindo-se os terceiros molares (Schalk-Van Der Weide *et al.*, 1994). Encontra-se também o termo anodontia parcial, com significado análogo a hipodontia, em alguns livros e artigos anteriores a 1978, quando foi considerado obsoleto (Erwin & Cockern, 1949; Shafer *et al.*, 1958). Os indivíduos que possuem oligodontia além de apresentar número consideravelmente reduzido de dentes, o tamanho destes é menor e a forma muitas vezes é anômala. Observa-se também erupção dental tardia, fato mais evidente em indivíduos do sexo masculino (Schalk-Van Der Weide *et al.*, 1994).

Segundo Schalk-Van Der Weide *et al.*, 1994 a hipodontia ou oligodontia (dependendo do número de dentes ausentes) é uma das características observadas em mais de 120 síndromes, sendo em algumas delas uma característica importante para o diagnóstico. Em algumas síndromes a agenesia dental é meramente descrita como uma característica associada. Uma das principais síndromes em que a ausência congênita de dentes é uma característica-chave para o diagnóstico é a Displasia Ectodérmica Anidróica. Com relação à dentição, esta síndrome apresenta número variável de dentes ausentes, indo da hipodontia até completa anodontia, incluindo-se o fato de que a forma dos dentes presentes é anormalmente simples (cônicos) e de tamanho reduzido (Kurisu & Tabata, 1997; Thesleff, 1996). Polimorfismos genéticos podem ser entendidos como variações genéticas que ocorrem naturalmente em uma população. Estas variações podem ter um efeito direto sobre a expressão genética e afetar a função protéica. Estudos recentes

têm mostrado que polimorfismos em regiões codificadoras e regiões reguladoras da transcrição parecem ser frequentes, e que estas variações são responsáveis por características fenotípicas individuais. Pouco se sabe sobre o papel de polimorfismos genéticos na determinação das características morfológicas de um indivíduo. Em última análise as características morfológicas seriam causadas por polimorfismos genéticos atuando durante o desenvolvimento embrionário e crescimento. É importante salientar que pequenas alterações durante o processo embrionário podem levar a grandes alterações no indivíduo adulto. Da mesma maneira, entende-se que as alterações que levaram a diferenciação das espécies durante a evolução são resultantes de alterações sutis que ocorreram durante a embriogênese. O desenvolvimento da dentição é um dos principais modelos usados em estudos que tentam conectar desenvolvimento e evolução (evodevótica) em mamíferos (Jernvall 2000, Jernvall E Thesleff 2000, Neubuser *et al.* 1997, Polly 2000).

O estudo das alterações genéticas que afetam a dentição pode fornecer informações importantes sobre o papel de genes específicos e também ajudar a entender os mecanismos moleculares que regulam este processo. Entre estas anomalias a hipodontia, ausência de um ou mais dentes, é um modelo especialmente interessante. A agenesia dental tende a ocorrer na ordem reversa na qual os dentes se formam durante o desenvolvimento, o que também caracteriza o padrão geral de que ocorreu durante a evolução dos mamíferos placentários (Peyer 1968). Além disso, os dentes são estruturas simétricas e possuem homologia seriada, o que permite a localização e quantificação (número de dentes ausentes) dos efeitos de mutações ou polimorfismos genéticos específicos e determinar a fase da odontogênese afetada.

Dentre os diversos fatores responsáveis pela agenesia dental, o fator genético destaca-se pela complexidade. O estudo das alterações genéticas que afetam a dentição pode fornecer informações importantes sobre o papel de genes específicos e também ajudar a entender os mecanismos moleculares que regulam este processo (Jernvall, Keranen, Thesleff, 2000). A identificação e o entendimento dos mecanismos genéticos responsáveis pela diversidade fenotípica que existe em uma população é um dos principais desafios da genética moderna. As características fenotípicas podem ser causadas ou influenciadas por polimorfismos genéticos atuando durante o desenvolvimento embrionário e crescimento.

A agenesia dental pode ser entendida como um “erro” da morfogênese que ocorreu nas fases iniciais da odontogênese. No entanto, a agenesia dental de terceiros molares, segundos pré-molares superiores, e incisivos laterais superiores, pode ser entendida como uma variação da normalidade (quando aparece como uma forma isolada), devido a sua presença freqüente na população. Desta maneira, a agenesia dental, não associada a síndromes, é um modelo particularmente interessante para estudos que visam correlacionar variações genéticas com variações morfológicas do desenvolvimento (Line 2001, Line 2001a, Line 2003). Além disso, a descoberta de marcadores genéticos relacionados a hipodontia possibilitaria a identificação de indivíduos susceptíveis. Estas informações podem ser clinicamente relevantes, uma vez que, permitiriam o desenvolvimento de estratégias de prevenção e planejamento clínico individualizados. Estudos têm sido conduzidos com objetivo de mostrar a participação de diversos genes na odontogênese e entender o papel que desempenham, auxiliando desta forma no desenvolvimento do planejamento de cada indivíduo.

Estas informações podem ser clinicamente relevantes, uma vez que, permitiriam o desenvolvimento de estratégias de prevenção e planejamento clínico individualizados. Estudos têm sido conduzidos com objetivo de mostrar a participação de diversos genes na odontogênese e entender o papel que desempenham, auxiliando desta forma no desenvolvimento do planejamento de cada indivíduo.

A maioria dos ortodontistas já tratou ou tratará em sua rotina ortodôntica, pelo menos um paciente com agenesia dentária ou com alguma discrepância de tamanho dentário. É importante ressaltar que em busca dos melhores resultados a serem alcançados, todos os elementos de diagnóstico devem ser claros e minuciosamente analisados. Assim, é impossível atingir bons resultados de tratamentos e bons prognósticos se o profissional eliminar o diagnóstico diferencial científico, que pode levar a melhor escolha de procedimentos.

O gene *MSX1* é expresso durante a odontogênese. Vários estudos mostram relação entre esse gene e formas de agenesia dental (SCAREL, *et al.*, 2003).

O objetivo do presente estudo foi analisar a relação existente entre polimorfismos no gene *MSX1* em uma família portadora da alteração. A amostra foi composta pelo DNA genômico de 12 indivíduos, sendo 5 deles portadores do fenótipo em estudo. Após a obtenção e extração do DNA, a região de interesse foi amplificada por reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) e cada amostra foi submetida a análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) para detecção de polimorfismos. Nossas análises mostram que polimorfismos na região do segundo éxon do gene *MSX1* estão presentes na população estudada e apresentam relação com o fenótipo da hipodontia.⁴

Proposição

Mapear o segundo éxon do gene *MSX1* em busca de variações genéticas em família portadora de agenesia dental e, se possível, correlacioná-las com esse fenótipo.

ANOMALIAS DENTÁRIAS - AGENESIAS E SUPRANUMERÁRIOS - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DENTAL ANOMALIES - AGENESIS AND SUPERNUMERARY TEETH - UPDATE

Elisângela Ribeiro da SILVA¹; Marcelísio PEREIRA²; Geraldo Gil FAGGIONI JÚNIOR³

RESUMO: Este artigo apresenta uma revisão bibliográfica sobre as anomalias de número em órgãos dentais - agenesia e dentes supranumerários. São abordadas características das anomalias, prevalências, localizações bucais mais frequentes, tratamento, além de síndromes associadas. O objetivo é contribuir para a prática odontológica, procurando despertar a atenção do cirurgião dentista para o possível aparecimento de problemas, como as más oclusões, bem como abordar condutas de tratamentos e suas conseqüências.

UNITERMOS: Anomalias dentárias, Agenesia dental, Dentes supranumerários.

INTRODUÇÃO

Na clínica odontológica diária, depara-se com diferentes anomalias que merecem atenção e as anomalias de número dos órgãos dentários surgem com frequência, despertando interesse, pois sabe-se ser

necessária uma dentição completa e funcional para uma vida de bem-estar.

As anomalias de número dos órgãos dentários podem causar alterações na função mastigatória e fala, assim como problemas estéticos (Figura 1) que podem afetar a vida social do indivíduo (SILVA et al., 2003).



Figura 1. Dentição que acarreta problema estético ao paciente.

Estas alterações podem ocorrer associadas a síndromes, seguindo padrões hereditários ou como uma entidade isolada e, nesses casos, seguem um padrão herdado ou aparecem sob forma congênita. Uma

condição congênita é, de acordo com Shafer; Hine; Levy (1979), aquela que está presente por ocasião do nascimento ou mesmo antes, porém, não é herdada - transmitida pelos cromossomos e genes.

¹ Cirurgiã Dentista da Universidade Federal de Uberlândia, Mestre em Biologia Buco-Dental (UNICAMP), doutoranda em Genética, Universidade Federal de Uberlândia, email: elisangela@uber.com.br.

² Biólogo - UNITRI, email: marcelisio_pereira@nacionalnet.com.br.

³ Cirurgião Dentista da Universidade Federal de Uberlândia, especialista em ortodontia, Uberlândia-MG

Received: 12/12/03 Accept: 24/04/04

Segundo Guedes-Pinto (1997), identificar os mecanismos de controle genéticos e ambientais e entender a forma como esses mecanismos se relacionam, para comandar todo o processo de desenvolvimento do organismo é um grande desafio. O conhecimento da odontogênese é fundamental para o entendimento dos distúrbios do crescimento e desenvolvimento que afetam os dentes (TOLEDO, 1996).

Embora o mecanismo molecular relacionado ao desenvolvimento normal dos dentes, em humanos, não seja muito bem conhecido, estudos em outros vertebrados têm mostrado várias moléculas envolvidas na interação epitélio-mesênquima que comanda o desenvolvimento de todos os órgãos derivados do ectoderme, incluindo os dentes, pêlos e glândulas mamárias (HARDY, 1992; JAHODA, 1992; KOLLAR, 1970; KOLLAR; BAIRD, 1970; LUMSDEN, 1988). O desenvolvimento inicial desses órgãos é similar até a formação de uma estrutura com forma característica de botão. Depois desse estágio, o desenvolvimento diverge para dar origem a estruturas especializadas, com diferentes morfologias, tipos celulares e funções (HARDY, 1992; LEFKOWITZ, BODECKER; MARDFIN, 1953).

No desenvolvimento do dente, o epitélio bucal (estomodeo) interage com células mesênquimais originadas da crista neural, no primeiro arco branquial (LUMSDEN 1988; NODEN 1988). O epitélio invaginado envolve parte do mesênquima condensado que forma uma papila mesenquimal.

A interação indutiva entre o epitélio e o mesênquima comanda o início do desenvolvimento desses órgãos, subsequente morfogênese e citodiferenciação terminal (GROBSTEIN 1967; GURDON 1992). Estudos indicam que a interação epitélio-mesênquima é recíproca e seqüencial e que um ou outro componente (epitélio ou mesênquima) pode ter um papel predominante na organogênese, dependendo do órgão e estágio do desenvolvimento (GROBSTEIN 1967; KRATOCHWIL 1986).

Embora muitos genes participem na interação epitélio-mesênquima durante o desenvolvimento do dente, em mamíferos a estrutura molecular implicada neste desenvolvimento é, ainda, pouco entendida

Por meio desse trabalho, buscou-se realizar uma revisão sobre anomalias de número dos órgãos dentais - agenesia e dentes supranumerários - para apontar as peculiaridades dessas condições.

AGENESIA DENTAL

A agenesia dental caracteriza-se pela diminuição do número de dentes na dentição decidua, permanente ou em ambas.

Na literatura científica não há consenso a respeito da terminologia empregada ao referir-se à falta congênita de dentes. Agenesia dental e hipodontia são termos apropriados para definir a ausência de um ou mais (até seis) dentes permanentes e/ou deciduos (STEWART; POOLE, 1982). Oligodontia é definida como a ausência congênita de seis ou mais dentes, excluindo-se os terceiros molares (SCHALK-VAN DER WEIDE *et al.*, 1994). Encontra-se, também o termo anodontia parcial, com significado análogo a hipodontia, em alguns livros anteriores a 1978 (SHAFER; HINE; LEVY, 1958), a partir de quando foi considerado obsoleto (ERWIN; COCKERN, 1949).

Os indivíduos que possuem oligodontia (Figura 2A, B) além de apresentarem número consideravelmente reduzido de dentes, estes têm tamanho menor e a forma, muitas vezes, é anômala. Observa-se, também, erupção dental tardia, fato mais evidente em indivíduos do sexo masculino (SCHALK-VAN DER WEIDE *et al.*, 1994).

A agenesia dental (Figura 3A, B, C, D) é uma das alterações mais freqüentes da dentição humana. Muitos estudos têm avaliado que a prevalência da agenesia dental (exceto para terceiros molares) varia de 5% a 10% em populações européias e asiáticas (ARTE *et al.*, 1996). De acordo com Cua-Benward; Dibaj; Ghassemi (1992), os dentes mais afetados na população norte americana são os segundos pré-molares 3,4% e incisivos laterais maxilares 2,2%. Os terceiros molares mostram-se ausentes em, aproximadamente, 20% da população.

Segundo Toledo (1996), a agenesia ocorre quando um ou mais botões epiteliais primitivos deixam de se formar a partir da lâmina dentária. Para Srang (citado por GUEDES-PINTO, 1997) a não formação do dente é de origem congênita, isto é, instala-se durante a vida intra-uterina. Por outro lado, a incidência da agenesia, especialmente do incisivo lateral superior em determinados grupos familiares, permite aceitar a ausência dentária como um fator hereditário (SILVA *et al.*, 2003).



Paciente 1



Paciente 2-A

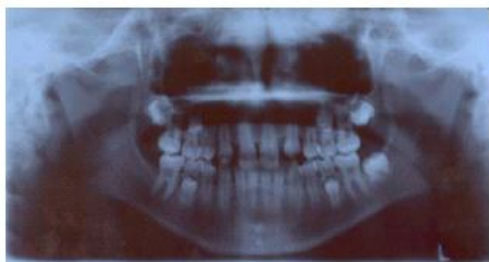


Paciente 2-B

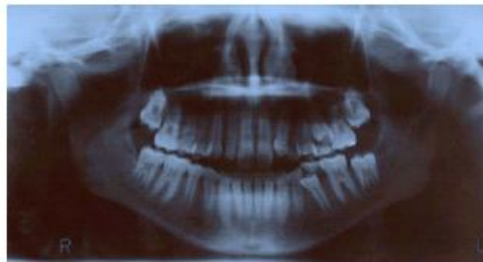
Figura 2. Casos de oligodontia.

Paciente 1: Indivíduo portador de oligodontia na dentição decídua.

Paciente 2A e B: Radiografia panorâmica e fotografias de indivíduo portador de oligodontia na dentição permanente.



A



B

Figura 3. Casos de Agenesia Dental.

3A- Paciente com agenesia de segundo molar inferior direito permanente e incisivos laterais superiores permanentes.

3B- Paciente com agenesia de incisivo lateral superior esquerdo permanente.

A agenesia na dentição decídua (Figura 4) é rara, geralmente aparece na região de incisivos inferiores e, freqüentemente, associada à ausência do seu sucessor permanente. Indivíduos portadores de agenesia

apresentam, com freqüência, microdontia, dentes cônicos, redução no desenvolvimento alveolar e dentes decíduos impactados.



Figura 4. Paciente com agenesia de incisivo lateral inferior esquerdo decíduo.

A agenesia de decíduo, está comumente associada à má formação do dente correspondente no lado contra-lateral (ZHU *et al.*, 1996). Yonezu *et al.* (1997) encontraram a prevalência de 2,38% de agenesia após examinarem 2.733 crianças japonesas de três anos de idade e a ausência unilateral foi mais freqüentemente observada que a bilateral, sendo o incisivo lateral inferior decíduo o dente ausente com mais freqüência.

Existe relação entre agenesia dentária e determinadas síndromes ou anomalias congênitas, podendo-se citar:

a- PACIENTES FISSURADOS: Shapira; LUBIT; KUFTINEC, (1999) estudaram a perda congênita de segundo pré-molares em crianças com fissura de lábio e de palato. Encontraram uma prevalência de 18% de agenesia nesse estudo, número bastante alto em comparação com a população em geral, que é de até 10% (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Uma prevalência consideravelmente alta foi encontrada na maxila, quando comparada à mandíbula, ambas para perdas dentárias uni e bilaterais. A ausência do segundo pré-molar foi mais freqüente no lado esquerdo do que no lado direito, tanto para o sexo feminino quanto para o masculino, em ambas as arcadas;

b- SÍNDROME DE DOWN: Em estudos realizados em crianças japonesas por Kumasaka *et al.*, (1997), constatou-se que 63% dos pacientes portadores da síndrome apresentavam oligodontia e vários deles tinham ausência de dois ou mais dentes (53%). O dente ausente mais freqüente foi o incisivo lateral inferior (23,3%) e o segundo pré - molar superior (18,2%). Em geral, a

distribuição da agenesia foi similar para dentes em posições homólogas;

c- Displasia ectodérmica: Guckes; ROBERTS; MCCARTHY, (1998) analisando 52 portadores dessa síndrome, verificaram que os incisivos centrais superiores, primeiros molares inferiores e superiores e caninos superiores são os dentes mais freqüentemente conservados em pacientes com hipodontia;

Existem várias opções de tratamento para pacientes com agenesia. A decisão a respeito do tratamento é melhor tomada por um especialista, juntamente com o paciente, pois é baseada não somente em qual dente está faltando mas, também, no comprimento do arco, posição dos incisivos e lábios, além do perfil estético (BROOKE, 1974; BROOK, 1984; LAÉRCIO, 2002 SIMONS; STRITZEL; STAMATIOU, 1993).

As alternativas de tratamento são o fechamento do espaço ou sua abertura, para que neste caso possa ser realizada uma reabilitação protética adequada, ambos com compromisso com a saúde oral, estética e função. Se o espaço já é adequado para uma reabilitação protética, não há necessidade de movimentação ortodôntica (ORLANDO; *et al.*, 2003; MARCO; BJÖRN, 2002 SIMONS; STRITZEL; STAMATIOU, 1993; BURZYNSKI; ESCOBAR, 1983; WEHRBEIN; FEIFEL; DIEDRICH, 1999).

A ausência de dentes permanentes pode ainda causar outros problemas além da estética deficiente, como alterações na função mastigatória e fala que também podem afetar a vida social do indivíduo (SILVA *et al.*, 2003).

A ausência de um dente permanente sucessor pode complicar a manutenção de espaço na dentição mista. Nos casos onde há presença de apinhamento, o tratamento possivelmente será a extração dos primeiros pré-molares e o fechamento do espaço remanescente, ortodonticamente (GUEDES-PINTO, 1997).

DENTES SUPRANUMERÁRIOS

A manifestação contrária à hipodontia é a hiperdontia, também denominada dentes supranumerários ou extranumerários (Figura 5A, B, C, D, E, F), que se caracteriza por um número de dentes acima da série normal. A presença de dentes supranumerários é uma anomalia causada por uma superatividade da lâmina

dentária (GUEDES-PINTO, 1997).

A conduta rotineira de se fazer tomadas radiográficas odontológicas, quando do exame inicial do paciente, veio mostrar que esta variação de número é bem mais freqüente do que se supunha anteriormente (MASON; RULE, 1995). Em estudo realizado em 2.733 crianças japonesas, Yonezu et al. (1997) observaram que 0.07% apresentavam dentes supranumerários e que a hereditariedade parece ter um papel importante, devido a alta incidência de dentes supranumerários em certos grupos de famílias. Existe consenso entre os autores quanto ao fato de haver predileção pela dentição permanente (MASON; RULE, 1995) e a freqüência de hiperdontia nos sexos masculino e feminino está na razão de 9:2 (YUSOF, 1990).



Figura 5. Casos de dentição supranumerária.

5A: Radiografia panorâmica revelando a presença de dente supranumerário junto ao lateral superior esquerdo permanente.

5B: Radiografia panorâmica revelando a presença de dentes supranumerários junto a oclusal dos terceiros molares superiores.

De acordo com Picosse, 1990 e Sicher; Tandler, 1981, o dente supranumerário de maior incidência é o mesiodens, localizado na sutura palatina mediana, próximo dos incisivos centrais superiores. Geralmente, apresenta-se em forma cônica, podendo ser único ou aos pares. Em alguns casos, são tão bem formados, que toma-se difícil determinar qual é o supranumerário. Este dente pode ter direção de erupção bastante variável, com alguns mesiodens irrompendo em direção ao assoalho das fossas nasais. O mesiodens ocasional, com bastante freqüência, o aparecimento de diastemas entre os incisivos e torna-se imprescindível sua remoção e posterior fechamento mecânico.

De acordo com Harel-raviv et al. (1996) a presença de um quarto molar é rara e, quase invariavelmente, este dente se encontra impactado,

porém, poderá ser encontrado na dentição decidua e permanente, embora seja mais comum na permanente. Segundo esses autores, os cirurgiões dentistas deveriam ficar mais atentos para a possibilidade de identificação de um supranumerário raro, seu diagnóstico e tratamento.

A hiperdontia é freqüentemente encontrada em indivíduos portadores de síndromes como a displasia cleidocraniana (ATASU; DUMLU; OZBAYRAK, 1996; MUNDLOS, 1999; YUSOF, 1990), sendo rara em pacientes não síndrômicos, que representam menos de 1% dos casos (ZHU; CREVOISIER; HENRY, 1996).

Casos raros de supranumerários são citados na literatura como, por exemplo, o de um paciente apresentando dente supranumerário fusionado a um incisivo central decíduo (AGUILO; GANDIA, 1997). Desai; Shah (1998) relatam que dentes supranumerários

são mais freqüentemente encontrados em pacientes com história familiar e síndromes genéticas. Citam, porém, um caso de hiperdontia não associado a síndrome, em dois irmãos.

Tanaka *et al.* (1998) relatam um caso raro de dois elementos bilaterais supranumerários, completamente irrompidos, encontrados na região de incisivos mandibulares em uma paciente do sexo feminino. De acordo com os autores, o tamanho atípico e forma anômala dos dentes supranumerários ajudam na sua identificação. O problema surge quando o dente se assemelha, tanto em forma quanto em tamanho, a um dente da série normal e, principalmente, quando este se encontra bem posicionado no arco, sem causar apinhamento dos dentes adjacentes, podendo então, passar despercebido. Dentes supranumerários que irrompem na dentição decídua, sobretudo na região de incisivos laterais superiores, podem não causar problemas de espaço e podem não ser identificados.

A constatação da presença de supranumerários através de radiografias, muitas vezes torna-se difícil, por iniciarem sua calcificação tardiamente. Ocorrem situações nas quais ainda não podem ser visualizados em radiografias tomadas aos 11-12 anos de idade, aparecendo posteriormente (DESAI; SHAH, 1998).

Babu; Nagesh; Diwakar (1998) citam o caso de múltiplos supranumerários impactados em uma criança de oito anos de idade. Esse estudo observou que tanto a criança quanto sua mãe exibiam dentição decídua retida e múltiplos dentes supranumerários impactados, referenciando o forte caráter familiar da anomalia.

Dentre as complicações associadas aos dentes supranumerários relatadas na literatura estão as maloclusões, a formação de diastemas e a formação de cistos (ZHU; CREVOISIER; HENRY, 1996).

O tratamento indicado aos pacientes que apresentam dentes supranumerários deve ser baseado em exames seriados da dentição decídua, tendo em vista a dentição permanente (BABU; NAGESH; DIWAKAR, 1998). Esse tratamento pode variar de acordo com o caso: os dentes supranumerários podem ser tracionados até a sua posição no arco para substituir um dente natural ausente ou perdido, podem ser removidos cirurgicamente para permitir a erupção de um dente natural ou podem ser acompanhados até o final da cronologia de erupção, quando poderão ser removidos sem risco de lesões às

raízes vizinhas (BABU; NAGESH; DIWAKAR, 1998).

A remoção dos dentes supranumerários fica justificada em casos de: dentes supranumerários parcialmente erupcionados; nesse caso a exodontia está indicada para eliminar fatores de retenção de placa, contribuindo para a saúde periodontal; em dentes supranumerários retidos, a exodontia está indicada para prevenção de anquiloses e reabsorções radiculares, devido à proximidade entre as raízes, além da possibilidade de transformação cística ou neoplásica do folículo dentário remanescente no interior dos ossos (ZHU *et al.*, 1996).

Os casos de hiperdontia devem ser estudados criteriosamente para se descartar a presença de síndromes associadas, devendo os pacientes serem encaminhados para um serviço médico adequado para avaliação.

CONCLUSÃO

O processo de desenvolvimento dentário, odontogênese, encontra-se ainda em estudo. Os complexos mecanismos ocorridos desde a sexta semana de vida intra-uterina, quando o embrião tem apenas 11 mm, são ainda obscuros à ciência.

Tanto a agenesia dental quanto os dentes supranumerários apresentam prevalência que varia de acordo com a população estudada. Na agenesia os dentes mais afetados na população norte americana são os segundos pré-molares, incisivos laterais maxilares e os terceiros molares, estando estes ausentes em uma parcela considerável da população.

O dente supranumerário de maior incidência é o mesiodens, localizado na sutura palatina mediana e a hereditariedade parece ter um papel importante para essa alteração, devido à alta incidência desses dentes em certos grupos de famílias. Sua prevalência é considerada baixa quando comparada à agenesia dental.

A observação e o exame clínico-radiográfico detalhado, aliados ao conhecimento, são as melhores armas com as quais o cirurgião dentista pode contar. Nesta abordagem, a prevenção se toma condição essencial para o tratamento das más oclusões que poderão ocorrer se não houver acompanhamento de todo o processo odontogênico. Para que isso ocorra, é necessário um diagnóstico baseado nos fatores determinantes da anomalia e seus sintomas, tendo em vista a completa adaptação do paciente às condições impostas pela natureza.

ABSTRACT: Through a review of the literature, this article discusses tooth number anomalies, specially supranumerary teeth and agensis. Emphasis is placed upon the clinical aspects, the prevalence, the location, the treatment and associated syndromes. Dentists should pay special attention to possible consequences of tooth number anomalies.

UNITERMS: Dental anomalies, Dental agenesis, Supernumerary teeth.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILO, L.; GANDIA, J.L. Late development of maxillary supernumerary tooth: a case report. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, Valencia, v. 22, n. 1, p. 41-44, mar/1997.

ARTE, S.; NIEMINEN, P.; PIRINEN, S.; THESLEFF, I.; PELTONEN, L. Gene defect in hypodontia: exclusion of EGF, EGFR, and FGF-3 as candidate genes. **J. Dent. Res.**, Helsinki, v. 75, n. 6, p. 1346-1352, aug/1996.

ATASU, M.; DUMLU, A.; OZBAYRAK, S. Multiple supernumerary teeth in association with cleidocranial dysplasia. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, Nisantasi-Istanbul, v. 21, n. 1, p. 85-91, apr/1996.

BABU, V.; NAGESH, K. S.; DIWAKAR, N. R. A rare case hereditary multiple impacted normal and supernumerary teeth. **Journal Clin. Ped. Dent.**, Bangalore, v. 23, n. 1, p. 59-61, jan/1998.

BROOKE, A. H. Dental anomalies of number form and size; their prevalence in British schoolchildren. **J Int Assoc Dent Child.**, Ontário, v. 5, p. 37-53, out/1974

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

BURZYNSKI, N. J.; ESCOBAR, V.H. Classification and genetics of numeric anomalies of dentition. **Birth Defects Orig Artic Ser**, Montreal, v. 19, n. 1. p. 95-106, mar/1983.

CUA-BENWARD, G. B.; DIBAJ, S.; GHASSEMI, B. The prevalence of congenitally missing teeth in class I, II, III malocclusions. **J. Clin. Ped. Dent.**, Boston, v. 17, n. 1, p. 15-17, mar/1992.

DESAI, R. S.; SHAH, N. P. Multiple supernumerary in teeth in two brothers: a case report. **J. Oral Pathol. Med.**, Nashik, v. 27, n. 8, p. 441-443, Sept. 1998.

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

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

GUCKES, A. D.; ROBERTS, M. W.; MCCARTHY, G. R. Pattern of permanent teeth present in individuals with ectodermal dysplasia and severe hypodontia suggests treatment with dental implants. **Pediatr. Dent.**, USA, v. 20, n. 4, p. 278-280, July/Aug. 1998.

GUEDES-PINTO, A. C. Fatores hereditários determinantes das maloclusões. In: _____ **Odontopediatria**: 6. edição. Santos: 1997, . cap. 38, p. 723-729.

GURDON, J. B. The generation of diversity and pattern in animal development. **Cell**, Cambridge, v. 68, n. 2, p. 185-199, Jan. 1992.

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

Biosci. J., Uberlândia, v. 21, n. 2, p. 105-113, May/Aug. 2005

HAREL-RAVIV, M.; ECKLER, M.; RAVIV, E.; GORNITSKY, M. Fourth molars: a clinical study. **Dental Update**, Montreal, v. 23, n. 9, p. 379-382, Nov. 1996.

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

KOLLAR, E. J. The induction of hair follicles by embryonic dermal papillae. **J. Invest. Dermatol.**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 374-378, aug/1970.

KOLLAR, E. J.; BAIRD, G. R. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 159-171, Aug. 1970.

KRATOCHWIL, K. Tissue combination and organ culture studies in the development of the embryonic mammary gland. **Develop. Biology**, Salzburg, v. 4, p. 315-333, jan/1986.

KUMASAKA, S.; MIYAGI A.; SAKAI, N.; SHINDO, J.; KASHIMA, I. Oligodontia: a radiographic comparison of subjects with Down syndrome and normal subjects. **Spec. Care Dentist.**, Yokosuka, v. 17, n. 4, p. 137-141, July/Aug. 1997.

LEFKOWITZ, W.; BODECKER, C. F.; MARDFIN, D. F. Odontogenesis of the rat molar. **J. Den. Res.**, Nova York, v. 32, n. 6, p. 749-772, jul/1953.

LOPES, L. N. F. Agenesia de incisivos laterais superiores - relato de caso clínico. **Rev. cl. ort. dental press**, Maringá, v. 1, n.6, p. 61-67, dez2002/jan2003.

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

MASON, C.; RULE, D. C. Midline supernumeraries: a family affair. **Dental Update**, London, v. 22, p. 34-35, Jan/Feb 1995.

MUNDLOS, S. Cleidocranial dysplasia: Clinical of molecular genetics. **J. Med. Genet.**, Mainz, v. 36, n. 36, p. 177-182, Mar. 1999.

NODEN, D. M. Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. **Develop.**, New York, v. 103, p. 121-140, apr/1988.

OLIVEIRA, O. M. S.; PALLOS, D.; GIL, F.; CORTELLI, J. R. Prevalência de hipodontia e alterações da anatomia dentária relacionadas. **Revista Biociências - UNITAU**, Taubaté, v. 7, n. 2, 2001. Disponível em: <www.unitau.br/prppg/publica/biocienc/revista_v7_n2_2001.htm>. Acesso em: 02 dez. 2003.

PICOSSE, M. Anomalias dentárias. In: _____. **Anatomia dentária**: 4 edição. São Paulo: Sarvier, 1990. cap. 10, p. 159-161.

ROSA, M.; BJÖRN, U.; ZACHRISSON. Integração da ortodontia (Fechamento de espaço) e da odontologia estética no tratamento de pacientes com agenesia de incisivos laterais superiores. **Rev. cl. Ort. dental press**, Maringá, v. 1, n.1, p. 41-55, fev/mar2002.

SCHALK-VAN DER WEIDE, Y.; BEEMER, F. A.; FABER, J. A.; BOSMAN, F. Symptomatology of patients with oligodontia. **J. Oral Rehab.**, Utrecht, v. 21, n. 3, p. 247-261, mar/1994.

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

SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. **Patologia bucal**, tradução de J. C. B. Teles. Rio de Janeiro: Interamericana, 1979.

SHAPIRA, Y.; LUBIT, E.; KUFTINEC, M. M. Congenitally missing second premolars in cleft lip and cleft palate children. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, Tel Aviv, v. 115, n. 4, p. 396-400, Apr/1999.

SILVA, E. R.; PERES, R. C. R.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; CONTO, F.; LINE, S. R. P. Absence of mutations in the promoter region of the *lef1* gene in patients with hypodontia. **Braz. J. Oral Sciences**, Piracicaba, v. 2, n. 4, p. 144-146, Jan/Mar2003.

SICHER, H.; TANDLER, J. Víceras da Cabeça e do Pescoço. In: _____. **Anatomia para Dentistas**: 1 edição. São Paulo: editora Atheneu, 1981. cap. 4, p. 158-165.

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

STEWART, R. E.; POOLE, A. E. The orofacial structures and their associations with congenital abnormalities. **Ped. Clin. North Am.**, Torrance, v. 29, n. 3, p. 547-560, June 1982.

TANAKA, S.; MURAKAMI, Y.; FUKAMI, M.; NAKANO, K.; FUJISAWA, S.; MIYOSHI, S. A rare case of bilateral supranumerary teeth in the mandibular incisor. **Br. Dent. J.**, Saitama, v. 185, n. 8, p. 386-388, Oct. 1998.

TANAKA, O.; KREIA, T. B.; MACIEL, J. V. B.; CAMARGO, E. S. Na ausência congênita de incisivos laterais superiores: fechar ou recuperar o espaço? **Rev. Cl. Ort. dental press**, Maringá, v. 2, n.1, p. 27-35, fev/mar2003.

TOLEDO, O. A. Crescimento e desenvolvimento; noções de interesse odontopediátrico. In _____. **Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica**: 3 edição. São Paulo: Premier, 1996. Cap. 1, p. 17-36.

WEHRBEIN, H.; FEIFEL, H.; DIEDRICH, P. Palatal implant anchorage reinforcement of posterior teeth: A prospective study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, San Antônio, v. 116, p. 678-686, aug/1999

YONEZU, T., HAYASHI Y., SASAKI J. AND MACHIDA Y. Prevalence of congenital dental anomalies of the deciduous dentition japanese children. **Bull Tokyo Dent. Coll.**, Chiba, v. 38, n. 1, p. 27-32, Feb. 1997.

YUSOF, W. Z. Non-syndrome multiple supernumerary teeth: literature review. **J. Can. Dent. Assoc.**, Kuala Lumpur, v. 56, n. 2, p. 147-149, Feb/1990.

ZHU, J.; CREVOISIER, R.; HENRY, R. J. Congenitally missing permanent lateral incisors in conjunction with a supernumerary tooth: a case report. **Pediatr. Dent.**, San Antonio, v. 18, n. 1, p. 64-66, jan/1996.

ZHU, J. F.; MARCUSHAMER, M.; KING, D. L.; HENRY, R. J. Supernumerary and congenitally absent teeth: a literature review. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, San Antonio, v. 20, n. 2, p. 87-95, mar/1996.

A GENÉTICA DA ODONTOGÊNESE

Silva E. R.¹, Alves J. B.¹

1-Department of morphologic, Universidade de Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

Campus Aeroporto - Avenida Nenê Sabino, Uberaba MG.

Correspondence to:

Elisângela R. da Silva

Universidade de Uberaba-UNIUBE

Avenida Nenê Sabino, Campus Aeroporto.

Uberaba, MG, Brazil.

Phone: +55-34-3232-2105

e-mail: elislaura@hotmail.com

Artigo ACEITO pela revista Bioscience Journal em agosto de 2007.

A GENÉTICA DA ODONTOGÊNESE

RESUMO

Este artigo apresenta uma revisão bibliográfica sobre as evidências mais atuais sobre os aspectos genéticos da formação dos dentes. São abordadas nesse artigo as principais moléculas envolvidas na interação epitélio-mesênquima, responsável pela formação da estrutura dental. O objetivo é contribuir para um melhor entendimento da expressão genética envolvida na formação do dente, bem como auxiliar na prática odontológica, procurando despertar a atenção do profissional para o conhecimento científico e facilitar assim a identificação de possíveis problemas relacionados à formação dos elementos dentais.

UNITERMOS: Interação epitélio-mesênquima, Odontogênese, Evolução

ABSTRACT

Through a review of the literature, this article discusses the genetic mechanisms that control tooth morphogenesis. Emphasis is placed upon the structure and function of some key molecules that participate in interactions between its epithelial-mesenchymal components. In this paper we will can understand the mechanisms that control tooth morphogenesis and the dentistry should pay special attention to possible consequences of tooth number anomalies.

UNITERMS: Epithelial-Mesenchymal Interactions, Tooth Development, Evolution

INTRODUÇÃO

O sorriso é uma expressão facial que diferencia os homens de outros primatas. O principal componente de um sorriso perfeito é uma dentição sadia e completa (TREVOR; PARIMAL; PRAGNA; 2005; SILVA; PEREIRA; FAGGIONI JÚNIOR, 2005). Uma dentição completa e funcional é pré-requisito também para a sobrevivência de muitos animais (ELISÂNGELA *et al.*, 2003). A dentição dos mamíferos consiste de dentes que se desenvolveram como órgãos discretos, e no homem, no sentido ântero-posterior da arcada, a dentição é dividida dentro das regiões de incisivos, caninos, pré-molares e molares (SCAREL *et al.*, 2003).

Os dentes são mais que estruturas duras que cortam ou trituram os alimentos. Vivos ou mortos, são de grande contribuição para os estudos de biologia, ecologia e paleontologia. O dente é composto basicamente por fosfato de cálcio, em forma de cristais de hidróxiapatita, e proteínas fibrosas em diferentes proporções. Anatomicamente são divididos em dois componentes principais, a coroa e a raiz, separados por uma região denominada colo. É formado em sua maior porção pela dentina, tecido mineralizado presente tanto na coroa quanto na raiz. A coroa é coberta pelo esmalte, um tecido altamente mineralizado e a raiz é coberta por um tecido semelhante ao osso, denominado cimento. Dentro do dente existe a polpa dental, tecido conjuntivo especializado que aloja vasos e nervos (BERGQVIST, 2003).

Nos últimos anos muitos progressos têm sido feitos no entendimento do mecanismo que controla a formação do dente. O desenvolvimento do dente é controlado por interações específicas entre o epitélio e o mesênquima. Esta é a formidável tarefa de mais de 200 genes que participam da formação dos dentes (THESLEFF & HUMERINTA, 1981, THESLEFF & JERNVALL, 2000). O objetivo dessa revisão bibliográfica é contribuir para um melhor entendimento da expressão genética envolvida na formação do dente, bem como auxiliar na prática odontológica, procurando despertar a atenção do profissional para o conhecimento científico e facilitar assim a identificação de possíveis problemas relacionados à formação dos elementos dentais.

ODONTOGÊNESE

Nos mamíferos, o desenvolvimento dos dentes é um processo complexo que envolve a interação recíproca entre o epitélio dental e o ectomesênquima originário das células da crista neural, envolvendo mudanças no potencial odontogênico desses tecidos no decorrer desse processo. O primeiro sinal do desenvolvimento do dente aparece com a banda epitelial primária, onde o processo odontogênico inicia com a formação de botões epiteliais localizados na região dos futuros dentes. Células ectomesenquimais se diferenciam em volta do botão epitelial para formar a papila dental, precursora da polpa dental e dentina, sendo esta secretada em fases mais avançadas do desenvolvimento por células já diferenciadas, os odontoblastos. Os estágios subseqüentes são; capuz, campânula, coroa e raiz, sendo a fase de campânula àquela onde os ameloblastos, formadores do esmalte iniciaram sua diferenciação. A matriz da dentina que se forma na periferia da papila dental durante a dentinogênese e subseqüentemente a deposição do esmalte ou amelogênese inicia na junção amelodentinária. Finalmente, após completada a deposição de esmalte e dentina na coroa, o dente inicia a formação de sua raiz e entra em erupção (SCAREL *et al.*, 2003).

EVOLUÇÃO DA DENTIÇÃO

A complexidade e a dinâmica da formação do dente pode ser exemplificada observando as mudanças nas dentições ocorridas durante o curso da evolução dos vertebrados. Dentes cônicos formam a dentição de vertebrados inferiores, e não há oclusão entre as mandíbulas opostas. A função é usualmente limitada a apreensão e perfuração de comida. O estabelecimento da oclusão dental em mamíferos permitiu um melhor processamento da comida e um conseqüente aumento na eficiência da entrada de nutrientes no sistema digestório. O desenvolvimento da mastigação foi, no entanto, um passo chave que permitiu aos mamíferos competir com o aumento da demanda de energia necessária para suportar os altos níveis de atividade. O dente é usualmente o fator mais significativo de controle da oclusão, porque o ajuste entre maxila e mandíbula durante a mastigação é regulado principalmente pelos contatos oclusais entre as cúspides, depressões, e fissuras de dentes opostos das mandíbulas (KEMP, 1982).

Embora o mecanismo básico da interação celular epitélio-mesênquima, que guia a diferenciação dos tecidos odontogênicos, seja altamente preservado, a passagem de répteis para mamíferos implicou na mudança da dentição. Muitos répteis são homodontes, tendo todos os dentes com forma similar, e são polifiodontes, significando que os dentes são continuamente repostos até o final da vida. O aparecimento da heterodontia e difiodontia nos mamíferos foi um processo gradual, pois esta característica surgiu durante o período permiano e triássico (KEMP, 1982).

Durante o curso da evolução dos mamíferos, a mudança na forma dos molares mostra a mudança da capacidade do dente de perfurar e cortar para a de esmagar e moer, bem como a tendência contínua da redução do número de dentes (STOCK *et al.*, 1997). Neste cenário, a agenesia dental em humanos pode ser entendida como uma tendência evolucionária e qualquer um dos genes envolvidos na formação do dente pode ter participado durante a evolução da dentição.

GENES ENVOLVIDOS NA ODONTOGÊNESE

A interação epitélio-mesênquima governa o desenvolvimento não só dos dentes, como também de órgãos epidermais como folículos pilosos e glândulas mamárias. Esta interação é recíproca e seqüencial, onde cada componente tem um papel importante na organogênese, dependendo do órgão e estágio de desenvolvimento (LUMSDEN, 1988; JAHODA, 1992). A fase inicial do desenvolvimento desses órgãos é semelhante, sendo caracterizado por um botão epitelial cercado por células mesenquimais. A partir daí, o desenvolvimento desses órgãos diverge para formar órgãos especializados e com grandes diferenças morfológicas, celulares e funcionais (DASSULE & MCMAHON, 1998; JERNVALL & THESLEFF, 2000)

Embora o mecanismo molecular relacionado ao desenvolvimento normal dos dentes, em humanos, não seja ainda completamente conhecido, estudos em outros vertebrados têm mostrado várias moléculas envolvidas na interação epitélio-mesênquima, que comanda o desenvolvimento de todos os órgãos derivados do ectoderme incluindo os dentes, pêlos e glândulas mamárias (ELISÂNGELA *et al.*, 2003). 20

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

Mais de 200 genes foram identificados no desenvolvimento do dente em mamíferos (JERNVALL & THESLEFF, 2000; PARR & MCMAHON, 1994). Alguns desses genes pertencem a família HOX, que contem uma região denominada homeobox, uma sequência de DNA conservada durante a evolução, encontradas inicialmente em genes de drosófilas (MAAS & BEI, 1997; MCGINNIS *et al.*, 1984). Na região homeobox encontra-se a região de homeodomínio, um ligante do DNA onde se associam os fatores de transcrição (DAVIDSON, 1995; MANZANARES & KRUMLAUF, 2001). Os genes homeóticos estudados em mamíferos são homólogos aos genes das drosófilas. O conjunto dos genes Hox está presente dos cefalocordados até os mamíferos porém, sua ortografia é um pouco diferente entre os invertebrados, ratos e humanos, por exemplo, o gene *msh* da drosófila é homólogo ao *Msx1* do rato e ao *MSX1* humano (SCAREL *et al.*, 2003).

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

No desenvolvimento do dente, além dos fatores de transcrição, existem outras moléculas que têm papel importante no processo, como fatores de crescimento e moléculas da matriz extra-celular (ECM) (VAAHTOKARI; VAINIO; THESLEFF, 1991).

Esse grupo de moléculas tem expressão combinada na dinâmica interação entre os tecidos epitelial e mesenquimal como uma cascata molecular, que promove o desenvolvimento do dente (SHARPE *et al.*, 1995).

FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Fatores de transcrição são moléculas que interagem com o DNA modulando a expressão de um gene. A inativação do gene que codifica um fator de transcrição pode modificar o fenótipo, especialmente se sua expressão ocorrer nos estágios iniciais da embriogênese (SATOKATA & MAAS, 1994). Serão citados a seguir alguns fatores de transcrição envolvidos na odontogênese.

1 - DLX: DISTAL-LESS HOMEODOMAIN

O grupo *Dlx* recebeu sua denominação a partir da homologia observada com o genoma de *Drosophila*, e é composto por seis membros no genoma de mamíferos que são arranjados em 3 pares mais estreitamente ligados: *Dlx1* e *Dlx2- Dlx7* e *Dlx3- Dlx6* e *Dlx5* (WEISS; STOCK; ZHAO, 1998).

Os genes *Dlx1* e *Dlx2* são expressos nos processos mandibulares e maxilares. O domínio de expressão do *Dlx1* nos arcos mandibulares é mais distalmente restringida do que o *Dlx2*, *Dlx5* e *Dlx6*. A expressão do *Dlx3* e *Dlx7* no arco mandibular é claramente coincidente com a área formadora do dente (ZHAO, 2000).

O papel do *Dlx3* na amelogênese foi comprovado por uma mutação em humanos que foi associada com hipoplasia do esmalte (PRICE *et al.*, 1998). A inativação do *Dlx5* afeta a maturação do esmalte dental (DEPEW *et al.*, 1999).

2 - LEF: LYMPHOID ENHANCER-BINDING FACTOR 1

Lef1 é um fator de transcrição expresso em linfócitos de ratos adultos, em células da crista neural, germes dentais, folículos pilosos, e outros lugares durante a embriogênese (TRAVIS *et al.*, 1991; WATERMAN *et al.*, 1991; OOSTERWEGEL *et al.*, 1993; VANGENDEREN *et al.*, 1994; ZHOU *et al.*, 1995).

Este gene foi mapeado no cromossomo humano 4 (q23-q25) e em ratos no cromossomo 3, perto do *Egf* (fator de crescimento epidermal) (MILATOVICH *et al.*, 1991).

Este gene é um membro da família de proteínas HMG (high mobility group proteins) que tem a capacidade de induzir uma dobra na dupla hélice do DNA (GIESE *et al.*, 1992; LOVE *et al.*, 1995). No entanto, *Lef1* ativa a transcrição somente com a colaboração de outras proteínas ligantes do DNA (CARLSSON *et al.*, 1993). No contexto do receptor de célula T (T-cell receptor), a proteína *Lef1* aparece tendo um papel arquitetural, participando da formação de um complexo nucleoprotéico, promovendo a justaposição de sítios de transcrição não adjacentes (LOVE *et al.*, 1995).

Lef1 reconhece uma seqüência específica de nucleotídeos no DNA através do domínio HMG (high-mobility-group). Estudos revelaram que o domínio HMG se liga ao sulco menor da dupla hélice. A região básica se liga de forma cruzada ao estreito sulco maior e contribui para o reconhecimento do DNA (LOVE *et al.*, 1995).

As proteínas com domínios HMG podem ser classificadas em duas subfamílias. Membros de uma subfamília, que incluem HMG-1 e HMG-2, têm múltiplos domínios HMG, se liga ao DNA com pouca ou nenhuma especificidade e são encontradas em todos os tipos de células. Membros da outra subfamília, que incluem *Lef1*, contem um único domínio HMG, liga em seqüência específica do DNA e são expressos em poucos tipos celulares (LOVE *et al.*, 1995).

Estudos sugerem um papel essencial de *Lef1* na formação de vários órgãos e estruturas que requerem a interação indutiva de tecidos (VAN GENDEREN, *et al.*, 1994; TRAVIS, *et al.*, 1991; MILATOVICH *et al.*, 1991, ZHOU *et al.*, 1995). Ratos mutantes para *Lef1* perdem dentes, glândulas mamárias e cabelos, mas não mostram defeitos óbvios na população de célula linfóide ao nascimento. O desenvolvimento do dente é iniciado em mutantes para *Lef1*, no entanto é interrompido antes da formação da papila dental. Portanto, o desenvolvimento dos folículos pilosos do corpo e glândulas mamárias é incompleto ou paralisado antes da morfogênese. Todos órgãos afetados pela mutação de *Lef1* requerem uma interação de tecidos para seu desenvolvimento (KRATOCHWIL, 1996). 23

A super-expressão forçada de *Lef1* em células ectodermiais de ratos transgênicos foi testada, resultando em formação aberrante de folículos pilosos e estruturas parecidas com dentes na região do sulco labial (ZHOU *et al.*, 1995; KRATOCHWIL *et al.*, 1996).

3 - MSX: MUSCLE SEGMENT BOX

A família dos *Msx* (em ratos) consiste em três membros cromossomicamente não ligados. O gene *Msx1* pertence a um grupo de genes altamente conservados dentro da escala evolutiva. Em humanos existem os genes *MSX1* e *MSX2*, que não se localizam no mesmo cromossomo (DAVIDSON, 1995), e estão estreitamente envolvidos na odontogênese (MAAS & BEI, 1997). O gene *MSX1* foi localizado no Cromossomo 4p16.3-p16.1, enquanto que o *MSX2* está em 5q34-q35

Ratos com inexpressão do gene *Msx1* têm os dentes molares paralisados no estágio de botão e os deficientes de *Msx2*, têm defeitos na morfogênese das cúspides, formação da raiz e diferenciação do órgão do esmalte (MAAS & BEI, 1997; SATOKATA & MAAS, 1994).

Nos humanos, o papel dos genes *MSX* no desenvolvimento crânio facial tem sido esclarecido em estudos que identificaram mutações nesses genes associadas a alterações da normalidade. Uma transversão na região homeobox do gene *MSX1*, que resulta na substituição de uma arginina por uma prolina, em um domínio de conservação da proteína, é causa de uma forma de agenesia dental. No entanto, mutações nos *MSX* não explicam todas as formas de agenesia dental (SCAREL, *et al.*, 2000).

Experimentos realizados com ratos transgênicos, em que o gene *Msx1* foi tornado não-funcional, geraram animais com palato fendido e anodontia, permanecendo a odontogênese interrompida na fase de botão. Vale acrescentar que esses animais não apresentaram mal-formações em outros órgãos. Pode-se explicar esse fato devido à redundância funcional entre os genes *Msx1* e *Msx2* e sua co-expressão em muitos sítios. Comprovou-se esse dado por um outro experimento, com ratos transgênicos, em que os genes *Msx1* e *Msx2* eram não-funcionais; os animais apresentaram além de anodontia, sérios defeitos no desenvolvimento de muitos órgãos.

Conclui-se a importância indubitável da proteína *Msx1* na odontogênese, e compreende-se o fato de ratos transgênicos para o *Msx1* não terem sido compensados pelo gene *Msx2*, já que este é expresso principalmente nos estágios da odontogênese mais avançados ao de botão. Tal padrão de expressão foi comprovado em ratos transgênicos para o gene *Msx2*, os quais não exibiram alteração no número de dentes, mas sim defeitos na morfogênese das cúspides, das raízes dentais e dos órgãos do esmalte (SATOKATA & MAAS, 1994; MAAS & BEI, 1997; THESLEFF, 1996).

4 - PAX: PAIRED BOX

Um outro grupo de genes homeóticos é o *Pax*, cujo nome também advém da homologia com um gene chamado *paired* em *Drosophila*. Esse grupo é formado por nove membros em mamíferos, que apresenta uma região conservada ligante do DNA, nomeada domínio *paired* (UNDERHILL, 2000), sendo que os membros mais estreitamente ligados à odontogênese são os *Pax1* e *Pax9*.

Mutação nos genes *paxs* causa profundos defeitos no desenvolvimento em organismos diversos como moscas, ratos e humanos (CHI & EPSTEIN, 2002).

Experimentos com ratos em que o gene *Pax9* foi deletado, a odontogênese de molares apresentou-se interrompida na fase de botão, o que é fenotipicamente similar aos resultados em ratos transgênicos para o gene *Msx1* (MAAS & BEI, 1997; STRACHAN & READ, 1994). Recentemente também foi mostrado que mutação no gene *PAX9* está associado com a oligodontia em humanos, afetando principalmente os dentes posteriores da dentição permanente (STOCKTON *et al.*, 2000).

O gene *PAX9* em humanos é locado em 14q12-q13. Mutação nesse gene foi implicada na agenesia dental de uma família com oligodontia autossômica dominante, onde foram afetados pré-molares e molares (STOCKTON *et al.*, 2000). Em outro caso, dois membros de uma pequena família mostraram a ausência de molares e pré-molares tanto na maxila quanto na mandíbula e também de alguns incisivos, causada por uma deleção no *PAX9*. Esses achados sugerem a relação de *PAX9* com a formação do dente em humanos (DAS, 2002).

5 - OUTROS IMPORTANTES FATORES DE TRANSCRIÇÃO

O gene Sonic hedgehog (*Shh*) é um homólogo vertebrado do gene hedgehog (*hh*), que controla na drosófila a segmentação e a organogênese (HAMMERSHMITZ; BROOK; MCMAHON, 1997; JOHNSON & TABIN, 1995). O gene patched (*ptc*), originalmente identificado como um gene seguidor da drosófila (HOOPER & SCOTT, 1989) codifica uma proteína transmembrana que serve como receptora para *Shh*. Interessantemente, a expressão ectópica do *Shh* leva a expressão ectópica do *Ptc* no desenvolvimento de vários órgãos dos vertebrados (ZHANG et. al., 1999). No desenvolvimento do dente, *Shh* pode estar envolvido neste processo ativando a expressão do receptor *Ptc* e o fator de transcrição *Gli1*. No entanto, *Gli1* é um componente do caminho sinalizador do *Shh* (ZHANG et. al., 1999).

Experimentos com camundongos “knockout” mostraram que a deleção de outros genes como a activina e genes *Gli1* e *Gli2* também causam agenesia dental e portanto, estão envolvidos na odontogênese (PETERS & BAILING, 1999). Um resumo dos genes cujo envolvimento na odontogênese foi comprovado por experimentos em camundongos “knockout” é mostrado na tabela a seguir.

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

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

FATORES DE CRESCIMENTO

Fatores de crescimento são importantes moléculas sinalizadoras. Um fator de crescimento produzido por uma célula pode afetar o desenvolvimento de outra célula na vizinhança (parácrino) ou pode ter um efeito autócrino (SCAREI, et. al., 2003). 27

Os efeitos dos fatores de crescimento são sempre diretamente mediados pela ligação de receptores de superfície em células específicas (THESLEFF, 1995). A interação sinalizadora que determina a localização, identidade, tamanho e forma do dente, tem lugar durante os estágios iniciais do desenvolvimento do dente. Os sinais mais estudados são os da família *Fgf*, *Egf*, *Tgf*. Cada família consiste de vários sinais codificados por diferentes genes (THESLEFF, 2000).

1 – FGF: FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLASTICO

Fgf é uma grande família de proteínas que tem efeitos morfogenéticos potentes em vários órgãos e são também potentes estimuladores da proliferação celular. Eles induzem a divisão celular no mesênquima e no epitélio em vários estágios da morfogênese do dente (JERNVALL, 1994; KETTUNEN & THESLEFF, 1998). Elas também previnem apoptose no mesênquima dental (VAAHTOKARI; ABERG; THESLEFF, 1996). Dez membros da família *Fgf* foram identificados. Essas moléculas têm efeitos biológicos muito similares e existe uma possível redundância funcional entre elas (THESLEFF & SHARPE, 1997; THESLEFF & ABERG, 1999; KETTUNEN & THESLEFF, 1998).

2 – EGF: FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL

Egfs têm sido encontradas em tecidos embrionários e a expressão é relatada para a proliferação epitelial (NEXO *et al.*, 1980; PARTANEM, 1990). De fato eles são mitógenos para a ectoderme, endoderme e mesoderme, estimulando a proliferação das células do embrião durante a morfogênese *in vivo* e *in vitro* (CARPENTER & COHEN, 1979). *Egfs* interagem especificamente com seu receptor, sendo *Egfs-R* glicoproteínas transmembrana que estão presentes em muitos tipos de células derivadas dos três folhetos embrionários (CARPENTER & COHEN, 1979; ADAMSON, 1990). *Egfs* e *Egfs-R* parecem ter sido conservados estrutural e funcionalmente durante a evolução (LIVNEH *et al.*, 1985). Em camundongos, a iniciação da odontogênese é totalmente inibida pelo bloqueio da produção de *Egfs in situ* (KRONMILLER; UPHOLT; KOLLAR, 1991). Esses achados indicam que *Egfs* estimula ou mantém a proliferação de células indiferenciadas durante o desenvolvimento embriológico.

3 - TGF β : FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE BETA

Membros da super família dos fatores de *Tgfb* regulam a proliferação celular diferenciação e apoptose, controlando o desenvolvimento e manutenção de vários tecidos (HSU *et al.*, 2002; PERES *et al.*, 2004). *Tgfb* é um fator de crescimento que tem lugar na cascata sinalizadora durante os estágios iniciais do desenvolvimento do dente (SHIMO *et al.*, 2002; VAAHTOKARI; VAINIO; THESLEFF, 1991).

3.1 – BMP: PROTEÍNA MORFOGENÉTICA DO OSSO

Pertence a família *Tgfb* uma classe de proteínas denominadas *Bmps* (Proteína Morfogenética do Osso), que regulam o desenvolvimento de ossos e cartilagens (DE CONTO, *et. al.*, 2004). A família de *Bmps* nos mamíferos, é formada por oito membros que podem ser agrupados em 3 subclasses, baseado na similaridade de aminoácidos.

Nos vertebrados, o subgrupo de *Bmp2* e *Bmp4* é o mais semelhantes ao gene decapentaplegic (*dpp*) em drosófila, com aproximadamente 75% de similaridade entre aminoácidos. Esses genes têm 95% de similaridade e podem ser um fator chave para a iniciação e morfogênese do dente (MAAS & BEI, 1997; THESLEFF, 1995).

A proteína *Bmp4* tem sido identificada como um sinal indutivo do epitélio na formação dos dentes. A proteína *Bmp2* guarda uma homologia de 95% com a *Bmp4*. A expressão da *Bmp2* indica forte correlação com o gene *Msx2* na formação dos dentes, de maneira que pode haver uma regulação recíproca entre eles. *Bmps* atuam como sinais que estimulam outros genes, e o envolvimento deles na cascata de eventos de sinalização recíproca tem sido esclarecidos (MAAS & BEI, 1997).

4 – MOLÉCULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular esta envolvida na interação epitélio-mesenquima durante a morfogênese e diferenciação do dente. A morfogênese e diferenciação do dente podem ser perturbadas por mutações de genes do colágeno e proteoglicanas (MAAS & BEI, 1997).

Estudos funcionais *in vitro* têm mostrado que a integridade da membrana basal é pré-requisito para morfogênese epitelial do dente (SAHLBERG; AUKHIL; THESLEFF, 2001).

No desenvolvimento do elemento dental, a membrana basal do epitélio contém colágeno do tipo 1, 3 e 4, laminina, fibronectina e várias proteoglicanas (THESLEFF *et al.*, 1981). Essas moléculas são expressas ao mesmo tempo quando a interação mediada pela membrana basal regula a diferenciação de células ectomesenquimais em odontoblastos (LESOT *et al.*, 1990). *Tgfb1* pode promover a síntese de proteínas da ECM. Pode também modificar receptores da superfície celular e prevenir a degradação de ECM (RASMUSSEN & RAPRAEGER, 1988; RIZZINO *et al.*, 1988).

“CASCATA MOLECULAR” DA SINALIZAÇÃO RECÍPROCA NO DESENVOLVIMENTO DO DENTE.

A sinalização molecular no desenvolvimento do dente é expressa nos diferentes estágios da odontogênese. A respeito dos estágios de iniciação, explicando o modelo genético da regulação, a expressão dos genes têm sido proposta por vários pesquisadores (BEI & MAAS, 1998; ZHANG *et al.*, 1999). A expressão de *Msx1* no mesênquima dental é inicialmente induzida por derivados epiteliais de *Bmps* e *Fgfs*. Interessantemente, *Bmps* não podem induzir *Fgfs* e nem o contrário, sugerindo que *Bmps* e *Fgfs* atuem em caminhos diferentes na indução do mesênquima dental. Porém, *Fgf8* e *Bmp4* podem induzir *Msx1* no mesênquima dental e somente *Bmp4* pode induzir a expressão de *Msx2*. *Bmp4* e *Fgf8* induzem a expressão de *Dlx2* no mesênquima dental e somente *Fgf8* pode induzir a expressão de *Dlx1*. *Fgf8* estimula a expressão de *Dlx1*, *Dlx2* e *Pax9* no mesênquima dental. A parada do desenvolvimento do dente em rato mutante para *Msx1* foi associada com a baixa regulação de *Bmp4*, *Fgf3*, *Lef1*, *Ptc*. Isso sugere que *Msx1* está colocado acima dos outros genes na cascata. No entanto, *Shh* epitelial induz a expressão de *Gli1* no mesênquima. *Gli* pode ativar a expressão de *Ptc* pela interação com o produto de *Msx1*, que é induzido no mesênquima por um derivado epitelial, o *Bmp4*. *Bmp4* mesenquimal, que induz *Lef1*, requer produtos de *Msx1* para induzir a expressão de *Ptc* e promover um feedback positivo para manter a expressão de *Msx1* (RAPRAEGER, 1989; TUCKER; KHAMIS; SHARPE, 1998).

Estudos recentes tem elucidado alguns aspectos da sinalização molecular que ocorre durante o estagio de botão da odontogênese. A regulação do *Bmp4* no mesênquima de molar, causa a regulação de *Lef1* e *Dlx2* no botão epitelial.

Isso foi deduzido da observação de que a adição de *Bmp4* exógeno pode parcialmente resgatar o fenótipo do dente e induzir a expressão de *Lef1* e *Dlx2* no germe molar do mutante *Msx1* (BEI & MAAS, 1998). Interessantemente, a expressão ectópica de *Bmp4* no mesênquima dental de mutantes *Msx1*, não pode resgatar a expressão dos genes *Fgf3* e *sindecin1* (ZHAO *et al.*, 2000). Similarmente, para muitos outros órgãos embrionários, o desenvolvimento dos dentes de mamíferos remonta largamente a interação epitélio-mesênquima.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

O desenvolvimento do dente pode ser dividido em múltiplos estágios, onde o número, tamanho e tipo de dentes são determinados. Mais de 200 genes estão envolvidos no desenvolvimento de elemento dental, entre eles vários fatores de transcrição, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular. As mudanças na dentição, ocorridas no curso da evolução dos vertebrados, permitiram um melhor processamento da comida e maior eficiência na absorção de nutrientes pelo organismo, possibilitando aos mamíferos competir pela energia necessária à sobrevivência.

Os dentes são estruturas homologas que permite a localização e quantificação dos efeitos de mutações genéticas específicas. No entanto, é possível também determinar a fase da odontogênese afetada por essa condição. Esse aspecto faz o desenvolvimento do dente um importante sistema para entendermos um intrincado mecanismo molecular que regula o desenvolvimento, abastecendo uma ligação entre o desenvolvimento e a genética evolucionária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, E. D. Growth Factors and Development. In: _____ Developmental of epidermal growth factor receptor. New York: John Wiley; 1990. cap. 1, p. 1-30.

BEI, M.; MAAS, R. *FGFs* and *BMP4* induce both *Msx1*- independent and *Msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development*, Boston, v. 125, p. 4325-33, dec. 1998.

BERGQVIST, L. P. The role of teeth in mammal history. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, piracicaba, v. 2, n. 6, p. 249-257, july/ sep. 2003.

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

CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem*, Nashville, Tennessee, v. 48, p. 193-216, aug. 1979.

CHI, N.; EPSTEIN, J. A. Getting your *Pax* straight: *Pax* proteins in development and disease. *Trends Genet.*, Philadelphia, v. 18, p. 41-7, may 2002.

DAS, P.; *et al.* Haploinsufficiency of *PAX9* is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum. Genet.*, Houston, v. 110, p. 371-6, sep. 2002.

DASSULE, H. R.; MCMAHON, A. P. Analysis of epithelialmesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol.*, Cambridge, Massachusetts, v. 202, p. 215-27, out. 1998.

DAVIDSON, D. The function and evolution of *Msx* genes: pointers and paradoxes. *Trends Genet*, Edinburgh, UK., v. 11, p. 405-11, aug. 1995.

DE CONTO, F.; *et al.* Investigação de polimorfismo na região promotora do gene *BMP4* em indivíduos com agenesia dental. *RFO*, Passo Fundo, v. 9, n. 1, p. 7-11, jan/jun. 2004.

DEPEW, M. J.; *et al.* A *Dlx5* regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development*, California, San Fran., v. 126, p. 3831-46, may 1999.

ELISÂNGELA, R. S.; *et al.* Absence of mutations in the promoter region of the *LEF1* gene in Patients with hypodontia. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, Piracicaba, v. 2, n. 4, p. 144-146, jan/mar. 2003.

GIESE, K.; COX, J.; GROSSCHEDL, R. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell.*, California, San Francisco, v. 69, p. 185-95, jan. 1992.

- HAMMERSHMDT, M.; BROOK, A.; MCMAHON, A. P. The world according to hedgehog. *Trends Genet.*, Frieburg, Germany, v. 13, p. 14-21, dec. 1997.
- HOOPER, J. E.; SCOTT, M. P. The *Drosophila patched* gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell.*, Colorado, v. 59, p. 751-65, sep. 1989.
- HSU, S.; *et al.* Transforming growth factor 1 deregulation in a human oral carcinoma tumor progression model. *Cell Prolif.*, Georgia, v. 35, p. 183-92, oct. 2002.
- HUNT, P. The branchial *Hox* code and its implications for gene regulation, patterning of the nervous system and head evolution. *Development*, London, UK., v. 2, p.63-77, sep. 1991.
- JAHODA, C. A. Induction of follicle formatin and hair growth by vibrissa dermal papillae implanted into rat ear wounds: Vibrissa-type fibres are specified. *Development*, Scotland, UK, v. 115, p. 1103-9, mar. 1992.
- JERNVALL, J.; *et al.* Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: Non-dividing cells express growth stimulating *FGF-4* gene. *Int J Dev Biol.*, Helsinki, Finland, v. 38, p. 463-9, nov. 1994.
- JERNVALL, J.; *et al.* The life history of an embryonic signaling center: *BMP-4* induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development*, Helsinki, Finland, v. 125, p. 161-9, may 1998.
- JERNVALL, J.; THESLEFF, I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.*, Helsinki, Finland, v. 92, p. 19-29, sep. 2000.
- JOHNSON, R. L.; TABIN, C. The long and short of hedgehog signaling. *Cell.*, Boston, Massachusetts, v. 81, p. 313-6, sep. 1995.
- KEMP, T.S. *Mammal-like reptiles and the origin of mammals*. Academic Press, New York, v. 3, p. 102-109, apr. 1982.
- KETTUNEN, P.; THESLEFF, I. Expression and function of *FGFs* 4, 8 and 9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth development. *Dev. Dyn.*, Helsinki, Finland, v. 211, p. 256-68, sep. 1998.
- KRATOCHWIL, K.; *et al.* *Lef1* expression is activated by *BMP-4* and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev.*, California, San Francisco, v. 10, p. 1382-94, aug. 1996.
- KRONMILLER, J. E.; UPHOLT, W. B.; KOLLAR, J. *Egf* antisense oligodeoxynucleotides block murine odontogenesis in vitro. *Dev Biol.*, Connecticut, v. 147, p. 485-8, jun. 1991. 33

LESOT, H.; *et al.* A 165 kDa membrane antigen mediating fibronectin-vinculin interactions is involved in murine odontoblast differentiation. *Differentiation*, Strasbourg, France, v. 44, p. 25-35, sep. 1990.

LIVNEH, E.; *et al.* The *Drosophila egf* receptor gene homolog conservation of both hormone binding and kinase domains. *Cell.*, Israel, v. 40, p. 599-607, jan. 1985.

LOVE, J. J.; *et al.* Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature*, La Jolla, California, v. 376, p. 791-5, jun. 1995.

LUMSDEN, A. G. S. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development*, London, v. 103, p. 155-69, dec. 1988.

MAAS, R.; BEI, M. The genetic control of early tooth development. *Crit. Rev. Oral Biol.*, Boston, Massachusetts, v. 8, p. 4-39, oct. 1997.

MANZANARES, M.; KRUMLAUF, R. Mammalian embryo: Hox genes. *Enciclopedia of Life Sciences*. 2001. Available from URL: <http://www.els.net>.

MCGINNIS, W.; *et al.* A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell.*, Switzerland, v. 37, p. 403-8, nov. 1984.

MILATOVICH, A.; *et al.* Gene for lymphoid enhancer-binding factor 1 (Lef-1) mapped to human chromosome 4 (q23-q25) and mouse chromosome 3 near *Egf*. *Genomics*, California, v. 11, p. 1040-8, apr. 1991.

NEXO, E.; *et al.* Detection of epidermal growth factor-urogastrone and its receptor during fetal mouse development. *Proc Natl. Acad. Sci.*, Bethesda, Maryland, v. 77, p. 2782-5, may 1980.

OOSTERWEGEL, M.; *et al.* Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and Lef-1 during murine embryogenesis. *Development*, Utrecht, The Netherlands, v. 118, p. 439-48, nov. 1993.

PARR, B. A.; MCMAHON, A. P. Wnt genes and vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev.*, Cambridge, Massachusetts, v. 4, p. 523-8, feb. 1994.

PARTANEM, A. M. Growth Factors and Development. In: _____ The development of epithelial mesenchymal organ of the mouse. New York: John Wiley; 1990. cap. 3, p. 31-53.

PERES, R. C.; *et al.* Absence of Association Between *TGF-β1* Promoter Polymorphisms and Hypodontia. *Angle Orthodontist*, Piracicaba, Brazil, v. 74, n. 4, p. 58-64, oct. 2004. 34

PETERS, H.; BALLING, R. Teeth – where and how to make them. Trends Genet., Neuherberg, Germany, v. 15, p. 59-65, apr. 1999.

PRICE, J.; *et al.* Identification of a mutation in *Dlx3* associated with tricondylar syndrome (TDO) syndrome. Hum. Mol. Genet., Winston-Salem, USA, v. 7, p. 563-9, nov. 1998.

RAPRAEGER, A. Transforming growth factor (Type b) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia. J Cell Biol., Madison, v. 109, p. 2509-18, jan. 1989.

RASMUSSEN, S.; RAPRAEGER, A. Altered structure of the hybrid cell surface proteoglycan of mammary epithelial cells in response to transforming growth factor-b. J Cell Biol., Madison, v. 107, p. 1959-67, nov. 1988.

RIZZINO, A.; *et al.* Regulatory effects of cell density on the binding of transforming growth factor beta, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor. Cancer Res., Nebraska, USA, v. 48, p. 4266-71, feb. 1988.

SAHLBERG, C.; AUKHIL, I.; THESLEFF, I. Tenascin-C in developing mouse teeth: expression of splice variants and stimulation by *TGFb* and *FGF*. Eur. J. Oral Sci., Helsinki, Finland, v. 109, p. 114-24, jan. 2001.

SATOKATA, I.; MAAS, R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. Nat. Genet., Boston, Massachusetts, v. 6, p. 348-56, feb. 1994.

SAXEN, L. *et al.* Inductive tissue interactions. In:_____The cell surface in animal embryogenesis and development. Amsterdam: ed. G. Poste and G. L. nicholson, cap. 7, p. 331-407, 1976.

SCAREL, R. M.; *et al.* Genes and tooth development: reviewing the structure and function of some key players. Brazilian Journal of Oral Sciences, Piracicaba, Brazil, v. 2, n. 7, p. 339-345, Oct/Dec. 2003.

SCAREL, R. M.; *et al.* Absence of mutations in the homeodomain of the *MSX1* gene in patients with hypodontia. Am J Med Genet., Piracicaba, Brazil, v. 92, p. 346-9, nov. 2000.

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

SHIMO, T.; *et al.* Expression, gene regulation, and roles of Fisp 12/CTGF in developing tooth germs. Dev. Dyn., Pennsylvania, Philadelphia, v. 224, p. 267-78, jul. 2002. 35

SILVA, E. R.; PEREIRA, M.; FAGGIONI JÚNIOR, G. Anomalias dentárias – Agenesias e supranumerários – Revisão bibliográfica. *Bioscience journal*, Uberlândia, v. 21, n. 2, p. 105-113, May/Aug. 2005.

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

STOCKTON, D. W.; *et al.* Mutation of *PAX9* is associated with oligodontia. *Nat. Genet.*, Houston, Texas, v. 24, p. 18-9, oct. 2000.

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

THESLEFF, I.; BARRACH, H. J.; FOIDART, J. M.; VAHERI, A.; PRATT, R. M.; MATIN, G. R. Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan and fibronectin during mouse tooth development. *Dev Biol.*, Helsinki, Finland, v. 81, p. 182-92, dec. 1981.

THESLEFF, I.; HUMERINTA, K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation*, Helsinki, Finland, v. 18, p. 75-88, oct. 1981.

THESLEFF, I. Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis. *Acta Odontol Scand.*, Helsinki, Finland, v. 53, p. 129-34, jan. 1995.

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

THESLEFF, I.; SHARPE, P. Signaling networks regulating dental development. *Mech. Dev.*, Helsinki, Finland, v. 67, p. 111-23, jul. 1997.

THESLEFF, I.; ABERG, T. Molecular regulation of tooth development. *Bone*, Helsinki, Finland, v. 25, p. 123-125, aug. 1999.

THESLEFF, I. Genetic basis of the tooth development and dental defects. *Acta Odontol. Scand.*, Helsinki, Finland, v. 58, p. 191-4, jan. 2000.

THESLEFF, I.; JERNVALL, J. Reiterative signaling and patterning during Mammalian tooth morphogenesis, *Acta Odontol. Scand.*, Helsinki, Finland, v. 58, p. 197-9, jan. 2000.

TRAVIS, A.; *et al.* LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor a enhancer function. *Genes Dev.*, California, San Francisco, v. 5, p. 880-94, jun. 1991.

- TREVOR, J. P.; PARIMAL, D.; PRAGNA, I. P. Hypodontia: genetics and future perspectives. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, Piracicaba, v. 4, n. 13, p. 696-706, apri/jun. 2005.
- TUCKER, A. S.; KHAMIS, A.; SHARPE, P. T. Interactions between *Bmp-4* and *Msx-1* act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. *Dev. Dyn.*, London, United Kingdom, v. 212, p. 533-9, may 1998.
- UNDERHILL, D. A. Genetic and biochemical diversity in the *Pax* gene family. *Biochem. Cell Biol.*, Edmonton, Canada, v. 78, p. 629-38, mar. 2000.
- VAAHTOKARI, A.; VAINIO, S.; THESLEFF, I. Associations between transforming growth factor b1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development*, Helsinki, Finland, v. 113, p. 985-94, aug. 1991.
- VAAHTOKARI, A.; ABERG, T.; THESLEFF, I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by *Egf* and *FGF-4*. *Development*, Helsinki, Finland, v. 122, p. 121-6, dec. 1996.
- VAN GENDEREN, C.; *et al.* Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in *Lef-1*-deficient mice. *Genes Dev.*, California, San Francisco, v. 8, p. 2691-2703, sep. 1994.
- WATERMAN, M. L.; FISCHER, W. H.; JONES, K. A. A thymus specific member of the HMG protein family regulates the human T-cell receptor Ca enhancer. *Genes Dev.*, La Jolla, California, v. 5, p. 656-69, mar. 1991.
- WEISS, K.; STOCK, D.; ZHAO, Z. Dynamic interactions and the evolutionary genetics of dental patterning. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, Pennsylvania, USA, v. 9, p. 369-98, dec. 1998.
- ZHANG, Y.; *et al.* *Msx1* is required for the induction of *Patched* by *Sonic Hedgehog* in the mammalian tooth germ. *Dev. Dyn.*, New Orleans, Louisiana, v. 215, p. 45-53, aug. 1999.
- ZHAO, Z.; *et al.* Expression of *Dlx* genes during the development of murine dentition. *Dev Genes Evol.*, Pennsylvania, USA, v. 210, p. 270-5, mar. 2000.
- ZHOU, P.; *et al.* Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev.*, Chicago, Illinois, v. 9, p. 700-13, feb. 1995.

Uso de novo método para extração de DNA genômico de células descamadas a mucosa oral para utilização em estudos genéticos

Silva E. R.¹, Alves J. B.¹ and Pereira R. W.²

*1- Department of morphologic, Universidade de Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.
Campus Aeroporto - Avenida Nenê Sabino, Uberaba MG.*

*2- Department of genetic, Universidade Católica de Brasília, Brasília, D.F., Brazil Campus
II – SGAN 916 Norte – Av. WS Cep: 70.790-160 – Brasília D.F.*

Correspondence to:

Elisângela R. da Silva

Universidade de Uberaba-UNIUBE

Avenida Nenê Sabino, Campus Aeroporto.

Uberaba, MG, Brazil.

Phone: +55-34-3232-2105

e-mail: elislaura@hotmail.com

Resumo

Uso de novo método para extração de DNA genômico de células descamadas a mucosa oral para utilização em estudos genéticos

A análise do DNA é largamente usada em estudos genéticos. O DNA humano, em muitos casos, é obtido através de amostras de sangue periférico. O uso de células descamadas da mucosa oral, como fonte de DNA para amplificação por PCR, tem apresentado muitas vantagens. Nesse estudo, nosso objetivo foi padronizar extração de DNA de células obtidas da mucosa oral, usando um novo método. Para testar a qualidade do DNA, nós amplificamos o segundo éxon do gene *MSX1* em pacientes com hipodontia. Criamos um novo método de extração de DNA através de células da mucosa oral, que apresenta baixo custo e rápidos resultados, indicando que o DNA dessas células, quando extraídos por essa técnica, é suficiente para estudos genéticos. O DNA extraído mostrou-se adequado em quantidade e qualidade, para estudos de PCR e análises de polimorfismos.

Palavras-Chave: PCR, Extração de DNA, Análise de polimorfismos

Introdução

A análise do DNA humano é largamente usada em estudos genéticos e, em muitos casos, esse material é obtido através de amostras de sangue periférico.^{1,2,3,4} No entanto, a retirada de sangue se faz através de procedimentos invasivos e a coleta pode envolver problemas éticos. Faz-se necessário também a supervisão de profissionais capacitados durante o processo de coleta, o que contribui para aumentar o custo do procedimento.^{5, 6,7,8,9}

Estudos têm demonstrado ampliações de fragmentos de DNA obtidos de células da mucosa oral de humanos, e posteriormente submetidos a técnicas de análise de DNA, onde os resultados apresentam-se satisfatórios.^{5, 6} Usa-se freqüentemente em laboratórios a extração orgânica de DNA, através de fenol, porém esse reagente é altamente tóxico para animais.¹³

Nós padronizamos um novo método para extração de DNA a partir de células da mucosa oral. Esse método é de baixo custo e rápidos resultados, e o DNA genômico obtido através dele de ótima qualidade para realização de estudos genéticos.

Materiais e Métodos

Amostras de saliva de 50 indivíduos da região sudeste do Brasil foram coletadas através de bochechos com solução isomolar de sacarose a 3% (aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia-UFU, protocolo 109/2004). A mistura foi então centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos, originando um *pellet*. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspenso em 500 µl de Master Mix [10 mM Tris-HCL (pH 8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. As amostras foram então congeladas a -20°C, até a extração do DNA.

Extração de DNA - Protocolo

Após o descongelamento das amostras, adicionou-se 2,5 µl de proteinase K (10mg/ml) e incubou-se, a 56°C durante toda a noite, em constante agitação, para digestão de proteínas. As amostras foram então centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos, para separar os restos de proteínas. A fase aquosa, contendo o DNA, foi pipetada e transferida para um microtubulo limpo.

Adicionamos 200µl de NaCl a 7M em cada microtubulo. As amostras foram incubadas a 0°C durante 10 minutos. Centrifugamos as amostras durante 15 minutos a 12000 rpm, e então coletamos a fase aquosa transferindo-a para microtubulos limpos. O DNA foi então precipitado com 1 ml de etanol absoluto. Novamente as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 12000 rpm, para nova precipitação.

Dispensamos então o sobrenadante e adicionamos 1ml de etanol 70%. Após nova centrifugação, 10 minutos a 12000 rpm, removemos o sobrenadante e deixamos os microtubulos abertos descansando durante 2 horas em temperatura ambiente, para o total evaporação do álcool. Ressuspendemos o DNA seco com 200µl de água mili-Q.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação foi realizada com 500 ng de DNA em um volume total da reação em 50 µl, contendo tampão 10X, 2,5 mM MgCl, nucleotídeos (200 unidades de cada), 1 Un dos iniciadores, 2U da enzima taq DNA polimerase (PROMEGA). A seqüência dos iniciadores usados foram:

MSX1:

5' ACT TGG GGG CAC TCA ATA TC 3' – sense

5' TGT GAG GGT TAA AGG GAA GG 3' – anti-sense

Ciclo de amplificação:

Aquecimento inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 50 segundos, temperatura de anelamento de 60°C por 1 minuto, temperatura de extensão de 72°C por 1 minuto e temperatura de 72°C por 5 minuto para extensão final. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose com brometo de etídio, em tampão 0,5X TBE (89 mM Tris-Borato, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), e então coradas com prata.

Resultados

Os resultados obtidos por esse processo de extração foram satisfatórios. A amplificação do 2º exons do gene *MSX1*, seguida de posterior análise de polimorfismo (figura 2 e 3) foram realizadas também com grande sucesso. O DNA genômico mostrou-se adequado para análise genéticas, devido a quantidade e qualidade do material genético.



Figura 1: Produtos da extração do DNA de células descamadas da mucosa oral. Gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio.



Figura 2: Produtos de PCR obtidos pela amplificação do 2º éxon do gene *MSX1*, 668 pb, em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio.

Discussão

O uso de células descamadas da mucosa oral para obtenção de DNA genômico, oferece vantagens em relação às células do sangue periférico. Dessa forma, o material genético pode ser obtido inclusive de pacientes resistentes a qualquer forma invasiva de coleta e, não necessita o acompanhamento de profissionais especializados durante a coleta. Vale ainda ressaltar que os riscos de contaminação são mínimos.^{10,11,12}

Nós amplificamos através de PCR, e posteriormente submetemos às técnicas de análise de polimorfismos, DNA extraído através desse método. O DNA extraído de 50 indivíduos apresentou quantidade e qualidade adequadas para estudos genéticos.

Estudos anteriores reportaram amplificação de fragmentos de DNA obtidos de células descamadas da mucosa oral de humanos.^{5, 6} Nós padronizamos um novo método para extração desse DNA genômico. Este método apresenta baixo custo e facilidade de execução. É um método seguro graças à não toxicidade dos produtos utilizados.

A extração orgânica (fenol-cloroformio) é largamente utilizada em laboratórios porém, os produtos utilizados para tal são tóxicos, podendo comprometer o sistema endócrino dos animais.¹³ Nesse artigo mostramos que através do método descrito, podemos obter DNA em quantidade e qualidade satisfatórias para estudos genéticos. Análises genéticas realizadas com DNA obtido por esse método mostraram excelentes resultados.

Abstract

Use of New Method For Genomic DNA Extraction From Jugal Epithelial Cells For Utilization In Polymerase Chain Reaction

The analysis of DNA is widely employed in the genetic studies. Human DNA in most cases is performed with samples obtained from peripheral blood. The use of buccal epithelial cells as a source of DNA for PCR amplifications has several advantages over blood sampling. In the present study our objective was to standardize DNA extraction from an oral swab, using a simple method. To test DNA quality, we amplified the exons 2 of *MSX1* gene and the promoter region of *LEF1* gene to patients with hypodontia. In conclusion, we standardized a simple DNA extraction of oral cells, which presented lower costs and faster results, indicating to that DNA from oral brushes/swabs are a reliable source for genetic studies. The quantity and quality of extracted DNA was shown to be adequate for PCR and polymorphism analyses.

Keywords: PCR, Extraction of DNA, Polymorphism analyses.

References

- 1 - Ohhashi A, Aoki T, Matsugo S, Simasaki C. PCR-based typing of human buccal cell's DNA extracted from whole saliva and saliva stains. *Nihon Hoigaku Zasshi*. 1993; 47(2): 108-18.
- 2 - Hochmeister MN, Budowle B, Jung J, Borer UV, Comey CT, Dirnhofer R. PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. *Int. J. Legal Med*. 1991; 104(4): 229-33.
- 3 - Zheng S, Ma X, Buffler PA, Smith MT, Wiencke JK. Whole genome amplification increases the efficiency and validity of buccal cell genotyping in pediatric populations. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. 2001; 10: 697-700.
- 4 - Thomson DM, Brown NN, Clague AE. Routine use of hair root or buccal swab specimens for PCR analysis: advantages over using blood. *Clin. Chim. Acta*. 1992; 207: 169-74.
- 5 - Witsø E, Stene LC, Paltiel L, Joner G, Rønningen KS. DNA extraction and HLA genotyping using mailed mouth brushes from children. *Pediatric Diabetes*. 2002; 3(1): 89-94.
- 6 - Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J. Forensic Odontostomatol*. 2000; 18(3): 6-9.

7 - Tobal K, Layton DM, Mufti GJ. Non-invasive isolation of constitutional DNA for genetic analysis. *Lancet*. 1989; 2: 1281-82.

8 - Walker AH, Najarian D, White DL, Jaffe JF, Kanetsky PA, Rebbeck TR. Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reaction- based biomarker assays. *Environ. Health Perspect*. 1999; 107: 517-20.

9 - Walsh DJ, *et al*. Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva. *J. Forensic Sci*. 1992; 37: 387-395.

10 - Bennett LC, Kraemer R, Liechti-Gallati S. Buccal cell DNA analysis in premature and term neonates: screening for mutations of the complete coding region for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Eur. J. Pediatr*. 2000; 159: 99-102.

11 - Harty LC, Garcia-Closas M, Rothman N, Reid YA, Tucker MA, Hartge P. Collection of buccal cell DNA using treated cards. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. 2000; 9: 501-06.

12 - Heath EM, Morken NW, Campbell KA, Tkach D, Boyd EA, Strom DA. Use of buccal cells collected in mouthwash as a source of DNA for clinical testing. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2001; 125: 127-33.

13 - Melikadze E. Biogenic amines during intoxication with phenol and correction with the liquid oxygen in the experiment. *Georgian Med. News*. 2007; 146: 67-9.

Mutação no gene *MSX1* está relacionada a agenesia dental

Silva E. R.¹, Alves J. B.¹, Vieira C. U.², Pereira B. B.² and Pereira R. W.³

1- Department of morphologic, Universidade de Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

Campus Aeroporto - Avenida Nenê Sabino, Uberaba MG.

2- Department of genetic, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais,

Brazil, Campus Umuarama –Avenida Pará, Uberlândia MG.

3- Department of genetic, Universidade Católica de Brasília, Brasília, D.F., Brazil Campus

II – SGAN 916 Norte – Av. WS Cep: 70.790-160 – Brasília D.F.

Correspondence to:

Elisângela R. da Silva

Universidade de Uberaba-UNIUBE

Avenida Nenê Sabino, Campus Aeroporto.

Uberaba, MG, Brazil.

Phone: +55-34-3232-2105

e-mail: elislaura@hotmail.com

Resumo

Mutação no gene *MSX1* está relacionada à agenesia dental

Hipodontia, a ausência congênita de dentes, é uma das alterações mais comuns na dentição humana. Vários dentes podem estar ausentes porém, os mais comuns são os terceiros molares, segundo pré-molares e incisivos laterais superiores. Embora essa alteração de número não represente um problema de saúde pública, ela pode causar disfunções mastigatórias e problemas estéticos graves. Nos humanos, o papel do gene *MSX1* no desenvolvimento crânio facial tem sido esclarecido em estudos que identificaram mutações nesses genes, associadas a alterações da normalidade. Mutações-polimorfismos no gene *MSX1* têm sido relatadas como responsáveis pela agenesia dental, no entanto, mutações neste gene não explicam todas as formas dessa alteração. Nossos resultados sugerem que polimorfismos no gene *MSX1* estão associados com a hipodontia.

Palavras-chave: Hipodontia, *MSX1*, Polimorfismo

Introdução

A hipodontia, ausência congênita de dentes, é uma das alterações mais comuns na dentição humana. Vários dentes podem estar ausentes porém, os mais comuns são os terceiros molares (20%), segundo pré-molares (3.4%), e incisivos laterais superiores (2.2%).¹ Embora essa alteração de número não represente um problema de saúde pública, ela pode causar disfunções mastigatórias e problemas estéticos graves.² A hipodontia pode ocorrer como uma herança familiar (autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X) ou como um traço isolado.³

Polimorfismos genéticos são mecanismos responsáveis pelo surgimento de características individuais consideradas biologicamente normais em uma população. Polimorfismos foram também mostrados relacionados com susceptibilidade a doenças. Muitos polimorfismos alteram a função dos genes e podem ocorrer em alta frequência em uma população.⁴

Nos últimos anos muitos fatores de crescimento e fatores de transcrição foram descobertos durante o desenvolvimento do dente.^{5,6} A participação direta de vários genes envolvidos na odontogênese foi evidenciada pela fenótipo de ausência de dentes em camundongos que tiveram esses genes deletados através de experimentos.⁷ O gene *MSX1* é um fator de transcrição que participa na cascata molecular que comanda o processo de odontogênese. Esse gene é expresso no mesênquima durante os estágios de botão, capuz e campânula da odontogênese. O gene *MSX1* regula a expressão do gene *BMP4* no mesênquima dental, passo essencial para o desenvolvimento do elemento dental.²

Em humanos o papel do gene *MSX1* no desenvolvimento crânio facial tem sido identificado através de mutações polimorfismos nesse gene. Polimorfismos-mutação na região homeobox do gene *MSX1* resultam na substituição de uma arginina por uma prolina, causando um forma específica de agenesia dental.⁸ Porém, mutações no gene *MSX1* não podem explicar todas as causas de agenesia dental.⁹

Nosso estudo analisou a presença de polimorfismos-mutações no gene *MSX1* em uma família portadora de agenesia dental, relacionando tal polimorfismo a hipodontia.

Materiais e Métodos

Casuística

Doze indivíduos de uma mesma família, cinco portadores de agenesia dental sem sinais de outras desordens, foram analisados. A ausência congênita dos incisivos laterais e terceiros molares foi confirmada por análises radiográficas (detalhes não mostrados).

Obtenção do DNA

O DNA genômico foi obtido através de bochechos com solução isomolar com a saliva, glicose a 3%, durante 2 minutos. A solução resultante do bochecho foi centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm. Ao precipitado de material celular foram acrescentados 500µl de Master mix (pH 8), contendo TrisCl a 10 mM, EDTA a 0,1 M e SDS a 0,5%. A solução foi homogeneizada e armazenada a -20°C até o momento da extração do DNA.

Amplificação por PCR

Os iniciadores utilizados para amplificar a região de 668 pb de parte do íntron e do segundo éxon do gene *MSX1* foram:

5' ACT TGG CGG CAC TCA ATA TC 3' (forward)

5' TGT GAG GGT TAA AGG GAA GG 3' (reverse).

Para as reações de PCR foram utilizadas quantidades aproximadas de 500 ng de DNA em um volume total de 50µl, contendo TrisCl a 10 mM (pH 8), KCl a 50 mM, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) e 5µl de cada iniciador. O DNA genômico de cada amostra foi desnaturado a 95°C por 5 minutos e submetido a 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por um minuto, 72°C por 1 minuto, finalizando a reação com uma extensão final na mesma temperatura por 5 minutos.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Eletroforese das amostras

As seqüências amplificadas foram submetidas a eletroforese em géis de poli-acrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 7,%. O volume de DNA aplicado em gel era de 4µl, acrescidos de 3µl de tampão carreador (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30%).

Análise de Polimorfismos por conformação de cadeias simples (SSCP)

Os produtos de PCR de todos os indivíduos da família estudada foram desnaturados a 98°C por 5 minutos, com 7µl de tampão desnaturante (formamida a 95%, xilenocianol a 0,05%, azul de bromofenol a 0,05%, EDTA a 20mM). A seguir, as amostras foram conservadas em temperatura de 0°C enquanto foram aplicadas em gel de poli-acrilamida/bis-acrilamida (29:1) e submetidas a eletroforese realizada a 4°C e 10mA. A concentração do gel foi padronizada a 7,5% e o tempo de corrida foi de 4 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados com prata.

Resultados

A amplificação dos fragmentos do gene *MSX1* apresentou 99% de sucesso; esses fragmentos por apresentarem excelente quantidade de DNA foram utilizados para o estudo. Os seguimentos amplificados foram submetidos a técnica de SSCP, a qual revelou padrão diferente de migração das bandas no gel, ou seja, houve indicação de polimorfismo/mutação na amostra nessa técnica.

O achado foi considerado conclusivo.

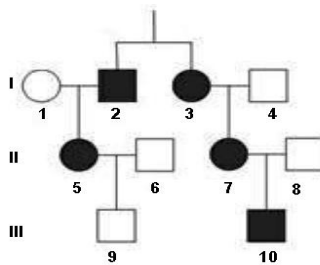


Figura 1- Heredograma que elucida a família estudada.

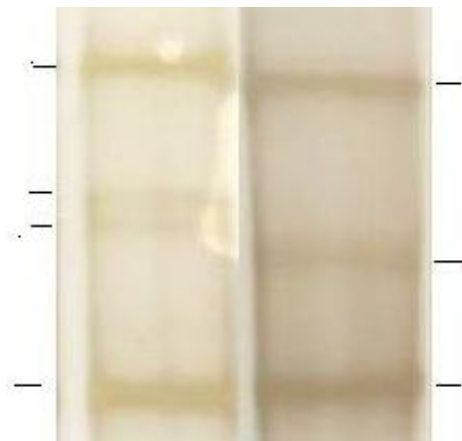


Figura 2 – Gel apresentando o padrão de migração para a família, sendo o padrão de 4 bandas referente aos indivíduos não-portadores e o padrão de 3 bandas referente aos indivíduos portadores de agenesia dental.

Discussão

Uma dentição completa e funcional é pré-requisito para sobrevivência de muitos mamíferos. A dentição dos mamíferos consiste de dentes que se desenvolveram como órgãos discretos, e de anterior para posterior, a dentição é dividida dentro das regiões de incisivos, caninos, pré-molares e molares. Particularmente, os dentes molares são muito diversificados nas suas formas.⁶

A hipodontia é a ausência congênita de um a seis dentes permanentes e/ou decíduos. Representa uma das alterações mais frequentes da dentição humana. Embora não constitua um problema de saúde pública, a agenesia dental pode causar alterações na função mastigatória e fala, assim como problemas estéticos que podem afetar a vida social do indivíduo.^{10,11} Esta alteração pode ocorrer associada a síndromes ou como uma entidade isolada, podendo, neste caso, seguir um padrão herdado ou não. Os terceiros molares são os dentes mais afetados, estando ausentes em aproximadamente 20% da população, seguidos pelos segundos pré-molares (3,4%) e incisivos laterais maxilares (2,2%)^{12,13}

Os processos de amplificação e análise de polimorfismos genéticos requerem DNA genômico em quantidade e nível de pureza satisfatórios para o sucesso das reações. Os resultados obtidos mostram que células descamadas da mucosa bucal oferecem material de boa qualidade para técnicas de análise em biologia molecular, como, no caso, para pesquisa de polimorfismos genéticos. Esse método se constituiu em um meio simples, de baixo custo e inofensivo ao paciente.¹⁴

A técnica de SSCP promove a identificação de polimorfismos conformacionais nas fitas simples de DNA, com o objetivo de se confirmar polimorfismos/mutações. Nessa técnica, a partir de produtos de PCR, separa-se a dupla fita de DNA que se houver mutação migrará com padrão diferente no gel, devido a conformação.

O polimorfismo encontrado somente nos pacientes com agenesia dental foi considerado conclusivo para a presença do fenótipo, considerando que o padrão diferente foi observado somente nos pacientes com agenesia, determinando assim relação direta com a manifestação da anomalia.

A análise por SSCP permite que a dupla fita do DNA seja desnaturada, impedindo sua renaturação imediata, para que, quando submetidas a eletroforese, as fitas separadas possam ter mobilidades diferentes no gel caso existissem diferenças entre as bases que as compunham. Assim é possível detectar polimorfismos ou indivíduos heterozigotos.¹⁵ É importante observar que a técnica de análise de polimorfismo por conformação de fita simples não substitui o seqüenciamento, pois somente essa última técnica identifica o polimorfismo/mutação por demonstrar a base ou seqüência que se mostra alterada.

A família que participou desse estudo não apresenta características síndrômicas, sendo que alguns indivíduos possuem fenótipo de hipodontia de incisivos laterais superiores e terceiros molares. Evidenciamos um padrão migratório diferente de bandas para o gene *MSX1* nos indivíduos que apresentam o fenótipo da hipodontia.

No entanto não parece sensato desconsiderar fatores epigenéticos e a influência ambiental na odontogênese. Estudos paleoantropológicos enfocando os aspectos evolutivos da dentição referem, a potencial contribuição de fatores ambientais ao longo do processo.¹⁴

Mecanismos epigenéticos podem ter contribuído para a redução do complexo

mastigatório, por exemplo. A contínua tendência de redução do número de dentes (terceiro molar) pode ser vista como um processo evolutivo, e o gene *MSX1* seria uma das moléculas relacionadas com tal efeito. Aliando-se a perspectiva evolutiva com técnicas de biologia molecular, seria possível compreender mais amplamente a odontogênese. Assim, não só os fatores genéticos seriam considerados, mais seria investigado um provável papel que interações gene/ambiente tenha desempenhado ao longo do processo.¹⁵

Considerações finais

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

2-A extração de DNA com Master Mix apresentou excelentes resultados quanto a quantidade e qualidade do material extraído.

3-Foram detectados padrão diferencial de migração das bandas do gel de SSCP para as amostras dos pacientes com agenesia dental, sugerindo, então, que esses polimorfismos estão relacionados a presença de tal alteração

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer aos Doutores Warwick Estevam Kerr e Luis Ricardo Goulart Filho, da Universidade Federal de Uberlândia, pela incrível contribuição nesse trabalho. Sem dúvida, sem a ajuda desses grandes cientistas esse trabalho não teria sido realizado.

Abstract

Mutação no gene *MSX1* está relacionada à agenesia dental

Hypodontia, the congenital absence of one or a few teeth, is one of the most common alterations of the human dentition. The most common permanent missing teeth are the third molars, second premolars, and maxillary lateral incisors. Although hypodontia does not represent a serious public health problem, it may cause masticatory and speech dysfunctions and esthetic problems. In human the participation of *MSX1* gene in craniofacial development have been evidenced by the studies that showed mutations in this gene. Hypodontia were shown to be caused by mutations in the *MSX1* gene in human however, the mutation in the *MSX1* gene cannot explain all types of tooth agenesis. Our data suggest that polymorphisms in *MSX1* gene are associated with hypodontia.

Key words: Hypodontia, polimorphism, *MSX1*

Referências

- 1-Simons AL, Stritzel F, Stamatiou J. Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisors and second premolars. *J Clin Pediat Dent.* 1993;17:109-111.
- 2-Scarel, RM, *et al.* Genes and tooth development: reviewing the structure and function of some key players. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, Piracicaba, Brazil, v. 2, n. 7, p. 339-345, Oct/Dec. 2003.
- 3-Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2000;117:650-656.
- 4-Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1958-62.
5. Thesleff I. Two genes for missing teeth. *Nat Genet.* 1996;13:379-80.
6. Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms Development.* 2000;92:19-29.
- 7 Line SRP. Molecular morphogenetic fields in the development of human dentition. *J Theoret Biol.* 2001;211:67-75.
- 8- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman IG, Seidman CE. A human *MSX1* homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 1996; 13: 417-21.
9. Scarel RM, Trevilatto PC, Di Hipólito Jr, O., Camargo LEA, Line, SRP. Absence of mutations in the homeodomain of the *MSX1* gene in patients with hypodontia. *Am J Med Genet* 2000; 92: 346-9.
- 10 Elisângela RS, Peres RC, Scarel RM, De Conto F, Line SRP. Absence of mutations in the promoter region of the *LEF1* gene in Patients with hypodontia. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, Piracicaba, v. 2, n. 4, p. 144-146, jan/mar. 2003.
- 11- Schalk Van Der Weide, Y. *et al.* Symptomatology of patients with oligodontia. *J. Oral Rehab.*, v. 1. P. 247-61, 1994

- 12- Cua-Benward, A. *et al.* The prevalence of congenitally missing teeth in class I, II, III malocclusions. *J Clin Ped Dent*, v.17, p.15-17, 1992.
- 13- Graber, L. W. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns. *JADA*, v.96, p.266-275, 1978.
- 14- Scarel RM, Trevilatto PC, Di Hipólito Jr, O., Camargo LEA, Line, SRP. Absence of mutations in the homeodomain of the *MSX1* gene in patients with hypodontia. *Am J Med Genet* 2000; 92: 346-9.
- 15-Prosser, J. Detecting single base mutations. *Tibtech*, v.11, p. 238-46, 1993
- 16- Macho, T., Moggi-Cecchi, A. Reduction of maxillary molars in homo sapiens sapiens: a different perspective. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 87(2), p. 151-59, 1992.

Referência Bibliográficas

Dermaut LR, Goeffers KR, De Smitt AA. Prevalence of tooth agenesis correlated with jaw relationship and dental crowding. *Am J Orthod.* 1986; 90(3): 204-210.

Erwin WG, Cockern RW. A pedigree of partial anodontia. *J Hered.* 1949; 40: 215-218.

Estácia A, Souza MMG. Agenesia bilateral de incisivos laterais superiores – relato de caso clínico. *J Bras Ortodon Ortop Facial.* 2000; 5(25): 21-28.

Jernvall J, Keranen SV, Thesleff I. Evolutionary modification of development in mammalian teeth: quantifying gene expression patterns and topography. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97(26): 14444-8.

Jernvall J. Linking development with generation of novelty in mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97(6): 2641-5.

Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev.* 2000; 92(1): 19-29.

Kokich Jr Vo. Congenitally missing teeth: Orthodontic management in the adolescent patient. *Am J Orthod.* 2002; 121(6): 594-595.

Kurusu K, Tabata MJ. Human genes for dental anomalies. *Oral Diseases.* 1997; 3: 223-228.

Line, SRP. Molecular morphogenetic fields in the development of human dentition. *J Theore Biol.* 2000; 211(1): 67-75.

Line, SRP. Molecular strategies in the evolution of mammalian dental patterning. *Evolutionary Ecology.* 2001; 15(1): 73-79

Line, SRP. Variation of tooth number in mammalian dentition: connecting genetics, development, and evolution. *Evol Dev.* 2003; 5(3): 295-304.

Moyers R. E. *Ortodontia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.

Neubuser A, Peters H, Balling R, Martin GR. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: A mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell*. 1997; 90(2): 247-255.

Peyer, B. *Comparative odontology*. Chicago and London: The University of Chicago Press; 1968.

Polly PD. Development and evolution occlude: evolution of development in mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97(26): 14019-21. Review.

Proffit W, Fiedls H. *Ortodontia contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; 1995.

Scarel R M, Pasetto S, Silva E R, Peres R C. Genes and tooth development: reviewing the structure and function of some key players. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, Piracicaba, Brazil, v. 2, n. 7, p. 339-345, Oct/Dec. 2003.

Schalk van der Weide Y, Beemer FA, Bosman F, Faber JA. Symptomatology of patients with oligodontia. *J Oral Rehabil*. 1994; 21(3): 247-261.

Shafer WG, Hine Mk, Levy BM. *Tratado de patologia bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara-Kogan; 1958.

Simons AL, Stritzel F, Stamatiou J. Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisors and second premolars. *J Clin Pediat Dent*. 1993; 17:109-111.

Stewart RE, Poole AE. The orofacial structures and their associations with congenital abnormalities. *Ped Clin North Am*. 1982; 29(3): 547-585.

Thesleff I. Two genes for missing teeth. *Nature Genetics*. 1996; 13(4): 379-380.

Woodworth D A, Sinclair PM, Alexander RG. Bilateral congenital absence of maxillary lateral incisors: A craniofacial and dental cast analysis. *Am J Orthod*. 1985; 87(4): 280-93.