The background of the cover features a close-up of a young child's face, looking directly at the camera with large, dark eyes. The child's face is partially obscured by a large, interlocking puzzle piece that covers the upper left portion of the image. The entire scene is bathed in a soft, ethereal light with a color palette of light blues, greens, and purples, creating a dreamlike atmosphere. Numerous small, out-of-focus light spots (bokeh) are scattered across the image, adding to the soft, ethereal quality.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

FERNANDA VERONESE DE OLIVEIRA

**Triagem de mutações e polimorfismos de genes candidatos à
malformação dentária em pacientes com fissura labiopalatina**

**BAURU
2015**

FERNANDA VERONESE DE OLIVEIRA

**Triagem de mutações e polimorfismos de genes candidatos à
malformação dentária em pacientes com fissura labiopalatina**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira

Versão corrigida

**BAURU
2015**

Oliveira, Fernanda Veronese de

OL4t Triagem de mutações e polimorfismos de genes
candidatos à malformação dentária em pacientes com
fissura labiopalatina / Fernanda Veronese de Oliveira.
– Bauru, 2015.
108p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE: 00911012.3.0000.5441
Data: 19/12/2012

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com fissura labiopalatina e malformações dentárias, razão deste estudo que, na inocência de suas vidas, ensinaram-me a agradecer o que sou, confiaram suas esperanças de alcançar uma melhor qualidade de vida, possibilitando-me servir com todo o carinho profissional e incentivando-me a oferecer-lhes um processo reabilitador cada vez melhor. Aos familiares dos pacientes, que gentilmente colaboraram, confiaram e se prontificaram em participar. Que este estudo, grão de areia na literatura científica, buscando reduzir o oceano de desconhecimento sobre o assunto, possa ajudar a oferecer-lhes uma vida com a dignidade que lhes é devida.

Ao meu saudoso e amado vovô Antonio, meu espelho e exemplo de vida, de determinação e caráter, eternamente vivo em meu coração, pela certeza de que olha por mim.

Aos meus amados pais José e Isabel, por me presentear com a vida, por acreditarem no meu valor como ser humano, pelo zelo com que me educaram e, acima de tudo, pelo amor incondicional. Com certeza, tudo é fruto dos seus ensinamentos de dignidade, humildade e honestidade.

Ao meu amado filho João Vitor, linda surpresa e benção de Deus, que veio ao mundo para ensinar-me a ser mãe, razão de todo o meu esforço e luta, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu amado filho que ainda carrego em meu ventre, milagrinho de Deus, razão de toda minha transformação, pelas melhores sensações e emoções sentidas nesta fase tão especial de nossas vidas.

Ao meu marido Fernando, amor da minha vida, por me presentear com uma sementinha tão linda em meu ventre, permitindo-me ser mãe novamente e por respeitar minhas escolhas mesmo com todas as suas dúvidas e questionamentos a respeito da minha formação.

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens e falasse a língua dos anjos...
sem o amor de vocês, eu nada seria...”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente, por me conceder o dom da vida, por guiar-me, proteger-me, permitir-me realizar tantas coisas, e por presentear a minha vida com pessoas tão especiais.

À querida amiga e orientadora Profa. Thais Marchini de Oliveira, não somente pela indescritível colaboração e impecável orientação durante a execução deste trabalho, mas, sobretudo pelo incentivo, pela confiança, carinho e compreensão, presente em todos os momentos.

Ao querido Prof. Carlos Ferreira dos Santos, por me “abrigar” no setor de Farmacologia, pela oportunidade de estar ao seu lado usufruindo de seus conhecimentos, por todos os ensinamentos compartilhados e pelo imenso carinho com que me chama de “neta científica”.

Ao querido amigo Thiago José Dionísio, a quem nunca terei como agradecer por todo ensinamento e por tudo que fez para a realização deste trabalho, e pela amizade conquistada ao longo destes anos de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia e Genética: Thaisinha, Carol, Dri, Russo, Rubens, Túlio, Dan, Vivi, Elzinha, Vera, Profa. Lucimara, Prof. Flávio e Prof. Léo, não só pela amizade conquistada, mas também pela prontidão, colaboração, ensinamentos e, principalmente, por me receberem com tanto carinho no laboratório. A convivência com vocês foi um presente.

Aos amigos do grupo de orientados da Profa. Thais: Aninha, Nádia, Lú, Tati, Paulinha, Bianca, Dri e Natal, pela amizade, ajuda, parceria, e principalmente por me receberem tão bem nesse grupo, mesmo eu sendo “a estranha no ninho”, por ser a única bióloga no meio de tantos dentistas.

A todos os funcionários do HRAC e FOB, pela atenção, disposição e prontidão presentes em todos os momentos, colaborando para a realização deste trabalho.

A todos os pacientes que aceitaram participar do estudo e seus familiares, por sua prestativa colaboração.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, pelo auxílio à pesquisa FAPESP concedido no processo nº 2009/12233-4, pela Bolsa de Mestrado concedida no processo nº 2009/12289-0 e pela Bolsa de Doutorado concedida no processo nº 2011/21190-7. Sem todo esse apoio, essa pesquisa não poderia ser realizada.

Aos meus queridos amigos os quais é impossível nomeá-los, pela deliciosa amizade e companheirismo ao longo de todos esses anos.

À minha família, meu porto seguro, por saber que tenho vocês ao meu lado, independente de tudo, sempre me impulsionando, com todas as forças, para que eu concretize todos os meus sonhos.

À minha vovó Laura, pelas orações, torcida, otimismo, exemplo e pela presença constante em minha vida.

À querida Cris, sempre presente em minha vida, por cuidar de mim e de minha família com tanto zelo e amor.

“Enquanto aqui dentro do peito bater-me quente o coração, teu nome acordará nele uma pulsação; enquanto houver vida em minha alma, haverá nela uma lembrança tua”.

Álvares de Azevedo

“É impossível avaliar a força que possuímos sem medir o tamanho do obstáculo que podemos vencer, nem o valor de uma ação sem sabermos o sacrifício que ela comporta.”

H. W. Beecher

RESUMO

O propósito deste trabalho foi investigar a ocorrência de mutações e polimorfismos em genes candidatos aos defeitos na formação do esmalte dentário em indivíduos com fissura labiopalatina (FLP) transforame incisivo unilateral ou bilateral isolada e associar o genótipo-fenótipo dos indivíduos com FLP e malformação dentária (MD) nos dentes incisivos centrais superiores permanentes. Foram coletadas amostras de saliva de 165 indivíduos de 6 a 15 anos de idade, de ambos os sexos, divididos em 4 grupos de estudo: Grupo 1 - 46 indivíduos com FLP e MD; Grupo 2 - 34 indivíduos com FLP e sem MD; Grupo 3 - 34 indivíduos sem FLP e com MD; Grupo 4 - 51 indivíduos sem FLP e MD. Foi realizada a extração do DNA genômico das amostras de saliva, seguida da Reação em Cadeia da Polimerase, sequenciamento direto dos éxons 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do gene AMELX e genotipagem dos SNPs rs3796703, rs3796704, rs3796705, rs7671281, rs2609428 e rs35951442 no gene ENAM. Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o Teste Exato de Fisher e o Teste do Qui-quadrado de Pearson. Em relação ao sequenciamento direto do gene AMELX, mutações foram encontradas em 30,4% (n=14), 35,3% (n=12), 11,8% (n=4) e 13,7% (n=7) dos indivíduos dos Grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Trinta e sete mutações foram detectadas e distribuídas ao longo dos éxons 2 (1 mutação - 2,7%), 6 (30 mutações - 81,08%) e 7 (6 mutações - 16,22%) do gene AMELX. Houve um aumento significativo ($p=0,003$) na frequência de mutações nos indivíduos com FLP (Grupos 1 e 2 - 65,7%) em relação aos indivíduos sem FLP (Grupos 3 e 4 - 25,5%). Em relação às 30 mutações encontradas no éxon 6, 43,34% (n=13), 23,33% (n=7), 13,33% (n=4) e 20% (n=6) foram encontrados nos Grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A mutação silenciosa c.261C>T (rs2106416) foi detectada em 26 indivíduos distribuídos nos quatro grupos estudados, sendo significativamente mais encontrada ($p=0,003$) nos grupos com FLP (23,75%), em comparação com os grupos sem FLP (8,23%). Nos grupos sem MD (Grupos 2 e 4), tal polimorfismo também foi encontrado de forma mais significativa ($p=0,032$) entre os indivíduos com FLP (Grupo 2 - 17,65%), quando comparados com aqueles sem FLP (Grupo 4 - 7,8%). Em relação à genotipagem dos SNPs no gene ENAM, a prevalência de heterozigotos no SNP rs2609428 foi maior ($p=0,006$) em indivíduos sem FLP com MD (Grupo 3 - 19,2%) em comparação com indivíduos com FLP e MD (Grupo 1 - 0%), assim como a prevalência dos heterozigotos/homozigotos mutados em indivíduos sem FLP (10%) foi maior ($p=0,028$) que em indivíduos com FLP (1,3%). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos demais SNPs analisados no gene ENAM. Com base nos resultados obtidos, sugere-se que o gene AMELX pode ser considerado um gene candidato para a FLP. O SNP rs2106416 no gene AMELX pode ser considerado um marcador para a FLP e o SNP rs2609428 no gene ENAM pode estar associado à MD na ausência da FLP.

Palavras-chave: Mutação. Polimorfismo. Fissura labiopalatina. Malformação dentária. AMELX. ENAM.

ABSTRACT

Screening of mutations and polymorphisms of candidate genes to dental malformation in patients with cleft lip and palate

The purpose of this study was to investigate the occurrence of mutations and polymorphisms (SNPs) in candidate genes to defects in the formation of enamel in individuals with cleft lip and palate (CLP) unilateral or bilateral incisive transforame isolated and associate genotype-phenotype of individuals with CLP and dental malformation (DM) in permanent teeth maxillary central incisors. For analysis of the proposed genes, saliva samples from 165 individuals from 6 to 15 years old, of both genders, were collected and divided into 4 groups: Group 1 - 46 individuals with CLP and DM; Group 2 - 34 individuals with CLP and without DM; Group 3 - 34 subjects without CLP and DM; Group 4 - 51 subjects without CLP and DM. Extraction of genomic DNA from saliva samples was performed, followed by Polymerase Chain Reaction, direct sequencing of 2, 3, 4, 5, 6 and 7 exons of AMELX gene and genotyping of SNPs rs3796703, rs3796704, rs3796705, rs7671281, rs2609428 and rs35951442 in the ENAM gene. For statistical analysis we used the Fisher's exact test and Pearson's chi-square test. Regarding direct sequencing of AMELX gene, mutations were found in 30.4% (n=14), 35.3% (n=12), 11.8% (n=4) and 13.7% (n=7) of individuals in Groups 1, 2, 3 and 4, respectively. Thirty-seven mutations were detected and distributed over the exons 2 (1 mutation - 2.7%), 6 (30 mutations - 81.08%) and 7 (6 mutations - 16.22%) of AMELX gene. There was a significant increase ($p=0.003$) in the frequency of mutations in individuals with CLP (Groups 1 and 2 - 65.7%) compared to subjects without CLP (Groups 3 and 4 - 25.5%). Regarding the 30 mutations found in exon 6, 43.34% (n=13), 23.33% (n=7), 13.33% (n=4) and 20% (n=6) were found in Groups 1, 2, 3 and 4, respectively. The c.261C>T silent mutation (rs2106416) was detected in 26 individuals distributed in all groups studied, and was significantly more found ($p=0.003$) in the groups with CLP (23.75%) compared to the groups without CLP (8.23%). In groups without DM (Groups 2 and 4), this polymorphism was also significantly more found ($p=0.032$) among individuals with CLP (Group 2 - 17.65%) compared to those without CLP (Group 4 - 7.8%). Regarding the SNPs genotyping in ENAM gene, the prevalence of heterozygous in SNP rs2609428 was higher ($p=0.006$) in individuals without CLP with DM (Group 3 - 19.2%) than in individuals with CLP and DM (Group 1 - 0%), as well as the prevalence of the heterozygous/homozygous mutated in individuals without CLP (10%) was higher ($p=0.028$) than in individuals with CLP (1.3%). No statistically significant difference was found in the other SNPs analysed in the ENAM gene. Based on the obtained results, it is suggested that the AMELX gene may be considered a candidate gene for the CLP. The SNP rs2106416 in AMELX gene may be considered a marker for CLP and the SNP rs2609428 in ENAM gene may be associated with DM in the absence of CLP.

Keywords: Mutation. Polymorphism. Cleft lip palate. Dental malformation. AMELX. ENAM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Indivíduo com FLP transforame incisivo bilateral apresentando MD.....	32
Figura 2 -	Indivíduo com FLP transforame incisivo unilateral sem MD	32
Figura 3 -	Indivíduo sem FLP apresentando MD	32
Figura 4 -	Indivíduo sem FLP e MD	32
Figura 5 -	Eletroferograma resultado do sequenciamento do éxon 2 do gene AMELX.....	39
Figura 6 -	Análise das sequências obtidas no Software SeqScape® 2.6.....	39
Figura 7 -	Resultado da genotipagem de uma amostra do SNP rs3796703 representando um resultado satisfatório, onde houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com o fluoróforo VIC, caracterizando um indivíduo homozigoto ancestral	44
Figura 8 -	Resultado da genotipagem de uma amostra do SNP rs3796705 representando um resultado insatisfatório, onde não houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com as sondas marcadas com os fluoróforos VIC ou FAM.....	45
Figura 9 -	Resultado da genotipagem de uma amostra do SNP rs3796704 representando um resultado satisfatório, onde houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com os fluoróforos VIC e FAM, caracterizando um indivíduo heterozigoto	45
Figura 10 -	Representação do resultado muito satisfatório da genotipagem do SNP rs35951442 onde houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com o fluoróforo VIC, caracterizando um indivíduo homozigoto ancestral.....	47
Figura 11 -	Representação do resultado muito satisfatório da genotipagem do SNP rs35951442 onde houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com os fluoróforos VIC e FAM, caracterizando um indivíduo heterozigoto	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência dos primers forward e reverse dos éxons 2, 3, 4-5, 6 e 7 do gene AMELX e condições da PCR.....	36
Tabela 2 -	Esquema contendo os reagentes, as concentrações e as quantidades utilizadas para PCR	36
Tabela 3 -	Quantidade de DNA purificado a ser utilizada na reação de sequenciamento	38
Tabela 4 -	Esquema contendo os reagentes e o volume utilizado para reação de sequenciamento	38
Tabela 5 -	Características dos SNPs do gene ENAM estudados para identificação dos genótipos	41
Tabela 6 -	Composição básica de reagentes para uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genótipos.....	42
Tabela 7 -	Resultados do sequenciamento direto do gene AMELX no Grupo 1	52
Tabela 8 -	Resultados do sequenciamento direto do gene AMELX no Grupo 2	52
Tabela 9 -	Resultados do sequenciamento direto do gene AMELX no Grupo 3	53
Tabela 10 -	Resultados do sequenciamento direto do gene AMELX no Grupo 4	53
Tabela 11 -	Resumo dos resultados dos ensaios de genotipagem para detecção dos SNPs rs3796703, rs3796704, rs3796705, rs7671281, rs2609428 e rs35951442 no gene ENAM	56
Tabela 12 -	Frequência de ocorrência do alelo mutado do SNP rs2609428 no gene ENAM nos grupos estudados.....	56
Tabela 13 -	Agrupamento dos resultados dos ensaios de genotipagem para detecção do SNP rs2609428 no gene ENAM de acordo com a presença da FLP	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	base nitrogenada adenina
AI	amelogênese imperfeita
AMBN	gene “ameloblastin”
AMELX	gene “amelogenin, X-linked”
C	base nitrogenada citosina
C4orf26	gene “chromosome 4 open reading frame 26”
ddNTP	dideoxinucleotídeo trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ENAM	gene “enamelin”
F	“forward” ou senso
FAM	sonda marcada com o fluoróforo FAM
FAM20A	gene “family with sequence similarity 20, member A”
FAM83H	gene “family with sequence similarity 83, member H”
FLP	fissura labiopalatina
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
G	base nitrogenada guanina
HCl	ácido clorídrico
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
ITGB6	gene “integrin, beta 6”
JAG2	gene “jagged 2”
KLK-4	gene “ kallikrein-related peptidase 4”
LAMB3	gene “laminin, beta 3”
MD	malformação dentária
MID1	gene “midline 1”
MIH	hipomineralização molar incisivo
MMP-20	gene “matrix metalloproteinase-20”
MSX1	gene “msh homeobox 1”
MYH9	gene “myosin, heavy chain 9, non-muscle”
pb	pares de base

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PVRL1	gene “poliovirus receptor-related 1”
R	“reverse” ou antisenso
ROX	referência fluorescente interna
RUNX2	gene “runt-related transcription factor 2”
SDS	dodecil sulfato de sódio
SLC4A4	gene “solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4”
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
T	base nitrogenada timina
TA	temperatura de anelamento
TBX1	gene “T-box 1”
TGFβ3	gene “transforming growth factor, beta-3”
TP63	gene “tumor protein p63”
USP	Universidade de São Paulo
VIC	sonda marcada com o fluoróforo VIC
WDR72	gene “WD repeat domain 72”

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
g	grama
<i>g</i>	força da gravidade
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
M	molar
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
s	segundos
U	unidades
V	volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	15
2	PROPOSIÇÃO	25
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	29
3.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	31
3.2	CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA.....	31
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.4	ANÁLISE MOLECULAR.....	33
3.4.1	Sequenciamento direto do gene AMELX	33
3.4.2	Genotipagem de SNPs no gene ENAM.....	40
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4	RESULTADOS	49
4.1	RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DIRETO DO GENE AMELX	51
4.2	RESULTADOS DA GENOTIPAGEM DOS SNPS NO GENE ENAM	54
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICES	81
	ANEXOS	101

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

A fissura labiopalatina (FLP) é uma alteração congênita que resulta da deficiência ou falta de nivelamento dos processos faciais e/ou palatinos, durante o período embrionário (4^a à 8^a semana de vida intrauterina) e início do período fetal (9^a à 12^a semana de vida intrauterina). Das malformações craniofaciais que envolvem a face e a cavidade bucal, as FLP representam as mais comuns. A etiologia é controversa sendo possivelmente determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais (teoria multifatorial). A prevalência é variável de acordo com a raça, sendo a amarela a mais atingida (1 a cada 440 nascimentos), seguida pela branca (1 a cada 650 nascimentos) e negra (1 a cada 2 mil nascimentos). As fissuras podem apresentar diversos graus de gravidade, envolvendo total ou parcialmente o lábio, rebordo alveolar e palato, sendo que nem sempre se manifestam isoladamente: 5 a 10% dos casos podem fazer parte de um complexo de outras malformações que constituem as síndromes (FREITAS et al., 2012).

A FLP é conhecida clinicamente pela sua diversidade, que acarreta comprometimentos de gravidades diferentes e, de certa forma, com protocolos distintos de tratamento. Os indivíduos com FLP, além de grave problema estético, apresentam distúrbios funcionais severos, de forma que se não for tratada adequadamente, poderá causar também problemas de ordem psicológica ao indivíduo. De um modo geral, o tratamento das anomalias craniofaciais é uma reabilitação altamente especializada e inicia-se precocemente, envolvendo inúmeras especialidades médicas, odontológicas e afins. A reabilitação é um conjunto de ações de atenção à saúde e, portanto, um componente imprescindível da promoção, prevenção e assistência às pessoas, na manifestação de sua saúde e bem-estar. A reabilitação tem como objetivo não só capacitar os indivíduos com FLP para sua integração na sociedade, mas propiciar sua inclusão social. A reabilitação envolve a ação de uma equipe interdisciplinar definida como a interação de várias disciplinas, numa relação de reciprocidade, mutualidade e diálogo. Nessa relação, a colaboração entre as diversas áreas é fundamental (FREITAS et al., 2012).

Atualmente sabe-se que vários genes estão envolvidos no desenvolvimento craniofacial, tais como TBX1, PVRL1, MID1, RUNX2, TP63, TGFβ3, MSX1, MYH9 e

JAG2, e polimorfismos nesses genes podem estar associados à FLP isolada (PARANAÍBA et al., 2013).

Alguns autores acreditam que parte da dificuldade encontrada nos estudos genéticos das FLP pode ser atribuída à falta de uma definição mais detalhada do fenótipo. A classificação precisa dos indivíduos afetados torna-se crucial quando se trata de um traço genético complexo, em que o fenótipo pode ser altamente variável. Inúmeras evidências sugerem que o fenótipo das FLP pode ser muito mais complexo do que se presume, podendo apresentar diversas combinações em relação ao lado afetado e extensão da fissura, ou ainda ser caracterizado por uma variedade de marcadores subclínicos associados. Dados epidemiológicos sugerem que indivíduos com FLP apresentam maior prevalência de cárie e anomalias dentárias, principalmente aquelas relacionadas à estrutura do esmalte dentário, quando comparados a indivíduos sem FLP (PEGELOW; ALQADI; KARSTEN, 2012; RUIZ et al., 2013; SHASHNI et al., 2015), sugerindo que a presença de anomalias dentárias em indivíduos com FLP poderia representar um marcador clínico adicional, implicando uma etiologia genética comum entre as duas condições (ADAMS; NISWANDER, 1967; SCHROEDER; GREEN, 1975; LARSON; HELLQUIST; JAKOBSSON, 1998; EERENS et al., 2001; STAHL; GRABOWSKI; WIGGER, 2006; PAVLIC et al., 2011).

As malformações dentárias (MD) podem afetar o esmalte em diversos graus de intensidade. A forma menos intensa consiste em coroas de forma normal, mas com esmalte de pobre qualidade, friável, áspero e com alterações de coloração (WRIGHT et al., 1995). Os dentes apresentam coloração amarelo-castanho a castanho escura, como resultado da translucidez do esmalte remanescente e da absorção de pigmentos pela dentina exposta. Devido a uma intensa atividade odontoblástica, causada por estímulos diretos sobre a dentina exposta, os canais radiculares e a câmara pulpar aparecem parcialmente obliterados e o dente pode desenvolver hipersensibilidade, particularmente a variações térmicas (FERRARIS; MUÑOZ, 2006).

O esmalte dentário é um tecido incomum que, uma vez formado, não sofre remodelação como outros tecidos duros. Por causa da natureza não remodeladora, alterações durante a formação são permanentemente registradas na superfície dentária sendo denominadas de defeitos de esmalte (HOFFMANN; SOUSA;

CYPRIANO, 2007). Os defeitos estruturais do esmalte são desvios da aparência normal resultantes da disfunção de constituintes do órgão do esmalte, em particular das células formadoras, ou seja, os ameloblastos. Assim sendo, o aparecimento desses defeitos está relacionado a distúrbios da amelogênese e é frequentemente diagnosticado nas dentições decídua e permanente (FERRARIS; MUÑOZ, 2006). Existe uma grande variedade de defeitos de esmalte e, durante muitos anos, diversas classificações e índices foram propostos para qualificar e quantificar o problema (MALANCZUK; OPITZ; RETZLAFF, 1999; BROADBENT; THOMSON; WILLIAMS, 2005; MACIEL; COSTA; GOMIDE, 2005; STEPHANOPOULOS; GAREFALAKI; LYROUDIA, 2005; SCHLUTER et al., 2008).

Os defeitos de esmalte são originados por distúrbios durante a formação dos dentes, provocando um desenvolvimento alterado da matriz orgânica ou da calcificação (FERRARIS; MUÑOZ, 2006). Esses defeitos podem estar localizados em um único dente, vários dentes ou afetar a dentição toda e, dependendo da intensidade do agente causador, podem variar em gravidade de um defeito moderado a uma falha completa na formação do esmalte. A agressão metabólica, quando suficientemente severa e prolongada, pode causar defeitos na quantidade, forma, qualidade ou cor do esmalte e as múltiplas agressões aos ameloblastos durante o estágio de amelogênese poderiam proporcionar a presença de mais de um defeito na mesma superfície dentária (FERRARIS; MUÑOZ, 2006).

De acordo com os índices, quase todos os defeitos de esmalte podem ser classificados tomando-se por base a aparência macroscópica, em duas principais categorias: hipoplasia e hipomineralização do esmalte. Enquanto a hipoplasia de esmalte é considerada um defeito quantitativo, a hipomineralização é um defeito qualitativo, identificado no exame clínico como anormalidade na translucidez do esmalte, também denominado de opacidade (FERRARIS; MUÑOZ, 2006).

A hipoplasia de esmalte é produzida por uma interrupção na formação da matriz orgânica do esmalte, resultando em uma matriz deficiente na fase de secreção da amelogênese (FERRARIS; MUÑOZ, 2006). Caracteriza-se pela formação defeituosa ou deficiente do esmalte, manifestando-se sob a forma de redução na espessura do esmalte e pode ser observada clinicamente como fossas, estrias ou ausência generalizada da superfície do esmalte, podendo resultar em aumento do desgaste, sensibilidade e comprometimento estético (BROADBENT;

THOMSON; WILLIAMS, 2005; SCHLUTER et al., 2008; HONG et al., 2009; PARAPANISIOU et al., 2009; URIBE, 2009).

Diferentemente da hipoplasia, as hipomineralizações (FERRARIS; MUÑOZ, 2006), se apresentam como uma mudança na qualidade da translucidez e podem aparecer nas colorações branca, creme, amarela ou marrom, com a superfície do esmalte intacta, e são usualmente bem demarcadas, nas formas arredondadas ou ovais. Independentemente do tipo, podem comprometer a estética (HONG et al., 2009; URIBE, 2009). Ocorrem provavelmente durante a fase de secreção da amelogênese devido a agressões menos intensas do que aquelas que causam hipoplasia, mas também podem ser resultado de qualquer distúrbio durante a longa fase de maturação na formação do esmalte (NEEDLEMAN; LEVITON; ALLRED, 1991). Um padrão comum de hipomineralização do esmalte afeta molares e incisivos, e esse defeito dentário é chamado de hipomineralização molar incisivo (MIH). Variações em genes envolvidos na formação do esmalte dentário contribuem para o aumento da incidência de MIH (JEREMIAS et al., 2013).

Sabe-se que a formação do esmalte dentário pode ser dividida em três estágios: (I) formação da matriz, no qual as proteínas da amelogênese são envolvidas; (II) calcificação, no qual é depositado mineral, e a maior parte das proteínas originais é removida; e (III) maturação, na qual o esmalte recém mineralizado sofre processo final de calcificação, e as proteínas ainda remanescentes são removidas. Esses processos acontecem sob influência genética e ambiental, desta forma, o desenvolvimento de defeitos de esmalte pode resultar de qualquer dano ocorrido nesses estágios. Geralmente é aceito que os distúrbios que ocorrem durante os primeiros estágios de desenvolvimento do esmalte resultam em hipoplasia. Em contraste, distúrbios ocorridos durante os estágios da calcificação e maturação podem levar às deficiências na mineralização e geralmente se manifestam como hipomineralização do esmalte (HOFFMANN; SOUSA; CYPRIANO, 2007).

O desenvolvimento do esmalte envolve a expressão de múltiplos genes necessários para controlar o complexo processo de mineralização. Mutações nos genes de proteínas e proteases do esmalte são associadas à MD (HU et al., 2005; STEPHANOPOULOS; GAREFALAKI; LYROUDIA, 2005; BARTLETT et al., 2006; HU; SIMMER, 2007; KAPADIA; MUES; D'SOUZA, 2007; WRIGHT et al., 2009;

SAWADA et al., 2011; WRIGHT et al., 2011). De acordo com a literatura, os principais genes envolvidos na formação do esmalte dentário são: amelogenina ligado ao X (AMELX), enamelina (ENAM), ameloblastina (AMBN), metaloprotease da matriz-20 (MMP-20) e calicreína-4 (KLK-4) (STEPHANOPOULOS; GAREFALAKI; LYROUDIA, 2005; WRIGHT et al., 2009; WRIGHT et al., 2011). Recentes análises genéticas têm identificado mutações em FAM83H (KIM et al., 2008), WDR72 (EL-SAYED et al., 2009; LEE et al., 2010), FAM20A (O'SULLIVAN et al., 2011; CHO et al., 2012), C4orf26 (PARRY et al., 2012), SLC24A4 (PARRY et al., 2013), LAMB3 (KIM et al., 2013; POULTER et al., 2014b; WANG et al., 2015) e ITGB6 (POULTER et al., 2014a; WANG et al., 2014).

Uma mutação é definida como qualquer alteração permanente no material genético. Pode ocorrer tanto em células de linhagem germinativa como em células somáticas, a nível dos cromossomos (mutações cromossômicas) ou dos genes (mutações gênicas). Existem diversos tipos de mutação, e também diferentes consequências de cada uma delas. Os seres humanos têm quase a mesma sequência de 3 milhões de bases de DNA (A, C, G, ou T) distribuídos entre os 23 pares de cromossomos, mas, em determinados locais, existem variações chamadas de polimorfismos. Polimorfismo é definido como qualquer alteração permanente no material genético que ocorre numa frequência maior que 1% numa determinada população. Polimorfismo de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism), frequentemente chamado de SNP, é o tipo mais comum de variação genética entre as pessoas, representada pela alteração de uma única base na sequência do DNA. SNPs ocorrem, em média, uma vez em cada 300 nucleotídeos, o que significa que existem cerca de 10 milhões de SNPs no genoma humano. Mais comumente, estas variações são encontradas no DNA entre os genes. Eles podem atuar como marcadores biológicos, ajudando na localização de genes que estão associados a doenças. Quando um SNP ocorre dentro do gene ou em uma região reguladora próxima ao gene, pode desempenhar um papel mais direto na doença por afetar a função do gene. A maioria dos SNPs não têm nenhum efeito sobre a saúde ou desenvolvimento. Algumas destas diferenças genéticas, no entanto, revelaram-se muito importantes no estudo da saúde humana. Pesquisadores descobriram SNPs que podem ajudar a prever a resposta de um indivíduo a determinadas drogas, suscetibilidade a fatores ambientais, como toxinas, e risco de desenvolvimento de

doenças específicas. SNPs também podem ser usados para controlar a herança de genes de doenças específicas em famílias. Futuros estudos são necessários para identificar SNPs associados a doenças complexas (SNPEDIA, 2013; GENETICS HOME REFERENCE, 2015).

Apesar dos defeitos na formação do esmalte dentário não compreenderem um problema de saúde pública, podem causar alterações estéticas graves, além de comprometerem as estruturas do esmalte. As formas severas podem levar à perda precoce do esmalte, causando desgaste acentuado com prejuízo da função do órgão dentário. Além disso, está bem estabelecida a relação entre os defeitos do esmalte e a cárie dentária. O esmalte menos mineralizado ou com superfície irregular pode se tornar mais suscetível ao desenvolvimento da cárie dentária (BROADBENT; THOMSON; WILLIAMS, 2005; SCHLUTER et al., 2008; HONG et al., 2009; PARAPANISIOU et al., 2009; URIBE, 2009; JEREMIAS et al., 2013; VARGAS-FERREIRA et al., 2014). A ocorrência de lesões de cárie na dentição afetada é aumentado principalmente devido às irregularidades, cavidades e sulcos causados pelos defeitos hipoplásicos que fornecem maior retenção mecânica às bactérias e, com a redução da quantidade de minerais e dureza do esmalte, a literatura mostra que há uma estreita relação entre as hipoplasias e lesões de cárie dentária (SEOW, 1997; BROADBENT; THOMSON; WILLIAMS, 2005; SCHLUTER et al., 2008; HONG et al., 2009; PARAPANISIOU et al., 2009; URIBE, 2009; OLSZOWSKI et al., 2012).

Clinicamente, as MD constituem sérios problemas para os dentistas e também para as crianças afetadas. Para os dentistas, o problema está relacionado com o rápido e inesperado desenvolvimento de cárie durante a irrupção e a dificuldade de anatomização quando o tratamento é indicado. Por outro lado, para as crianças, a experiência de dor e sensibilidade (quando o esmalte não está intacto) pode desestimular a escovação. Há também a queixa sobre a estética dos incisivos (WEERHEIJM, 2004).

Nos indivíduos com FLP, os estudos abordam alta prevalência de anomalias dentárias quando comparados à população em geral (VICHI; FRANCHI, 1995; MALANCZUK; OPITZ; RETZLAFF, 1999; CHAPPLE; NUNN, 2001; BROADBENT; THOMSON; WILLIAMS, 2005; MACIEL; COSTA; GOMIDE, 2005; SCHLUTER et al., 2008). Dentre elas, as alterações de esmalte foram encontradas com maior frequência, principalmente em incisivos centrais permanentes superiores adjacentes

às fissuras labiopalatinas (VICHÍ; FRANCHI, 1995; MALANCZUK; OPITZ; RETZLAFF, 1999; CHAPPLE; NUNN, 2001; MACIEL; COSTA; GOMIDE, 2005; RUIZ et al., 2013). Embora apareçam na dentição decídua, prevalecem na dentição permanente. Essas anomalias parecem ser determinadas embriologicamente, ocorrendo em fases diferentes do desenvolvimento dentário. Relatos na literatura mostram que indivíduos com FLP apresentam defeitos na formação do esmalte dentário e a sua intensidade parece depender da severidade da fissura (MALANCZUK; OPITZ; RETZLAFF, 1999; CHAPPLE; NUNN, 2001; MACIEL; COSTA; GOMIDE, 2005).

Acredita-se que a causa das alterações dentárias possa ser uma desordem genética em conexão com doenças específicas e não-específicas durante a odontogênese com o metabolismo mineral, principalmente o metabolismo do fosfato de cálcio. Alguns pesquisadores (LAGARDE; KEREBEL; AJACQUES, 1987; VICHÍ; FRANCHI, 1995; MALANCZUK; OPITZ; RETZLAFF, 1999; MACIEL; COSTA; GOMIDE, 2005; RUIZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014a) sugerem que a FLP está relacionada com a presença das alterações no esmalte, existindo uma relação direta entre aparecimento do defeito e a presença da fissura. Considerando que as MD podem estar relacionadas a diferentes mutações localizadas nos diversos genes envolvidos na formação do esmalte dentário, a investigação dos genes que transcrevem as principais proteínas e proteases do esmalte torna-se essencial para uma melhor compreensão dessas alterações. De acordo com a literatura, o AMELX e o ENAM são os principais genes responsáveis pela mineralização e formação dos cristais do esmalte (WRIGHT et al., 2009). Desta forma, é de grande importância o estudo destes genes em indivíduos com fissuras labiopalatinas.

2 PROPOSIÇÃO

O propósito deste trabalho foi investigar a ocorrência de mutações e polimorfismos/SNPs nos genes AMELX e ENAM, candidatos aos defeitos na formação do esmalte dentário, em indivíduos com fissura labiopalatina e associar o genótipo-fenótipo dos indivíduos com fissura labiopalatina e malformação dentária, comparando os resultados aos indivíduos sem fissura labiopalatina com e sem malformação dentária.

3 Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

Seguindo princípios éticos e jurídicos, a realização deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - Universidade de São Paulo (HRAC/USP) - CAAE: 00911012.3.0000.5441 – parecer nº 179.410 (Anexo A). Os pais ou responsáveis pelos indivíduos foram consultados e esclarecidos a respeito da pesquisa e em seguida foram convidados e orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

3.2 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Foram selecionados indivíduos de 6 a 15 anos de idade, de ambos os sexos, com e sem FLP, com e sem MD nos dentes incisivos centrais superiores permanentes, regularmente matriculados no HRAC/USP e na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP (FOB/USP). As MD variaram de hipomineralização a hipoplasia do esmalte. Indivíduos síndrômicos, com malformações associadas ou amelogenese imperfeita, e indivíduos com restaurações, aparelho ou acessório ortodôntico e fluorose sobre as superfícies dentárias dos dentes avaliados, foram excluídos da pesquisa.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram selecionados 80 indivíduos com FLP transforame incisivo unilateral ou bilateral isolada e 85 indivíduos sem FLP. A amostra foi dividida nos seguintes grupos:

- Grupo 1 - 46 indivíduos com FLP e MD (Figura 1);
- Grupo 2 - 34 indivíduos com FLP sem MD (Figura 2);

- Grupo 3 - 34 indivíduos sem FLP e com MD (Figura 3);
- Grupo 4 - 51 indivíduos sem FLP e sem MD - Grupo Controle (Figura 4).

Figura 1 - Indivíduo com FLP transforame incisivo bilateral apresentando MD

Figura 2 - Indivíduo com FLP transforame incisivo unilateral sem MD

Figura 3 - Indivíduo sem FLP apresentando MD

Figura 4 - Indivíduo sem FLP e MD

3.4 ANÁLISE MOLECULAR

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório das Disciplinas de Farmacologia e de Fundamentos de Genética, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP.

- **Coleta de saliva**

Amostras de saliva não estimulada dos indivíduos selecionados foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL, graduados e estéreis, devidamente identificados. Os indivíduos foram orientados a expectorar 10 mL de saliva de forma natural, sem estimulação. Essas amostras foram acondicionadas em gelo e em seguida armazenadas em freezer -20°C, no Laboratório da Disciplina de Farmacologia, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP, até o momento da extração do DNA.

3.4.1 Sequenciamento direto do gene AMELX

- **Extração de DNA genômico das amostras de saliva**

Os tubos contendo as amostras de saliva foram descongelados em temperatura ambiente e homogeneizados em agitador de soluções (Phoenix AP56, Brasil).

A extração de DNA das amostras de saliva foi realizada com QIAamp DNA Mini Kit (51306, Qiagen, Alemanha) conforme recomendações do fabricante. Apenas parte das amostras de DNA obteve boa concentração e pureza ao final da extração, assim, as amostras que não apresentaram rendimento adequado foram submetidas à nova extração com a utilização do protocolo do acetato de amônio, descrito a seguir:

1. Descongelar a saliva total e centrifugar a 10.000 g por 5 minutos;
2. Descartar sobrenadante;
3. Ressuspender o pellet em 1 mL de tampão de extração [10 mM Tris-HCl; pH 7.8; 5 mM EDTA; 0,55% SDS];

4. Adicionar 5 μ L de proteinase K (0,02 g/mL);
5. Agitar no vórtex;
6. Incubar em banho-maria a 56°C overnight;
7. Centrifugar rapidamente;
8. Adicionar 500 μ L de solução de acetato de amônio a 10 M;
9. Agitar manualmente por 3 minutos;
10. Centrifugar a 10.000 *g* por 15 minutos em temperatura ambiente;
11. Transferir com cuidado 500 μ L do sobrenadante para um novo tubo;
12. Adicionar 540 μ L de álcool isopropílico gelado;
13. Agitar em vórtex por 15 segundos;
14. Descansar na geladeira por 2 horas. Pode descansar overnight;
15. Centrifugar a 10.000 *g* por 20 minutos em temperatura ambiente;
16. Descartar o sobrenadante com cuidado para não deslocar o pellet;
17. Adicionar 1 mL de álcool 70% gelado;
18. Centrifugar por 5 minutos 10.000 *g* por 5 minutos em temperatura ambiente;
19. Descartar o sobrenadante com cuidado;
20. Deixar o tubo aberto para evaporar o excesso de álcool por 4 ou 5 horas;
21. Ressuspender o pellet em 50 μ L de água deionizada autoclavada (ou água Milli-Q);
22. Congelar a amostra de DNA em freezer -20°C.

• **Quantificação do DNA genômico**

Essa etapa teve por objetivo quantificar e verificar a qualidade do DNA extraído. O aparelho utilizado foi um espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific, Estados Unidos), o qual fornece os dados de absorbância em 230 nm, 260 nm e 280 nm após o carregamento de 2 μ L de amostra sem diluição. Este aparelho

emite luz nos comprimentos de onda citados e, ao mesmo tempo, detecta o quanto dessa luz foi absorvida pela amostra. No caso do DNA, há absorção da luz no comprimento de 260 nm e o cálculo utilizado para a quantificação desse DNA foi: $[\text{DNA}] = \text{Absorbância em 260 nm} \times \text{fator de diluição} \times 50$ (constante para o DNA).

De posse desses dados, o mesmo aparelho indicou a quantidade e a qualidade do DNA que foi usado no estudo. A qualidade foi expressa de acordo com a razão entre a absorbância em 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) a qual deve estar entre 1,9 e 2,1.

- **Diluição das amostras de DNA**

A solução estoque de DNA foi padronizada em 50 ng/ μL e a quantidade inicial de DNA para PCR em 500 ng. Após a adequada diluição de cada amostra, estas foram armazenadas em freezer -20°C para serem utilizadas ao longo do estudo.

- **Reação em cadeia da polimerase**

A triagem de mutação no gene AMELX foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida do sequenciamento direto das regiões codificadoras, incluindo as regiões de splicing.

Os primers forward e reverse necessários para a realização da PCR dos éxons codificadores de proteínas do gene AMELX foram desenhados com base em sequências publicadas no Ensembl (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2010), utilizando-se o programa Primer3 (ROZEN; SKALETISKY, 2000). Cada primer foi desenhado de maneira a flanquear o éxon antes do seu início. A confirmação da especificidade dos primers desenhados foi realizada por meio de consulta na base de dados BLAST (NCBI, 2011a) e a presença de hairpins, self dimers e cross dimers foi realizada por meio de consulta ao programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

As sequências dos primers forward e reverse do gene AMELX, assim como as condições da PCR estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos primers forward e reverse dos éxons 2, 3, 4-5, 6 e 7 do gene AMELX e condições da PCR

Éxon	Primer (5' – 3')	pb	TA
2	F: AGATTATGTGTGTTTTATGGAGCA	233	62°C
	R: CCCTAATTCACCAACTATGAGC		
3	F: TCCTTTAATGTGAACAATTGCAT	250	57°C
	R: TCTGGGATAAAGAATCAACACA		
4-5	F: TGAAGAATGTGTGTGATGGATG	367	60°C
	R: TCCCATTAATGTCTGCATGTG		
6	F: CCATAATGGCAAAGAAAACAC	599	59°C
	R: TGGTTGTCTGGAGACCTTAGAA		
7	F: TGACAAAAGTGAAGCCAGACAT	237	61°C
	R: TGCATTTTATTGTCTGCTAATGG		

F= primer forward; R= primer reverse; pb= pares de bases; TA= temperatura de anelamento.

Cada éxon codificador de proteína do gene proposto foi amplificado pela técnica de PCR utilizando kit para PCR (Taq DNA polymerase 11615-010, Invitrogen, Estados Unidos) em um volume final de 50 µL, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Esquema contendo os reagentes, as concentrações e as quantidades utilizadas para PCR

Produto	Volume utilizado	Concentração final
Tampão Tris-HCl (10 X)	5,0 µL	1 X
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µL	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	1,0 µL	0,2 mM
Primers F+R 10 mM	2,0 µL	0,4 µM
Taq DNA Polimerase (1 U/µL)	0,5 µL	0,5 U
DNA molde (50 ng/µL)	10,0 µL	500 ng
Água livre de DNAase e RNAase	30,0 µL	

O processo de ciclagem térmica, realizado em termociclador (Veriti, Applied Biosystems, Estados Unidos) está esquematizado a seguir:

4 minutos - 95°C	} 45 X
30 segundos - 95°C	
30 segundos - TA ideal do par de primers	
1 minuto - 72°C	
7 minutos - 72°C	
∞ - 4°C	

- **Eletroforese em gel de agarose**

Para a confirmação da amplificação dos fragmentos desejados dos éxons do gene AMELX, foram utilizados 10 µL do produto da PCR de todas as amostras, misturados ao tampão da amostra (azul de bromofenol 0,025% em sacarose 4%) e corridos em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,64 µg/mL). A eletroforese foi realizada em cuba para sistema horizontal de eletroforese (LCH 12x14, Loccus Biotecnologia, Brasil) alimentada por fonte de eletroforese (LPS 300 V, Loccus Biotecnologia, Brasil) nas seguintes condições: 110 V por 90 minutos.

Foram considerados amplificados os produtos das amostras que apresentaram sinal positivo de bandas de tamanho esperado, observadas quando da exposição do gel em luz ultravioleta, pela comparação com um marcador de peso molecular de acordo com o gene estudado (Tabela 1).

- **Purificação dos produtos de PCR**

Os produtos da PCR foram purificados com kit de purificação AP-PCR 250 (013387, Axygen, EUA) conforme recomendações do fabricante. Este protocolo de purificação rende cerca de 150 µL de produto de PCR purificado. Após a purificação, foi realizada novamente a quantificação das amostras pela leitura em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Cada produto de PCR purificado foi adequadamente diluído para uma concentração final de 2 ng/µL.

- **Reação de sequenciamento**

A quantidade de DNA purificado utilizada na reação de sequenciamento variou de acordo com o tamanho do fragmento a ser sequenciado, descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Quantidade de DNA purificado a ser utilizada na reação de sequenciamento

Tamanho do fragmento	Quantidade de amostra
100 - 200 pb	1 - 3 ng
200 - 500 pb	3 - 10 ng
500 - 1000 pb	5 - 20 ng
1000 - 2000 pb	10 - 40 ng
> 2000 pb	40 - 100 ng
DNA fita simples	50 - 100 ng
DNA fita dupla	200 - 500 ng
DNA genômico bacteriano	2 - 3 µg

pb= pares de bases.

Após a purificação e adequada diluição dos produtos da PCR, foi realizada a reação de sequenciamento utilizando o produto BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (4336917, Applied Biosystems, Estados Unidos) descrita na Tabela 4 e realizada em termociclador (Veriti, Applied Biosystems, Estados Unidos), nos seguintes moldes:

1 minuto - 96°C	} 25 X
15 segundos - 96°C	
15 segundos - 50°C	
4 minutos - 60°C	
∞ - 4°C	

Tabela 4 - Esquema contendo os reagentes e o volume utilizado para reação de sequenciamento

Reagentes	Quantidade para uma reação
BigDye® Terminator v3.1 Cycle	2,0 µL
BigDye® Terminator v1.1, 3.1 Sequencing Buffer	3,0 µL
Primer a 3,2 µM (F ou R)	1,0 µL
Água ultrapura	10 µL
Produto PCR purificado (2 ng/µL)	4,0 µL
Volume Final	20 µL

• Precipitação da reação de sequenciamento

Imediatamente após o término da reação de sequenciamento, iniciou-se a precipitação da mesma. O protocolo de precipitação da reação de sequenciamento utilizado foi Etanol/EDTA/Acetato de Sódio.

Em seguida as amostras foram submetidas ao sequenciamento no sequenciador da Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (4352715, Applied Biosystems, Estados Unidos). Acoplado ao sequenciador, existe o Software Data Collection® (Applied Biosystems, Estados Unidos), programa que gera os resultados referentes à corrida (o eletroferograma) e estes, por sua vez, podem ser visualizados em outro programa, o Software Sequencing Analysis® 5.3.1 (Applied Biosystems, Estados Unidos) (Figura 5).

Figura 5 - Eletroferograma resultado do sequenciamento do éxon 2 do gene AMELX

Após a visualização dos eletroferogramas, as sequências obtidas foram analisadas no Software SeqScape® 2.6 (Applied Biosystems, Estados Unidos) (Figura 6).

Figura 6 - Análise das sequências obtidas no Software SeqScape® 2.6

Cada mutação identificada no sequenciamento foi confirmada repetindo-se a reação de sequenciamento de um novo produto de PCR. Para descrição das mutações foi utilizado o sistema de nomenclatura de den Dunnen e Antonarakis (2000). Uma mutação foi considerada patogênica quando a mesma interrompeu a tradução da proteína (mutações que introduzem códon de parada prematura e mutações que deslocam a matriz de leitura); alterou bases conservadas do sítio de splicing, ou quando segregou com o fenótipo na família e não foi encontrada em controle normal. Para localizar as variações encontradas, as bases foram numeradas a partir da primeira metionina (ATG) da proteína resultante deste gene.

Para verificar se as alterações encontradas representavam polimorfismos, foi realizada busca nos sites do BLAST (NCBI, 2011a) e do dbSNP (NCBI, 2011b). Para avaliar o efeito potencial de uma mutação no genoma, na transcrição e/ou na tradução, foram utilizados programas específicos como o Ensembl (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2010).

3.4.2 Genotipagem de SNPs no gene ENAM

- **Triagem dos SNPs rs7671281, rs2609428, rs3796705, rs3796703, rs3796704 e rs35951442 no gene ENAM**

Para a discriminação dos diferentes genótipos do gene em estudo, foi utilizado o sistema Taqman[®] no termociclador ViiA 7 (Applied Biosystems[®], Estados Unidos).

Para a determinação dos genótipos dos SNPs rs3796703, rs3796704, rs3796705, rs7671281, rs2609428, rs35951442 no gene ENAM, foram utilizados ensaios produzidos e validados pela empresa Applied Biosystems[®], com os seguintes números de catálogos, respectivamente: C__27517802_10, C__25766207_10, C__27488875_10, C__25763290_10, C__16047590_30, C__15929426_10.

A seleção dos ensaios levou em conta a localização no gene (regiões exônicas), o tipo de mutação (missense) e a frequência dentro da população americana.

Os ensaios consistiram na presença de quatro oligonucleotídeos: o primer forward, da posição 5' para posição 3' do DNA; o primer reverse, da posição 3' para posição 5' do DNA; e duas sondas, também da posição 5' para posição 3' do DNA.

Os primers forward e reverse flanquearam a região do DNA que possuía o polimorfismo e foi amplificada por meio da técnica de PCR. As sondas anelaram exatamente na região do polimorfismo. A diferença foi que uma delas possuía as sequências de bases corretas e foi marcada com o fluoróforo VIC. Neste caso, a outra sonda marcada com o fluoróforo FAM, possuía praticamente a mesma sequência de bases, exceto uma que caracterizava o polimorfismo. Neste caso, após o término do experimento, pode-se ter a amplificação somente de fragmentos de DNA marcados com a sonda VIC, o que assinala que o sujeito é homozigoto ancestral para o determinado gene. Foi realizada também a amplificação de fragmentos de DNA somente marcados com a sonda FAM que caracteriza o sujeito como homozigoto mutado (ou polimórfico) e, por fim, houve a possibilidade da amplificação de fragmentos de DNA de ambas as sondas, o que indica um sujeito heterozigoto. As características dos SNPs estudados estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Características dos SNPs do gene ENAM estudados para identificação dos genótipos

Ensaio	Base nitrogenada	Sonda	Alelo
rs7671281	C	VIC	ancestral
	T	FAM	mutado
rs2609428	C	VIC	mutado
	T	FAM	ancestral
rs3796705	A	VIC	ancestral
	G	FAM	mutado
rs3796703	C	VIC	ancestral
	T	FAM	mutado
rs3796704	A	VIC	mutado
	G	FAM	ancestral
rs35951442	C	VIC	ancestral
	T	FAM	mutado

Para a realização das reações de discriminação dos genótipos do gene em estudo, além dos ensaios supracitados, foram utilizadas as amostras de DNA devidamente quantificadas e qualificadas e o reagente denominado TaqMan® Genotyping Master Mix (4381656, Applied Biosystems®, Estados Unidos), o qual

contém todos os reagentes necessários para a reação, dentre os quais, a Taq DNA polimerase, o cloreto de magnésio e as bases nitrogenadas. Na Tabela 6 é possível observar a composição básica da mistura de reagentes necessária para as reações de discriminação alélica. Vale destacar que todos os ensaios foram feitos em duplicata.

Tabela 6 - Composição básica de reagentes para uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genótipos

Reagentes	Quantidade em μL para uma reação
Amostra de DNA (10 ng/ μL)	1 μL
TaqMan [®] Genotyping Master Mix	2,5 μL
Ensaio inventariado 20 X	0,25 μL
Água ultrapura	1,25 μL
Volume final	5 μL

Após a confecção dos ensaios na placa de 384 poços (4343370, Applied Biosystems[®], Estados Unidos), essa mesma placa foi colocada no aparelho Viia 7 (Applied Biosystems[®], Estados Unidos) e as condições de ciclagem que foram utilizadas para a realização da PCR foram: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

• Experimentos

Foi realizada a lavagem de todas as amostras de saliva com soro fisiológico para se retirar as impurezas que poderiam estar interferindo negativamente na qualidade do DNA. As amostras lavadas foram ressuspensas em PBS 1 X. Após a lavagem, foi realizada nova extração de DNA de todas as amostras de saliva com o QIAamp DNA mini kit para se obter novas amostras de DNA. Imediatamente após a extração, foi realizada a quantificação das amostras de DNA no espectrofotômetro.

Primeiramente foi realizado um piloto com 12 amostras (imediatamente após a extração) utilizando o ensaio do gene eNOS padronizado no laboratório. Foram utilizados 7,5 μL de Master Mix, 0,37 μL de primers + sondas, 2,13 μL de água ultrapura e 5 μL de amostra de DNA (puro), sendo o volume final de 15 μL . As 12

amostras estavam com a concentração baixa (entre 1 e 15 ng/ μ L) e o resultado do ensaio foi satisfatório, com 100% de aproveitamento.

Após o experimento piloto, deu-se início à triagem dos SNPs no gene ENAM. Todas as amostras remanescentes primeiramente foram submetidas à genotipagem dos SNPs rs3796705 e rs35951442. Foram utilizados 2,5 μ L de Master Mix, 0,125 μ L de primers + sondas e 2,38 μ L de amostra de DNA (puro), sendo o volume final de 5 μ L. O aproveitamento da genotipagem do ensaio rs3796705 foi de 29% e do ensaio rs35951442 foi de 19%. Logo após, foi realizado o experimento do ensaio rs3796703. Foram utilizados 5,5 μ L de Master Mix, 0,275 μ L de primers + sondas e 5 μ L de amostra de DNA (puro), sendo o volume final de 11 μ L. O aproveitamento desse ensaio foi de 48%. Devido ao baixo aproveitamento dos três ensaios realizados, foi lançada a hipótese de que as amostras de DNA estivessem degradadas e novos experimentos pilotos deveriam ser realizados.

Como apenas no experimento piloto com o gene eNOS o aproveitamento foi satisfatório, decidiu-se testar os seis ensaios do gene ENAM e o ensaio do gene eNOS com duas amostras descongeladas e duas amostras frescas. Foram utilizados 2,5 μ L de Master Mix, 0,25 μ L de primers + sondas, 1,25 μ L de água ultrapura e 1 μ L de amostra de DNA (puro), sendo o volume final de 5 μ L. O aproveitamento foi de 50% para as amostras frescas e 100% para as amostras descongeladas, o que provou que todos os ensaios estavam funcionando devidamente.

Foi realizado então um novo piloto para testar seis amostras descongeladas e duas amostras frescas com os ensaios rs3796704, rs7671281, rs2609428 e eNOS. Foram utilizados 2,5 μ L de Master Mix, 0,25 μ L de primers + sondas, 1,25 μ L de água ultrapura e 1 μ L de amostra de DNA (puro), sendo o volume final de 5 μ L. O aproveitamento foi de 100% para as amostras frescas e 58% para as amostras descongeladas, o que provou que o problema poderia estar na qualidade das amostras descongeladas.

Após esse período de experimentos piloto, decidiu-se mudar a estratégia para se conseguir um bom aproveitamento. Foram utilizadas amostras de DNA extraídas com o InstaGene (sem a adição de proteinase K e SDS), congeladas por mais de três anos. Foi realizada uma purificação dessas amostras com o QIAamp DNA mini kit para ver se as amostras antigas extraídas com o InstaGene, após a purificação, estariam boas o suficiente para serem submetidas à genotipagem.

Testaram-se oito amostras purificadas e as mesmas não purificadas, com o ensaio rs7671281 e o eNOS. O resultado foi negativo para ambas as amostras significando que tanto as amostras de três anos descongeladas e as mesmas purificadas não estavam com boa qualidade para serem genotipadas.

Tentou-se por último a genotipagem do ensaio rs2609281 das amostras extraídas com QIAamp DNA mini kit. Foram utilizados 1,5 µL de Master Mix, 0,075 µL de primers + sondas, 0,425 µL de água ultrapura e 1 µL de amostra de DNA (puro), sendo o volume final de 3 µL. O aproveitamento foi de 9% sendo que a amplificação dos fluoróforos conjugados às sondas foi inferior comparada à fluorescência do fluoróforos ROX (fluorescência de referência das reações de PCR).

Exemplos dos resultados satisfatórios estão representados na Figura 7 enquanto dos não satisfatórios estão representados na Figura 8. A Figura 9 representa um indivíduo heterozigoto para a mutação.

Figura 7 - Resultado da genotipagem de uma amostra do SNP rs3796703 representando um resultado satisfatório, onde houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com o fluoróforo VIC, caracterizando um indivíduo homozigoto ancestral

Figura 8 - Resultado da genotipagem de uma amostra do SNP rs3796705 representando um resultado insatisfatório, onde não houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com as sondas marcadas com os fluoróforos VIC ou FAM

Figura 9 - Resultado da genotipagem de uma amostra do SNP rs3796704 representando um resultado satisfatório, onde houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com os fluoróforos VIC e FAM, caracterizando um indivíduo heterozigoto

Após realizados todos os experimentos supracitados utilizando amostras de DNA extraídas com o QIAamp DNA mini kit e o InstaGene, observou-se um baixo aproveitamento.

Decidiu-se então testar um novo kit nunca utilizado anteriormente no laboratório, para a extração de DNA das amostras, o kit MagMAX™ - 96 DNA Multi-Sample Kit (4413022, Ambion, Estados Unidos).

O kit MagMAX™ foi projetado para purificação rápida de DNA genômico de alta qualidade a partir de uma variedade de tipos de amostras, incluindo sangue, tecido, caudas do rato, swab bucais, cremes leucocitários e células cultivadas. Este kit de purificação usa tecnologia magnética de isolamento de ácido nucléico a base de beads para produzir altos rendimentos de DNA altamente puro, livre de nucleases, proteínas e outros inibidores que podem afetar reações enzimáticas a jusante.

Primeiramente, foi realizada a extração de DNA de 96 amostras de saliva (92 congeladas e 4 frescas) utilizando o kit MagMAX™ conforme recomendações do fabricante. Para esse experimento, foi utilizado 2,5 µL de Master Mix, 0,25 µL de primers + sondas, 0,25 µL de água ultrapura e 2 µL de amostra de DNA (puro), sendo o volume final de 5 µL. Imediatamente após a extração, foi realizada a quantificação das amostras de DNA no espectrofotômetro, e o resultado foi muito satisfatório, sendo que a maioria das amostras estavam com a razão 260/280nm entre 1,7 e 2,1 e concentração de 5 a 25 ng/µL. Houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com os fluoróforos VIC e/ou FAM em 100% das amostras descongeladas e frescas da genotipagem do SNP rs35951442 e de 91% das amostras descongeladas e 100% das amostras frescas do SNP rs7671281 (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Representação do resultado muito satisfatório da genotipagem do SNP rs35951442 onde houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com o fluoróforo VIC, caracterizando um indivíduo homozigoto ancestral

Figura 11 - Representação do resultado muito satisfatório da genotipagem do SNP rs35951442 onde houve a amplificação de fragmentos de DNA conjugados com a sonda marcada com os fluoróforos VIC e FAM, caracterizando um indivíduo heterozigoto

Em seguida, foi realizada a extração de DNA das amostras de saliva remanescentes com a utilização do Kit MagMAX™ e as amostras de DNA foram submetidas à genotipagem dos seis diferentes ensaios. A repetição foi realizada quando necessário para confirmação do resultado.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados do sequenciamento direto do gene AMELX foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Para a análise estatística dos resultados da genotipagem dos SNPs no gene ENAM foi utilizado o Teste Exato de Fisher e o Teste do Qui-quadrado de Pearson (X^2). Foi adotado nível de significância de 5% para que as diferenças pudessem ser consideradas estatisticamente significativas. As análises foram realizadas no programa STATISTICA (versão 11.0, StatSoft Inc., Tulsa, USA).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DIRETO DO GENE AMELX

Dos 165 indivíduos divididos nos quatro grupos: Grupo 1 - com FLP e MD, n=46; Grupo 2 - com FLP sem MD, n=34; Grupo 3: sem FLP com MD, n=34; Grupo 4: sem FLP e MD, n=51; mutações foram encontradas em 30,4% (n=14) no Grupo 1, 35,3% (n=12) no Grupo 2, 11,8% (n=4) no Grupo 3 e 13,7% (n=7) no Grupo 4. Quando os grupos com FLP (Grupos 1 e 2 - 65,7%) foram comparados aos grupos sem FLP (Grupos 3 e 4 - 25,5%), observou-se um aumento significativo na frequência de mutações nos grupos com FLP ($p=0,003$). Trinta e sete mutações foram detectadas e distribuídas ao longo dos éxons 2 (1 mutação - 2,7%), 6 (30 mutações - 81,08%) e 7 (6 mutações - 16,22%) do gene AMELX. Não foram encontradas mutações nos éxons 3, 4 e 5. Em relação às 30 mutações encontradas no éxon 6, 43,34% (n=13), 23,33% (n=7), 13,33% (n=4) e 20% (n=6) foram encontrados nos Grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A mutação c.261C>T (rs2106416) foi detectada em 26 indivíduos (sendo 13 no Grupo 1, 6 no Grupo 2, 3 no Grupo 3 e 4 no Grupo 4) e significativamente mais encontrada ($p=0,003$) nos indivíduos com FLP (Grupos 1 e 2 - 23,75%), em comparação com aqueles sem FLP (Grupos 3 e 4 - 8,23%). Nos grupos sem MD (grupos 2 e 4), esse polimorfismo também foi encontrado de forma mais significativa ($p=0,032$) entre os indivíduos com FLP (Grupo 2 - 17,65%), em comparação com aqueles sem FLP (Grupo 4 - 7,8%). Os resultados do sequenciamento direto dos éxons 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do gene AMELX, incluindo as regiões de splicing, podem ser visualizados no Apêndice A e estão descritos abaixo nas Tabelas 7, 8, 9 e 10, de acordo com o grupo estudado.

Tabela 7 - Resultados do sequenciamento direto do gene AMELX no Grupo 1

n	Éxon	Mutação	Eletroferograma	Aminoácido
1	2	c.34G>R (A/G) (hetero)		p.12G>R (Gly>Arg)*
7	6	c.261C>T (homo)		p.87H>H (His>His)**
6	6	c.261C>Y (C/T) (hetero)		p.87H>H (His>His)**

(14)

n= número; ()= total por grupo; **homo**= mutação homozigota; **hetero**= mutação heterozigota; *substituição do aminoácido; **SNP rs2106416.

Tabela 8 - Resultados do sequenciamento direto do gene AMELX no Grupo 2

n	Éxon	Mutação	Eletroferograma	Aminoácido
2	6	c.261C>T (homo)		p.87H>H (His>His)**
4	6	c.261C>Y (C/T) (hetero)		p.87H>H (His>His)**
1	6	c.420C>M (A/C) (hetero)		p.140P>P (Pro>Pro)

5 7 Fora do transcrito

(12)

n= número; ()= total por grupo; **homo**= mutação homozigota; **hetero**= mutação heterozigota; **SNP rs2106416.

Tabela 9 - Resultados do sequenciamento direto do gene AMELX no Grupo 3

n	Éxon	Mutação	Eletroferograma	Aminoácido
1	6	c.362A>R (A/G) (hetero)		p.121H>R (His>Arg)*
1	6	c.261C>T (homo)		p.87H>H (His>His)**
2	6	c.261C>Y (C/T) (hetero)		p.87H>H (His>His)**
(4)				

n= número; ()= total por grupo; **homo**= mutação homozigota; **hetero**= mutação heterozigota; *substituição do aminoácido; **SNP rs2106416.

Tabela 10 - Resultados do sequenciamento direto do gene AMELX no Grupo 4

n	Éxon	Mutação	Eletroferograma	Aminoácido
4	6	c.261C>Y (C/T) (hetero)		p.87H>H (His>His)**
1	6	c.482A>R (A/G) (hetero)		p.161H>R (His>Arg)*
1	6	c.245T>W (A/T) (hetero)		p.82V>E (Val>Glu)*
1	7	Fora do transcrito		
(7)				

n= número; ()= total por grupo; **homo**= mutação homozigota; **hetero**= mutação heterozigota; *substituição do aminoácido; **SNP rs2106416.

4.2 RESULTADOS DA GENOTIPAGEM DOS SNPS NO GENE ENAM

Para a genotipagem dos SNPs no gene ENAM, 147 indivíduos foram divididos nos 4 grupos: Grupo 1: com FLP e MD, n=43; Grupo 2: com FLP sem MD, n=34; Grupo 3: sem FLP com MD, n=26; Grupo 4: sem FLP e MD, n=44. O número inicial de 165 indivíduos foi reduzido para 147 indivíduos devido ao esgotamento de algumas amostras de saliva por razão das inúmeras repetições das técnicas de extração de DNA na tentativa de recuperar amostras degradadas.

O SNP rs3796703 é caracterizado pela troca do alelo C (ancestral) pelo alelo T (mutado) na posição 70643597 do cromossomo 4. Na população americana, o alelo ancestral aparece em homozigose em 99% dos genomas analisados e em heterozigose em 1%. No Grupo 1, 2% dos indivíduos são heterozigotos, ou seja, apresentam um alelo ancestral e um alelo mutado. Nos Grupos 2, 3 e 4, 100% dos indivíduos apresentam apenas o alelo ancestral.

O SNP rs3796704 é caracterizado pela troca do alelo G (ancestral) pelo alelo A (mutado) na posição 70643714 do cromossomo 4. Na população americana, o alelo ancestral aparece em homozigose em 81% dos genomas, enquanto que 18% são heterozigotos e apenas 1% apresentam ambos os alelos mutados (A/A). Nos Grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, 19%, 21%, 19% e 18% dos indivíduos são heterozigotos e 81%, 79%, 81% e 82% são homozigotos para o alelo ancestral.

O SNP rs3796705 é caracterizado pela troca do alelo A (ancestral) pelo alelo G (mutado) na posição 70643726 do cromossomo 4. Na população americana, 100% dos genomas apresentam apenas o alelo ancestral. Nos quatro grupos do nosso estudo, 100% dos indivíduos também apresentam apenas o alelo ancestral.

O SNP rs7671281 é caracterizado pela troca do alelo C (ancestral) pelo alelo T (mutado) na posição 70643369 do cromossomo 4. Na população americana, 80% dos genomas são homozigotos para o alelo mutado, 19% são heterozigotos e apenas 1% são homozigotos para o alelo ancestral. No nosso estudo 81%, 76%, 73% e 84% dos indivíduos dos Grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, apresentaram o alelo mutado em homozigose (T/T) enquanto que 19%, 24%, 27% e 16%, respectivamente apresentaram um alelo mutado e um alelo ancestral, portanto são heterozigotos.

O SNP rs2609428 é caracterizado pela troca do alelo T (ancestral) pelo alelo C (mutado) na posição 70643152 do cromossomo 4. Na população americana, 97% dos genomas analisados são homozigotos para o alelo ancestral e 3% apresentam um alelo mutado, ou seja, são heterozigotos (C/T). No Grupo 1, 100% dos indivíduos apresentaram dois alelos ancestrais (homozigoto ancestral), enquanto que 3%, 19% e 5% dos indivíduos dos Grupos 2, 3 e 4, respectivamente, apresentaram um alelo ancestral e um alelo mutado (heterozigotos) e 97%, 81% e 95%, respectivamente, apresentaram os dois alelos ancestrais. A incidência de heterozigotos no SNP rs2609428 foi maior ($p=0,006$) no grupo sem FLP com MD (Grupo 3, $n=5$ - 19,2%) do que no grupo com FLP com MD (Grupo 1, $n=0$ - 0%) assim como a prevalência dos heterozigotos/homozigotos mutados nos grupos sem FLP (Grupos 3 e 4, $n=7$ - 10%) foi maior ($p=0,028$) quando comparados com os grupos com FLP (Grupos 1 e 2, $n=1$ - 1,3%).

O SNP rs35951442 é caracterizado pela troca do alelo C (ancestral) pelo alelo T (mutado) na posição 70644703 do cromossomo 4. Na população em geral, 100% dos genomas são homozigotos para o alelo ancestral (C/C). No nosso estudo, 100% dos indivíduos dos quatro grupos estudados são também homozigotos para o alelo ancestral.

Os valores das frequências dos alelos na população americana e na população em geral citados foram retirados do Ensembl (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2014).

Os resultados da genotipagem dos SNPs rs3796703, rs3796704, rs3796705, rs7671281, rs2609428 e rs35951442 no gene ENAM podem ser visualizados no Apêndice B e estão descritos nas Tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11 - Resumo dos resultados dos ensaios de genotipagem para detecção dos SNPs rs3796703, rs3796704, rs3796705, rs7671281, rs2609428 e rs35951442 no gene ENAM

Grupos	n	rs3796703			rs3796704			rs3796705			rs7671281			rs2609428			rs35951442		
		HA	HT	HM	HA	HT	HM	HA	HT	HM	HA	HT	HM	HA	HT	HM	HA	HT	HM
1	43	42	1	0	35	8	0	43	0	0	0	8	35	43	0	0	43	0	0
2	34	34	0	0	27	7	0	34	0	0	0	8	26	33	1	0	34	0	0
3	26	26	0	0	21	5	0	26	0	0	0	7	19	21	5	0	26	0	0
4	44	44	0	0	36	8	0	44	0	0	0	7	37	42	2	0	44	0	0
TOTAL	147	146	1	0	119	28	0	147	0	0	0	30	117	139	8	0	147	0	0

Grupo 1= com FLP e MD; **Grupo 2=** com FLP, sem MD; **Grupo 3=** sem FLP, com MD; **Grupo 4=** sem FLP e MD; **HA=** homozigoto ancestral; **HT=** heterozigoto; **HM=** homozigoto mutado.

Tabela 12 - Frequência de ocorrência do alelo mutado do SNP rs2609428 no gene ENAM nos grupos estudados

Grupos	n	HÁ	HT	HM
1	43	43 (100%)	0 (0%)*	0 (0%)
2	34	33 (97,1%)	1 (2,9%)	0 (0%)
3	26	21 (80,8%)	5 (19,2%)*	0 (0%)
4	44	42 (95,5%)	2 (4,5%)	0 (0%)
TOTAL	147	139 (94,6%)	8 (5,4%)	0 (0%)

Grupo 1= com FLP e MD; **Grupo 2=** com FLP, sem MD; **Grupo 3=** sem FLP, com MD; **Grupo 4=** sem FLP e MD; **HA=** homozigoto ancestral; **HT=** heterozigoto; **HM=** homozigoto mutado; *p=0,006 (Teste do X²).

Tabela 13 - Agrupamento dos resultados dos ensaios de genotipagem para detecção do SNP rs2609428 no gene ENAM de acordo com a presença da FLP

Grupos	n	HA	HT + HM
1 + 2	77	76 (98,7%)	1 (1,3%)*
3 + 4	70	63 (90%)	7 (10%)*
TOTAL	147	139 (94,6%)	8 (5,4%)

Grupos 1+2= com fissura; **Grupos 3+4=** sem fissura; **HA=** homozigoto ancestral; **HT=** heterozigoto; **HM=** homozigoto mutado; *p=0,028 (Teste Exato de Fisher).

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

A formação do esmalte dentário deve ser bem coordenada ao longo de todas as fases, incluindo a pré-secreção, secreção, transição e maturação. Esta coordenação não inclui apenas os componentes da matriz extracelular secretada por ameloblastos, mas também outros fatores genéticos que influenciam a função dos ameloblastos (SEYMEN et al., 2014). Acredita-se que a causa das malformações dentárias possa ser uma desordem genética em conexão com doenças específicas e não-específicas durante a odontogênese, com o metabolismo mineral, principalmente o metabolismo do fosfato de cálcio. Alguns pesquisadores sugerem que a fissura labiopalatina pode estar envolvida num espectro dismórfico mais amplo de anomalias e está relacionada com a presença da MD, existindo uma relação direta entre o aparecimento do defeito e a presença da fissura (LAGARDE; KEREBEL; AJACQUES, 1987; VICHI; FRANCHI, 1995; MALANCZUK; OPITZ; RETZLAFF, 1999; MACIEL; COSTA; GOMIDE, 2005; FREITAS et al., 2012; RUIZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014a). Considerando que as MD podem estar relacionadas a diferentes mutações localizadas nos diversos genes envolvidos na formação do esmalte dentário, a investigação dos genes que transcrevem as principais proteínas e proteases do esmalte, como o AMELX e o ENAM, torna-se essencial para uma melhor compreensão dessas alterações, como proposto neste trabalho.

O gene da amelogenina ligado ao X, o AMELX (OMIM 300391), está localizado no cromossomo Xp22.31-p22.1 e é conhecido também como AMG, AI1E, AIH1, ALGN, AMGL e AMGX. Ele é composto de sete éxons e seis íntrons, e splicings alternativos resultam em três diferentes transcritos (NCBI, 2014a). No presente estudo, apenas os éxons que participam da transcrição do gene AMELX foram sequenciados (éxons 2 - 7). O AMELX codifica um membro da família amelogenina de proteínas da matriz extracelular e tem um importante papel na biomineralização do esmalte dentário durante o seu desenvolvimento. Mutações nesse gene causam amelogênese imperfeita (AI) ligada ao X, também conhecida como AI do tipo 1E (OMIM 301200 AI1E) (WRIGHT, 2006; HU et al., 2012). Diversas mutações no gene da amelogenina do cromossomo X estão associadas à MD, entretanto, nenhuma mutação foi associada ao gene do cromossomo Y (HART et al.,

2002). A amelogenina é considerada a proteína mais abundante da matriz do esmalte, ou seja, constitui até 90% da proteína no desenvolvimento do esmalte (CHO et al., 2014). Ela é secretada por ameloblastos inicialmente com 25 kDa, mas a forma estável apresenta 20 kDa e seu acúmulo no estágio secretório indica uma diminuição na velocidade de sua hidrólise (ROBINSON et al., 1998). A amelogenina é degradada, resultando em pequenos peptídeos que formam um esqueleto para a mineralização e formação dos cristais do esmalte (WRIGHT et al., 2009). É através da região hidrofílica que as amelogeninas interagem com os cristais de hidroxiapatita (ROBINSON et al., 1998). A amelogenina é expressa no desenvolvimento de várias estruturas, incluindo tecidos de suporte dentário e durante a formação e remodelação do osso alveolar (GRUENBAUM-COHEN et al., 2009). É bem estabelecido o papel da amelogenina como uma proteína multifuncional no complexo craniofacial (COXON et al., 2012).

Apesar de as mutações encontradas no presente estudo estarem distribuídas em todos os grupos, associação entre os grupos foi pertinente. Nossos resultados sugerem que a presença da FLP (Grupos 1 e 2 - 65,7%) aumenta significativamente ($p=0,003$) a frequência de mutações no gene AMELX, quando comparados com a ausência da FLP (Grupos 3 e 4 - 25,5%). Com isso não podemos afirmar que existe uma relação direta entre o aparecimento do defeito e a presença da fissura, mas sim que existe uma maior prevalência de mutações no gene AMELX em indivíduos com a fissura. Para afirmarmos que as mutações encontradas no gene AMELX são as causas das MD observadas nos indivíduos avaliados, estudos minuciosos da proteína amelogenina resultante das mutações encontradas nos dentes que apresentam a malformação do esmalte seriam necessários.

Um estudo avaliou o gene AMELX em modelos de ratos para se obter entendimento da patogênese da AI. Os autores afirmaram que as MD são pouco compreendidas e que muitos estudos sobre os genes que participam do desenvolvimento do dente humano são significativamente limitados (WRIGHT et al., 2009). Assim, uma vez que o AMELX codifica uma proteína que desempenha um importante papel na organização e na estruturação do esmalte dentário, ele é considerado a peça fundamental para organizar e estruturar este tecido altamente mineralizado (RICHARD et al., 2007). Outro estudo identificou dois SNPs na

sequência codificadora do gene AMELX em humanos. O SNP rs2106416 é uma substituição silenciosa da base C pela base T no aminoácido 87 (His>His), localizado no éxon 6 e também foi encontrado no presente estudo (Tabelas 7, 8, 9 e 10). O outro SNP, o rs6639060, é também uma substituição silenciosa da base C pela base T no aminoácido 152 (Leu>Leu), mas não foi encontrado no presente estudo. No entanto, sabe-se que a região central do gene AMELX (éxon 6), embora seja altamente variável na evolução dos mamíferos, é altamente preservada nos humanos (RICHARD et al., 2007). No presente estudo, 81,08% de todas as mutações foram encontradas no éxon 6 do gene AMELX e a prevalência do SNP rs2106416 foi maior ($p=0,003$) nos grupos com FLP (Grupos 1 e 2 - 23,75%) em relação aos grupos sem FLP (Grupos 3 e 4 - 8,23%) assim como foi maior ($p=0,032$) no grupo com FLP sem MD (Grupo 2 - 17,65%) em relação ao grupo sem FLP sem MD (Grupo 4 - 7,8%). Este SNP representa a única mutação comum em todos os grupos, sendo responsável por 70,3% de todas as mutações detectadas. É caracterizado pela troca da base C pela base T, alterando o códon de leitura de CAC por CAT, sendo considerado uma mutação silenciosa onde não há alteração da proteína a ser produzida (His>His). O alelo ancestral é o alelo C, que está presente em 88% da população americana e o alelo T, que é o alelo mutado, está presente em 12% (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2010). Em nosso trabalho, o alelo T mutado foi encontrado em 15,7% das amostras (26 SNPs em 165 amostras). Com esses resultados, sugere-se que o SNP rs2106416 no gene AMELX pode ser considerado um marcador para as FLP uma vez que esse polimorfismo não compromete a proteína a ser produzida, embora apareça com maior frequência nos indivíduos com FLP, e na ausência das MD. A ausência de relação do SNP rs2106416 com a MD é confirmado por recente caso clínico do nosso grupo (OLIVEIRA et al., 2014b) que analisou o gene AMELX em um indivíduo com AI e sua família. Os integrantes da família apresentaram tal polimorfismo, enquanto o indivíduo com AI não apresentou, excluindo a possível relação do SNP rs2106416 com a AI.

O gene da enamelina, o ENAM (OMIM 606585), está localizado no cromossomo 4q13.3 e é conhecido também como ADAI, AI1C e AIH2. Este gene possui 14 éxons, sendo que somente nove deles participam dos quatro diferentes transcritos (NCBI, 2014b). A enamelina é produzida por ameloblastos durante o

estágio secretório concentrando-se próximo ao processo de Tomes (FINCHAM; MORADIAN-OLDAK; SIMMER, 1999) e é essencial para formação e crescimento dos cristais do esmalte dentário (HU et al., 2014; WRIGHT; CARRION; MORRIS, 2015). A enamelina está presente em pequenas quantidades, sob a forma de uma série de produtos clivados para gerar vários polipeptídeos que participam da enucleação e extensão dos cristais de esmalte, bem como da regularização desses cristais (FUKAE et al., 1993). O gene da enamelina codifica a maior (200 kDa) e menos abundante (3-5%) proteína entre as três principais proteínas da matriz extracelular no desenvolvimento do esmalte (HU et al., 2007). O gene ENAM foi mapeado no cromossomo 4 e somente 15 Kb o separam do gene da ameloblastina, sugerindo que essa região contém um conjunto de genes codificadores das proteínas do esmalte (MARDH et al., 2002). Como a ameloblastina, a enamelina atua como uma molécula de adesão e suporte na diferenciação dos ameloblastos (SAWADA et al., 2011). Sabe-se que mutações no gene ENAM resultam em AI do tipo 1B e 1C (OMIM 104500 AI1B e OMIM 204650 AI1C) (SEYMEN et al., 2014). AI é um grupo clinicamente e geneticamente heterogêneo de defeitos hereditários do esmalte dentário (WITKOP, 1967). A amelogênese é orquestrada pela regulação genética da secreção, organização e processamento do desenvolvimento da matriz extracelular do esmalte dentário (WRIGHT, 2006). Mutações no gene AMELX (HART et al., 2002; KIM et al., 2004) e ENAM (RAJPAR et al., 2001; MARDH et al., 2002) estão envolvidos na etiologia dos tipos de AI em humanos.

Existem estudos que apoiam a hipótese de que os defeitos do esmalte causados por mutações no gene ENAM são dose-dependente e resultam em AI hipoplásica, caracterizada pela presença de esmalte fino e áspero, de coloração amarelada e sensível a mudanças térmicas. As mutações em ambos os alelos, muitas vezes, levam à completa ausência de esmalte (OZDEMIR et al., 2005; COXON et al., 2012; HU et al., 2014). Pacientes com tal condição exigem amplo e frequente atendimento odontológico, o que provoca uma sobrecarga psicológica e financeira significativa. Melhorar o diagnóstico, o tratamento e o prognóstico a longo prazo de pacientes com AI e compreender o controle genético da amelogênese é primordial. Pesquisas que utilizam modelos knockout para enamelina e camundongos transgênicos possibilitam o estudo da AI hipoplásica humana decorrentes de defeitos genéticos no gene da enamelina. As interações célula-matriz

durante a formação do esmalte são um possível mecanismo de regulação de atividades ameloblásticas onde as principais proteínas da matriz do esmalte, a amelogenina, a ameloblastina e a enamelinina, provavelmente estão realizando diferentes funções de forma sincronizada para produzir um esmalte dentário organizado e totalmente mineralizado. A enamelinina é essencial para formação do esmalte dentário, com o seu distinto cristal e estruturas prismáticas. A caracterização do gene-alvo enamelinina em modelos de camundongos revela a função essencial da enamelinina na manutenção da integridade dos ameloblastos e na montagem da ultraestrutura do esmalte. Para compreender o mecanismo básico de biomineralização, é importante visualizar frente à mineralização, para descobrir o padrão de montagem de proteínas da matriz e para compreender sua funcional relação com as fases do fosfato de cálcio depositados dentro do espaço extracelular do esmalte (HU et al., 2014).

De um modo geral, mutações no gene ENAM causam hipoplasia do esmalte, mas a gravidade dos defeitos do esmalte é, por vezes, altamente variável, mesmo entre indivíduos com a mesma mutação. Neste momento não há uma explicação clara para sustentar a ausência de penetrância ou o fenótipo extremamente moderado em um indivíduo. Outros fatores genéticos, tais como os elementos ainda não identificados, cis ou trans, poderiam regular e influenciar a expressão e a função da proteína enamelinina. Mais estudos genéticos e funcionais são necessários para entender a dinâmica e variável natureza da formação do esmalte (SEYMEN et al., 2014).

Os SNPs no gene ENAM foram selecionados levando-se em conta a localização no gene, onde necessariamente deveriam estar inseridos em regiões exônicas, o tipo de mutação, na qual necessariamente deveria ser missense, a frequência dentro da população, e também a disponibilidade em ensaios produzidos e validados para genotipagem por empresa bem estabelecida no mercado de trabalho. Seis SNPs foram selecionados para o estudo, todos eles localizados no éxon 9 do gene ENAM, sendo esse o maior éxon do gene citado, compreendendo 2.841 bases nitrogenadas. De acordo com os resultados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na frequência de homozigotos mutados e/ou heterozigotos dos SNPs rs3796703, rs3796704, rs3796705, rs7671281 e rs35951442 no gene ENAM entre os grupos estudados. A incidência de

heterozigotos no SNP rs2609428 foi maior no grupo sem FLP com MD (Grupo 3) do que no grupo com FLP com MD (grupo 1), assim como a incidência dos heterozigotos/homozigotos mutados nos grupos sem FLP (Grupos 3 e 4) foi maior quando comparados com os grupos com FLP (Grupos 1 e 2). Com base nesses resultados, podemos sugerir que o SNP rs2609428 no gene ENAM pode estar associado à MD na ausência da FLP. Sabe-se que mutações no gene ENAM estão relacionadas a AI, mas não existe trabalho na literatura que correlacione mutações ou polimorfismos no gene ENAM com as MD e as FLP. Um recente estudo mostrou que a presença, na mesma variante, dos SNPs rs7671281 e rs3796704 do gene ENAM (p.I648T e p.R763Q, respectivamente), aumenta a susceptibilidade à cárie independente dos fatores de risco ambientais, sugerindo que o gene ENAM pode ser um gene candidato para suscetibilidade à cárie na população estudada (CHAUSSAIN et al., 2014). Outro estudo mostrou que o SNP rs3796704 está associado a MIH (hipomineralização molar incisivo) (JEREMIAS et al., 2013). Pesquisadores investigaram a correlação genótipo-fenótipo entre os camundongos mutados e os controles do tipo selvagem da AI causada por mutações nos genes AMELX e ENAM (COXON et al., 2012). O presente estudo foi o primeiro em humanos demonstrando que os genes AMELX e ENAM podem ser candidatos para as FLP e MD. Mais estudos são necessários para investigar mutações e polimorfismos, incluindo SNPs, em áreas codificadoras e de splicing de genes candidatos a defeitos na formação do esmalte, como o AMELX e ENAM, e para elucidar as consequências dessas mutações nas proteínas finais produzidas.

Sabe-se que as MD podem ocorrer como consequência de agentes ambientais, como uso de medicamentos e traumas no germe dentário durante a amelogênese, e por esse motivo, a realização de uma anamnese do paciente levando em conta esses aspectos é imprescindível para se obter resultados fiéis na pesquisa.

Os reflexos da evolução dos conhecimentos genéticos têm sido profundamente sentidos em todas as especialidades da área da saúde. A aplicação do conhecimento adquirido por meio da genômica deve transformar a prática clínica, nas próximas décadas, melhorando a qualidade de vida. De fato, nenhum profissional da saúde que pretenda exercer suas funções de forma consciente e responsável, pode estar à parte da revolução genética ocorrida nas últimas décadas.

A barreira que divide a ciência básica da aplicada, a qual sempre foi tênue, está agora a ponto de desaparecer. Cada vez mais, os clínicos necessitarão acompanhar as novas informações científicas.

A partir do momento em que as bases moleculares de desordens geneticamente complexas forem entendidas da mesma maneira que aquelas mais comuns será possível diagnosticar a suscetibilidade da doença antes do seu início, em indivíduos de risco, e iniciar as estratégias de intervenção. O tema comum por trás de todos esses avanços, é que a detecção precoce e diagnóstica da doença pode ser facilitada pela aplicação das técnicas de biologia molecular. Os profissionais do futuro próximo deverão ser capazes de prevenir efetivamente as doenças e promover saúde por meio dessas técnicas de diagnóstico. A identificação de alvos moleculares de agentes ambientais ajudará a entender o processo da doença e a desenvolver estratégias de tratamento apropriadas. Em tais casos, o entendimento da causa da doença exercerá papel-chave em testes pré-sintomáticos para identificar e determinar estratégias de tratamento efetivo aos indivíduos de risco. Estas informações poderão contribuir para um melhor entendimento do mecanismo envolvido nas malformações dentárias, os quais serão úteis nas terapias preventivas e curativas. A previsão é de que o tratamento será mais personalizado, sendo adotado com base no genoma do paciente.

Com base nos resultados desta pesquisa, propõe-se a realização de futuros trabalhos, utilizando este modelo de estudo. As modernas técnicas de sequenciamento e manipulação genética, associadas a métodos de análise bioquímica de ácidos nucleicos e de proteínas estão permitindo que modificações sejam introduzidas nos organismos. Sabe-se que a procura por soluções e materiais ideais para qualquer área de conhecimento, atualmente, deve estar direcionada ao conhecimento de proteínas expressas pelo próprio organismo, às quais, com o auxílio dos princípios de biologia molecular e terapia genética, poderão vir a ser investigadas para que os resultados laboratoriais possam ser transportados para a prática clínica.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que o gene AMELX pode ser considerado um gene candidato à fissura labiopalatina; o SNP rs2106416 no gene AMELX pode ser considerado um marcador para a fissura labiopalatina e o SNP rs2609428 no gene ENAM pode estar associado à malformação dentária na ausência da fissura labiopalatina.

Referências

REFERÊNCIAS

- Adams MS, Niswander JD. Developmental noise and a congenital malformation. *Genet Res.* 1967;10(3):313-7.
- Bartlett JD, Skobe Z, Lee DH, Wright JT, Li Y, Kulkarni AB, et al. A developmental comparison of matrix metalloproteinase-20 and amelogenin null mouse enamel. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1:18-23.
- Broadbent JM, Thomson WM, Williams SM. Does caries in primary teeth predict enamel defects in permanent teeth? A longitudinal study. *J Dent Res.* 2005;84(3):260-4.
- Chapple JR, Nunn JH. The oral health of children with clefts of the lip, palate, or both. *Cleft Palate Craniofac J.* 2001;38:525-8.
- Chaussain C, Bouazza N, Gasse B, Laffont AG, Opsahl Vital S, Davit-Béal T, et al. Dental caries and enamelin haplotype. *J Dent Res.* 2014;93(4):360-5.
- Cho ES, Kim KJ, Lee KE, Lee EJ, Yun CY, Lee MJ, et al. Alteration of conserved alternative splicing in AMELX causes enamel defects. *J Dent Res.* 2014;93(10):980-7.
- Cho SH, Seymen F, Lee KE, Lee SK, Kweon YS, Kim KJ, et al. Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Hum Mutat.* 2012;33:91-4.
- Coxon TL, Brook AH, Barron MJ, Smith RN. Phenotype-genotype correlations in mouse models of amelogenesis imperfecta caused by Amelx and Enam mutations. *Cells Tissues Organs.* 2012;196:420-30.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000;15(1):7-12.
- Eerens K, Vlietinck R, Heidbüchel K, Van Olmen A, Derom C, Willems G, et al. Hypodontia and tooth formation in groups of children with cleft, siblings without cleft, and nonrelated controls. *Cleft Palate Craniofac J.* 2001;38(4):374-8.
- El-Sayed W, Parry DA, Shore RC, Ahmed M, Jafri H, Rashid Y, et al. Mutations in the beta propeller WDR72 cause autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2009;85(5):699-705.
- European Bioinformatics Institute. e!Ensembl [homepage on the Internet]. Gene: AMELX ENSG00000125363. Cambridge, United Kingdom: Wellcome Trust Genome Campus; 2010 [cited 2011 June 14]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000125363;r=X:11311533-11318881.

- European Bioinformatics Institute. e!Ensembl [homepage on the Internet]. Gene: ENAM ENSG00000132464. Cambridge, United Kingdom: Wellcome Trust Genome Campus; 2014 [cited 2014 Oct. 21]. Available from: http://feb2014.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000132464;r=4:70628744-70686816.
- Ferraris MEG, Muñoz AC. Histologia e embriologia bucodental. São Paulo: Guanabara Koogan; 2006.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol*. 1999;126(3):270-99.
- Freitas JA, Neves LT, Almeida AL, Garib DG, Trindade-Suedam IK, Yaedú RY, et al. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP) - Part 1: overall aspects. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(1):9-15.
- Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Yamakoshi Y, Shimizu M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int*. 1993;53(4):257-61.
- Genetics Home Reference. U.S. National Library of Medicine [homepage on the Internet]. Mutation; 2015 [cited 2015 Apr. 09]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=mutation>
- Gruenbaum-Cohen Y, Tucker AS, Haze A, Shilo D, Taylor AL, Shay B, et al. Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009;15;312B(5):445-57.
- Hart PS, Aldred MJ, Crawford PJ, Wright NJ, Hart TC, Wright JT. Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. *Arch Oral Biol*. 2002;47(4):261-5.
- Hoffmann RHS, Sousa MLR, Cypriano S. Prevalence of enamel defects and the relationship to dental caries in deciduous and permanent dentition in Indaiatuba, São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2007;23(2):435-44.
- Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B. Association between enamel hypoplasia and dental caries in primary second molars: a cohort study. *Caries Res*. 2009;43(5):345-53.
- Hu JC, Simmer JP. Developmental biology and genetics of dental malformations. *Orthod Craniofac Res*. 2007;10(2):45-52.
- Hu JC, Yamakoshi Y, Yamakoshi F, Krebsbach PH, Simmer JP. Proteomics and genetics of dental enamel. *Cells Tissues Organs*. 2005;181(3-4):219-31.
- Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer JP. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*. 2007;186:78-85.

- Hu JC, Chan HC, Simmer SG, Seymen F, Richardson AS, Hu Y, et al. Amelogenesis imperfecta in two families with defined AMELX deletions in ARHGAP6. *PLoS One*. 2012;7(12):e52052.
- Hu JC, Hu Y, Lu Y, Smith CE, Lertlam R, Wright JT, et al. Enamelin is critical for ameloblast integrity and enamel ultrastructure formation. *PLoS One*. 2014;9(3):e89303.
- Jeremias F, Koruyucu M, Kchler EC, Bayram M, Tuna EB, Deeley K, et al. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. *Arch Oral Biol*. 2013;58(10):1434-42.
- Kapadia H, Mues G, D'Souza R. Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofac Res*. 2007;10(4):237-44.
- Kim JW, Simmer JP, Hu YY, Lin BP, Boyd C, Wright TJ, et al. Amelogenin p.M1T and p.W4S mutations underlying hypoplastic Xlinked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*. 2004;83:378-83.
- Kim JW, Lee SK, Lee ZH, Park JC, Lee KE, Lee MH, et al. FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified Amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 2008;82:489-94.
- Kim JW, Seymen F, Lee KE, Ko J, Yildirim M, Tuna EB, et al. LAMB3 Mutations Causing Autosomal-dominant Amelogenesis Imperfecta. *J Dent Res*. 2013;92:899-904.
- Lagarde A, Kerebel B, Ajacques JC. Structure, ultrastructure and microanalysis of the enamel of teeth near maxillary clefts. *Ann Pathol*. 1987;7(2):113-21.
- Larson M, Hellquist R, Jakobsson OP. Dental abnormalities and ectopic eruption in patients with isolated cleft palate. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1998;32(2):203-12.
- Lee SK, Seymen F, Lee KE, Kang HY, Yildirim M, Tuna EB, et al. Novel WDR72 mutation and cytoplasmic localization. *J Dent Res*. 2010;89:1378-82.
- Maciel SP, Costa B, Gomide MR. Difference in the prevalence of enamel alterations affecting central incisors of children with complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2005;42(4):392-5.
- Malanczuk T, Opitz C, Retzlaff R. Structural changes of dental enamel in both dentitions of cleft lip and palate patients. *J Orofac Orthop*. 1999;60(4):259-68.
- Mardh KC, Backman B, Holgren G, Hu JC-C, Simmer JP, Forsman-Semb K. A nonsense mutation in the enamel gene causes local hypoplastic autosomal dominant amelogenesis imperfecta (AIH2). *Hum Mol Genet*. 2002;11:1069-74.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information [homepage on the Internet]. BLAST Assembled RefSeq Genomes; 2011a [cited 2011 Sept. 26]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

NCBI - National Center for Biotechnology Information [homepage on the Internet]. dbSNP Short Genetic Variations; 2011b [cited 2011 Sept. 26]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

NCBI - National Center for Biotechnology Information [homepage on the Internet]. AMELX amelogenin; 2014a [cited 2014 Oct. 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/265>.

NCBI - National Center for Biotechnology Information [homepage on the Internet]. ENAM enamelin; 2014b [cited 2014 Oct. 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10117>.

Needleman HL, Leviton A, Allred E. Macroscopic enamel defects of primary anterior teeth – types, prevalence and distribution. *Pediatr Dent*. 1991;13(4):208-16.

O'Sullivan J, Bitu CC, Daly SB, Urquhart JE, Barron MJ, Bhaskar SS, et al. Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *Am J Hum Genet*. 2011;88:616-20.

Oliveira FV, Dionísio TJ, Neves LT, Machado MAAM, Santos CF, Oliveira TM. Amelogenin gene influence on enamel defects of cleft lip and palate patients. *Braz Oral Res*. 2014a;28(1):1-6.

Oliveira FV, Gurgel CV, Kobayashi TY, Dionísio TJ, Neves LT, Santos CF, et al. Amelogenesis imperfecta and screening of mutation in amelogenin gene. *Case Rep Dent*. 2014b;2014:319680.

Olszowski T, Adler G, Janiszewska-Olszowska J, Safranow K, Kaczmarczyk M. MBL2, MASP2, AMELX, and ENAM gene polymorphisms and dental caries in Polish children. *Oral Dis*. 2012;18(4):389-95.

Ozdemir D, Hart PS, Firatli E, Aren G, Ryu OH, et al. Phenotype of ENAM mutations is dosagedependent. *J Dent Res*. 2005;84:1036-41.

Paranaíba LMP, de Aquino SN, Bufalino A, Martelli-Júnior H, Graner E, Brito LA, et al. Contribution of polymorphisms in genes associated with craniofacial development to the risk of nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(3):e414-20.

Parapanisiou V, Gizani S, Makou M, Papagiannoulis L. Oral health status and behaviour of Greek patients with cleft lip and palate. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(2):85-9.

Parry DA, Brookes SJ, Logan CV, Poulter JA, El-Sayed W, Al-Bahlani S, et al. Mutations in C4orf26, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 2012;91:565-71.

- Parry DA, Poulter JA, Logan CV, Brookes SJ, Jafri H, Ferguson CH, et al. Identification of mutations in SLC24A4, encoding a potassium dependent sodium/calcium exchanger, as a cause of amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2013;92:307-12.
- Pavlic A, Battelino T, Trebusak Podkrajsek K, Ovsenik M. Craniofacial characteristics and genotypes of amelogenesis imperfecta patients. *Eur J Orthod.* 2011;33(3):325-31.
- Pegelow M, Alqadi N, Karsten ALA. The prevalence of various dental characteristics in the primary and mixed dentition in patients born with non-syndromic unilateral cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Orthod.* 2012;34(5):561-70.
- Poulter JA, Brookes SJ, Shore RC, Smith CE, Abi Farraj L, Kirkham J, et al. A missense mutation in ITGB6 causes pitted hypomineralized amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet.* 2014a;23:2189-97.
- Poulter JA, El-Sayed W, Shore RC, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation in LAMB3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet.* 2014b;22:132-5.
- Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Gen.* 2001;10:1673-7.
- Richard B, Delgado S, Gorry P, Sire JY. A study of polymorphism in human AMELX. *Arch Oral Biol.* 2007;52(11):1026-31.
- Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:282-91.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.
- Ruiz LA, Maya RR, D'Alpino PH, Atta MT, da Rocha Svizero N. Prevalence of enamel defects in permanent teeth of patients with complete cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2013;50(4):394-9.
- Sawada T, Sekiguchi H, Uchida T, Yamashita H, Shintani S, Yanagisawa T. Histological and immunohistochemical analyses of molar tooth germ in enamelin-deficient mouse. *Acta Histochem.* 2011;113(5):542-6.
- Schluter PJ, Kanagaratnam S, Durward CS, Mahood R. Prevalence of enamel defects and dental caries among 9-year-old Auckland children. *N Z Dent J.* 2008;104(4):145-52.
- Schroeder DC, Green LJ. Frequency of dental trait anomalies in cleft, sibling and non-cleft groups. *J Dent Res.* 1975;54:802-7.

Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J*. 1997;47:173-83.

Seymen F, Lee KE, Koruyucu M, Gencay K, Bayram M, Tuna EB, et al. ENAM mutations with incomplete penetrance. *J Dent Res*. 2014;93(10):988-92.

Shashni R, Goyal A, Gauba K, Utreja AK, Ray P, Jena AK. Comparison of risk indicators of dental caries in children with and without cleft lip and palate deformities. *Contemp Clin Dent*. 2015;6:58-62.

SNPedia. [Homepage on the Internet]. Single Nucleotide Polymorphism; 2013 [cited 2015 Apr. 04]. Available from: http://www.snpedia.com/index.php/Single_Nucleotide_Polymorphism.

Stahl F, Grabowski R, Wigger K. Epidemiology of Hoffmeister's "genetically determined predisposition to disturbed development of the dentition" in patients with cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006;43(4):457-65.

Stephanopoulos G, Garefalaki ME, Lyroutdia K. Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*. 2005;84(12):1117-26.

Uribe S. Early childhood caries--risk factors. *Evid Based Dent*. 2009;10(2):37-8.

Vargas-Ferreira F, Zeng J, Thomson WM, Peres MA, Demarco FF. Association between developmental defects of enamel and dental caries in schoolchildren. *J Dent*. 2014;42(5):540-6.

Vichi M, Franchi L. Abnormalities of the maxillary incisors in children with cleft lip and palate. *J Dent Child*. 1995;62:412-7.

Wang SK, Choi M, Richardson AS, Reid BM, Lin BP, Wang SJ, et al. ITGB6 loss-of-function mutations cause autosomal recessive amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 2014;23:2157-63.

Wang X, Zhao Y, Yang Y, Qin M. Novel ENAM and LAMB3 Mutations in Chinese Families with Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0116514.

Weerheijm KL. Molar-incisor hypomineralisation (MIH): clinical presentation, aetiology and management. *Dent Update*. 2004;31:9-12.

Witkop CJ. Partial expression of sexlinked recessive amelogenesis imperfecta in females compatible with the Lyon hypothesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1967;23:174-82.

Wright JT. The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet*. 2006;140:2547-55.

Wright JT, Carrion IA, Morris C. The molecular basis of hereditary enamel defects in humans. *J Dent Res*. 2015;94(1):52-61.

Wright JT, Deaton TG, Hall KI, Yamauchi M. The mineral and protein content of enamel in amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res*. 1995;32(1-4):247-52.

Wright JT, Hart TC, Hart PS, Simmons D, Suggs C, Daley B, et al. Human and mouse enamel phenotypes resulting from mutation or altered expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):224-9.

Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred MJ, et al. Amelogenesis Imperfecta: Genotype-Phenotype Studies in 71 Families. *Cells Tissues Organs*. 2011;194:279-8.

APÊNDICE A - Mutações encontradas no sequenciamento direto do gene AMELX

Grupo	Amostra	Mutação	Éxon	Aminoácido
1	1.2	c.261C>T	6	p.87H>H
	1.4	c.261C>T	6	p.87H>H
	1.5	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	1.14	c.261C>Y	6	p.87H>H
	1.15	c.261C>T	6	p.87H>H
	1.16	c.261C>T	6	p.87 H>H
	1.20	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	1.21	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	1.23	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	1.27	c.261C>T	6	p.87H>H
	1.33	c.261C>T	6	p.87H>H
	1.38	c.261C>T	6	p.87H>H
	1.42	c.34G>R (A/G)	2	p.12G>R
	1.42	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
2	2.1	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	2.3	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	2.4	fora do transcrito	7	--
	2.6	fora do transcrito	7	--
	2.8	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	2.9	c.261C>T	6	p.87H>H
	2.21	c.261C>T	6	p.87H>H
	2.21	fora do transcrito	7	--
	2.25	c.420C>M (A/C)	6	p.140P>P
	2.29	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	2.30	fora do transcrito	7	--
	2.32	fora do transcrito	7	--
3	3.11	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	3.29	c.362A>R (A/G)	6	p.121H>R
	3.31	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	3.36	c.261C>T	6	p.87H>H
4	4.8	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	4.16	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	4.31	c.245T>W (A/T)	6	p.82V>E
	4.31	c.482 A>R (A/G)	6	p.161H>R
	4.33	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	4.48	c.261C>Y (C/T)	6	p.87H>H
	4.48	fora do transcrito	7	--

APÊNDICE B - Resultados dos ensaios de genotipagem para detecção dos SNPs rs3796703, rs3796704, rs3796705, rs7671281, rs2609428 e rs35951442 no gene ENAM

Amostra	rs3796703	rs3796704	rs3796705	rs7671281	rs2609428	rs35951442
1.1	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.4	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.5	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.6	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.7	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.8	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.10	HA	HA	HA	HT	HA	HA
1.11	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.12	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.13	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.14	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.15	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.16	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.17	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.18	HA	HT	HA	HM	HA	HA
1.19	HA	HA	HA	HT	HA	HA
1.20	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.21	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.22	HA	HA	HA	HT	HA	HA
1.23	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.24	HA	HT	HA	HT	HA	HA
1.25	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.26	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.27	HA	HT	HA	HM	HA	HA
1.28	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.29	HA	HT	HA	HT	HA	HA
1.31	HA	HT	HA	HM	HA	HA
1.32	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.33	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.34	HA	HA	HA	HT	HA	HA
1.35	HT	HA	HA	HM	HA	HA
1.36	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.37	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.38	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.39	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.40	HA	HT	HA	HM	HA	HA
1.41	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.42	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.43	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.44	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.45	HA	HA	HA	HM	HA	HA
1.46	HA	HT	HA	HT	HA	HA
1.47	HA	HT	HA	HT	HA	HA
2.1	HA	HA	HA	HM	HT	HA
2.2	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.3	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.4	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.5	HA	HT	HA	HT	HA	HA
2.6	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.7	HA	HA	HA	HT	HA	HA
2.8	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.9	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.10	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.11	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.12	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.13	HA	HA	HA	HM	HA	HA

continua

continuação

Amostra	rs3796703	rs3796704	rs3796705	rs7671281	rs2609428	rs35951442
2.14	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.15	HA	HA	HA	HT	HA	HA
2.16	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.18	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.19	HA	HT	HA	HT	HA	HA
2.20	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.21	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.22	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.23	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.24	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.25	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.26	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.27	HA	HT	HA	HT	HA	HA
2.28	HA	HT	HA	HT	HA	HA
2.29	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.30	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.31	HA	HT	HA	HT	HA	HA
2.32	HA	HT	HA	HT	HA	HA
2.33	HA	HT	HA	HM	HA	HA
2.34	HA	HA	HA	HM	HA	HA
2.35	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.3	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.10	HA	HT	HA	HT	HA	HA
3.11	HA	HT	HA	HT	HA	HA
3.12	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.13	HA	HT	HA	HM	HT	HA
3.15	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.16	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.17	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.18	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.19	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.20	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.22	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.23	HA	HA	HA	HM	HT	HA
3.24	HA	HA	HA	HT	HA	HA
3.25	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.27	HA	HA	HA	HM	HT	HA
3.28	HA	HA	HA	HM	HT	HA
3.29	HA	HA	HA	HT	HA	HA
3.30	HA	HT	HA	HT	HT	HA
3.31	HA	HA	HA	HT	HA	HA
3.32	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.33	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.34	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.35	HA	HT	HA	HT	HA	HA
3.36	HA	HA	HA	HM	HA	HA
3.37	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.1	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.8	HA	HT	HA	HT	HA	HA
4.10	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.12	HA	HT	HA	HT	HA	HA
4.13	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.14	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.15	HA	HT	HA	HT	HA	HA
4.16	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.17	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.18	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.19	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.20	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.21	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.22	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.23	HA	HT	HA	HT	HA	HA
4.24	HA	HA	HA	HM	HT	HA

continua

conclusão

Amostra	rs3796703	rs3796704	rs3796705	rs7671281	rs2609428	rs35951442
4.25	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.26	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.27	HA	HT	HA	HT	HA	HA
4.28	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.29	HA	HT	HA	HM	HA	HA
4.30	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.31	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.32	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.33	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.34	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.35	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.36	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.37	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.38	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.39	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.40	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.41	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.42	HA	HA	HA	HM	HT	HA
4.43	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.44	HA	HT	HA	HT	HA	HA
4.45	HA	HA	HA	HT	HA	HA
4.46	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.47	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.48	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.49	HA	HT	HA	HM	HA	HA
4.50	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.51	HA	HA	HA	HM	HA	HA
4.52	HA	HA	HA	HM	HA	HA

HA= homozigoto ancestral; HM= homozigoto mutado; HT= heterozigoto.

NCBI Reference Sequence: NC_000023.10

[illegible]

CTGAAGACAAATGTTAGTAAGATTTTGAGGCAAGATTTTCTGTTGAACCGAAAAGATTGACACATCTGATCAGTCAATCTG
 TGTTTCTAGGATGAGGGACAGTGTTCACCTCTCTTTTCCCATTGTGACATCAAAGAAAAAATGAAATTAACATCATG
 TCATATTATTATGTCTAATTTTGTGTTTGTCTTCAATGAAAAAGGAAGTATGGAATTAACAGATTTACTC
 CCTGTGTAACCTCAGTCAAGTTAATGAATCTCTTTAACTCCCCATAACCTTATCTAAAAAGTGAGAGTAATAACTTTGCC
 TCCTAGCATATAAGAAAAGATGAAGAATGTGTGTGATGGATGTAAACACAGTGCCTGTACACAGGAAGCACCCCAACAAAT
 TTTTACCTTCTTCTTTCTTTTGTAGAACTCACATTCTCAGGCTATCAATGTTGACAGGACTGCATTAAGTGAGTCTATATTT
 CCTACTGCATCAGTGAGTTTCTATATTGGATGAAAGTAAATTAATCAAATGGGTTCTAATATCTTTTCTCTTAAGGTGC
 TTACCCCTTTGAAGTGGTACCAGAGCATAAGGCCACCGGTATGTAGACATTTTGTTCCTTATTCCCTGAAAAATATTAGGCA
 TGCATTAAAAATCCCATATTAAAGTGAAATATCATGTCTACTCCACATGCAGACATTAATGGGAATTTAGTTTGTAACAAA
 TCATATCTGTGTACACAGTTACAAATTTTGCAGGAAAAATGAATAAAATATTCCCTATAGCCATAATGGCAAGAAAAAC
 ACTGCTGCTTCTCTGTTGGAGTCACTGAGCCAATGTTAACTGCTCTCTGTTTCTCACCAGTACCTTCTCTATGGTT
 ACGAGCCCCATGGGTGGATGGCTGCACCACCAATCATCCCCGTGCTGTCCCAACAGCACCCCCGACTCACACCCTGCAGC
 CTCATCACACCATCCAGTGGTGCCAGCTCAGCAGCCCGTATCCCCAGCAACCAATGATGCCCGTTCTCTGGCCAACACT
 CCATGACTCCAATCCAACACCAGCCAAACCTCCCTCCGCCGCCAGCAGCCCTACCAGCCCCAGCCTGTTTCAGCCAC
 AGCCTCACCAGCCCCATGCAGCCCCAGCCACCTGTGCACCCCATGCAGCCCTGCCGCCACAGCCACCTTGCCCTCCGATGT
 TCCCCATGCAGCCCCCTGCCTCCCATGCTTCTCTGATCTGACTCTGGAAGCTTGGCCATCAACAGACAAGACCAAGCGGGAGG
 AAGTGTGAGTATATTTGAAGCCACTACAATGCAATCCTGTGAAAAATGGTGCAGCAAAATAGGCCCCAGAGTTCTAAGG
 TCTCCGACAACCAAGGATCTAGAGTTGTAGTAGTTACAGGTCTATGATCTATTAGTCCAAGCAATATGCTATACCTTTAT
 GTTAAAGACAAATTCCTCTAAATGGCTTGGTAATTAAGACCACAGTTTTTATGGTAGGTTTCAATTTTACTATTACTGAAT
 TTCTACCAGAATATGTATTACCAAAACCATTAATAGAAATATATATTACTAAACCCCATGAATTTTAAGGGCAACAGTAT
 AAGGGAATATCAGTTCTCCTTATATTTCAAAGGTTTACTAGCAAGAATAGGCTAGAGTTGCACTGAAGGCTTAAGACAAG
 AGGGAGCGGATAATTTTGAGAGTGCAAAATATCTGAACAGGCTACAAAAGGTAGACGGGAAATCTCTTCAAAAACCTACAGG
 AAGATTTCCCATTTCCAGTAGTTTCAATCTAACTTGAGGGCGGCTAAACTAAACATACTGTTAGATTCTTTTCTGTACT
 GGGGTTCTATAGATGATTAAGCTTTTAGCAAGAAGTTACTGCAATTTAGCACTAAATCTTCCATTACAGGTAGCTCTTACA
 AATGAATGGGAATAGTCAACAAAACAACTTAATCTACATCCATAAAGTCTTACTTCTATGTATACGAGATTATGTGATCC
 TATCATGTATATGTATCCAATGTAATTTCAATTTATACATGTTATTGATGATTTGCTACTGAGAAGAAGAGAGAAGTGAG
 GTGGAAATGACCAGGATAAGAAGCCAGGACACAAAGGTTCAATTTCTGGCTTTGCCCTCAAAGACGAGGCAGTATTGTAAA
 AGTTACTTCAAATGTATCGGTGTTTTATTTCTTTTAAATGGGGGAAAATGACGAAATCAGATTATTTTCAAGTCTCTGTC
 CAATATATAAATACCATAGTTTCTGAATTTAAAAAATCATAAATATATGTCATAAATGGCTTCATAATTGTGAGCATGTTTA
 CGGAAAAATATGGGGCAGAATTTTTTGAAAAATGATTGAATCCCAAGTAATCGGTGCCTATCATTGGCTATTCTAGTCCAAG
 GCACATGTTCTCTCTGTACATAGAAAATGCATTTACTTCTTTATGAATAATTAATACCATGAACCTTTATAATGTGCTCACA
 TCTTGACAAAGCTATTTATGGAAAGGTGACTTTGGGCAGATAGTTTGAACCTCTTTAAACTCAGTTTCTTTTGTGTAAAA
 TTTGAGTATAAACATTGATAGTTTCTTAGAGTTGTTTATGGAAAACAAAATAGCGTGATAAGCTTGGAGCCTGACATGCA
 AGACGTACCCCCAAAAAGGTAGCAATTGTTATTTTATATAAAATAATAGGCTTTAAGTGTCTGAAGGTGGAAGCAGTC
 CTCATGGACACCTAATATCTAATGACAACGAAATAACAAAGAACTTCAGAAATTATAGAGTTCAACTTAAATGGTTGTAC
 ATTGTTTGTGACAAAATGAAGCCAGACATGTTATTGTAATGGTACTCACTAGGAACATTTGTAAATTATTTTAACTGTTT
 TTTTGAATTTTTTTCAGGATTAAAAGATCAGAAGATGAGAGGGGAATGAATACTTCAGATGCTTTTCAGGAGTGACACAAG
 AACACAATGATTTTTTGCTTATAATCACTTTACTTTAGCAAAATCTGTAACTAAAAAAGTACCATTAGCAGACAATAAAATGC
 ATTAAAAATCATTTATGCTTTTGTGTTGAATGAACTTAAATTTTCTATCATTTGAGATGATATATTATGAATGAGTATT
 CTTGAATCAGGTAGGAAGTCTCATTTAGTCATACAAATTCACCATTTGGCAAGCAATAAGGAATATATTCTTTTGTAGA
 GAAAAATTTAAATTATACTGTCTCAAACTTTTTTAAAAAACAAGTTTATACATCAGTTAAACAGTTGATAAAATGAAAA
 TTTATGAATATGTACAATAACTAAAACCTGAACCAATGAAGGGAAGTTTATATGAAAAATCTTTTACATTAAGAAAGATA
 AACTTTTGAAGAATGTTTATATTATGAAACAAAATAGGACATGGAACACTGGCTTTACACTTCACACCACACTGGCAATCA
 AAATCTGGTCTTTTATCTCATTTCTATGGAAAAAAGATTTTAAATGAAATTATGTGATATGCATAAATGTACTGAATT
 TAAAGTTATTCAAGTAATTTGTTTTCTCAAAAAATGTTATCAATGGAGCTTCAAATAGAGAATTGCAGTGATTTTAAACA
 CAAGTCATTTCTTTCACCTCATACTTTAAGATAAATGTACTG

Sequências grifadas em laranja: éxons 1 a 7; Sequências grifadas em amarelo: primers.

APÊNDICE D - Sequência do gene ENAM, éxons, primers e SNPs

Homo sapiens chromosome 4: GRCh 37 (71494460 - 71512535)

NCBI Reference Sequence: NG_013024.1

```

TTTTTCATTAAGTTGTATTATCATAATAGCTGAGAGTTTCATTTGCCATTGTACCCAACTCATCTAAAATTCTGAATCCCCAG
TGACTGGATTATATTTGACTTCAAAAAGAACACTATGTCCTGCTAGCCTTATGTAATACAAAGTAAATCAAGTCACTGAGT
TTTCACCCATGGATATAACATTCCAGTTTCATTTTAATTACATATAAAATGTATATTAAGTAAATATATATATTAGCCTGCC
TTTGTGATGAAGGCAACTGACTTATGACAATAGCATACAGTTAATATTCGCCTTTGTTCCTGAAATATCTTTGTTATAAACA
TAGTTTCTATACTTTGAAAGCCAAATTCACCAAGGGAAGCATCTTCTAAATCTTACTGCTGTAAGCTCATTTTCTGGACT
GTTATTATACGTAATAAGAGACTTGACTTGACAGCTCCTATAATAACACATTCTAAATTTTAAATTTCGATGTGTGTTTTTT
ACCTTAAACTCTTGTGATGACAAAACCATTTTCCCTCAAAGCTGATTGGTTATGCAGGCTACAACAGTGCTTAAATGGAAC
CTTGCTGTGCCAAGCTTTCTGACAAGGAGGAATCTTTTATTTTGTAGCCTTTTGTACTGAACATGATATCTGAGTGAAG
AATTTTGTGTTTATTATTAAGAAATAAATGTATCTTGCTTCTTGAGATCTCCCTGGCTTCAGCAATTTGTAGTTATTTCCA
CTATAGACCATTAAAGATATATTTCAAAGGCAAGCTAAACAAAGTTCAAGTAAAAATTTTTTTTTATATATTACAGCTTCTA
ATTGGCATTGGTGAGTATTAGAGATTATCAACATAAATTACATATAGTGTCAAATAATGAATTTAATTCATAGATGTTGG
TTAATTTCTCCTTATTCGATTCCCTTCTGTTGGTTGTATAATCATTGTATGCAGACTAATCTTCTGATAAACTTTAACTC
TTGGTTTGTGTTGTTTCTTGTAACTTTTCCAGCCTTCTTAGACCTCCTTTACTACTGCTGCTTGTATCTGCTTAC
ATTTCCCATAGTGAAGTCTAGTTTGTCAACATCGCCCTAGAAGTATCTCAAAATACAGTGCCTGTGTCATTTCTCTCT
GATTTAGCTTTTCATCTACTTTTAAAGCAACAGAAGATTAACTTGATTTTGTGGCCCCAATAACAGGTATGACTGGATA
AAATAATTAACATGACATGTGCTGCCTTAGAAGTGAAGCTTTGCTATTCATTTTATTTGTTCCATTTCTATATTTTA
GTTCTTCTCAGGTTAAAGCTGTATTTTCTTAAAGGCTTATAAAAAATTTGCTGAAAAAATGTTGGTGGCTTCGGTGCAG
GCTTGGAACTCTTTTCTTAACTAGATAACTTGTTGAGTACTTTTCAATTTTGTGCAATACATACAGGTTCTCAAAC
AGATACTGTGAGAAATACACTTGAGAGGGCCAAACACTACTGAAATGTATCAGAAGACTCAAAGAGCATCTGCTTTCACAG
ATGGAATGGAAGAAGAACTTACACAGTCAATGTACTTTGTGGCAATCATTATGAGTGTTACTTTCAACTCAAAAAATAACT
AATTATAGACTTTAATCACTAATCTTTAGAGATGGAAGGGATCTCAGTCATCCAACATAATATATTAATTTTACAAAAGAG
AAAATGAGTTTTCTATTTGCAAAATATAAAGGCTACATATATTATCAAGAATCACTGTGACAGCTACTAGAGAGATGAGATG
AATGATTAAGCAAGGCAGAAATTAACCATCCAAAAGCACCTTAAATCTTGGGCCATAATCTTAGAACATTTAGCAAAGA
AAGCTTTCACAGTATTCTCTTTATAGTTTCCACATATTGTTGTAACCTATACTAAACACTCTAAAATAACATTCAGCTG
TTATTTTTCATTTCTATGATGTTCTAACTCTGAAATCTTTAAATAGTAGGAAAGGTTATTTACATACTACTGCTTCTCTTG
TTAATTTACATTTCTGCCAATTTTCTAATGTATGAAAGATAACTGATTACACCCACAATTTAGGAAAATGTCCATTATAAA
AATGCTAAAGCGTCATTTATGTTGCTCTATAGGAAGTAAACAGAGGGTGAGCATTTGGCTCCAATTTAGCTAGATAGATT
TTATGTCCAGAAAAGGAAGAAAGAAATGAAAGGAATGAAACAACAGTGTCTACATGTTGGTTACTCTGCTAGGAAATGG
ACTATATCTGATATACGATGAAATGAATCATTCTGATTAAACCTTTTATTTTCTCTATTGTATATGCAAAATAGAAAGT
TTTCTTAAGAAATTTACTCAAGTAAATGTTTCAGATAAACCTTGTTCGAAGATGTAATACGAGACTTAATTTTACAGTC
TTTCATAATTAAGTAGAGTGGGATAAATGAATGAACCCCGTTAAAAACAATCTCCAACTTCATACATAAGTCTATATGTT
TAATCAAGGTATCTAATAAAGAGATAAATTTACTATTCTGCCTATTTCCTATTTCTTCTATTTTCTGACCATTCTAGAG
CATAAAGTGATTTTGTGTTTGTGAGACAGAGTCTCACTCTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAATGGCAGCATCTTGGCTCA
CTGCAACCTCCTCCTGCTGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTGGCTGGTATTACAGGTGTGAGACACCA
CACCCGGCTAATTTTGTATTTTGTAGTAGAGACAAGGTTTCCCATGTTGGCTCAGCTGGTCTCAAGCTCCTGTCTCAGG
GGATCCACCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGATGGGATTAAGGCGTGAGCCACCGCGCTGGCCACATAAGTGATTTTAAAG
GAAGTGATGATGATGATAATAATAAATAACAGGAACAATAGAGGAAACAGGAAAAAATAAGATTCTGCATATTCCAGTTT
ACTTAGTCTCTATATAACAGAAATATATCTATAACATCTAGAAAGTAGCACAAAGTTTGTATTTGGAGTGTGCCCTCCT
TGAAACTGAGATTATCTGTACAATGAATGTAGTTGGACATCACTATTTCTTTATAAATCACTAGTAACTAGAAACCTCAA
ACCATTAATATTTCTATTTGGGGGATAACCTCCTAATTTCTAATTTTTCACATTTCTGGTGCTATGATATCTCTCTCTCT
CTCTCTCTCTGCTCTCTCTCTCTTTCCCTGTCTCTCTCTTTCCCTGTCTCTCTCTCACGCACACACACTTATATTTCCCTT
TTAATCTGACTCTTTTGGCAGCTTGAAAAGTACCAGATGATAACTATCTAATAGTTTCTTGACATAAAAATAAACTGGCAG
CAGGGGCCCCATCCATTTCCATACTCTCCTTGACAGACAAGTAGGCTAGTACTTAGATAAGTGCAGAGTGCCCTAAGCATA
CTATTTTCACAGACCAAAAATAAAAATCAATTTTATTCTAGGTACCAAAAGGCAAAATGAAGATTCTCCTGGTCTTTCT
AGGGCTTCTTGGTAATTTCTGTTGCTATGCCAGTGAGTATTTTTTAAATGTTAGCTCTTCTCTTTGTGTTCCGTTAGGAACA
ATTGTTGAGCTTATTTTCAACTGATGTTCTGCATTTGTCACTGACATTTCTTACTTCCAGATGCACATGCCCGAATGCCT
GGATTAGCAGTAAAGTGAGGAGGTATGTACGTTTCAGTCTCAGAGGAGAAGTTATCCAGAGTCCATCCTACACATTTAC
TAAAAAGGAGAATATTGGAATTTGTCTCATATATAATATTTCTTATGAAAAGGTAAAAAGAGGGAGATTGAAAGTCTT
AACTCTCAAATCGAGGCAAAGTAGTAATTTCCCGAGCCATCAGCTACCTATGTACTTCAGTGTCTCTTTTCAAGGTAGA
TGTGGATTTGTGTTAAATCTAGTTGATGTTACCTTATCTGCTAAGTTTTTTAGCTAGCAAAAGTGACCAATTGTACCAAG
GGTTATTAGAAGGTAGATGCTTAAAAATAGAAATACCTTTCACATGACTCATATCCAGATCATTAATCAAATTCATACA
TATCAGAAAGATGAATCATCTTGTACATAATTTCTATGTTCTCAATCCTGAACCTCAAAAAGAAATAGAACAGAACATTCA
AAAACCTTTACAGTAGATCAGACTTTTATTTTCTATGATTCTCTATTTGATTATTCTCAAAAATAAAATCTGACTTAAAGTT
AACTGCCTGAGAAGCTTCTTTAATTTGTATACTTTCTTAAATTTCAAGCATAAGTAGGAAAAGGTGATATGACTGTTGTGC
ATTAATAATCAGAAATTTTACACTGGGAAGTTCTAAGGTTAAAAAAGAAATTTTACTTATTTCTTACGATTTGTGCATTG
ATTTAATAAAAGTTTCACTTTGTATCACAATTAATGGATTCTTTTGGTTGCAGATGATGCGGTATAATCAATTCACATTTAT
GAACGGCCACATGTAAGTTTTCTTTATGTTATTTCTGATGATTCTTGTGTTATCTAGATAACTCCGTTATAAAGTTTGC
CTTAGTCAATAGAGACCAATCCACATGTTTTAAGTATAATGTAATCATTACAAAAGTTTCAAGGTGGAAAAATTTATGTC
CCTATCCTCTCACACCAAAATTTCTTATTTCTATTTCTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
TGTTATTTTATTTGAGACTGAGTCTCAAATGTATAGTCAAGAAAAGATGGTTCTGGGAAAATATCACATAAGATGTCACAAA

```

[illegible]

[illegible]

TATTTACCTAAGCCAGAGAGGCTCTTGCTGTGCTGGTAGCTCCACAGGGCCCAAGGACAATCCACTAGCTCTACAAGACT
 ACATCCCATCTATGCTCTTGACCTGGGGAGAACCAGACACCAGTCTCTGTATACAGACGGTAGTCATACCAAGCAGA
 CAAGAGATATCATCTCCCCAACAGCATCTACCAGGCCAAAGAAACAGCTCAGAGAAGAGGGAAAGCCAAAACCTTTTA
 GAGATGATGTGTCCACGCTGAGGAGGAACACACCATGTTCTATAAAGAATCAACTGGGCCAAAAGGAAATATGCCCTTTC
 CTGAAGCCAGAAATTTTCAATCAAAGAATACACCTTAAGTGTCTGACTGCTTGGTGTATCCTTAAGTTTTCTCCCCTCTCAGC
 AAGTTTTTGAAGACAAACAGCTCAATGAAAGAAGTGTGACCTTACTCTGAGCAGCTTGTATTGGTACACCTGATGAAG
 GCTCCAATCCAGAAGGCATCCAAAGTCAAGTCCAAGAAAATGAGAGTGAGAGGCAACAGCAAAGACCATCTAACATTCTGC
 ATTTGCCATGCTTTGGCTCCAAATTAGCAAAGCATCACTCTTCCACCACCGGAACCTCATCTAGCGATGGAAGGCAAAGCC
 CATTGATGGGGATTCAATTACGCCCTACTGAAAATCTAACACATTGGTTGAGTTAGCTACTGAGGAACAATTTAAGAGTA
 TAAATGTAGACCCACTTGATGCAGATGAACACAGTCCATTTGAATTCCTTCAAAGAGGGACCAATGTACAGGACAGGTAC
 AAGACTGCTTACTCTCAGGCTAGGGTTATCCAACCAAGCATTCTTGGGGAAGAGAAATCACTGACATTCTATACCA
 ATGTTTCCCAAAATTTTCCCAAGACTTAATTAAGTGTCTGACTGCTTGGTGTATCCTTAAGTTTTCTCCCCTCTCAGC
 AATAGGAGTAGCGACCCAGGTGGAGCTGAGATTAGGCCTCTGGGGATCACCAGATCTAGCACTTTCACAGATTAGTGCAGA
 CCTTAAAAAAGCAAGAAGGCCATGACCATCCCTGCCCTGAAACTTGCAAGTCACTTGTCTGAGTTAGTTCTCTTTTGTCTG
 ATGACTTCTTTTGTCTCTCAAAGTTCATCTGCAAAATTTGGTTTTTCAAGACTGAAAGGCAGATTAACTTTCCATTCTAC
 TTATGGAGATCCACACATCAGTATAGTCTGATGCACTGTACGTTTTTTGCTTGTGTTGATCTTGTGTCAGGTTTTTTTCTA
 CTCAATATTCTCTTCAAGCATTTTTTTTCTTCCACTGCCACTCTCTTACCTTTATCATTCTTTTTCTTAGCTTTCTTCC
 TTCTTTTCTCTCCCTCAACCATCTGTATTAGTCTTCTAATCCTCATCTTTTTCTCTGTATCACTTTCTTACATA
 TTAATATTAGTATTTTAAACATTTCTAGTCTCTCTTTATGTCTACCTCCTCCATTATGTCTTCCGTCCTTCCAACCTATC
 TGTCTGTCTCCCAATGTACCACTTATCAACTAATCCCTCTCTCTGATTCTTTCTTCCCTTCAATTTATCTTTTTTCC
 CTGTACACCATTTTCTATCTTAAGACTGCATGTCACTCTCTTCTTTTTGTATCCACTCTCCAAATCGTACCCTAAATTTT
 TCTTGACCCAGCTTAAACCATCATTACAGAATATATTTTGGAAATGGTAGACACTGATAGCTACTTTGTTTTTAGTTATCTT
 AGGGTCTCTACCAAGTAGACACAGTTCAGTTAGAGAGACGTATTTAAGGAGAAGGGAAGGCAGGATACCCAGAAGTAGCAG
 CCTAGGGAAAGGCTTAGGAAGATGGAGAATGAGGAAGTGAAGAACTGCCGCTCTGAGACTGCACATCCAGGAAAAAGA
 CTAGGACTTGGCACACACTGCCAATCATAATCCGAGGATCTGTAGAAGACATTTTGGGAAACACTGTCTTAAATAAAAA
 CTCAATGTTTAGTTGTTTTTTTTTTTTTACTAGTTCAGCATAAGGGATTCTACCAGTATGTGCTACTACTAACATTCTT
 CATGTCCATGCAGAATTACTTACAGACACTCTTCTTGGTATCTTGAATAAATTGTGTAAATTATTTTGAAGTGGATAT
 TTCTATATGCCTTGCTTATAATACATCAGGGATTATTATTCTTATTAATAACATGTTGGCTATTATCTGGATGTCCCTTG
 CCTAGAGCAGGAAAAAGTCTCAGAAATACCTAAAAACATACTTTATAACTTTAAGAGATTTCTTAGGATACATCTTCAGG
 GGCAGATTTTATAACAACATCTCAAAAATTTGGGGAACACAACGTTGAAACTTCTTAAGAAAAGGAATCTTGGCCTTGA
 ATCTTCTGAAGTACCTAGCAGAGTGTCTTCAACATAGAAGGTACCCAATAAATATATATCAATTCAATTTTTAATGACTTT
 CAACACTCCCATGAAAAACACCGTAGTCTGCTTTTCCGTAAGGTGACTGTCTAGGATGCTGAATGAGCCACCCTCCGTAG
 CTTTATATATTACAGCAACATTTCCATCATAGAATTTAGCGTTAGAAGGGATCTTAGAGGTAGATTATCCAGGCCATCCCC
 TACTGCTTACATTCCCTCCCCCTGGCCAGTTTTATATTTAATCACACATTGAAAAATTCATTAACCTTATTCTGTATAAA
 ACTGCTTTTTAAGAATTATCCTTTCAAAATAAAAAATGTTATTGTTTCACTAGTTATTTTTTCCAAATGATTTTTTTTGA
 TCTCAATATGAGTACTTTTATTACAAGATACTCACTTCAATTTTCCAAAAATGCATGGGTTTACATAAATGTTTTTGGCAG
 ATATGTTGACATATCTGAATTTATAAGACACTGTACTTAACTTACCATCTGAGATCGCTGCAATGTAATAAGTAAAAAGT
 ACAGTGTGACACTTTCCAAAGTCTGCTTGAAGTCTGCTTAAAGTGAAGTGCACGCTGGATATCGGAGGCTCAAAAGTAACTTGT
 TTTTGAATTTGAAAAACACAGTGAAGGAAGGGAATGTCTCTCCAGAAAATAACTGTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTTGGTTTTTTGTTTTGAGACAGAGTCTTGCCCTATTGCCACACTGGAGTGCAGTGGCACCATCTCAGCTCACTGCAAC
 CTCCACCTCCCAAGTTGAAACAATTCTCGTGCCTCAGCCTCCCAAGCAGCTGAGATTACAAATGTGTGCCACCAGGCATGG
 CTAATCTTTGCATTTTAAATAGAGACAGGGTTTACCATGTTGGTCTAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCA
 TCCACCTCCGCTCCCAAGTGTGGGATTATAGGCGTGAGCAGTGTGGCCGGCCAGAAAACCTTGTATGTCTATCAGCAC
 AGGTATGCATTTGCAACCTGGATACCATATGAGTTCCTTACAGTAAAGAAATCAATATTCTGTATGCTCTTGGCTAAG
 TTAATGATAAAGCTTTTAAAGTCTGCTTAAAGTCTGCTTAAAGTGAAGTGCACGCTGGATATCGGAGGCTCAAAAGTAACTTGT
 TCTTAGCATCTGAACCTTACCGCTACTACTACACTTCTGTGATGAGTTCCTACATCTAGTGGTCTATCTGCTGATTCTAAAC
 TAGCTGGATATAGTCTATGATGTCTTTAGTTGATAAGGTAAAGAAGAAGAAAAAATGTGAGGATTATAAACACAAGAGAT
 AATCCAGCAAGGTTGACACTCATCTGCTTTATATGACAGCCTACAGTAACTTCTCTAGAGGATGGTTGGGCATTAATCC
 AGGTGCTGGGGGAATCTTGCATTTCTCACCCTGACACAGGAAGCAAGTAAGATGACAAAATGTAGAGCCAAGCCAGAC
 CTCGTAACAGCCTAGTAGCCATTAGCATGGAGAGTCTTCTCTGACTTTTTTGGAGCACCTAAACATGTAGATAACATGTT
 TCACTTCGGCTCACTCATACATCCTTAACCTTTATACACCTTTAAAGAAAACGCAAGTAATGACCTTTGAGTTATTG
 TATTATTAAACATTACTCAGACGTATCTGACCCTCGTTTCTCTTCCCTCATTACCCAGTCGCCTTCAATCATGACC
 TTAAGGAACTGAAAAAGATTCTGACCTCAGGAAACCAAACTTCATTTCTAATAACTAAAAAAGAAACAGAAACGT
 TGGACTTAAAAAATCAACAGCTCTGTCCCACTGCCCAATCAAAAGTTGGAAGAAAACCTTCACTCGATGGAATAAGACGT
 TCACCATTTCACAATAAAATATAGCATTAGGTTTTTCCACATGCGCTCCATGTGACTCCACCTCACCCCTAGTCCAATA
 ACATCAGCCACTGAACTTTTCTTCTTGCTTTGAATTTACAGTCAATTAGATTAGAAAATAGGATTCACTGGTAACAAGC
 AAAATTCATGCTGGCAGAGGAAAAATTTTCAAAATGAAGAGCGAAGAGGAGCTGATCTGTAATTTGACAAAAGATATAAT
 TGTGAATAGATAAAGCTATTCTCAGGATCCCTTACATCCGAGGAGGTCCTGTGCTCTCATGATGCGCCCACTTCAATC
 CACCTGAGCACCCAGCAACTTCCGTTTCTGTGCTCATCAGAGCTTGACCAGTAATTACCTCTGAGCTTACCCAAATAACC
 TTATCTCATTCCTTTCTGCACTATATAAAGCTTTTACTCTATTGCTGATGAATATAATTTTTATCTGGCTGATGCGGAATG
 TGCTTGGTTGGCTTTACTCTCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTGGAGACAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGCATCTGG
 GCTAATTGCAACCTCCACCTCCTGGATTGAGGCGATTCTCTGCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACACGCACCACC
 ACACCCAGCTAATTTTTGTATTTTGTAGTAGAGAGGGGTTTACCATGTTGGCCAGGAGGCTCTGATCTCTTGACCACGT
 GATCCGCCCCCTCAGCCCCCAAAGTGTGGGATTACAGGTATGAGCCACCGGACTGGCCGACTTTACTCTTTTTTTGTT
 TGTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGACGGAGTTTTGCTCTTGATGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGGATCTCAGCT
 CACCGCAACCTCTGCTTCCCGGTTCAAGGGATTCTCTGCTCAGCCTCTCGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGGGCCAA
 CACACCAACTAATTTTGTATTTTGTAGTAAAGACAGAGTTTCTCCATGTTGGTCTAGGCTGGTCTCCAACCTCCGACCTCAG
 GCGATCGACCCATCTAGGCCTCCCAAGTGTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCAGCCGCGGCGGCTTTACTCTTAT

[illegible]

AAAACCACACTCTAGATTAAAGATCAGTCAAGAATGGATGTATCTTTAATACACCAAACTGGGGTTTCTACTGAAGCACC
 AGTGTCTTATGCATATCCCTAAAGAACTGAATAATCCGTGGAAGTCATTAAAGATGACTATTACCAGAACAATTCCTT
 TTCAAGAAACCAACTCTTACTAATCATCTTCCCACCTGTTTTAAATTCAGAGTTAGCATTACTTTCCATGGTACCTTTAA
 TATATATGTCAATTGGCCTTGGCTTTCTGCCATAAAGTTTTATGTGCCATGATAAACATGGTATTTATCAGGGGGGATTTT
 GCCCTTTTATTTAATTATGGGTATAAAATGGCAAAGCCCTCAAATATGTACATGTATAGTTCTGTGATTAAATGCTTCA
 TTACATCATACTTACAAACCATTCATCAATAACAAAGTTAACTTACGTAAAGAAAGTTAACATAAGGAACTTTTTTCCAAC
 AAATTATTTACACACAGGTATATGCTTATGAATCTATTTAATTGCTCAGACTGTGCTAGAGAATACGTACCATGAAATACAT
 ATATTTTATAAGGTTTCAAGTTACAAAAATGGATTGTTTTCAAATGGCAATTTCTTACACTAACCTGATTATGAAAAAAGAAGT
 CTGTATCATCTGCTTCCAAGTCTGTTATGTCCAAATATATTTTAAATATGCATTTATTTTGCTACTTTTATAAATATTAGA
 GATTTACACCTTAAATTTATTTTGTAACTAGTTCTAGAACATGTTTTCCAATTATTATTTTCTAATGGAGACATATAATTG
 ACCATATGTTTATGCATATATGTTCTCTACACAGTGAACCTTTTTTTAAAAAGAATAGTAAAGAAAAATCGGGAAGCTCTGGC
 TCTCCAAGGCAAAGTCAAAAAAAGCGGGGGAATGCGAGGAACATTTTATTACACCTCCGTGATTTTTCAGTCT
 CTTGAGTTTTATTTTCTCCCTTGTGTTATTTGTTTAAATGCTAGAACTGTATTCTTAAGAGAGCATACCTCTTTCAGGTGA
 GCATGATAATTGGAAGATTTTGATACTTAGAGTATGAACATATAATTAAGAAGTGATTACCTAATAAAGATAACAATGTGA
 CTATTTTAAATTTTGGTGGCAGGGAGTTGGTTTTACATCACCCAAAAAAGCCCTGGTTTTCAAATTCATTGG
 TAATAAATATGCTAACTTTCTGAATCAAAATGGAGAGCCTCTCAAGAAAAAGAGCTATGCAGTCAGCAATGACTTAAATTA
 GTCAGGATAGCAGGCATCTGGGGTTAAGGCTGTTTCCACCATTTTGGTCTCACCACCATATACGAGTGGGACCACAGCTGT
 GTAGCACTTGTTCCTGTCTAAGTGTAGCAGGTCTCTGTAGCACTGTCTTATCATCACAGATATTGCTCTGGGTAGCAGTAA
 TATCTGATTATCCAGTCCACTTCTGTAGGATCACATTTTTCAGCTGAAAAAGCAAAATATATGTATTGATGACAAATCCCTC
 AAATGCTGTCTCAAAATGTGACTACACATTTCAATCCAAATCAATTAGTTCTTGCAGCTCTGACATGACAGCAAGGGATG
 ACTCCTTTTCAGACATAAGCAGCTCTACAATACAGAATAGCTTATGGGATTTTCCAATCTTAAATATATATAGTTGAAAGT
 AAGCAATATAATTAATGATATGATAATATGATTGTTTTATCTACACCATACAGCAATTTCTACTGTGTAGGCTTATTTCC
 AACTGTATATCTGTCTAAACAAGTTATTTATAGTGACAAGAAAGGGAGAATTTTTAAAAAATTTGATGTTGGAGTCTGTCA
 TTTCCAAAGAAACCTGCTTTTTTATAAGATCAAATCCACTTATTGAACTATTAAGAGAAATTTGGCTTTCTATGAATGC
 CAATGATTTTTTCTTTAGAAAAAATGTATAGCTAAATTTATCTGTGACAAAGTTTTATGAATTTATGATACCTAAATTA
 AACATAGGAATTAATGTATTCAAAAGTTCAGATTATGTTTGTAAATGTTTATACTCCAACATATTTTTAAAAACATTCTTA
 CTAACAAGGTTAAATTAAGCTATTAACCTCCACATCTATATTACTATGGAAAAAATATATCTTACAGGTCAGACAAA
 TGGTACACAAATCTGGTTCTCAATGGTGAGGTGGGATCAGAGATATTCTCCCTGTTGTTTCAAGAGGAACACTAAAAGAAA
 AAAGAAAACAAAGTTAAACAATGAAATGCAGATATTGTTATTTTTGGTAATGAGTATACGGCCACTATTTTCATCAGAACA
 GTACTTATTGTATTTAGTACTCTATAAGCACTCTAGAGTAATACCGTTACTCAGATTTTATAGTAACCTGCTATATTTTA
 AATATTTCTCATTCAAATAAACCTCACAACAACCTCGCTGTCAACTATCTTTGCTGACTTGGCAAATTTTGGCTTTTCCCT
 TTAACACTCAACTCAGTTTTTACCCTCTGTAATAATTTATTTATGATGTTATCCCCACCCTTCAACAAACTTCTTCTCTGCAG
 TCTCATTAATGCTCATATATATTTTATATATCAAAATGCCGTATCATAGTTGCTTGTCTACAGAGTGGTTGCTTCCCTGGGC
 TATGTAAGTTCTTTGAGGCAAAAACATTTATGTATTCCCAGTGCCTAGCTAGGTATGTGGCATATGGAATATGTTCAATAT
 ATGTGAAATGGACAGACAGATATTATATCCAGATTTTAGAGGAGAGGAAATCATAAATAGGAGAGGTTAGTGATCCACCC
 AAGTTCACACAACAATTAAGTAGCAAAGCTGGAACTTTTTCATCGTGATGTCCCATGAAAAATTAGATGATTGTCAACGAG
 TTCAGGTGATTTTCACTTAACATTTTTCATCTAAGTCACTATCTTCTCATGTGCAGCCCTCCCTACCAAAAGG
 AACACAAAAACCTTGTGTTTCTTAACCTCAGTATTTTAAATACCATCCAAGCAAAAACCTGGCTATCATCTGCAATCC
 TCCCTGTCTACATATCTAATCAATCTCAGAGTCCAGTTGATTCTAATTATTTTCATGTGTGAAATCCATCCACTTGCCTCT
 CTTCTCATTATTACTGCCTTAATTCAGGACACCCTATCCTCTCCTAGATTGTAACAATGTCTTCTTTTGTCTTGACCCC
 TTCAAACCACTGGCCACATTATTGCCAAACATCCTTTCTAAAAATGCAAGCTTAATTTCTCTCTGCTTAAACCTCTAG
 TGTCTCTCCACAGATAACAGGGTATCCTCAAATAGCATAGAAGGCAGTATCCTAATATGCCCTAACCTCCAGCTTCAT
 CTCTCACAATGTCCACATCTACAATGCATGCCAGCTGTAACAATCACTTGCAATTTCCACAAACGTACCATGCTTTTCTCA
 TCTCCCATCTTAACAATAACAGTTCTAACATATAACTGGTTACAGTGTGCCTGGTACTATGCTAAGCATATTACGTGAT
 GATCTCATATAACTCGTCACAGCAATCCTGTTCTTTCTGGAATGACCTGCCCCACCTATTAATTTCTCTCACCACCC
 ACACATTTAGCCAGCAAACTCCTATTGAGCTAACAGCCATCATCCATCCCACCCTTATTCCAAGCACCTTTCTGCTC
 CCACTGCCACCCTTCTCTCTCCCCAGGATTGGACTGGGTGCCCTCCTCAGTACTCCTATAACAACCCATGCCCATTTCC
 TATCATAGCACTTACAATACAGAATTGTAATTGCCGTTTAAATGTTTACGGTTTCTGTTAGACTATAAATCTTTTTAAG
 AAATGGACTATATTTTAAATAAATCTGTTTTATCCCCACCACCAACCCTTAATATTTGGCAGTTACTAAATAAACATTCGTT
 GAATGAATGAATGAACTATTCTTAATAAGACTGTAAAGACTCTAGTAATATCAGAAAAAGGAGAGGCTACTATAAGCCAA
 AACTGTTCTTTTATGAATTATTTAATCTCAACCCCTATAAAGTATATGTGTATAAATTCATACATGCAATAATT
 ATCCCTTTTTTTAAAGTTTAGGAAAAAGGCTAGTTTAAGTAACTTGCCCAAGTCACATCATTTTATGTAAGTAATGGAGTTG
 GGAATAATACCATAATGGCAGGCTCGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACCTTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGGAT
 TGCTTGAGGTGAGGAGTTCAAGCCCAGCTTGCCCAACATGATGAAACCTTGTCTCTACTAAAAATACAAAAATAGCCAGG
 CGATGAGGAGTGATATGTAGTTCCAGCTACTAGGGAGACTGAGGCAGAAGAATTGCTTGAACCTGGGAGGCAGAGGTTGC
 AGTGAGCCAAGATCATGCTACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGTGAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAGCCAGGACGGTGGCTCATGCCTGCAGCTCTCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGCAGATCACCTGAGGTCA
 AGTGTTCGAGACTGCTGGCCAAACATGGTGAACCTCATCTCTACTAAAAATAACAAAAAATAGCTGGGCATGGTGG
 TGCGTGCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGTTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGTAAGC
 CAAGATCGCACCCTGCATTCCAACCCGGGTGACAGAGGGAGACTCCATCTCAAAATAATGATAAGAATAATAATAAAT
 ACCATAATGGCACAGCAATGGCAATATACTTTTCAAGAAATCAGAACAGAAGATCAACACATCAGGCAAAGTGTGATGAAATA
 TCTGAATTATCTGATTTCAAGTAAACAATGTAATATAAAAAAGAAATCATTTTCAATAAATAAAAAAGATGAATTAGAAGATCATG
 GAGGAGATTTTAAAAATCTCCTGGAGGTTTAAACGTAAGATAGACACTCTTCAACATGGCTTAAGTGCCAGTGTGATGTAT
 GCCATTCTTTCAATTACCCACTACTCCAGCTATTTCTATCCCTAACACGAAGCTATGTGGGCAGGATCTGAGTGGTCAAAG
 AAAACCTCCTAGAGGAAGTGAATGGCTGAACTAAGACATGCACATTTGAGAAGGAGTTAACTAGGCTAAGAGGGGTGGGACAG
 AGTTCTTCAACAGAGGAACTAGCAGATGTAAAGCACTGTGAATGTGGGGAAATAGAGACACTACAGCAGTGTGATTTT
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGAAAGTCTCGCTCTTGTCCCCAGGCTGGAGTGACAGCAATGGCATGATCTTGGCTGACTGC
 AACCTCCGCTTCCGGGTTCAAGTGATTCTCCTGCTTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCACCTGCCACCAGCC

CGGATAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTCGTCTCAAACCTCCTAACCTCAGGTGAT
 CCACCCGCTCGGCTCCCAAAGTCTGGCATTACAGGCATGAGCCACCGTGCCAGCCCCAGTAGTCTGAATTTTTTAAA
 CATGAAGTAAAAGAAAAGTGGCAATGGATGATCTTGAGAGTTATGCTAAGCTTTGTAGATCAGGCCAAGGCATTTGTAATA
 TATCCTAAGGTCAATGTTGGGGAACCATCACAAGACTTTTAAAGCAGGATGGTGACAATAATTGGGCATAGATTAGGTGA
 ATAAATAATAGTAAATATTTTTTAATATGTCCAGAAATATATAAGCTCTAAAAGGAATATTCTCTATTTATTTTTACAAT
 AATCCTATGAGTTAAGCATGATTTTTTTTCTCATTTAAAGATGAAAAAGTTGAAGTTCAAAGTAGATTAGTAACCTGCATA
 CAAAAACACACAACCTATTAAGTGTCCAGACAGAAGCTTAAACAAAATTCTTAAACACATTATACTTTTTCCATTGATTGA
 ATGGAATGGAATGCTCTGTTCTTTCTATAGGAGATTTGATTGGGGAACCTATTAAGGTAGGAGTGGTTTACAAGGAA
 AACTTATAACTGATTGGATCCAATAGAAATCTAATTTCTCAAATAGTATTAGCATCTCTGCTATTGAAAAAGAGCTGTATA
 GCATATAACTCTGGACTGTGTGTGAAATGAAATGAATATCTGAAATCCAATCTAAAAGTGAGATCAAATCAAATTAATGTG
 ATCAGTCTGCCTTATCTCGATGCAGACATCTGGTTACAGTATAAAAGACTCAGTTATCTATATATGGTACAAAAAAGGCT
 TTAGTGGTTATCTGAAGTTTCAGTTTGAAGTCAATGATCAAAGGCACTGAAAGTTCTGATTCAAAGTTGAAATAGGCTGGCCAGGC
 GTGGTGGTTTCAGGCTGTAATCCTAGCACTCTGGGAGGCCAAGGCAGGAGGATCGCTTGAGCTCAGAAGTTCGAGAACAGC
 CTGGGCAACATAGTGAGACCTGTCTCTAAAGAAAAATAAAAAATTATCCAGGTGTGGGTGGTGCATGCCTGTAGTCCCA
 TCTACTGAGGAGGATCACTTGAGCCTGGGAGTTCGAGGCTGCAGTAAGCAGTAATCTTGCCACTGCCTCTAGCCTGGGTG
 ACAGAGTGAGACCTGTCTCAAAAAACAAGCAACAAAAATAAATGAATAGAAATAACTCCATATAAACAGTGCATGTTGAT
 GACTAGATTACAACCTTTGTTTATAATTTGATGTAGCCACTGATTTTAGATTGGCTGTAATCTTTCATTCTTACCCTAA
 TTTCAATAAAGTTGCCTCAAGCTCATTCAAGACTCAATTCCTTACTCATGTAAAGTGCTACACAGCAAAAAAGGGAGTA
 AAGAGGCAGGTGTACATTCAAACAATGCTCAGTGTCAAGAAAGTATCTCTGCTTAGAACAGGAAAAAGGAATATGGAAAT
 GCCACATACATAATTCGGATGTTTCTCTCCACAATGTCTCTATTAGGATCTTCGGAAGAACGGATGATCCTGGAAGTAATC
CGGGCACACTTACATTTGTTGTCAACAAGAACAATCCTTTTCATCTTCTTGGGCTTGAAGGTAAACGTATTAATAAAGAAAG
 GAAAACAAAGGTCAATTTATATATTTTTGTATTGAGTTATTTTTATCTTCTTGCCCTGCAGAAAAATAGTTTTATGGTTGGTT
 TGCTCTCAGCTTTCTCCATTTGTTCTCTAAGCAGAATCTTACATCACAGTAAAGGAAATCCAAAGGTACTCTAAAAGGGATT
 TTCATTTTTTTCTGAACAGTCTATGGGAATCTGGGTGAAAGAATTCTGATTTTCGCATCCTTCTTAACTCTCATTGT
 TACTTAAATTTTTTTGTATAAATTTGATTATAGTTAAGAAGCAGGATGTTTTTCATCCAAGATAACCTTATTTGTAGAC
 TTTTAAATATTTCTTACCACAATTATCTGCCTTTTTCATAATAACAATCAGATTATCATAGTACATGATTCAATTTAAAAA
 AGGCTATATTTCTTATAAGAATTATTTAAGCAGGGCGCAGTGGCTCATGCCTGTAATCCAGGACTTTGGGAGGCCGAGG
 CGGGCAGATCACAGGTCAGGAGTCAAGACCGGCTGGCCAACATAGTGAAACCCCATCTCTACTAAAAACACAAAAATT
 AGCCGGGCATGGTGGTGCATGCCGTGTAGTCCCAGCTACTCAAGAGTCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCTGGGAGGTGG
 AGGTTGCAGTGAGCCAAGATCGTGCCACTGCCTCCAGCTTGGGCAACAGAGTGAGACTTCATCTCAAAAAAAGGAAAA
 AAAAGAATTATTTTAAAGATAGAGTATATATAGATATAAAGTGTCTGTAATTTGCAAAAGCAATTTAGAAATATTATGAG
 GTACAATCTCAATTGAATATGCCGTGTATACAGAAAAAATAAATGAATAAATACACATATGACCATTAAGCCTT
 AACTTTGAATGTCAACATTTATTTGTCTAATCTGAATATTAGACAAAGAGGTCTGATAAGTTGTTTGTATTGTTGCCAGAAT
 GTCTCACTCTGTCTCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGCATCTCAGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCTGGGTTCAAGTGATT
 TTCTCCTCCTCAGCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGTGTGCACCATCACACCTGGCTAGATCTTTGTATTTTTTTTTTAGC
 AG**AGATGGAGTTTACCATGTTGCCAGGCTGGTCTTAAACTCCTGACCTCAAGTGATCCACCTGCCTCGAGCCTCCCAA**
GTGCTGGGATTACAGAGCCACCGCACCTGACCTTGATAAGTATTGCAAGGAATAAACAAGGAAATTTGTATCACTGGG
 TTTGGATCAATTAACAGATTTTATTTTAAATTTTATTTTGTAGACAGAGTTTCACTCTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGC
 GTGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCGGTTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAACCTCCCAAGTAGCTGGGATTACA
 GGCATGTGCCACCATGCCAGCTAATTTTGTATTTTGTAGTAGAGACCGAGTTTACCATGTTGGTTAGGCTGGTCTCGAA
 CTCTGACCTCAGGTGATCCACCTCCTCGGCCCTCCAAAGTGCTGGGATTATGGGCGTGAGCCACCACGCTGGCAAATT
 ACCAGATTTTAAAAATTCAATAATAGCTTTACATAAGTAATGCTATTAAATAAGAGTGCTAATTAATAATAACAATGATGT
 TGGCCGGGTGCAGTGGCTCACGCCGTGAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGATCATGAGTTTCAAGGATTCCA
 GACCAGCTGGCCAATATGGTGAACCTCCATCTCTACTAACAATACAAAAATTAGCCAGGCATGGTGGCACAAC**CTGTAA**
TCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGAAGAACTCTTGAACCTGGAGGTGGAGGTGTCAGTGAAGCCAAAGCTGCACAC
 TCCACTCCAGCTTGGGCAACAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAATAATAATAATAATAATAATTACAACAATGATGTTAAA
 TATGCTTTATTCATATAATTTTAGCTAAGTGACCTTTAACAATTCCTCTCATTAGCCTCAACTAAAAAACAATTTAG
 TATACGAATTCAAGTTATAAAGTTTAAATGATCAGAATAGTTATAATTTTAACTGGAAGTCTATTCTGAGACGATTCCCA
 GAGCAAAGAGGACCTAATGCAGTATTTTCAATGATAAGAGCCACTACAAAAACATTTTAAAGACCATTGTTATTGTA
 CTTGTAATTGTTGAAGTACTTTATAATGCATTATTATACCATTATTATACAAAGTTTCTAATGAATCTTCTGACACTGTGTA
 ATATTGGAAGAAACATTATGGAGTAAATTCAGGTAATGAAATAACTCATTACATCTGAAAGAGGTAAATGACTTAA
 TGATGTCCTCTTTCTCATTGTGTATCCATGACTTTAAAGATTTTCTCAATGAAATATAAATGAGCACAATAATGGCTG
 ACCAAAAATATAGATTGTTGAGGAGTGACTTGACTATTAAGTCTTAAATAGAAAAATGTCTATATTCTATTACGGCATATGA
 TTACTTCTTACCAGAAACCTGGGAAGTTAATATAGAAAAATATTAGGCAGCCTAATATCTATCAGAAATACATAGCTGTC
 AGAAAAGTTACAAATACTTTCAATTCACCAAGACTTAGAGTCTAGCATTTGCTCTCACCACAGGCAGTATTTTTCTTAAC
 AAACCTGTTATTAGGGACTGTGCCTTACTTTATTTCCAAGAGCATCTGACACATAGTAGGTGTTCAATAAATATTTGTTAAA
 TTTAATTCACTTCAACAAATAAGAAAAATAGATTTAACAACATATGCTAGATATGACCATAATGAGTTTACTAAAAAGTGA
 TTTGCTTACACAAGGCAGAATAGGATAGTAGGAGTGGGGCTATAGGGTCAGATTGCTGGGTTCTGCTTACACTTGTCT
 TGCTGTATGACTTTGGTAAGTTACTTCACCTCTGTAAGTCTCAACTGGCTCAACTGTATGTGAGAAGTAATAATAGTATTT
 ATTCTCATATGGTTACTGAGAGAATTAAATGGAATATTATATGTAAAGGAATTAGCATGATACCTAGAATATCATATTAG
 TAAGTGATAGCTGTTTATATACAGATGGTCCCCAATTACCATGGTTCTACTTATGATTTTTCTACTTTATGATGCTGTG
 AAAGTGATATGTATTCAGTATGCTCCTCAGCTACAATGGGGCTACCTCCCTATAAAGTCACTGTAAGCTGAAAGTATGATA
 TTTTCAACTTTCACTTTATAGGGTTTATAGGGAAGTAGCCCCATTATATATATCATATATTTTTTAGATATGTATATATAC
 TTACATTGTACATGCTTTACTAATATTTTATATTTTAAATCATTAGAAAGTTATTCTTAATGTCAAAATAGTATAAAATAT
 ATATATAAGGCCTATTCTTAATCACATTTCTGTCAATTATTCATCTTGAAATAAGAACCACAGACTCAGTGATAGGAACAAT
 CCAGACAAATTTTGTGTCTTCTTAAATGAAATTTATTAATACTGTAC**CTTAAATTGAGAATGTATTCCATTTT**CTG
 AAGTTGTTTGAAGATCAGTAACAAAAATAACAAAAGTTTCAAGTCAATTTATAGGCAACCTGTATAACATTAAACATTG
 TTAAGGGTCATAATAAATCTGTGGGATCAGATCCAGGAAAGCTGTTAAACCAATACCAGCCTCTTTGGGGAATAAAT

CCCAATGCATTCCATGTTGTACTTACAGTAATTATTATTTTCATTTCTCCAGAATATTAATTTAAGAGACTCAAGGGAAGGA
 TTATAGATTTTTTAAGATTCAATATGGACATTCATATAAGCAGGACTATCTGTAGTTAGCTAATTTCTTATCTCTAGTTTG
 TAGTAGGCAAAACAAGTAAGTAAGATAAGAGAAAAAGAATAAAAAGAGTCTTATCTATGTAAAGACAACCTGCCATAGAAAG
 ATGAAAGCATGTTAGGAAAAAGTAGCTGGCTAACTGGCCAACCAAGCATAGGCATAAATGTTTAAAACTGAAAAACAGAT
 CTGTCCATATATTTTCTTTGATCTGGGATCATTTCATAATATCACATACCTTTCACATGAACAGCCTTAATAAAAAACCG
 CCAGGACTCCCCAGAAAAGCAATGGTTCTTCATCTTGACTTCACCTTCTTCTGAAAACTGGAGCAAAAAAGTCAGGGTT
 AAGGTGTGTGATCTATAAGGAGTGTGCAAAATGATGGTGCTTCTGCTTTCTTAAATAACACTCCAGGCAGCTAACAACTA
 AAAACAATCACAACTGTGGTTGAAGTCTGAAGTTTAAATGCTGAAGTGGAAAAATGTATGACTCACATTTAAGTATTTTCT
 TGCAAAGCATCCAAATAAAAACCATAATTTGATACAAATCATTTCATTTTATTTTGCATTTTACACTATATAAATGTTTAAACCAGA
 AGACTAATAATAATTTCAAGGAAGGATTCATTAAGAATGTTGAAATAGGGATTTTCCATTTTATTACCTAGATATATTCA
 TATTAGTCTTCAAATCAGACATCTGACACTTGTCTAGCTTAGAATAATAAATGAAGGTAAAGTGAAGGAGGAGAGATGAAGG
 AAGGGGAGAGAAATGAAAGTCCTTTAAGGTCCCAAGTGTATCTTATGTTAATTTTTTATAGTCTTAATTTAACCAGGC
 TACCAGATTTAAATATATATTTTGTATATATCTCACAAAATATGTATTTTGTATATATCTCACAAAATCTGTATTTTGTAT
 ATATCTCACAAAATCTGTATTTTGTATATATCTCACAAAATCTGTATTTTGTATATATCTCACAAAATCTGTATTTTGTAT
 ATATCTCACAAAATCTGTATTTTGTATATATCTCACAAAATCTGTATTTTGTATATATCTCACAAAATCTGTATTTTGTAT
 ATATCTTACAAAATATATTTTGTATTTTGTATTTTGTATTTTGTATTTTGTATTTTGTATTTTGTATTTTGTATTTTGTAT
 CTGGCTGGGCGCAGTGCTCACACCTGTAAACCTGCACTCTGGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACTTGGGGTCAGGAAT
 TCAAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAATGAGCTGGACATGGTGAAGGCGCTGA
 ATCCAGCTATGCGGGAGGCTGGGGCAGGAGAATCGTTGAATCTTGGATGCAAGAGGCTGCAGTAAAGCCGAGATGGCACC
 ACTGCACTCTAGCCTGGGTGACAGAGGGAGACTCTATCTCGAAAAAAGAGCGGGTATATACCAGA
 TAAATAAGTTGCCATATTTAATTTGATAGCATTAAAGACGGACCTTCTGTCTAGTTACACCTTTCAGAAATGCAAAACCAT
 AAGATGATTTTTGAGATGCCTCAAAAGCAAACTGAATCACTGCAGTATTTTGTGTAAATTTTTTCTCAATTAATGTC
 ATTTTTTTTAACTGAGCTTTTGGACAGAGCACCCCTGCACTCCCCTCCCAACATGCTGGAATTTCTGTCTCTTAGGCAA
 GGTGGTTCCAAAGATATGCTGGTTACACAACAGCATCAAATCCGTGTTACTTCTGGTTCTCAGCTCTAATTTTGAAGGG
 ACTCCTAGAATTTTAAAGGTAATTAGGAGTACTTACAGATCATAAAGGCAAGCAGACTTCAAGCTAGAAATACGAA
 ATGACAGGATGAAAGAGACATTAAAGGCTAGCACATGATTGCACCTTCTCAGAGTATGTATTGAAAGTCTGTAAGAACAAA
 GTGTCAGGCACTGTCTACGCAATATTACTATACTGTCCAAGTTTATTTCTATTTTAAATTTCTACTATCAGTAGGACTTAG
 CACTACTTGAGTTTAGGAAAATATACTGGCATCACATGGACAGTTTATTAAGAAAGAAACAGACCTGAAAGCACATTA
 TTTTAGTTTGTGGTCAGGAGGTCAAAACAACATCAACCCTCTAAAAGATCCTCACCCCACTGAAGTTTCTAAATAAC
 TGACTTATTCAATCACTCAAAAAAATAGTAATTAATAGTCAGCTGGATACCTTTTTAATTTCTGAAAAATAAACTCAAG
 GCTAGACTGCCTTCCCAAGCAAGTTGAGTAACTCTTGGGAACAAATTAAGAACTTCTCAAAAGTTCTCTTTTATAAC
 AGCAAAGATTTTAACTCATAAATTAACCTAAAGAAAGCTCTATATTTGATATTTTCAATTTTCCATCTTGTCTTTT
 TTTTCTTTTGTAGATGGAGTTTGTCTTGTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGTGCCATCTCGGCTCACTGCAACCTCC
 ACCTCCAGGTTCAAGCAATTTCTCTGTCTCAGCCTCTGAATAGCTGGGATTATAGGCATGTGCCACCATGCCAGCTAG
 TATTGTATCTTTAGTAGAGACGGGGTTTCTCCATGTTGTTTACGCTGGTCTGGAACCTCAACCTCAGGTAATCTGCCTGC
 CTCGGCCTCCCAAAGTACTGGGATTACAGGCGTGAGCCACTGCGCCTGGCCAATCTTGCATTTTTATATTTTCGATTATGTA
 AACTATAAATCTAAATAAATTTGCGTTAATAAAAAAAGAGTGACACATTTGTCTATTAGAAGAGATTACCTATGCTGGC
 AACATAGGATCTGGACTAGTGTGTTTGGCTTGTGTCTTAGGATCACTGACTAGAACCCCTTGTAGTCTGGTTAAAT
 ATGGATTTCTTGGTAACACTCAGAATTTCTGGAGATGTGACCTTGGAAATATGTATTTTCAAAAAGCATCCAGTTGATTCT
 GATGTGCACTGAAGTTTGAAGCAATGGAAGAAAGACTGGCCTAGGCAGGAAGTAAGGGAGTGCAAGAACTAGCAG
 CAATAACTATTTATGGAAGAACAAGATTAATAAAGGTAATTTTTTAAATAAATAGCCATACTGAAAAGTTAGCTGAAGTT
 TGTATTTGCTTATAATTCATATAGGTAAGCTGTTGCATATTTCTTTTATCATTAACCTACTATATACAAATACAAGTTCC
 AGTTTAATTTTAAACCACTTCTTTGCCAGTTTGTATGTTTGGCCACTAAAAAATGTCAAATGTGAATAGTAGAAC
 CTTTACATGTGTGTTAAGTGATTGAGAATTTAGCCATGTGTTCTAAATTTCTCAGCAAAAAAGAGGCTTATTTTCTATA
 CTACATTTAAGATTTGTGTAGTAAAGATTCAGTGATAGACTAGATGAAAGAGATCTTAAAGTATTTATTTAGTCTC
 ACCTTCATGACTCTCAATTTTTTTTCAATATTCTATATAACGAATTCAGCATTTAGTTGAAAATCATCCGAAATAGTTGG
 ATGCTCCACTCCCTGTGGACACAACCTCATTATATTTTGGGATATTCAAATTTGTGACAAGATTTTATTTCTATGGGACACAG
 AGAATGTAACCTCCCTGTTTCTCTCTCTCACTGGTGACTCCTTCTGGGTCTCTTGCCAAATTTTCTCTGAATATTGAG
 GACATCAAGGCTTAATCCTCATCTTTCTATTCTCTTAGCCTCTCCTTAATTAATTTTACCTTATTCCATGCCTTTAAACA
 TAGGGCACACTGAGGACTCTCAAATGTATAACTTTTAACTTTTACCTTGCCATTGAGTTCTGAATGCCATGTCCAACCTT
 TTATTTTATATCTCCATGTAGCTATCTAAATGGGTATCTAAACTTAACCAGGTAAACCGTATTTCTGATGACCAATCCAT
 CCTCACACTCACATACCAATCTCTTCTGTCTCAAGTTTCTCCCATCTCAGTAAATGACACCTCCATCTACTCAAGC
 CAAAATCCTCTTCTTTGCTTCTTTCTTTCTCTCCCTACATCCAATTTACCAGCATGACCTGTGCGCTTCTCTCCAA
 AACATATCCCAAATTCATCTGATTCTCTCCGTTTTCTACTACCAACCTAGTCCAAGCCTCCATCTCTTTCTCTGGACTACCA
 TAATAGCTTCTATAATTAAGTAAGTAACTTTTCTTTCTCCCTCAGCATTTGGTGACTAAGGCACACAGATCATAAACAAGAAATG
 ACTAAGTACCACAAATCTAAAGCAAGCCAAATATTTCTCCTCAAGGTTTGTAAAGAGGCAACGAAGCCAGACACAGTGGTGC
 ATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTAAGGCAGGAGATCGCTTGAGGCCAGGAATTGAAGGCAAGGCTAAGGAAGA
 TAACATGTTGTTCAATGTATAACTATTATGTACACATAAATTTTTTCTTAAAGAGGCAACCAAACTCAATCTACTTCT
 CATCAACCACCCTCCACCGCTCCCATACACTCCCATCTCATCTTTAGAAGACTAGGGAGGGAAGAGGGGGATGTTATAA
 GAGCAGCTGTTACCTTGTGAAATCATAGTGTGTTGTAATAAGAGACTCCACACACATATCCACCTCGCTTCAACCTTGG
 GAGAGTAGAGAGTAAAGGTGGGGCACCTTCTCTCCCGAGATTCAAGTGAGGGAGAGTTTCAAGAAAATCACCCAAGAGAT
 CAGGGACCCCTAAAAGCAGGGGAGATTGAGAAGCAATATAGCATAATAGTTAAGAGAAAGGGCTCTGAACCTGACTGATTGG
 GTTTATCCCCAATTCACCACCTCTCTAGCTAGGTAACTGGACAAACCTTGAACAAATCACTTAATCTCTCTTAATTTCT
 CTCTATCTGTAAGGGGGAAATAACAATATAGTCTTACAGGATTTGTGTCAGGTTAATATTTATTACATCTATTACATC
 ATGTGAAGAAGTTAGATCTTGGCACACAATAAGTGTATGTAAGTACTAGTTACTTATTATTATCATCTCGTCTCATCATT
 TGTCTTAACTCCTTGTGGAGTTGCAGAAAATGCAGCTACCAACTGCAATGAAGTTTGGGGAAAGCATTTCTGGGAGAACCT
 GACATGGCCCCCTTGGGTTGTGGATGTGAGGAATATCAAAAATGATACATGATCATGCTATATAAAGTATAAATGAAAATG
 TCCAAAGTTTCCAACCTTAGGATGGGTGAGGAGGAAGTTCACTTGGAAGATATGTTAGCTTTATTTGTAATAGCCTAAAGCT

[illegible]

AAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCATTTCCTGGCCTTTTCCCCCATTTCAATTGTACAAGCTTAGAATCTATTTTG
 AACTTCAGAATCAATCTTAGTCATTCTAAAGCTAAAGGTAGAGAGCCTAAGCCTCTTAACCTTACAGTCCATTTTACCTCTC
 ACAATACCAAGAGCCATTAATACTATTTTTTTCACATCTATATGGAGAAATTTCTTCTAATTGGCATTTTTTGGGGGTGGGG
 GAATTGAAAGATTAGACTGAATCATTTCACAATGTGATGTTTGTATTATGTATACCTTGTGAAATGATACAAAACCTTAGAA
 ATCTGTAATTTAAATAAGTGAATAATCAAAAATGATTTTGTCTAACAAAATGCTTTAGCTGGCTGAACACGGTGGCTCA
 TGCTGTAAATCCCAGAACTTCAGGAGGCTGAGGTTGATGAATCACCTGAGGTGAGAAGTTTGAGACCAGCCAGCCAACGT
 AGTAAAACCCAGCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGTGTGGTGAAGTACATCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGG
 CTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCAGGAGGAGGCTGCAGTGACCCAAGATCACACCGCTGCACTCCAGCCTTGGCAACA
 AAGCAAGACTCTGTCTCAAAAAATATATATATATTTAGCTATTTTTTGCAGAGATATACACTGAATGATTTTTTCTGATAT
 TATATAAGCATTGAATGATTAAAGTCAACAGAGCATTTTTTACTCACTTTTGATACCCCTTTGATACCCCTCCTTCCTAATC
 TTTGTGACTTCCAACCTCATTAAATGTCTGATAATACTAACTGCCATTTTTTAACCCTAACATTTTCGTCTTATATGCA
 GAGTTTCTTCAAATATTGATCTCTATCCAAGCACAGTGTATGTAATAATTTATATTTAGATATCAGGAGGCAAAAGCTGGTC
 AGTTGGGTGCAGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAACACTTTGGGAGGCCAAGGCAAGCAGATCATTTGGGGTCAGGAGTTAA
 AGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGAATGATGGCGCATGCCTGTA
 ATCCAGATACTCGGAGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCTGGGATACAGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCATGCCAC
 TGCCTCCAGCCTGGGCGACAGAGTGAGACTCCATTTCAAAAAAAGCAGAGGCAAAAGCTGAATTTAAAAAAGAAC
 CCTCAAAATATGAAGAAGAACTTCATTCCAAATCTTACTAAAAATTAATAAATACAAACCAAAATTTGACTTCTTTTT
 CTCGAACAGCTTTCCACATAGACTTTTAGGGTAGTCTTCTGTGGTTAAATGTTTATGAGGAGAATTGCACCTGTGTTGTG
 GTACGCTTTTAAATAAAGTGCACCTGCAGTGGTTTTTGCATGAATTTTCTGTTTGGAGAAATTACATGTGCTGGTTGACC
 ATCACACAGAGCTATTTCCCTTACCATATCACCTGCCAGGCAGGTCTAATTTAAAAAGGGCCTACTTCCAAAAATTCAT
 TTGAAAAAATCTGGTTAGATTTTATGTAATCTCTCCAGGGACACAATAAAGTAAGGTTTCCAGGATACCCCTCAAA
 CAAAAAGAATATGCTCCCTTCAATTCATCCATTGCAGTGGTCTGGTCTCTCTGCTTTAAGAAAACCTCTGATTTCTGGA
 GAGGCTTCTGCTCTAGTCAATTATGTCTGCTTTCCCTTTTCTGTATATTTATCTGCTAATTCCTGTTTCAGAATCTTTTTTA
 GTTTGTCAATTTTCTTACCATAAATTTATTTCTCTTCTCTCTGTTTATCTCTCATAAAAAACCTAAATCTTTCAAAT
 AATTCAAGTAGGCTAAATGTCTTCTTCTGTTTCACTCTTTTACTTGTGTTTCTTCTTCTGCTAATAAATTCATCTGTAT
 CTTGTATACCATTTTACTCAGCTGGCATATTACTTTTATCACTTTTCTTCTATATGTGTGTAATTTTATATATTAATGTTTTC
 TAGATGCAGAGAGGTGTTTATAAAGAGCAATATCAGATGGCACCCCAAAAAGGATATGAAAGAACACCAAAAGGGAACCTC
 TAAAGATTTAGTTGGAAGAGTAGGTAAGAAAATACAATTTTCTTGTCTAACTCTTCTATTCAGAGTGTTTACATCATATG
 TAAGTGCCATACTAAGTTTCAATTTTCCCTAATAACGAGAAAGCATAAATCTGTGGTGAGGAATATCCAGTCAGTTATTTTTA
 AAATATCAGATGCACTGTAAAGATGTGTCTTAAGAGACACTTCTACTTAGTCTTCTACTGAACAAAAGAGCAAAACGCTG
 TGGAGTCAGTTATTGCTGGGTGCAATGGGACTCTGACAAGTTATAAAATCTTGTGTTTCTCTGTTTCTGTTTCTATAAAATGG
 GCATCACTGTATGACATAAATCTCACAAGATTGATGAAAATTAATTTGATAAGTGTAAGCATGGAATATGCTAGAACATGGC
 TACAACATATAAACAATTACTTTAGCATAATGCTTAGCTCTTGATCTGCCTACTTTTTCATATCCATATTTCCAGGACCCCTG
 ATTTAGACACAAAACGCATCACTCTGATGACTATCACCATCTTGACCAACTTCTTCTGTCAATTTTCCAATCTTTCCC
 TGTTTAAAACCTCCAATGATTCCCTTTTGTCTATAGCATAAATAATATATCTCTACCCAAAATAGATATAGATCAAGATC
 ACATTTGCAAAATAGCTTATTAATTTCTTAGGTCAATTTTAAATAATTTCTAATACCTTATTGAAATTTAACAGAGCTTGGTT
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGACAGAGTCTCACTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCATCTTGGCTCACTG
 CAACCTCCGCTCCAGGTTCAAAATGATTCTCTGCTGCTGAGTCTGAGTCTAGGAGTACAGGTCTGGGCCACCCACAC
 CCAGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTACCATGTGGGCCAGGCTGCTCTCGAATTCCTGGCCTCAAACAA
 TGCACCTGCCTCGGCCCTCCAAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGTCACTGCGCCAGCCAATCCAAGCCTTTTTAATTTG
 ACACCTGGAGATATGTAGTCTTAACTCTAGTAGCAGGTAGGTAGTATAACACTTTTGGTCTACTAGTTCACGTGTGCTA
 GTTACTTAAGTCAGAACACCCAAAATATATTTTTATTTGCCTTTAGTTAAATATCAATATGGTCCCAGCTTTCAACTGA
 ATTTTAAAGACATCAAAAATTTCTTTCTTAAAGAGATCCATATATCAAAACATCTAGAAGACATCTAGACACTTAAATAG
 CTTTACAGACACCTCAAATCAACATATACAAAATTAACCTTCCATTTCTTGGCCCTGCTTAAATCTTTTTTTTTTTTT
 TTTTTTTTTTGTAGATGGAGTCTCGCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGTGATCGCAGTCACTGCAACCTCTGCCT
 CTTGGATTCAAGCAATTTCTCTGTCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCATGCACCACCACACAGGCTAATTTT
 TGTAACCTCTGGCCTCCAAACATCCACCCACCTCGGCCCTCCAAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCCACCACGCCCCGCC
 AAGACAAGTACATACTAGTCTTAACACAAAGGAGAAATGTTTAGAAATCCCTAAGAAAGGAAGAGTTAGGGACTATTAG
 ATGTTAATAGAATGAAGTATATCAGAGAAGACAGCCTAGAGAAGACACAATCTTAGCTGGGCCCTTGAAGGCCATATAAGCA
 TTGAAATATGAGACAGCCCAAGAGAGGCCAAGAGAATAAAAATCTCAAAAAGAGAAAAAATAGTACATAGTTTGGC
 TAGAACATATAAATTCATGAAAGTGGGAAAGCAGCTGGAAAAATAAGTTGGGGCCAGATAAAGGCAGCCCTGAATTTGGC
 TTAGAGATAAAGAATTGATTCTATAGAGAATGAGGGGTGACTAAAGAAAAAATTTTAAACATGGGCTGTGTTTCAAAAGACC
 TTCACCACCAAGCTATAATTATCACTGGGTCAATATTTAAATCAAAAATAATTGTAGTTACAAGTTTTCCCATGAAAAGAA
 AAACTAAAAGGGATTAAATAATGTTTAGAAAGTAATGCCAAGTTTTTAGTTGAATTAGAGTTTGAAGGGAAAGCAGTG
 TCGTAATTTCACTAAATTTCTTCAATTTGTAATGAAGCTACCAACCTGTTTTCTAG**ATGCAGAGAGGTGTTTCATAAAGAG**
CAATATCAGATGGCACCCCAAAAAGGATATGAAAGAACACCAAAAGGGAACCTCTAAAGATTTAGTTGGAAGAGTAGGTAA
 GAAAATACAATTTCTGTTCTAACTCTTCTATTAGAGTGTGTTACATCATATGTAAGTGCCATACTAAGTTCATTTTCCC
 TAATAAGGAGAAAGCATAAATCTGTGTGAGGAACATGCTGATCATTTTAAATTAAGTTAAATTAAGATTAAGAAAGCT
 TCAATATTTTAC**CAATATTTTCAAGTGAAGCTCTATATTTTACTTCCAAGT**CACTTTTAGGACTTTTGGGACTTAAATAG
 ATACAGACCTTATTTGCAAAAAGAATCTGTGACATATTTGTTTTCAGAGTAAGTGGTTTCTGACAGATGAAACTAGATGAAA
 TGAAAGCAGATGGCAAACTTCATCCATTTTCTTTCTTATAACTAAAAATAATCTTTCTTTTCTTTTTTGCATCCAAAAATAG
 TTCAGCATGTTTCTGGGGTTATATTAATATATCCAAATATATTGATAGGTACTAACACCAAGAATACATTTTCCCAATATA
 ACTCTTATATCAAAATTTATTTTACTATTACTACCTTTATGCACATTTTAAAGAAAGCTACTTCTTTTGCAGCTTCA
 GTCATCTAGCCTAGTCTGTGATGCTGGGAAAAACGTAATGCTGTTTATTGTCAGCACTATTACAAATAGCAAAGACTT
 GGAACCAACCAAATGTCTCAACAATGATAGACTGAATTAAGAAGATGTGGCAGATATACACCATGGAATACTATGCAGCCA
 TAAAAAAGGATGAGTTAACGTCCTTTGCAGAGACATGGATGAAGCTGGAAACCATCATTTCTGAGCAAACATATACAAGGAC
 AGAAAACCAACACCACATGATCTCACTCATAAGTGGAACTGAACAATGAGAACACTTGGTCATAGGGTGGGGAACATCA
 CACTTGGGGCCTGTCATGCGGTGGGGGCGAGAGGGAGGAATAACACTGGGAGAGATACCTAATGTAAATGACGGGTGAT

Caracteres verdes: participam do transcrito; **Base grifada de rosa:** rs7671281; **Base grifada de verde escuro:** rs2609428; **Base grifada de azul claro:** rs3796703; **Base grifada de azul escuro:** rs3796704; **Base grifada de vermelho:** rs3796705; **Base grifada de verde claro:** rs35951442.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - HRAC-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Triagem de mutações e polimorfismos de genes candidatos à malformação dentária em pacientes com fissura labiopalatina

Pesquisador: FERNANDA VERONESE DE OLIVEIRA

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

Versão: 1

CAAE: 00911012.3.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 179.410

Data da Relatoria: 19/12/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme solicitado segue parecer dos aspectos éticos do projeto de pesquisa com o título: "Triagem de mutações e polimorfismos de genes candidatos à malformação dentária em pacientes com fissura labiopalatina" de autoria de Fernanda Veronese de Oliveira e Thaís Marchini de Oliveira.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de um trabalho que tem por objetivo triar e correlacionar mutações e/ou polimorfismos em genes candidatos para a amelogenese imperfeita em pacientes com e sem fissura labiopalatina. Para tal serão necessários 120 pacientes os quais serão subdivididos em 4 grupos: 1) 30 indivíduos com fissura labiopalatina transforame incisivo unilateral ou bilateral isolada e malformação dentária; 2) 30 indivíduos com fissura labiopalatina transforame incisivo unilateral ou bilateral isolada sem malformação dentária; 3) 30 indivíduos sem fissura labiopalatina e com malformação dentária e 4) 30 indivíduos sem fissura labiopalatina e sem malformação dentária.

O DNA para as análises supracitadas será obtido a partir da saliva do paciente. Esta saliva será coletada com auxílio de uma micro bomba de sucção que sugará e armazenará a saliva da boca do paciente e recipiente adequado. Este procedimento não causa desconforto ao paciente, os quais, ou seus responsáveis, que derem seus consentimentos para a participação na referida pesquisa cederão a saliva em suas visitas de rotina ao HRAC ou FOB.

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** uep_projeto@centrinho.usp.br

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho tem mérito científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Tendo em vista o exposto acima, julgo que o projeto não apresenta envolvimento ético, e solicito a aprovação por este Comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Colegiado acatou o parecer do relator em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador fica responsável pela entrega na Seção de Apoio a Pesquisa do SVAPEPE dos relatórios semestrais e final.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final para publicação do trabalho.

Projeto aprovado na reunião de 28/02/2012, na fase de adequação da Plataforma Brasil.

BAURU, 20 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Marcia Ribeiro Gomide
(Coordenador)

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA

CEP: 17.012-900

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: uep_projeto@centrinho.usp.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, responsável pelo paciente * _____, após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa: "Triagem de mutações e polimorfismos em genes candidatos à malformação dentária de pacientes com fissura labiopalatina", realizada por Fernanda Veronese de Oliveira, nº do Conselho: CRBio 64605, sob orientação da Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira, nº do Conselho: CRO 65047, que tem como objetivo: Investigar a ocorrência de mutações nos genes candidatos a defeitos na formação do esmalte dental, pela análise do DNA extraído da saliva. A coleta da saliva será realizada uma única vez e por não ser um procedimento invasivo não causa riscos em potencial para a pessoa que aceitar fazer parte do estudo. Após a coleta da saliva os dentes com malformação dentária serão fotografados e as fotos arquivadas para análise posterior.

"Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8421".

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 10 do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru, _____ de _____ de _____.

Pesquisadora responsável

Responsável pelo sujeito da pesquisa

* A SER PREENCHIDO, SE O SUJEITO DA PESQUISA NÃO FOR O PACIENTE

Nome do pesquisador responsável: Fernanda Veronese de Oliveira
Endereço do pesquisador responsável: Rua Silvio Marchione 3-20
Cidade: Bauru/SP CEP: 17100-000
Telefone: (014) 3235 8141 e-mail: veronesefernanda@hotmail.com
Endereço Institucional: Alameda Otávio Pinheiro Brizola 9-70
Departamento de Odontopediatria
Cidade: Bauru/SP - CEP: 17100-000

ANEXO C - Códigos IUPAC

Código	Tradução
A	ADENOSINA
C	CITOSINA
G	GUANINA
T	TIMINA
B	C,G ou T
D	A,G ou T
H	A,C ou T
R	A ou G (PURINA)
Y	C ou T (PIRIMIDINA)
K	G ou T (KETO)
M	A ou C (AMINO)
S	G ou C (FORTE - 3 PONTES H)
W	A ou T (FRACA - 2 PONTES H)
N	QUALQUER BASE
V	A, C ou G

ANEXO D - Abreviação dos aminoácidos

Aminoácido	3 Letras	1 Letra
Alanina	ALA	A
Arginina	ARG	R
Asparagina	ASN	N
Ácido Aspártico	ASP	D
Cisteína	CYS	C
Ácido Glutâmico	GLU	E
Glutamina	GLN	Q
Glicina	GLY	G
Histidina	HIS	H
Isoleucina	ILE	I
Leucina	LEU	L
Lisina	LYS	K
Metionina	MET	M
Fenilalanina	PHE	F
Prolina	PRO	P
Serina	SER	S
Treonina	THR	T
Triptofano	TRP	W
Tirosina	TYR	Y
Valina	VAL	V
Qualquer Aminoácido		X

ANEXO E - Bases para formação dos códons

1 ^a Base	2 ^a Base				3 ^a Base
5'	T	C	A	G	3'
T	Phe	Ser	Tyr	Cys	T
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Och	Opa	A
	Leu	Ser	Amb	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	T
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	T
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	T
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Amb, Och, Opa= Códigos de Parada.