UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

FERNANDA VERONESE DE OLIVEIRA

Estudo genético da mutação do gene AMELX na malformação dentária de pacientes com e sem fissura labiopalatina

Bauru

2011

FERNANDA VERONESE DE OLIVEIRA

Estudo genético da mutação do gene AMELX na malformação dentária de pacientes com e sem fissura labiopalatina

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas
Orientadora: Profª. Drª. Thais Marchini de Oliveira

Bauru

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Fernanda Veronese

O4e Estudo genético da mutação do gene AMELX na malformação dentária de indivíduos com e sem fissura labiopalatina / Fernanda Veronese de Oliveira. Bauru, 2011.

133 p.; il.; 30cm

Dissertação (Mestrado – Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas) – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Dra. Thais Marchini de Oliveira

1. AMELX. 2. Fissura labiopalatina. 3. Malformação dentária

CDD:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Veronese de Oliveira

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas

Aprovado em:

Banca Examinadora

_____

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos
Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

_____

Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

_____

Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira (Orientadora)
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP
Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

_____

Profa. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira
Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC – USP

Data de depósito da dissertação junto à SPG: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com fissura labiopalatina e suas famílias, razão deste estudo, que gentilmente colaboraram, confiaram e se prontificaram em participar. Aos pacientes 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 a oportunidade de servir com todo o carinho profissional e incentivando-me a oferecer-lhes um processo reabilitador cada vez melhor.

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 lição 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 presentearem com a vida, por acreditarem no meu valor como ser humano, pelo zelo e amor 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 querido filho João Vitor, linda benção de Deus, razão de todo o meu esforço e luta, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão nos momentos de ausência.

"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 minha amiga e orientadora Profa. Thais Marchini de Oliveira,
não somente pela imprescindível colaboração e orientação precisa 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 departamento de Ciências Biológicas, 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".

À querida Profa. Lucimara Teixeira das Neves,
por compartilhar seus conhecimentos e experiência, com tanta sabedoria e humildade.

Ao querido 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 deste ano de convivência diária.

À querida Thais Francini Garbieri,
pelo esforço e comprometimento, por toda colaboração e ajuda prestadas para a realização deste trabalho.

Às professoras do Setor de Odontopediatria, Marcinha, Bia, Gisele e Cleide; e às alunas Vivian, Micaela, Bianca, Paula Jorge, Paula Barsi, Eduara, Annecy, Tábata e Tássia, não só pela amizade conquistada, como também pela prontidão, colaboração, ensinamentos e, principalmente, por me "adotarem" com tanto amor como uma "odontopê".

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

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Farmacologia,
que se tornaram meus colegas de laboratório: a convivência com vocês é um presente.

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

À FAPESP,
por todo o apoio financeiro, pela Bolsa de Mestrado concedida no processo no. 2009/12289-0 e pelo auxílio à Pesquisa FAPESP concedido no processo no. 2009/12233-4.

Aos meus queridos amigos e amigas, os quais seria impossível nominar,
pela amizade marcante e companheirismo.

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

À minha vovó Laura,
pela torcida, pelas orações, pelo otimismo, 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 bater forte o coração aqui dentro do meu peito, o nome de cada um de vocês será lembrado, sempre, em cada pulsação".

Alvarez 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 objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de mutações na sequência de nucleotídeos do gene AMELX, candidato a defeitos na formação do esmalte dentário, em indivíduos com e sem fissura labiopalatina. Para análise do gene proposto, foi coletado saliva de 165 indivíduos, que foram divididos em 4 grupos: Grupo 1 - composto por 46 indivíduos com fissura labiopalatina e malformação dentária; Grupo 2 - composto por 34 indivíduos com fissura labiopalatina e sem malformação dentária; Grupo 3 - composto por 34 indivíduos sem fissura labiopalatina e com malformação dentária e Grupo 4 - composto por 51 indivíduos sem fissura labiopalatina e malformação dentária. Foi realizada a extração do DNA genômico das amostras de saliva, seguido da PCR e sequenciamento direto. Cada mutação identificada no sequenciamento foi confirmada repetindo-se a reação de sequenciamento da fita antisenso. Após a coleta dos dados no *Software SeqScape® 2.6*, estes foram devidamente analisados por meio de gráficos e tabelas. Das amostras submetidas ao sequenciamento genético, obteve-se um aproveitamento de 95%, 90%, 89%, 88%, 94% e 100% destas amostras dos éxons 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. Dos 990 fragmentos sequenciados (seis éxons em 165 amostras de saliva), 918 fragmentos (93%) foram analisados. Detectou-se alteração na sequência de bases em 37 destes fragmentos (4%), sendo 14 no Grupo 1 (1,5%), 12 no Grupo 2 (1,3%), quatro no Grupo 3 (0,4%) e sete no Grupo 4 (0,7%), dos tipos missense e silenciosa, distribuídas nos éxons 2, 6 e 7 do gene AMELX, em oito distintos locais no cromossomo X. De acordo com os resultados obtidos do sequenciamento direto do gene AMELX, foi possível concluir que foram encontradas mutações na sequência de nucleotídeos do gene AMELX, em indivíduos com e sem fissura labiopalatina e malformação dentária. Observou-se ainda que a mutação localizada na posição 75 do éxon 6 esteve presente em todos os grupos estudados, sugerindo que, apesar de ser uma mutação silenciosa, pode ser um polimorfismo novo, a ser catalogado, pois foi detectado em 26 indivíduos, do total de 165, representando 16%. Entretanto, este estudo não pode afirmar que estas mutações alteraram diretamente o fenótipo dos pacientes dos grupos estudados.

Palavras-chave: AMELX. Fissura labiopalatina. Malformação dentária.

ABSTRACT

Genetic study of the AMELX gene mutation on dental malformations of patients with and without cleft lip and palate

The aim of this study was to investigate the occurrence of mutations in the AMELX candidate gene involved in enamel formation, in patients with and without cleft lip and palate and dental malformation. For gene analysis proposed was collected saliva from 165 patients who were divided in 4 groups: Group 1 - 46 individuals with cleft lip and palate and dental malformation, Group 2 - 34 individuals with cleft lip and palate without dental malformations; Group 3 - 34 individuals without cleft lip and palate with dental malformations and Group 4 - 51 individuals without cleft lip and palate and dental malformation. Next, genomic DNA was extracted from this saliva, followed by PCR and direct DNA sequencing. All samples with mutations were sequenced twice; once using the forward primer and a second time using the reverse primer. After data analysis with *Software SeqScape® 2.6*, the data were collated. Of the 165 samples, 95%, 90%, 89%, 88%, 94% and 100% of the samples were successfully sequenced from exons 2, 3, 4, 5, 6 and 7 respectively. Overall, of the 990 total sequenced exons (six exons in 165 samples of saliva), 918 exons (93%) were able to be completely sequenced and analyzed. Mutations were detected in 37 of the fragments (4%), more specifically, 14 in Group 1 (1.5%), 12 in Group 2 (1.3%), four in Group 3 (0.4%) and seven in Group 4 (0.7%), which included only missense and silent mutations, distributed throughout exons 2, 6 and 7 in the AMELX gene in eight different locations on chromosome X. According to the results obtained from direct sequencing of protein-coding exons of the AMELX gene, mutations were found in the nucleotide sequence of the AMELX gene in individuals with and without cleft lip and palate and dental malformation. It was also observed that the mutation in position 75 of exon 6 was present in all groups, suggesting that, though a silent mutation, may be a new polymorphism to be cataloged: it was found in 26 patients, the total of 165, representing 16%. However, this study cannot confirm that these mutations directly altered the phenotypes of the patients in the groups tested.

Keywords: AMELX. Cleft lip and palate. Dental malformations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização do gene AMELX no cromossomo X 38

Figura 2 - Indivíduo com fissura labiopalatina transforame incisivo bilateral apresentando malformação dentária 54

Figura 3 - Indivíduo com fissura labiopalatina transforame incisivo unilateral sem malformação dentária 55

Figura 4 - Indivíduo apresentando malformação dentária 55

Figura 5 - Indivíduo sem malformação dentária 56

Figura 6 - Gel de agarose corado com brometo de etídio representando as amplificações de DNA do gene da β-actina extraídos a partir do protocolo utilizando InstaGene™ associado a diferentes concentrações de proteinase K 58

Figura 7 - Eletroferograma visualizado no *Software Sequencing Analysis® 5.3.1*, resultado do sequenciamento do éxon 2 do gene AMELX 73

Figura 8 - Análise das sequências obtidas no sequenciamento no *Software SeqScape® 2.6* 74

Figura 9 - Gráfico representativo do aproveitamento das sequências dos éxons do gene AMELX 79

Figura 10 - Gráfico representativo do número de fragmentos sequenciados, analisados e alterados de cada grupo estudado 80

Figura 11 - Eletroferograma contendo picos e vales bem definidos, boa intensidade do sinal, ilustrando a qualidade do experimento e o sucesso do protocolo utilizado 99

Figura 12 - Sequência fornecida pelo *Software SeqScape® 2.6*, com os picos de confiabilidade de cada base 99

Figura 13 - Relatório geral das amostras sequenciadas mostrando as mutações encontradas em cada amostra, assim como a troca de base, a localização, o tipo, o efeito, entre outros aspectos 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos *primers* senso e antisenso dos éxons 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do gene AMELX e as condições da PCR 63

Tabela 2 - Esquema contendo os reagentes, as concentrações e as quantidades utilizadas na PCR 64

Tabela 3 - Quantidade de DNA purificado a ser utilizada na reação de sequenciamento 69

Tabela 4 - Esquema contendo os reagentes e o volume utilizado para Reação de Sequenciamento 70

Tabela 5 - Aproveitamento das sequências dos éxons do gene AMELX por grupo estudado 80

Tabela 6 - Mutações encontradas nos sequenciamentos analisados do Grupo 1 82

Tabela 7 - Mutações encontradas nos sequenciamentos analisados do Grupo 2 84

Tabela 8 - Mutações encontradas nos sequenciamentos analisados do Grupo 3 86

Tabela 9 - Mutações encontradas nos sequenciamentos analisados do Grupo 4 88

Tabela 10- Distribuição das mutações detectadas nos 4 grupos de estudo 89

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Nucleotídeo (base) adenina
AI	Amelogenese imperfeita
AMBN	Ameloblastina
AMELX	Amelogenina ligada ao X
C	Nucleotídeo (base) citosina
ddNTPs	Dideoxinucleotídeos
DLX3	Distal-Less Homeobox 3
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos
ENAM	Enamelina
F	"*Forward*" ou senso
FAM83H	FAM83H = family with sequence similarity 83, member H
FLP	Fissura Labiopalatina
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
G	Nucleotídeo (base) guanina
G	Força gravitacional
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
Kb	Kilobase
KLK-4	Calicreina-4
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
Mm	Milimolar
MMP-20	Metaloprotease da matriz-20
Ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pmol	Picomol
R	"*Reverse*" ou antisenso
S	Segundo
SLC4A4	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4
SNP	*Single Nucleotide Polymorphism*
T	Nucleotídeo (base) timina
TA	Temperatura de anelamento
USP	Universidade de São Paulo
WDR72	WD repeat domain 72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA **29**
1.1 Fissura Labiopalatina 29
1.2 Malformações dentárias 31
1.3 Genética da amelogênese 36
1.4 Justificativa do Estudo 44

2 PROPOSIÇÃO **49**
2.1 Objetivo Geral 49
2.2 Objetivo Específico 49
2.3 Hipóteses 49

3 MATERIAL E MÉTODOS **53**
3.1 Comitê de Ética 53
3.2 Casuística 53
3.3 Análise Molecular 56
3.3.1 Estudo Piloto 57
3.3.2 Coleta e preparo das amostras 58
3.3.3 Extração do DNA genômico das amostras de saliva 59
3.3.4 Quantificação do DNA extraído da saliva 61
3.3.5 Diluição das amostras de DNA para PCR 62
3.3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 62
3.3.7 Eletroforese em gel de agarose para verificação da amplificação 65
3.3.8 Purificação do produto da PCR 66
3.3.9 Reação de sequenciamento 67
3.3.10 Precipitação do produto da reação de sequenciamento 70
3.3.11 Leitura no Sequenciador 72
3.3.12 Análise das sequências obtidas 74
3.4 Análise Estatística 75

4 RESULTADOS **79**

5 DISCUSSÃO **93**

5.1 Amostra 93

5.2 Metodologia 96

5.3 Resultados 100

5.4 Implicações Clínicas 104

6 CONCLUSÃO **109**

REFERÊNCIAS **113**

APÊNDICES **121**

ANEXOS **127**

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 Fissura Labiopalatina

A fissura labiopalatina é uma malformação congênita, que resulta da deficiência ou falta de fusão dos processos faciais e/ou palatinos durante o período embrionário (da 4ª a 8ª semana de vida intrauterina) e início do período fetal (9ª a 12ª semana de vida intrauterina). Das malformações craniofaciais que envolvem a face e a cavidade bucal, as fissuras labiopalatinas representam as mais comuns. A etiologia é controversa, sendo possivelmente determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais (herança 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, e nem sempre se manifestam isoladamente: 5 a 10% dos casos podem fazer parte de um complexo de outras malformações que constituem as síndromes (Trindade e Silva Filho 2007).

A fissura labiopalatina é conhecida clinicamente pela sua diversidade, que acarreta comprometimentos de gravidades diferentes e, de certa forma, com protocolos distintos de tratamento. Os indivíduos com fissuras labiopalatinas, além de grave problema estético, apresentam distúrbios funcionais severos, de forma que, se esta deformidade não for tratada

convenientemente e a tempo, poderá causar também problemas de ordem psicológica. 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 fissuras labiopalatinas para sua integração na sociedade, como também, 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 (Trindade e Silva Filho 2007).

Alguns autores acreditam que parte da dificuldade encontrada nos estudos genéticos das fissuras labiopalatinas 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 fissuras labiopalatinas pode ser muito mais complexo do que se presume, podendo apresentar diversas combinações de fissura (com relação ao lado afetado e à extensão da fissura) ou ainda ser caracterizado por uma variedade de marcadores subclínicos associados. Dados epidemiológicos sugerem que indivíduos com fissuras labiopalatinas apresentam uma maior

incidência de anomalias dentárias do que indivíduos sem fissuras e ainda, que a gravidade das anomalias dentárias parece estar relacionada à gravidade das fissuras labiopalatinas, principalmente quando se trata de fissura de lábio isolada (Adams e Niswander 1967, Schroeder e Green 1975, Larson et al. 1998, Eerens et al. 2001, Stahl et al. 2006, Aizenbud et al. 2010).

1.2 Malformações dentárias

As malformações dentárias podem ocorrer como resultado de fatores genéticos e ambientais. Enquanto essas malformações são comumente causadas por defeitos em genes específicos, eventos etiológicos pré e pós-natal também têm resultado em malformações no tamanho, morfologia, posição, número e forma dos dentes (Aizenbud et al. 2010).

Malformações dentárias afetam o esmalte em diferentes intensidades, promovendo desde a deficiência na formação até defeitos no conteúdo mineral e proteico. Isso acontece porque o processo de controle da mineralização e desenvolvimento do esmalte se dá pela expressão de diversos genes (Hu e Simmer 2007, Wright et al. 2009).

O conhecimento da formação do esmalte (amelogênese) é imprescindível para interpretar as alterações patológicas que afetam essa estrutura e o seu desenvolvimento. Isto é importante para a compreensão das bases científicas que fundamentam a prevenção e terapêutica que o profissional

de odontologia utiliza. Observa-se um grande número de publicações e dissertações orientadas com o tema (Duque et al. 2004, Pioto et al. 2005, Galante et al. 2005, Maciel et al. 2005; Gomes et al. 2009), entretanto, não se conhece ao certo a etiologia que afeta a formação do esmalte.

As malformações dentárias, também conhecidas como amelogênese imperfeita (AI) do esmalte, afetam o esmalte em vários graus de intensidade. A forma menos intensa consiste em coroas de forma normal, com esmalte de pobre qualidade, friável, áspero e com alterações de coloração (Wright et al. 1995). Os dentes apresentam coloração amarelo-castanho a castanho escuro, 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 e Muñoz 2006).

O esmalte dentário constitui a camada externa dos dentes e é a substância mais dura encontrada nos vertebrados. O esmalte dentário é um tecido incomum que, uma vez formado, não sofre remodelação como outros tecidos duros. Por causa de sua natureza não remodeladora, alterações durante sua formação são permanentemente registradas na superfície dentária e são denominadas *defeitos de esmalte* (Hoffmann et al. 2007). Os defeitos estruturais do esmalte são desvios de sua aparência normal, resultante da disfunção de constituintes do órgão do esmalte, em particular de suas células

formadoras, os ameloblastos. Assim sendo, o aparecimento desses defeitos está relacionado a distúrbios da amelogênese (Ferraris e 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 et al. 1999, Maciel et al. 2005, Broadbent et al. 2005, Schluter et al. 2008). As alterações que afetam a formação do esmalte podem ser de origem genética ou de origem ambiental, considerando-se que o ameloblasto é uma célula muito sensível às alterações do meio. Os defeitos podem afetar somente uma pequena área da superfície do esmalte ou, ao contrário, toda a sua espessura (Ferraris e Muñoz 2006). Da mesma forma, a alteração pode ser localizada, afetando somente um ou dois dentes, ou generalizada, afetando muitos dentes ou toda a dentição. Os defeitos podem ser ainda simétricos ou assimétricos à linha média da dentição. Qualquer alteração no esmalte dentário é um defeito da amelogênese. As duas alterações mais características, que constituem defeitos da amelogênese, são: a hipoplasia e a hipomineralização. Entre as causas que originam essas alterações, destacam-se os distúrbios sistêmicos (nutricionais, endócrinos, viroses, etc.), as afecções locais (trauma, infecções do dente decíduo, etc.) e os distúrbios de origem genética. Não se deve esquecer que, como o esmalte é de origem ectodérmica, a alteração pode ocorrer na formação do esmalte e de outros derivados ectodérmicos, como pêlos, unhas e pele. Mutações nos genes da amelogenina causam malformações dentárias (Hu et al. 2005, Ferraris e Muñoz 2006, Hu e Simmer 2007, Wright et al. 2009, Wright et al., 2011); dessa forma, pesquisar mutações

nos genes propostos poderá esclarecer a etiologia destas alterações dentárias.

Os defeitos no esmalte são originados por distúrbios durante a formação dos dentes, provocando um desenvolvimento alterado da matriz orgânica ou de sua calcificação (Ferraris e Muñoz 2006). Esses defeitos no esmalte podem estar localizados em um único dente, afetar vários dentes ou 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 e Muñoz 2006).

De acordo com os índices, quase todos os defeitos do esmalte podem ser classificados, tomando-se por base sua aparência macroscópica, em duas principais categorias: hipoplasia e hipomineralização do esmalte. Enquanto a hipoplasia de esmalte é considerada um defeito quantitativo, a hipomineralização de esmalte é considerada um defeito qualitativo, identificado no exame clínico como uma anormalidade na translucidez do esmalte, também denominado de opacidade (Ferraris e 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 e Muñoz 2006). Caracteriza-se pela formação defeituosa ou deficiente do esmalte, sendo uma alteração

quantitativa, ou seja, manifesta-se como uma 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 et al. 2005, Schluter et al. 2008, Uribe 2009, Parapanisiou et al. 2009, Hong et al. 2009).

Diferentemente da hipoplasia, as hipomineralizações são alterações qualitativas do esmalte (Ferraris e Muñoz 2006), que 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 (Uribe 2009, Hong et al. 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 et al. 1991).

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 o mineral e a maior parte das proteínas originais é removida; e (III) maturação, no qual o esmalte recém-mineralizado sofre processo final de calcificação e as proteínas ainda remanescentes são removidas. Esses processos acontecem por influências genética e ambiental; assim, o desenvolvimento de defeitos de esmalte pode resultar de qualquer dano ocorrido nesses estágios. Geralmente, aceita-se que

os distúrbios que ocorrem durante os primeiros estágios de desenvolvimento do esmalte resultam em hipoplasia. Em contraste, distúrbios ocorridos durante o estágio da calcificação e maturação podem levar a deficiências na mineralização e geralmente se manifestam como hipomineralização do esmalte (Hoffmann et al. 2007).

1.3 Genética da amelogênese

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 malformação dentária (Hu et al. 2005, Bartlett et al. 2006, Hu e Simmer 2007, Kapadia et al. 2007, Wright et al. 2009, Sawada et al. 2010).

Mutação genética é definida como qualquer alteração permanente no material genético, que traz alterações deletérias ou vantajosas (raramente) a um organismo ou seus descendentes e é a maior responsável pela variabilidade genética e pela evolução das espécies. As mutações podem ser espontâneas (erros de replicação do DNA, danos ao DNA como oxidação e sequências altamente repetitivas), ou induzidas (por agentes químicos, físicos ou biológicos), germinativa ou somática e, gênica, cromossômica ou genômica. As mutações gênicas podem ocorrer por substituição de base única, inserção ou deleção. Por sua vez, as substituições de base única podem ser missense, nonsense, silenciosa ou no sítio de corte. Nas mutações de base única, também

conhecidas como mutações puntiforme, podem ocorrer transição (troca de uma purina por outra purina – A/G, ou uma pirimidina por outra pirimidina – C/T) e transversão (troca de uma purina por uma pirimidina, ou uma pirimidina por uma purina). A substituição missense é caracterizada pela troca de uma base, formando um códon diferente, gerando um aminoácido diferente, que por sua vez, determina uma proteína alterada. O efeito dessa troca depende da posição que esse aminoácido ocupa na proteína. A substituição nonsense é caracterizada pela troca de uma base que leva a formação de um códon de parada (TAA, TAG, TGA), produzindo uma proteína truncada. Na substituição silenciosa, a troca da base gera um códon diferente, mas este por sua vez, não altera o aminoácido. Isso se dá porque diferentes códons codificam um mesmo aminoácido. Já a substituição no sitio de corte modifica o nucleotídeo sinalizador do *splicing*, gerando fragmentos alterados a serem traduzidos (Griffiths 2000).

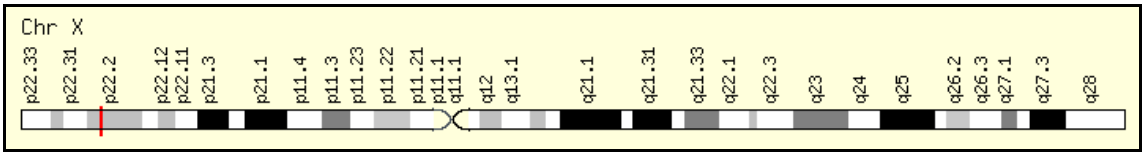
De acordo com a literatura, alguns genes estão envolvidos na formação do esmalte dentário: amelogenina (AMELX), enamelisina (ENAM), calicreína-4 (KLK-4), metaloprotease da matriz-20 (MMP-20), ameloblastina (Wright et al. 2009) e, mais recentemente, os genes DLX3 (Stephanopoulos et al. 2005), FAM83H (Wright et al. 2011, Haubek et al. 2011, Lee et al., 2011), *WDR72* (Wright et al. 2011) e SLC4A4 (Urzúa et al. 2011).

Mutações nesses genes estão associadas com tipos específicos de amelogênese imperfeita e aos modos de herança: ligada ao X, autossômica dominante ou autossômica recessiva (Hu et al. 2003, Dong et al. 2005, Wright

2006, Kim et al. 2008, El-Sayed et al. 2009).

O gene da amelogenina ligado ao X, o AMELX, está localizado no cromossomo Xp22.31-p22.1 e é conhecido também como AMG, AIH1, ALGN, AMGL e AMGX (Figura 1). O AMELX codifica um membro da família amelogenina de proteínas da matriz extracelular e tem um importante papel na biomineralização, durante o desenvolvimento do esmalte dentário. Mutações nesse gene causam amelogênese imperfeita ligada ao X. *Splicings* alternativos resultam em múltiplas variantes de transcrição, que codificam diferentes isoformas (Bocchini 2011).

Diversas mutações no gene da amelogenina do cromossomo X estão associadas à malformação dentária, entretanto, nenhuma mutação foi associada ao gene do cromossomo Y (Hart et al. 2002). A amelogenina é secretada por ameloblastos, inicialmente com 25 kDa, mas sua 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 para formação dos cristais do esmalte. É através da região hidrofílica que as amelogeninas interagem com os cristais de hidroxiapatita (Robinson et al. 1998).



Fonte: OMIM, Wizmann Institute of Ciencie (2011)
Figura 1 - Localização do gene AMELX no cromossomo X

O gene da enamelina (ENAM) está localizado no cromossomo 4q3.13 e codifica a maior proteína da matriz do esmalte dos dentes em desenvolvimento, compreendendo cerca de 5% do total de proteínas da matriz do esmalte. O ENAM está envolvido na organização da estrutura e na extensão do esmalte, durante o estágio secretório na amelogênese. Defeitos neste gene resultam em amelogênese imperfeita tipos IB e IC (Tiller 2008).

A enamelina é produzida por ameloblastos, durante o estágio secretório, concentrando-se próximo ao processo de Tomes (Fincham et al. 1999). A enamelina está presente em pequenas quantidades e sobre a forma de uma série de produtos clivados para gerar vários polipeptídios, que participam da enucleação e extensão dos cristais de esmalte, bem como da regularização desses cristais (Fukae et al. 1993). O gene da enamelina foi mapeado no cromossomo quatro 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). Recente estudo mostrou que, como a ameloblastina, a enamelina atua como uma molécula de adesão e suporte na diferenciação dos ameloblastos (Sawada et al. 2010).

O gene da metaloprotease da matriz-20 humano (MMP-20) localiza-se no cromossomo 11q. A MMP-20 , também conhecida como enamelisina, foi primeiramente identificada por Bartlett et al. (1996). Ela representa o único membro da família das MMPs que tem um padrão de expressão altamente restrito, podendo ser observada em ameloblastos do órgão do esmalte e odontoblastos da papila dentária (Caterina et al. 2000). Nível muito baixo de

expressão de MMP-20 foi detectado no órgão pulpar (Bartlett et al. 1996), porém, nenhum outro tecido fisiologicamente normal tem demonstrado expressão de enamelisina (Grant et al. 1998), considerando-se que a MMP-20 é uma metaloprotease específica de células que formam o dente (Caterina et al. 2002).

Outra enzima que participa no processamento da matriz do esmalte é a calicreína-4, conhecida como KLK-4. O gene da KLK-4 está localizado no cromossomo 19q13.4. Durante a formação do esmalte, a KLK-4 é secretada tanto por ameloblastos quanto por odontoblastos (Nagano et al. 2003), na forma de um zimógeno com 230 aminoácidos e, então, ativada por clivagem proteolítica (Simmer e Hu 2002). A KLK-4 é expressa no final do estágio de transição e durante todo o estágio de maturação. Ela parece ser a enzima predominante na degradação de proteína, durante o início da fase de maturação, e tem uma função digestiva, clivando a amelogenina e as outras proteínas da matriz do esmalte (Ryu et al. 2002, Simmer e Hu 2002).

A ameloblastina é uma proteína da matriz do esmalte dentário, também conhecida como AMBN, que se localiza no cromossomo 4q21 e desempenha um papel crucial na manutenção do estado de diferenciação dos ameloblastos, sendo essencial para a formação do esmalte e um importante regulador para manter o estado de diferenciação dos ameloblastos (Fukumoto et al. 2005).

Outros genes candidatos a mutações nas regiões codificadoras são responsáveis por diversos fenótipos clínicos de alterações no esmalte dentário,

como o DLX3, que é um gene candidato *homeobox*, localizado no cromossomo 17q21.33 (McKusick et al. 1995), e tem sido descrito e associado com AI tipo hipoplásica com taurodontismo (Stephanopoulos et al. 2005), enquanto a identificação de uma mutação no gene FAM83H, que se localiza no cromossomo 8q24.3 (McKusick et al. 2008), foi associada com AI autossômica dominante hipocalcificada (Kim et al. 2008, Wright et al. 2011, Haubek et al. 2011, Lee et al. 2011, Urzúa et al. 2011). A mutação no gene WDR72 (Hartz et al. 2010) causa AI tipo hipomaturada, localizada no cromossomo 15q21.3 Recentemente, o gene SLC4A4, localizado no 4q21 (Sherman et al. 1998), pode ser considerado um novo gene candidato das alterações dentárias (Urzúa et al. 2011).

Apesar dos defeitos na formação do esmalte não compreenderem um problema de saúde pública, podem causar alterações estéticas graves, além de comprometerem as estrutura do esmalte dentário. 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 et al. 2005, Schluter et al. 2008, Bailleul-Forestier et al. 2008, Uribe 2009, Parapanisiou et al. 2009, Hong et al. 2009, Kang et al. 2011).

Observa-se que o potencial cariogênico 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, há uma estreita relação entre a hipoplasias e lesões de cárie dentária (Seow 1997, Jalevik et al. 2001, Broadbent et al. 2005, Muju et al. 2006, Schluter et al. 2008, Patir et al. 2008, Uribe 2009, Parapanisiou et al. 2009, Hong et al. 2009). Clinicamente, constituem sérios problemas para os dentistas e também para as crianças afetadas. Para os primeiros, o problema está relacionado com o rápido e inesperado desenvolvimento de cáries durante a erupção 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) desestimula a escovação. Há também a queixa sobre a aparência de seus incisivos (Weerheijm 2004).

Pacientes com amelogênese imperfeita apresentam muitas dificuldades orais, incluindo sensibilidade e estética. Os métodos de tratamento da amelogênese imperfeita em crianças são limitados, embora não complexos. O planejamento do tratamento está relacionado com a idade, a gravidade da malformação e da saúde bucal do paciente. O diagnóstico precoce, cuidados preventivos e tratamento adequado são de fundamental importância para melhorar a saúde bucal de pacientes com amelogênese imperfeita (Markovic et al. 2010; Kang et al. 2011).

Nos indivíduos com fissura labiopalatina, os estudos abordam alta prevalência de anomalias dentárias quando comparados à população em geral (Vichi e Franchi 1995, Malanczuk et al. 1999, Chapple e Nunn 2001, Duque et al. 2004, Maciel et al. 2005, Galante et al. 2005, Pioto et al. 2005, Broadbent et

al. 2005, Schluter et al. 2008, Frazier-Bowers et al. 2009, Gomes et al. 2009). Entre elas, as alterações de esmalte foram encontradas com frequência e, principalmente, em incisivos centrais permanentes superiores, adjacentes às fissuras labiopalatinas (Vichi e Franchi 1995, Malanczuk et al. 1999, Chapple e Nunn 2001, Duque et al. 2004, Maciel et al. 2005, Pioto et al. 2005, Galante et al. 2005, Gomes et al. 2009). 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 fissura labiopalatina apresentam defeitos na formação do esmalte dentário e a sua intensidade parece depender da gravidade da fissura (Malanczuk et al. 1999, Chapple e Nunn 2001, Duque et al. 2004, Pioto et al. 2005, Galante et al. 2005, Maciel et al. 2005, Gomes et al. 2009). De acordo com a literatura recente, a amelogenina (AMELX) forma o esqueleto para a mineralização e para formação dos cristais do esmalte (Wright et al. 2009). Desta forma, seria interessante o estudo destes genes nos indivíduos com fissuras labiopalatinas.

Acredita-se que a causa das alterações dentárias possa ser uma desordem genética em conexão com doenças específicas e não-específicas durante a odontogênese (Lagarde et al. 1987, Frazier-Bowers et al. 2009), com o metabolismo mineral, especialmente o metabolismo do fosfato de cálcio. Alguns pesquisadores (Lagarde et al. 1987, Vichi e Franchi 1995, Malanczuk et al. 1999, Maciel et al. 2005) sugerem que a fissura labiopalatina poderia estar relacionada com a presença dessas alterações no esmalte, existindo uma

relação direta entre aparecimento do defeito e a presença da fissura. Considerando-se que as malformações dentárias podem estar relacionadas a diferentes mutações localizadas nos diversos genes envolvidos na formação do esmalte dentário e que o gene da amelogenina (AMELX) forma o esqueleto para a mineralização e formação dos cristais do esmalte (Wright et al. 2009), a investigação dos genes que transcrevem as principais proteínas e proteases do esmalte torna-se essencial para uma melhor compreensão dessas alterações, sendo interessante o estudo do gene AMELX, em específico nos indivíduos com fissuras labiopalatinas.

1.4 Justificativa do estudo

Conforme descrito anteriormente, a fissura labiopalatina é uma anomalia craniofacial comum em humanos e pode ocorrer como característica de um quadro sindrômico ou isolada, quando os indivíduos afetados não apresentam qualquer anomalia estrutural associada. A etiologia das fissuras labiopalatinas é complexa, com a contribuição de componentes genéticos e ambientais. Alguns autores consideram as fissuras labiopalatinas como parte de um fenótipo amplo e sugerem que características clínicas adicionais, como a presença de anomalias dentárias, poderiam ser utilizadas para uma melhor descrição do fenótipo individual, em investigações genéticas (Adams e Niswander 1967, Schroeder e Green 1975, Larson et al. 1998, Eerens et al.

2001, Stahl et al. 2006, Aizenbud et al. 2010). Defeitos na formação do esmalte dentário são frequentes em indivíduos com fissura labiopalatina e a sua intensidade parece depender da gravidade da fissura. O controle do complexo processo de mineralização se dá pela expressão de múltiplos genes, assim, mutações nos genes de proteínas e proteases do esmalte são associados à malformação dentária. Isso posto, justifica-se a realização de investigações adicionais, para que aspectos relativos ao desenvolvimento biológico e à genética da mutação das anomalias dentárias sejam esclarecidos. Isso poderá trazer contribuições importantes para um melhor entendimento do mecanismo envolvido nas malformações dentárias.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

- Realizar sequenciamento direto dos éxons codificadores de proteínas do gene AMELX.

2.2 Objetivo Específico

- Investigar a ocorrência de mutações nas sequências de nucleotídeos do gene AMELX candidato a defeitos na formação do esmalte dentário, em indivíduos com e sem fissura labiopalatina e malformação dentária.

2.3 Hipóteses

- H0 - A hipótese nula é que não há variações nas sequências de nucleotídeos no gene estudado.
- H1 - A hipótese alternativa é que há variações nas sequências de nucleotídeos no gene estudado.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL 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 (Ofício n°57/2010) (Apêndice A e B).

3.2 Casuística

Os participantes desta pesquisa foram selecionados junto a duas instituições:

- Setor de Odontopediatria do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP (HRAC-USP), local onde cerca de 900 prontuários foram analisados e,
- Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP (FOB-USP), local onde cerca de 300 pacientes foram avaliados

A amostra foi composta por 165 indivíduos, sendo 80 com fissura labiopalatina transforame incisivo unilateral ou bilateral isolada (não-sindrômica) e 85 sem fissura labiopalatina. Foram selecionados indivíduos de ambos os sexos, de 6 a 15 anos de idade, com e sem malformações dentárias. Essas malformações dentárias foram desde uma hipomineralização até uma hipoplasia nos dentes incisivos centrais permanentes superiores. A amostra foi dividida nos seguintes grupos:

- **Grupo 1:** 46 indivíduos com fissura labiopalatina transforame incisivo unilateral ou bilateral isolada e malformação dentária, regularmente matriculados no HRAC-USP (Figura 2).

Figura 2 – Indivíduo com fissura labiopalatina transforame incisivo bilateral apresentando malformação dentária

- **Grupo 2:** 34 indivíduos com fissura labiopalatina transforame incisivo unilateral ou bilateral isolada, sem malformação dentária, regularmente matriculados no HRAC-USP (Figura 3).

Figura 3 – Indivíduo com fissura labiopalatina transforame incisivo unilateral sem malformação dentária

- **Grupo 3:** 34 indivíduos sem fissura labiopalatina e com malformação dentária, regularmente matriculados na clínica de Odontopediatria da FOB-USP (Figura 4).

Figura 4 – Indivíduo apresentando malformação dentária

- **Grupo 4:** 51 indivíduos sem fissura labiopalatina e sem malformação dentária, regularmente matriculados na clínica de Odontopediatria da FOB-USP (Controle) (Figura 5).

Figura 5 – Indivíduo sem malformação dentária

A triagem e a coleta de saliva dos participantes deste estudo foi realizada pela pesquisadora, com a supervisão do dentista responsável pelo setor, na ocasião em que os indivíduos compareceram para consultas de rotina no setor de Odontopediatria do HRAC-USP e na clínica de Odontopediatria da FOB-USP. A todos os indivíduos selecionados, de acordo com os critérios acima descritos, e convidados a participar do estudo, foi explicado pela pesquisadora o objetivo do trabalho e, após aceitação em participar, foi solicitada a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável (Apêndice B).

3.3 Análise Molecular

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório da disciplina Farmacologia, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. As análises moleculares foram

realizadas pela pesquisadora, com a colaboração do especialista de laboratório Thiago José Dionísio.

3.3.1 Estudo piloto

Esta fase do estudo constituiu na extração de DNA da saliva de um grupo de voluntários, utilizando-se diferentes concentrações de proteinase K, com o objetivo de estabelecer o melhor protocolo para a extração de DNA da saliva, comparando-se os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene constitutivo humano β-actina.

Foi utilizado o protocolo com o produto InstaGene™ Matrix (732-6030, Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) diluído em água (1:1) associado a 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µL de proteinase K >600 mAU/ml (19133, Qiagen®, Alemanha).

Com o DNA obtido por meio das seis diferentes concentrações de proteinase K, foi realizada a PCR do gene da β-actina (fragmento de 351 pb), utilizando-se os *primers* e condições de PCR já estabelecidos previamente no laboratório de Farmacologia da FOB-USP (Santos et al. 2002; Sakai et al., 2007), com o objetivo de verificar a amplificação de DNA na PCR. Para a confirmação da amplificação do fragmento desejado do gene da β-actina, foram utilizados 10 µL do produto da PCR das amostras misturadas 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 300V, Loccus Biotecnologia, Brasil) nas seguintes condições: 110 V por 90 minutos.

Foram considerados amplificados os produtos das amostras que apresentaram sinal positivo de bandas observadas quando da exposição do gel em luz ultravioleta, pela comparação com um marcador de peso molecular, pois o tamanho do fragmento desejado do gene da β-actina com os *primers* utilizados na PCR, era de 351 pb (Figura 6).

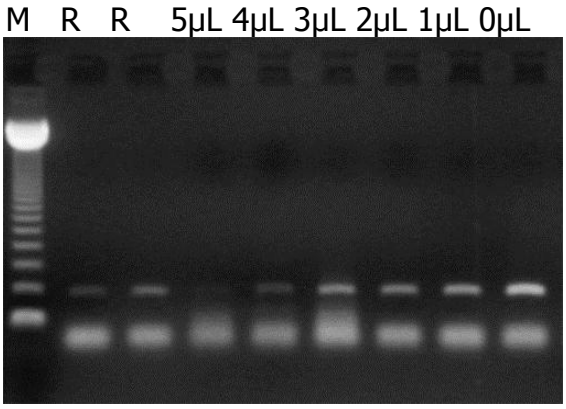


Figura 6 – Gel de agarose corado com brometo de etídio representando as amplificações de DNA do gene da β-actina extraídos a partir do protocolo utilizando InstaGene™ associado a diferentes concentrações de proteinase K. A banda em destaque representa a amostra que foi extraída utilizando o InstaGene™ sem proteinase K. M= marcador de peso molecular de 150 pb.
pb=pares de base
R=repetições

3.3.2 Coleta e preparo das amostras

Os pacientes receberam um tubo plástico estéril Falcon, de 50 mL, devidamente identificado para a coleta de 10mL de saliva total expectorada.

Após a coleta, as amostras foram aliquotadas em tubos estéreis de microcentrífuga de 1,5 mL, para melhor manuseio e estoque, e foram alocadas em freezer, a -20°C, no laboratório da disciplina de Farmacologia, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP, até o momento da extração do DNA.

3.3.3 Extração do 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).

De cada uma das amostras, foi pipetado 1 mL da saliva, o qual foi transferido para um novo tubo estéril de microcentrífuga, de 1,5 mL, devidamente identificado. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA, conforme protocolo descrito a seguir:

- **PROTOCOLO 1 - EXTRAÇÃO DE DNA DE SALIVA**

InstaGene™ Matrix (732-6030, Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) diluído em água - 1:1

A) Lavagem das células

1. Acrescentar 0,5 mL de soro fisiológico no tubo contendo 1 mL de saliva.
2. Agitar o tubo no agitador, para diluição uniforme do conteúdo.
3. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos, a 4°C (Biofuge 15R Heraeus Instruments, Alemanha e Z326K Hermle Labortechnik GmbH, Alemanha).
4. Descartar o sobrenadante.
5. Acrescentar 1 mL de soro fisiológico no mesmo tubo.
6. Agitar o tubo no agitador, até que o precipitado se dissolva completamente.
7. Centrifugar a 13.000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C.
8. Descartar o sobrenadante.
9. Repetir os procedimentos 5 a 8 por mais duas vezes.
10. Deixar o tubo invertido num papel absorvente, por alguns segundos, para secagem do precipitado.

B) Remoção de resíduos que podem interferir no resultado da PCR, ruptura de membrana celular e precipitação de resíduos

1. Acrescentar 100 µL de água livre de DNAase e RNAase (água Milli-Q) e 100 µL do InstaGene™ (1:1).
2. Agitar o tubo no agitador até que o precipitado se dissolva completamente,

3. Incubar a 56°C, por 30 minutos (Banho-maria 314/2D Nova Ética, Brasil).
4. Agitar o tubo no agitador, em velocidade máxima, por 10 segundos.
5. Ferver os tubos em 100°C, por 10 minutos, para promover a lise celular.
6. Agitar o tubo no agitador, em velocidade máxima, por 10 segundos.
7. Centrifugar a 13.000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C.

C) *Coleta do DNA*

1. Pipetar o sobrenadante, pois é onde se encontra o DNA, tomando cuidado para não pipetar o precipitado no fundo do tubo, nem o líquido turvo próximo ao precipitado, pois nesse local se encontram os restos de células, organelas e proteínas. O rendimento em volume desse protocolo é por volta de 150 µL de solução de DNA.

O principal objetivo desta etapa foi obter, por meio do protocolo de extração escolhido, a maior concentração de DNA possível, com a melhor qualidade.

3.3.4 Quantificação do DNA extraído da saliva

A quantificação e a expectativa de qualidade do DNA obtido de todas as amostras foram realizadas por meio de leitura no espectrofotômetro, em comprimentos de onda de 260 e 280 nm (NanoDrop™ 1000 Thermo Scientific, Estados Unidos). Esse equipamento fornece duas medidas importantes: concentração e expectativa de qualidade do DNA. Os valores referentes à concentração são expressos em ng/µL e, para a aferição realizada no espectrofotômetro, são necessários de 1,5 µL a 2 µL de cada amostra. Os valores referentes à qualidade são expressos por meio da relação das absorbâncias em 260 nm e 280 nm.

3.3.5 Diluição das amostras de DNA para PCR

Padronizou-se a quantidade inicial de DNA para PCR em 500 ng. Após a adequada diluição de cada amostra, estas foram armazenadas em freezer, a -20°C, para serem utilizadas ao longo do estudo.

3.3.6 Reação em Cadeia da Polimerase

As triagens de mutação no gene AMELX foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento direto das regiões codificadoras (éxons 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do gene AMELX).

Os *primers* senso e antisenso necessários para a realização da PCR dos éxons do gene AMELX, foram desenhados com base em sequências publicadas no Ensembl (European Bioinformatics Institute e Wellcome Trust Sanger Institute 2011a), utilizando-se o programa Primer3 (Rozen e Skaletsky 2000). Cada *primer* foi desenhado de maneira a flanquear o éxon antes do seu início (Anexo A). A confirmação da especificidade dos *primers* desenhados foi realizada por meio de consulta na base de dados Blast (National Center for Biotechnology Information 2009) 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).

Optou-se por desenhar um par de *primers* comum para os éxons 4 e 5 do gene AMELX*,* devido ao seus tamanhos reduzidos.

As sequências dos *primers* senso e antisenso do gene AMELX e as condições da PCR estão na Tabela 1:

Tabela 1 – Sequência dos *primers* senso e *anti*senso dos éxons 2, 3, 4-5, 6 e 7 do gene AMELX e as condições da PCR

Éxon	***Primer* (5′ – 3′)**	pb	TA
2	F: AGATTATGTGTGTTTTATGGAGCA R: CCCTAATTTCACCAACTATGAGC	233	62°C
3	F: TCCTTTAATGTGAACAATTGCAT R: TCTGGGATAAAGAATCAACACA	250	57°C
4-5	F: TGAAGAATGTGTGTGATGGATG R: TCCCATTAATGTCTGCATGTG	367	60°C

6	F: CCATAATGGCAAAGAAAACAC R: TGGTTGTCGGAGACCTTAGAA	599	59°C
7	F: TGACAAAACTGAAGCCAGACAT R:TGCATTTTATTGTCTGCTAATGG	237	61°C

F: *primer* senso; R: *primer* antisenso; pb: pares de bases; TA: temperatura de anelamento.

O cálculo da temperatura de anelamento dos *primers* foi realizado levando-se em conta os pares de bases (pb) que compõem os *primers*, por meio da fórmula: TA = (A+T) x 2 + (C+G) x 4. Essa fórmula foi usada para cada uma das fitas senso e antisense separadamente e então realizada a média aritmética. O resultado desta média aritmética é a TA de partida para a padronização da TA ideal para o par de *primers*. A partir desta TA de partida, foram testadas TA de partida -1, +1, -2 e +2. A escolha da TA ideal se deu pela presença e pelo aspecto das bandas visualizadas no gel de agarose corado com brometo de etídeo exposto à luz ultravioleta, após a eletroforese.

Cada éxon do gene AMELX foi amplificado pela técnica de PCR, utilizando-se o kit para PCR (*Taq DNA polymerase* 11615-010, Invitrogen, Brasil) em um volume final de 50 µL, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Esquema contendo os reagentes, as concentrações e as quantidades utilizadas na PCR, num volume total de 50 µL por reação

Produto	**Volume utilizado (µL)**	**Concentração final (1 reação)**
Tampão Tris-HCL (10x)	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 µM	2,0 µL	0,4 µM

Taq Polimerase (1 U/µL)	0,5 µL	0,5 U
DNA molde (50 ng/µL)	10,0 µL	500 ng
Água livre se DNAase e RNAase	30,0 µL	-

O processo de ciclagem térmica, realizado em termociclador (Veriti, Applied Biosystems, Estados Unidos), constituiu de desnaturação inicial por 4 min, a 95°C, seguida de 45 ciclos de amplificação. Cada ciclo constituiu de desnaturação por 30 s, a 95°C, anelamento por 30 s, a TA ideal do par de *primers* e extensão por 1 min, a 72°C. As amostras foram incubadas por um período adicional de 7 min, a 72°C, e mantidas em 4˚C, até o momento da retirada do aparelho.

3.3.7 Eletroforese em gel de agarose para verificar a amplificação

Para a confirmação da amplificação do fragmento desejado dos éxons do gene AMELX foram utilizados 10 µL do produto da PCR de todas as amostras, misturadas 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 300V, Loccus Biotecnologia, Brasil) nas seguintes condições: 110 V por 90 minutos.

Foram considerados amplificados os produtos das amostras que apresentassem sinal positivo de bandas observadas, quando da exposição do gel em luz ultravioleta, pela comparação com um marcador de peso molecular de 123 pb, pois o tamanho do fragmento dos éxons do gene AMELX, com os *primers* utilizados na PCR, variam de 233 a 599 pb.

3.3.8 Purificação do produto da PCR

Os produtos da PCR foram purificados com *QIAquick® PCR Purification Kit* (28106, Qiagen, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante, seguindo-se o protocolo descrito a seguir.

- **PROTOCOLO 2 – PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR**

QIAquick® PCR Purification Kit (28106, Qiagen, Alemanha)

1. Nos tubos contendo as colunas, pipetar 40 µL de produto de PCR e 200 µL do tampão de ligação (PB *Buffer*).
2. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 min, a 20°C.
3. Descartar o líquido existente no fundo do tudo coletor, após a centrifugação.

4. Adicionar 750 µL de tampão de lavagem (PE *Buffer*), preparado de acordo com a recomendação do fabricante, com a adição de etanol.
5. Centrifugar novamente, a 13.000 rpm, por 1 min, a 20°C.
6. Descartar o líquido existente no fundo do tudo coletor, após a centrifugação.
7. Centrifugar novamente, a 13.000 rpm, por 1 min, a 20°C.
8. Desprezar o tubo coletor, trocando-o por outro tubo novo e estéril.
9. Acrescentar à coluna 30 µL de tampão de eluição (EB *Buffer*).
10. Esperar 1 minuto.
11. Centrifugar novamente, a 13.000 rpm, por 1 min, a 20°C.
12. Desprezar a coluna e transferir o volume de líquido com DNA purificado, presente no tubo coletor, para um tubo de microcentrífuga de 600 µL, para estocagem em freezer, a -20°C.

Este protocolo de purificação rende cerca de 150 µL de produto de PCR purificado. Após a purificação do produto da PCR, fez-se novamente a quantificação das amostras, pela leitura em espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000) em comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Cada produto de PCR purificado foi adequadamente diluído para uma concentração final de 2 ng/µL.

3.3.9 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento é uma reação baseada nos mesmos princípios da PCR. A primeira diferença é que as reações das fitas senso e antisenso são realizadas em ciclagens separadas. A segunda é que juntamente aos dNTPs comuns, presentes na reação, estão os dideoxinucleotídeos (ddNTPs). Estes últimos são chamados nucleotídeos de terminação, pois têm a mesma característica dos deoxinucleotídeos comuns, nos quais, porém, foi removido o grupo hidroxila 3' terminal. O momento da ligação de uma fita molde de DNA aos ddNTPs marcados com sinal de fluorescência ("*dye-terminators*") determina o término da sua extensão da mesma, pois sem o grupo hidroxila 3' terminal não é possível ocorrer a ligação peptídica, determinando a paralisação da fase de extensão. É justamente esse sinal de fluorescência do ddNTP terminal que é lido pelo sequenciador (Neves 2009). Como a adição de ddNTPs marcados ocorre aleatoriamente durante a reação de sequenciamento, no produto final encontram-se diversos fragmentos de DNA, de tamanhos distintos, representando todas as extensões possíveis entre as duas extremidades a serem analisadas. Essa marcação empregada no processo utiliza moléculas capazes de emitir fluorescência de diferentes cores para cada ddNTP (vermelho, verde, amarelo e azul para T, A, G e C, respectivamente), quando excitada por uma fonte de luz. As reações podem ser combinadas em um só tubo, com a leitura das bases realizada simultaneamente. Outra característica importante da reação de sequenciamento é que, ao contrário da

reação de PCR, que é exponencial, no sequenciamento, a reação é linear. Isso acontece porque a ciclagem ocorre separadamente para as fitas senso e antisenso. Logo, no tubo de reação, após a fase de desnaturação, só há um *primer* iniciador para o anelamento e extensão pela AmpliTaq DNA polimerase, enquanto a outra fita do molde de DNA, que se abriu na desnaturação, se torna resíduo da reação (Neves 2009).

Nas reações de sequenciamento foram utilizados de 10 a 20 ng do produto da PCR purificado. A quantidade de produto de PCR purificado, a ser utilizada na reação de sequenciamento, depende do tamanho do fragmento a ser sequenciado, descrito na Tabela 3 (Neves 2009).

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

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de 96 poços (N801-0560, Applied Biosystems, Estados Unidos), devidamente seladas com selo óptico (4311971, Applied Biosystems, Estados Unidos), utilizando-se

2 µL de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (4336917, Applied Biosystems, Estados Unidos) (Tabela 4).

Tabela 4 – Esquema contendo os reagentes e o volume utilizado para Reação de Sequenciamento

Produto	Volume utilizado
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)	2,0 µl
BigDye® Terminator v1.1, 3.1 Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	3,0 µl
Primer a 3,2 µM (F ou R)	1,0 µl
Água	Para completar 20 µl
Produto PCR purificado (2ng/µl)	De 5 a 10 µl
Volume Final	20 µl

O processo de ciclagem térmica, realizado no termociclador (Veriti, Applied Biosystems, Estados Unidos), constituiu de desnaturação inicial por 1 min, a 96°C, seguida de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo constituiu de desnaturação por 15 s, a 96°C, anelamento por 15 s, a 50°C e extensão por 4 min, a 60°C. As amostras foram mantidas em 4°C, até o momento da retirada do aparelho. Ao programar os ciclos de temperatura, tomou-se o cuidado de configurar a rampa de temperatura do termociclador para subir e descer a uma velocidade de 1°C por segundo.

3.3.10 Precipitação do produto da Reação de Sequenciamento

Imediatamente após o término da reação de sequenciamento, iniciou-se a precipitação do produto da reação de sequenciamento. O protocolo utilizado foi etanol/etilenediaminotetracético (EDTA)/acetato de sódio e está descrito a seguir.

- **PROTOCOLO 3 – PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO**

Etanol/EDTA/Acetato de Sódio (volume final de 20 µL)

Após retirar a placa de 96 poços do termociclador, colocá-la sobre suporte adequado (N8010531, Applied Biosystems, Estados Unidos) e realizar os seguintes procedimentos:

1. Ligar a centrífuga e programá-la para ficar a 15°C.
2. Adicionar 2 µL de EDTA a 125 mM em cada poço da placa.
3. Adicionar 2 µL de acetato de sódio a 3M em cada poço da placa.
4. Adicionar 50 µL de etanol absoluto em cada poço da placa.
5. Selar a placa com selo óptico.
6. Agitar a placa brevemente.
7. Incubar a placa contendo as amostras em temperatura ambiente por 15 minutos, protegida da luz.
8. Centrifugar a placa por 30 minutos, a 4.000 rpm, a 15°C.
9. Remover o sobrenadante, vertendo a placa na pia, sem volta-la para a posição normal, colocando-a sobre papel absorvente e alocando-a, a seguir, na centrífuga, em posição invertida, para remover todo o etanol.

10. Centrifugar a placa invertida por 1 minuto, a 1.000 rpm, a 15°C.
11. Adicionar 70 µL de etanol a 70%, em cada poço da placa.
12. Centrifugar por 15 minutos, a 4.000 rpm, a 15°C.
13. Novamente, descartar o sobrenadante, vertendo-o na pia.
14. Centrifugar a placa invertida por 1 minuto, a 1.000 rpm, a 15°C.
15. Deixar a placa secar em temperatura ambiente por 30 minutos, protegida da luz.
16. Adicionar, em cada poço da placa, 10 µL do tampão de injeção Formamida Hi-Di (4311320, *Applied Biosystems*, Estados Unidos).
17. Selar a placa com selo óptico.
18. Centrifugar por 1 minuto, a 1.000 rpm, à temperatura ambiente.
19. Colocar a placa no termociclador, a 95°C, por 5 minutos, para realizar a desnaturação das amostras.
20. Imediatamente após retirar a placa do termociclador, colocá-la no gelo, protegendo-a da luz, por 2 minutos.
21. Tirar o selo, colocar a septa (4315933, *Applied Biosystems*, Estados Unidos) e colocar a placa no sequenciador.

3.3.11 Leitura no Sequenciador

Em seguida, as amostras foram submetidas a leitura do sequenciamento no 3130xl - Genetic Analyzer (4352715, Applied Biosystems,

Estados Unidos), que utiliza um sistema de eletroforese capilar para a separação dos fragmentos de DNA. Nesse sequenciador, de 16 capilares, cada um deles é revestido por um eletrodo em uma das extremidades e durante a eletroforese capilar, as moléculas, fragmentos a serem sequenciados, tendem a ser eletroinjetados no capilar, entrando em contato com o polímero; ou seja, elas migram para o interior do capilar. Quando submetidos à alta voltagem, esses fragmentos no polo negativo tendem a se mover no interior do capilar preenchido com o polímero (malha de corrida), em direção ao polo positivo. A ordenação nessa migração das moléculas, para a leitura, vai depender do peso molecular de cada uma delas. Assim, todas essas moléculas (fragmentos) marcadas em diferentes locais, com ddNTPs fluorescentes, migrarão progressivamente, de acordo com o tamanho, tendo sua fluorescência detectada por um laser.

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 7).

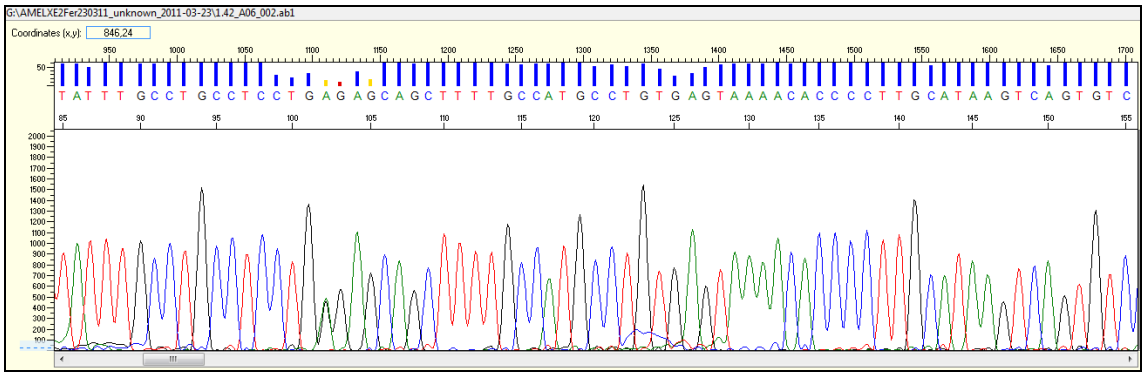


Figura 7 – Eletroferograma visualizado no *Software Sequencing Analysis® 5.3.1*, resultado do sequenciamento do éxon 2 do gene AMELX. Em destaque, uma mutação encontrada.

3.3.12 Análise das sequências obtidas

Após a visualização, as sequências obtidas foram analisadas no *Software SeqScape® 2.6* (Applied Biosystems, Estados Unidos) (Figura 8).

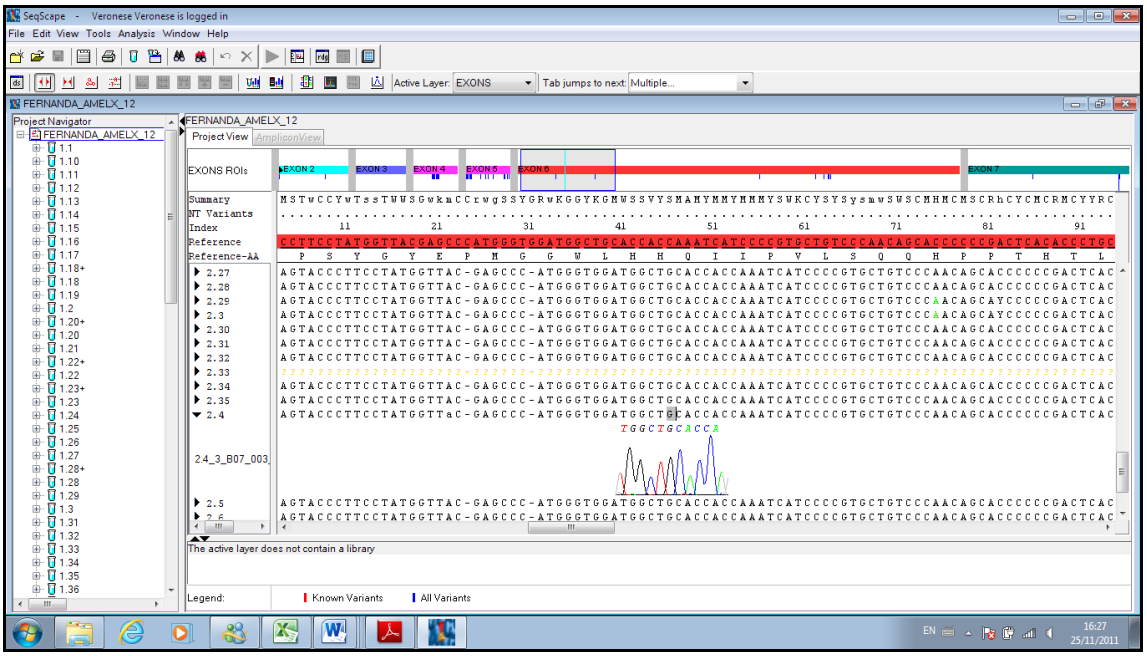


Figura 8 – Análise das sequências obtidas no sequenciamento no programa *Software SeqScape® 2.6*

As sequências de bases e os eletroferogramas gerados pelo programa foram inspecionados, minuciosamente, por dois examinadores a fim de detectar variações. Houve concordância de 100% entre os avaliadores. As alterações encontradas no sequenciamento utilizando o *primer* senso foram confirmadas por meio do sequenciamento utilizando o *primer* antisenso.

Cada variação de sequência de nucleotídeos identificada no sequenciamento foi descrita utilizando-se o sistema de nomenclatura de den Dunnen e Antonarakis (2000). 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 Blast (National Center for Biotechnology Information 2009) em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast e dbSNP (National Center for Biotechnology Information 2011) em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP. Para avaliar o efeito potencial de uma mutação no genoma, na transcrição e/ou na tradução, foram utilizados programas específicos como o Ensembl (Genome Bioinformatics Group, 2011).

3.4 Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva dos dados dos sequenciamentos.

4 Resultados

4 RESULTADOS

Das 165 amostras de saliva submetidas ao sequenciamento genético do gene AMELX, ao final das repetições, obteve-se um aproveitamento de 157 amostras do éxon 2 (95%), 148 amostras do éxon 3 (90%), 147 amostras do éxon 4 (89%), 146 amostras do éxon 5 (88%), 155 amostras do éxon 6 (94%) e 165 amostras do éxon 7 (100%). A média de aproveitamento das amostras de todos éxons sequenciados foi de 93% (Figura 9).

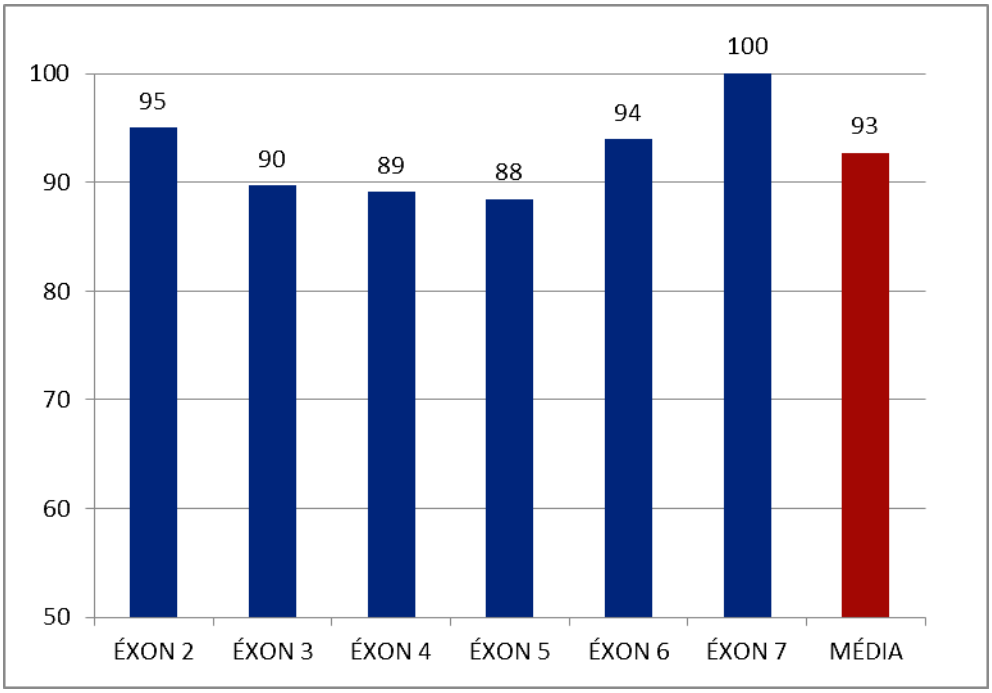


Figura 9 – Gráfico representativo do aproveitamento das sequências dos éxons do gene AMELX

Com relação aos grupos estudados, o aproveitamento das sequências de cada éxon está disposto na Tabela 5.

Tabela 5 – Aproveitamento das sequências dos éxons do gene AMELX por grupo estudado

		Éxon 2		Éxon 3		Éxon 4		Éxon 5		Éxon 6		Éxon 7	
	NT	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Grupo 1	46	45	98	39	85	36	78	38	83	41	89	46	100
Grupo 2	34	33	97	24	71	26	76	23	68	29	85	34	100
Grupo 3	34	29	85	34	100	34	100	34	100	34	100	34	100
Grupo 4	51	50	98	51	100	51	100	51	100	51	100	51	100
Total	**165**	**157**	**95**	**148**	**90**	**147**	**89**	**146**	**88**	**155**	**94**	**165**	**100**

N= número, NT= número total

Dos 990 fragmentos sequenciados (6 éxons em 165 amostras de saliva), 276 eram do Grupo 1, 204 do Grupo 2, 204 do Grupo 3 e 306 do Grupo 4. Desse total, 918 fragmentos (93%) foram analisados (245, 169, 199 e 305, respectivamente). Detectou-se alteração na sequência de bases em 37 destes fragmentos (4%), sendo 14 no Grupo 1, 12 no Grupo 2, 4 no Grupo 3 e 7 no Grupo 4 (Figura 10).

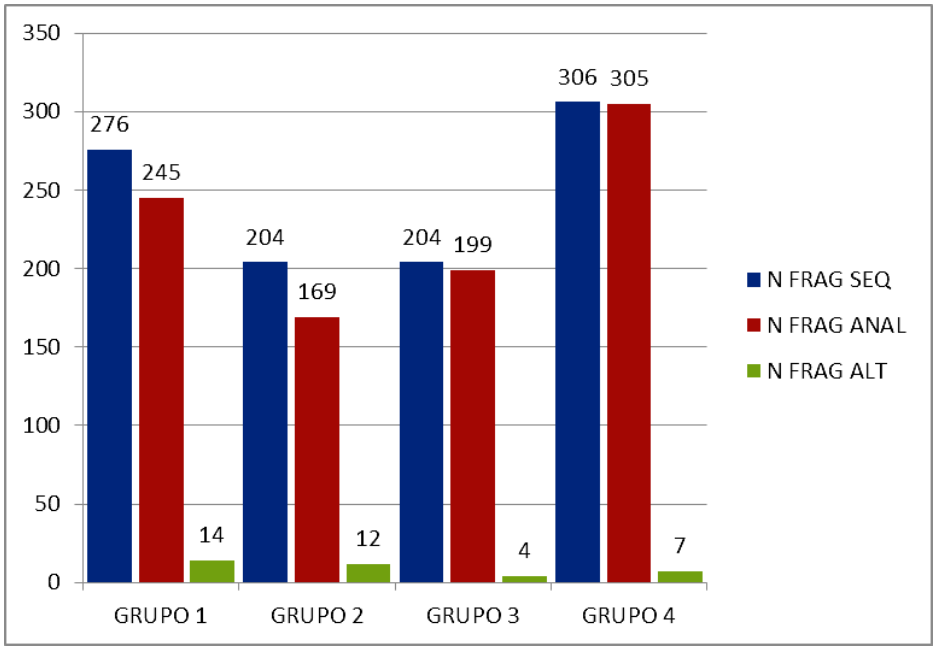
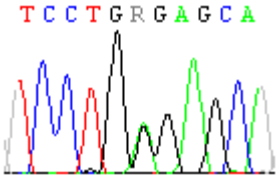
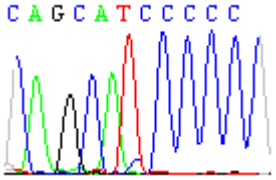
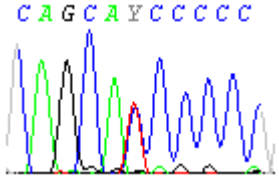


Figura 10 – Gráfico representativo do número de fragmentos sequenciados, analisados e alterados de cada grupo estudado

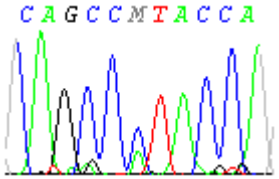
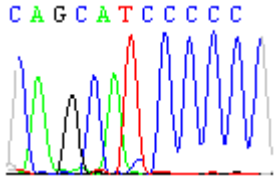
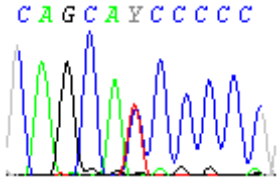
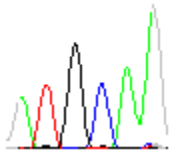
Das 14 mutações encontradas no Grupo 1, formado por indivíduos com fissura labiopalatina e malformação dentária, uma mutação localizou-se no éxon 2 e caracterizou-se pela substituição missense de uma base G por uma base A, em apenas um dos alelos, na posição 11313543 do cromossomo X. Essa substituição promoveu a troca do aminoácido Gly pelo aminoácido Arg nesse local. As outras 13 mutações, do tipo silenciosa, localizaram-se no éxon 6: sete delas caracterizadas pela substituição da base C pela base T, nos 2 alelos, e seis caracterizadas pela substituição destas mesmas bases em apenas um dos alelos, na posição 11317343 do cromossomo X (Tabela 6).

Tabela 6 – Mutações encontradas nos sequenciamentos analisados do Grupo 1

Éxon	n	Troca de Base	Posição no éxon	Posição no gene	Posição no Cromossomo X	Tipo	Efeito	Troca de Códon	Troca de aa	Eletroferograma
2	1	G>R (A/G)	46	2010	11313543	Substituição	Missense	GGA>AGA	Gly>Arg	
6	7	C>T	75	5810	11317343	Substituição	Silent	CAC>CAT	His>His	
6	6	C>Y (C/T)	75	5810	11317343	Substituição	Silent	CAC>CAT	His>His	

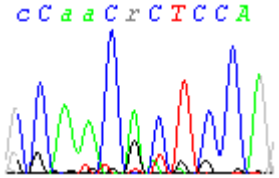
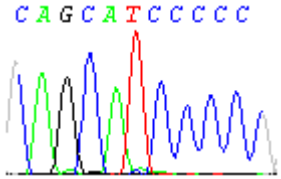
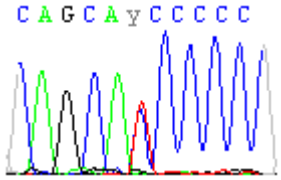
Com relação ao Grupo 2, formado por indivíduos com fissura labiopalatina e sem malformação dentária, foram encontradas 12 mutações. Sete delas, do tipo silenciosa, foram localizadas no éxon 6: uma caracterizada pela substituição da base C pela base A, em um dos alelos, na posição 11317502 do cromossomo X e as outras seis mutações caracterizadas pela substituição da base C pela base T, na posição 11317343 do cromossomo X. Destas últimas, em duas, a troca se deu nos dois alelos e nas outras quatro, a troca se deu em apenas um dos alelos. Cinco mutações caracterizadas pela substituição missense da base T pela base A foram detectadas no éxon 7, na posição 11319473 do cromossomo X, promovendo a troca do aminoácido Ile pelo aminoácido Asn nesse local (Tabela 7).

Tabela 7 – Mutações encontradas nos sequenciamentos analisados do Grupo 2

Éxon	n	Troca de Base	Posição no éxon	Posição no gene	Posição no Cromossomo X	Tipo	Efeito	Troca de Códon	Troca de aa	Eletroferograma
6	1	C>M (A/C)	234	5969	11317502	Substituição	Silent	CCC>CCA	Pro>Pro	
6	2	C>T	75	5810	11317343	Substituição	Silent	CAC>CAT	His>His	
6	4	C>Y (C/T)	75	5810	11317343	Substituição	Silent	CAC>CAT	His>His	
7	5	T>A	146	7940	11319473	Substituição	Missense	ATT>AAT	Ile>Asn	

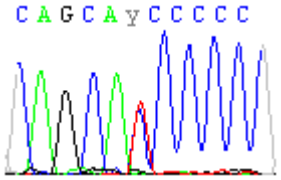
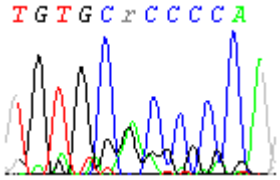
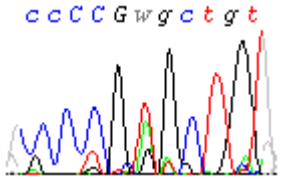
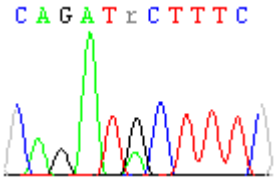
No Grupo 3, formado por indivíduos sem fissura labiopalatina e com malformação dentária, foram detectadas quatro mutações, todas localizadas no éxon 6 do gene AMELX. Uma das mutações caracterizou-se pela substituição missense da base A pela base G, em um dos alelos, na posição 11317444 do cromossomo X, promovendo a troca do aminoácido His pelo aminoácido Arg nesse local. As outras três mutações detectadas eram substituições do tipo silenciosa, da base C pela base T, na posição 11317343 e em duas delas ocorreram em apenas um dos alelos (Tabela 8).

Tabela 8 – Mutações encontradas nos sequenciamentos analisados do Grupo 3

Éxon	n	Troca de Base	Posição no éxon	Posição no gene	Posição no Cromossomo X	Tipo	Efeito	Troca de Códon	Troca de aa	Eletroferograma
6	1	A>R (A/G)	176	5911	11317444	Substituição	Missense	CAC>CGC	His>Arg	
6	1	C>T	75	5810	11317343	Substituição	Silent	CAC>CAT	His>His	
6	2	C>Y (C/T)	75	5810	11317343	Substituição	Silent	CAC>CAT	His>His	

Com relação ao Grupo 4, formado por indivíduos sem fissura labiopalatina e malformação dentária, nas amostras sequenciadas e analisadas, foram detectadas sete mutações, todas em apenas um dos alelos. Seis mutações foram detectadas no éxon 6: quatro caracterizadas pela substituição do tipo silenciosa da base C pela base T, na posição 11317343 do cromossomo X; uma caracterizada pela substituição missense da base A pela base G, na posição 11317564 do cromossomo X, promovendo a troca do aminoácido His pelo aminoácido Arg; e uma caracterizada pela substituição do tipo missense da base T pela base A, na posição 11317327 do cromossomo X, gerando a troca do aminoácido Val por Glu nesse local. A outra mutação encontrada no Grupo 4 localizou-se no éxon 7 e é caracterizada pela substituição missense da base G pela base A, na posição 11319371 do cromossomo X, promovendo a troca do aminoácido Cys por Tyr (Tabela 9).

Tabela 9 – Mutações encontradas nos sequenciamentos analisados do Grupo 4

Éxon	n	Troca de Base	Posição no éxon	Posição no gene	Posição no Cromossomo X	Tipo	Efeito	Troca de Códon	Troca de aa	Eletroferograma
6	4	C>Y (C/T)	75	5810	11317343	Substituição	Silent	CAC>CAT	His>His	
6	1	A>R (A/G)	296	6031	11317564	Substituição	Missense	CAC>CGC	His>Arg	
6	1	T>W (A/T)	59	5794	11317327	Substituição	Missense	GTG>GAG	Val>Glu	
7	1	G>R (A/G)	44	7838	11319371	Substituição	Missense	TGC>TAC	Cys>Tyr	

Todas as mutações detectadas no sequenciamento do gene AMELX estão distribuídas por éxon e por grupo estudado, conforme a Tabela 10.

Tabela 10 – Distribuição das mutações detectadas nos 4 grupos de estudo

Éxon	Troca de Base	Posição no Cromos. X	Grupo 1 (n)	Grupo 2 (n)	Grupo 3 (n)	Grupo 4 (n)	Total (n)
2	G>R (A/G)	11311579	1	0	0	0	1
6	A>R (A/G)	11311709	0	0	1	0	1
	C>M (A/C)	11311767	0	1	0	0	1
	A>R (A/G)	11311829	0	0	0	1	1
	T>W (A/T)	11311592	0	0	0	1	1
	C>T	11311608	7	2	1	0	10
	C>Y (C/T)	11311608	6	4	2	4	16
7	T>A	11311679	0	5	0	0	5
	G>R (A/G)	11311577	0	0	0	1	1
TOTAL por grupo			14	12	4	7	37
TOTAL			26		11		37

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Comparações pertinentes dos resultados obtidos neste trabalho e outros presentes na literatura devem ser conduzidas com cautela, devido à escassez de estudos sobre o assunto. É importante ressaltar que este trabalho é único, apesar da existência de alguns semelhantes. Mesmo diante desta dificuldade, torna-se possível estabelecer parâmetros e avaliar a pesquisa realizada.

Visando proporcionar uma melhor interpretação dos resultados obtidos nesta pesquisa, serão discutidos inicialmente os aspectos referentes à amostra bem como à metodologia aplicada para obtenção dos resultados. Posteriormente, serão realizadas considerações sobre os resultados obtidos mediante análise descritiva dos dados e as implicações clínicas do trabalho proposto.

5.1 A Casuística

Neste estudo, foram utilizados para a composição da amostra 165 pacientes: 46 com fissura labiopalatina e malformação dentária (Grupo 1), 34 com fissura labiopalatina e sem malformação dentária (Grupo 2), 34 sem fissura labiopalatina e com malformação dentária (Grupo 3) e 51 sem fissura labiopalatina e malformação dentária (Grupo 4). O critério de inclusão da

amostra, proposto no projeto inicial, foi alterado devido à dificuldade de obtenção desses pacientes e à complexidade das técnicas a serem empregadas. Assim, para padronização homogênea da amostra, os critérios de inclusão ficaram definidos da seguinte forma:

- dentes avaliados: incisivos centrais permanentes superiores;
- idade dos pacientes selecionados: 6 a 15 anos de idade;
- tipo de fissura labiopalatina: fissura transforame incisivo unilateral ou bilateral.

No setor de Odontopediatria do HRAC-USP, cerca de 900 prontuários foram analisados e somente 80 pacientes puderam fazer parte, efetivamente, da pesquisa.

Na clínica de Odontopediatria da FOB-USP, cerca de 300 pacientes foram avaliados e apenas 85 pacientes puderam fazer parte da pesquisa.

Uma das principais dificuldades encontradas na pesquisa foi selecionar e convidar os pacientes para participar do estudo. Os motivos eram vários, embora a maior dificuldade fosse falta de tempo dos pacientes para coletar a saliva.

No HRAC-USP, a maioria deles tinha outras consultas agendadas, logo após o atendimento no setor de Odontopediatria e, tratando-se de um hospital, não poderiam ocorrer atrasos. Quando os pacientes não tinham outra consulta logo após o atendimento no setor de Odontopediatria, muitos tinham hora marcada para o retorno a suas cidades de origem. A falta de informação no Prontuário de Genética, também, foi um fator prejudicial para a coleta de

saliva. Muitos pacientes que se encaixavam nos critérios de inclusão não tinham o diagnóstico genético fechado, assim, a possibilidade de terem síndromes genéticas os impedia de participar da pesquisa.

Outra dificuldade encontrada foi que, como os pacientes eram abordados logo após o atendimento odontológico, frequentemente tinham realizado exodontia ou algum outro procedimento odontológico que os deixavam sensibilizados; desta forma, não eram incluídos na pesquisa.

A alta incidência de fluorose foi outro obstáculo para a seleção dos participantes, visto que a sua presença foi um critério de exclusão.

A maioria dos estudos que investigam genes candidatos ou realizam triagem de mutação em indivíduos com fissura labiopalatina incluem vários tipos de fissura na avaliação, o que não é o ideal, uma vez que as formações do lábio e do palato ocorrem em períodos embriológicos distintos (Slayton et al. 2003, Stephanopoulos et al. 2005, Riley et al. 2007, Pegelow et al. 2008, Neves 2009). Neste estudo, foram selecionados indivíduos que apresentavam fissura labiopalatina transforame incisivo unilateral ou bilateral isolada (não-sindrômica), tipo de fissura mais frequente no HRAC/USP, definindo o fenótipo a ser estudado.

Na literatura consultada, a maioria dos estudos analisou famílias com alterações dentárias (Hart et al. 2002, Kim et al. 2005a, Kim et al. 2005b, Kim et al. 2008, Stephanopoulos et al. 2005, Wright et al. 2009, Hart et al. 2009, Wright et al. 2011, Haubek et al. 2011, Lee et al. 2011) e não grupos de pacientes com diferentes fenótipos e genótipos, como neste estudo.

5.2 Metodologia

Para a realização desta pesquisa, utilizou-se o método de sequenciamento direto de DNA genômico, a partir de amostras de saliva.

Os rápidos avanços no desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento, nos últimos anos, permitem um número crescente de aplicações na biologia e nas várias áreas da saúde (Berglund et al. 2011). O sequenciamento direto de DNA genômico tem sido o método de eleição para investigar polimorfismos e mutações nas populações e relacioná-los às doenças (Karger e Gutman 2009, Neves 2009, Milos et al. 2009, Bennet et al. 2009).

A saliva é o material de partida para extração de DNA, citado na literatura de mais fácil acesso e não necessita de intervenção invasiva para a coleta (Vieira et al. 2008a, Vieira et al. 2008b, Neves 2009, Wright et al. 2011), e por esse motivo, foi utilizada a saliva como material de partida para o sequenciamento do DNA.

Neste trabalho, apenas os éxons que participam do processo de transcrição do gene AMELX foram amplificados e sequenciados (éxons 2-7). Em primeira análise, apenas as fitas senso dos éxons foram sequenciadas e analisadas. A fita antisenso foi sequenciada e analisada apenas para a confirmação da mutação, quando detectada. A partir da realização do estudo piloto, foi necessário modificar o protocolo de extração de DNA da saliva, padronizado pelo Laboratório de Farmacologia da FOB-USP (Neves 2009), por causa da complexidade de fatores envolvidos na extração do DNA, para obter-

se amostras íntegras e quantidade suficiente de DNA. Após a verificação da viabilidade de uso do DNA extraído da saliva, utilizando as diferentes concentrações de proteinase K para amplificação do gene da β-actina (gene constitutivo humano), optou-se em não utilizar a proteinase K na extração de DNA da saliva, devido ao sinal positivo e ao tamanho das bandas no gel de agarose das amostras, que foram extraídas sem a proteinase K. Assim, o DNA extraído das amostras de saliva sem a utilização da proteinase K foi o material de partida para a padronização das condições da PCR.

O gene AMELX é composto por sete éxons e seis íntrons; e *splicings* alternativos resultam em três diferentes transcritos, conforme o Ensembl (European Bioinformatics Institute e Wellcome Trust Sanger Institute 2011b). O éxon 1 do gene AMELX não foi estudado, pois não contém sequência de nucleotídeos codificadora de proteínas, assim, não participa do processo de transcrição do gene. Os éxons 4 e 5, devido ao pequeno tamanho e proximidade de ambos, foram amplificados, utilizando-se um mesmo par de *primers*, resultando num fragmento único a ser analisado.

Foram muitas as dificuldades encontradas no desenho dos *primers* específicos de cada éxon, assim como na padronização da temperatura de seu anelamento. Os *primers* dos éxons do gene AMELX, citados nos trabalhos existentes na literatura (Stephanopoulos et al. 2005, Wright et al. 2009, Wright et al. 2011), foram avaliados quanto à localização, homologia e diferença de temperatura de anelamento de ambas as fitas, o que evidenciou a necessidade de redesenhar todos os *primers*. Após o desenho dos *primers*, foi necessário

consultar, por meio de site especializado Blast (National Center for Biotechnology Information 2009), a homologia dentro do próprio genoma. Este passo foi importante, porque os *primers* podem ser semelhantes a outras regiões do genoma e poderão amplificadar regiões que não as de interesse deste estudo. Esta checagem foi vital para verificar homologia com outras espécies, visto que, na saliva, encontram-se diversas espécies de microrganismos, que provavelmente terão seu DNA disponível para amplificação (Neves 2009).

Para visualização dos dados obtidos na leitura do sequenciador existem *software*s específicos. Neste estudo foi utilizado o *Software SeqScape® 2.6*, que permite a visualização do relatório geral das amostras sequenciadas e as classifica de acordo com a intensidade do sinal, número e sequência das bases. Além disso, este programa possibilita a análise do eletroferograma, o qual permite a visualização dos picos e vales bem definidos, a intensidade do sinal (Figura 11) e a confiabilidade da sequência (Figura 12), o que mostra a qualidade do experimento e o sucesso do protocolo utilizado, critério este adotado por Bennet et al. (2009) e Neves (2009).

O *Software SeqScape® 2.6* permite também a visualização de um relatório geral das amostras sequenciadas, classificando-as de acordo com o tipo de mutação encontrada, a troca de aminoácidos, entre outros aspectos (Figura 13).

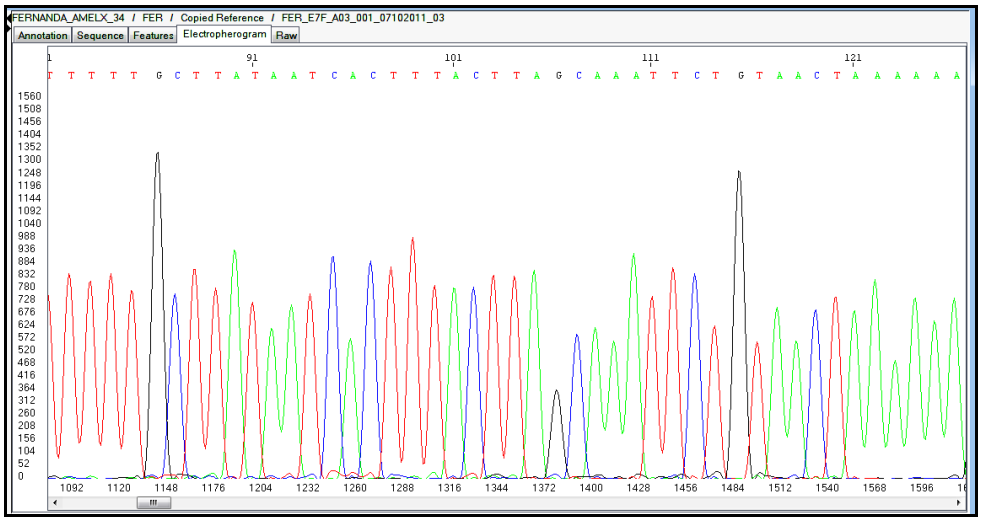


Figura 11 – Eletroferograma contendo picos e vales bem definidos, boa intensidade do sinal ilustrando a qualidade do experimento e o sucesso do protocolo utilizado

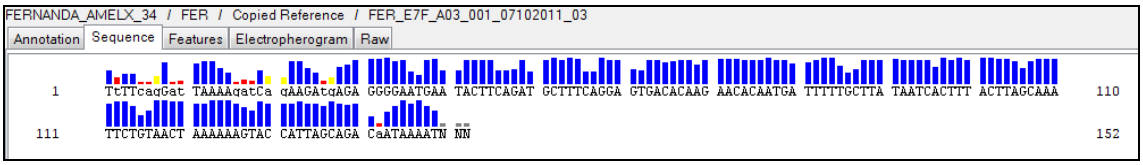


Figura 12 – Sequência fornecida pelo *Software SeqScape® 2.6*, com as barras de confiabilidade de cada base. Quanto maior a barra azul, mais confiável.

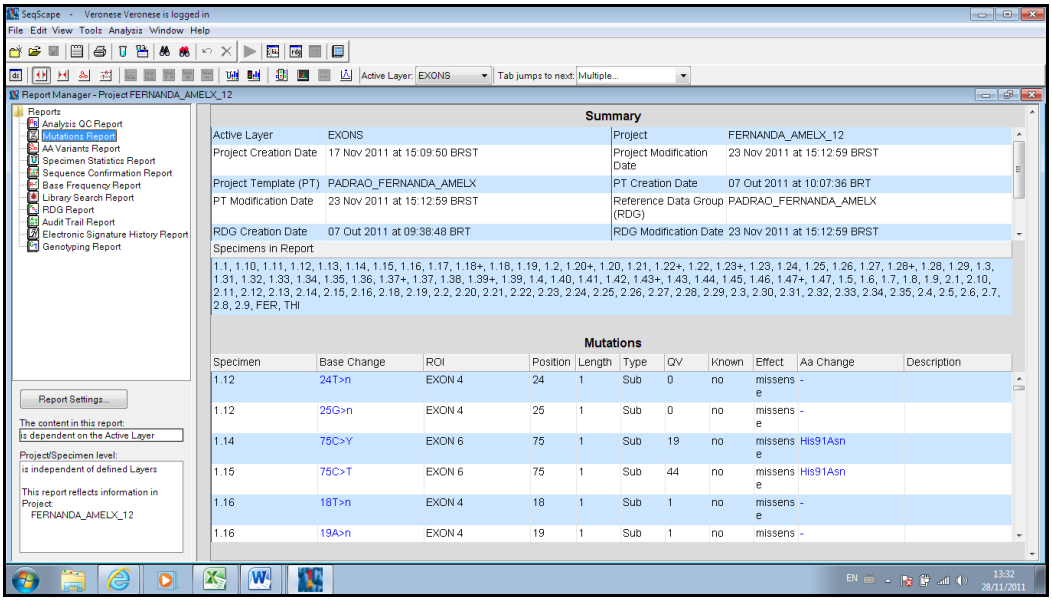


Figura 13 – Relatório geral das amostras sequenciadas mostrando as mutações encontradas em cada amostra, assim como a troca de base, a localização, o tipo, o efeito, entre outros aspectos

Apesar das repetições, em até três vezes, do sequenciamento de algumas amostras, uma porcentagem delas não pôde ser analisada, devido aos resultados insatisfatórios nas sequências obtidas, que impossibilitaram a leitura. O critério para excluir uma sequência da análise levou em consideração o grau de confiabilidade da sequência, a intensidade do sinal de cada base e a análise visual do eletroferograma.

Nos diversos centros de pesquisa, estão sendo utilizados protocolos distintos para o preparo das amostras com vistas ao sequenciamento direto, cada um aplicado a um tipo de plataforma de sequenciamento (Stephanopoulos et al. 2005, Neves 2009, Wright et al. 2011, Urzúa et al. 2011). A falta de padronização desses protocolos e dos métodos de análise é a principal barreira para a discussão da metodologia do sequenciamento de DNA genômico a partir de saliva. Estudos futuros são necessários para padronizar os protocolos e métodos de análise dos resultados (Mihaly e Gyorffy 2011).

Embora o método de sequenciamento seja ainda pouco utilizado na prática clínica, áreas da saúde evidenciam sua necessidade, para o conhecimento adicional obtido por esta nova tecnologia. Avanços recentes da aplicabilidade das técnicas de sequenciamento permitem diagnósticos e tratamento de pacientes (O' Connor e Glynn 2011).

5.3 Resultados

A formação do esmalte dentário é um notável exemplo do processo

de biomineralização (Wright et al. 2011). O mecanismo exato que envolve este processo permanece parcialmente obscuro. Alguns genes que codificam proteínas específicas do esmalte têm sido identificados com genes candidatos para malformações dentárias. Análises mutacionais, com estudo de famílias, têm suportado esta hipótese (Hart et al. 2002, Kim et al. 2005a, Kim et al. 2005b, Kim et al. 2008, Stephanopoulos et al. 2005, Wright et al. 2009, Hart et al. 2009, Wright et al. 2011, Haubek et al. 2011, Lee et al. 2011). Por sua vez, o método de sequenciamento direto permitirá aos profissionais prever quais genes candidatos podem estar com defeito, dado o fenótipo dentário dos pacientes, e este conhecimento será útil ao considerar alternativas de tratamento.

Neste trabalho foram encontradas tanto mutações silenciosas quanto mutações missenses, nos quatro grupos estudados. As mutações silenciosas não geram nenhum dano à proteína produzida, ao contrário das mutações missenses, que geram proteínas alteradas. Do total de 37 mutações encontradas, 26 foram detectadas nos grupos 1 e 2 (70%), e 11 foram detectadas nos grupos 3 e 4 (30%). Esse fato é intrigante pois os grupos que envolveram pacientes com FLP apresentaram maior frequência de mutações do que os grupos que envolveram pacientes sem FLP.

Das 14 mutações que foram detectadas no Grupo 1, 13 estavam localizadas na posição 75 do éxon 6 e eram silenciosas; uma estava localizada na posição 46 do éxon 2 e era caracterizada por uma substituição missense, na

qual ocorreu a troca do aminoácido glicina pelo aminoácido arginina, neste local.

Das 12 mutações detectadas no Grupo 2, seis estavam localizadas na posição 75 do éxon 6 e uma estava localizada na posição 234 do mesmo éxon, todas silenciosas. As outras cinco mutações detectadas estavam localizadas na posição 146 do éxon 7, a qual não participava dos três diferentes transcritos do gene AMELX, concluindo-se que, neste grupo, não existiu a produção de proteínas alteradas.

Das quatro mutações detectadas no Grupo 3, três eram silenciosas, localizadas na posição 75 do éxon 6, e uma era missense, localizada na posição 176 deste mesmo éxon, a qual promoveu a troca do aminoácido histidina por arginina neste local.

Das sete mutações detectadas no Grupo 4, quatro eram silenciosas e estavam localizadas na posição 75 do éxon 6; duas eram missense: uma localizada na posição 296 deste mesmo éxon, a qual promoveu a troca do aminoácido histidina por arginina; a outra, localizada na posição 59 deste mesmo éxon 6, promoveu a troca do aminoácido valina por ácido glutâmico; a última delas estava localizada na posição 44 do éxon 7, posição que não participa dos três diferentes transcritos do gene AMELX.

Associação e comparações entre os grupos são pertinentes, entretanto, as mutações, quando encontradas no presente estudo, foram distintas e em locais diferentes em todos os grupos, mesmo se forem agrupados os Grupos 1 e 2 com fissura labiopalatina e os Grupos 3 e 4 sem

fissura labiopalatina, ou os Grupos 1 e 3 com malformação dentária e os Grupos 2 e 4 sem malformação dentária.

Notou-se que o éxon 6 do gene AMELX era um éxon suscetível a mutações. As quatro mutações detectadas, do tipo missense, em região que participa do transcrito, estavam localizadas no éxon 6.

Percebeu-se que a mutação localizada na posição 75 do éxon 6 estava presente em todos os grupos estudados, sugerindo que, apesar de ser uma mutação silenciosa, poderia ser um polimorfismo novo, a ser catalogado, pois foi detectado em 26 indivíduos, do total de 165, representando 16%.

Ressalte-se que nenhuma das mutações detectadas neste trabalho estão presentes no dbSNP (National Center for Biotechnology Information 2011), sugerindo que podem ser mutações inéditas e, portanto, deveriam ser inseridas neste banco, ou ainda, mutações que até o presente momento não foram catalogadas, aspecto que dificulta sobremaneira a comparação deste trabalho com outros citados na literatura.

Sabe-se que as proteínas geradas a partir das mutações genéticas detectadas têm a estrutura alterada, desta forma, estudos futuros são necessários, para elucidar se essas proteínas têm também a função prejudicada no organismo humano. A adição de informações genéticas sobre malformações dentárias poderá proporcionar novas oportunidades para mapear os genes candidatos para fissuras labiopalatinas.

As fissuras labiopalatinas são anomalias congênitas isoladas e podem estar envolvidas num espectro dismórfico mais amplo de anomalias. A partir

desta premissa e levando-se em conta o número grande de afetados com fissuras labiopalatinas que também são acometidos por anormalidades dentárias e de esmalte, suscita-se a hipótese de que genes como AMELX possam estar envolvidos no tal espectro suposto. Como analisado neste estudo, os resultados contribuem para uma linha de pesquisa para o estudo de outros genes envolvidos na coalescência dos processos faciais, na formação dentária e na formação do esmalte. O estudo das fissuras labiopalatinas é de suma importância para as áreas de Genética Médica, Odontologia, Cirurgia Crânio-Maxilo-Facial, entre outras. Sabe-se que são de etiologia multifatorial, o que corresponde a genes de predisposição herdados aliados a fatores ambientais, como exemplo, o conhecido ácido fólico (vitamina B9).

Vale salientar que as alterações de esmalte são determinadas por dezenas de genes e isso pode fazer com que grande parte da casuística tenha resultados negativos, em relação ao gene estudado, mas positivos em relação a outros genes que não foram contemplados neste estudo, mas que podem ser estudados em projetos futuros. Desta forma, sugere-se estudos futuros de investigação de mutações e polimorfismos, incluindo SNPs, nas regiões codificadoras e de *splicing* de genes candidatos a defeito na formação do esmalte, para elucidar quais são as consequências dessas mutações nas proteínas produzidas formadoras do esmalte dentário. Ressalte-se também, a grande importância da análise estatística, além da análise descritiva dos dados obtidos.

5.4 Implicações clínicas

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 nucléicos 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

De acordo com os resultados obtidos do sequenciamento direto dos éxons codificadores de proteínas do gene AMELX, foi possível concluir que:

- Foram encontradas mutações na sequência de nucleotídeos do gene AMELX, em indivíduos com e sem fissura labiopalatina e malformação dentária. Observou-se que a mutação localizada na posição 75 do éxon 6 esteve presente em todos os grupos estudados, sugerindo que, apesar de ser uma mutação silenciosa, poderia ser um polimorfismo novo, a ser catalogado, pois foi detectado em 26 indivíduos, do total de 165, representando 16%.

Diante do exposto, rejeita-se H0 e aceita-se H1.

Referências

REFERÊNCIAS

Adams MS, Niswander JD. Developmental noise and a congenital malformation. Genet Res. 1967;10(3):313-7.

Aizenbud D, Coval M, Hazan-Molina H, Harari D. Isolated soft tissue cleft lip: epidemiology and associated dental anomalies. Oral Dis. 2010 Aug 27. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01729.x. [Epub ahead of print]

Bailleul-Forestier I, Molla M, Verloes A, Berdal A. The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 1: clinical and molecular aspects of non-syndromic dental disorders. Eur J Med Genet. 2008 Jul-Aug;51(4):273-91.

Bartlett JD, Skobe Z, Lee DH, Wright JT, Li Y, Kulkarni AB, Gibson CW. A developmental comparison of matrix metalloproteinase-20 and amelogenin null mouse enamel. Eur J Oral Sci. 2006;114 Suppl 1:18-23.

Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. Gene. 1996;183(1-2):123-8.

Berglund EC, Kiialainen A, Syvanen AC. Next generation sequencing technologies and applications for human Genetic History and Forensics. Investig Genet. 2011 Nov 24;2(1):23.

Bocchini CA et al. 300391 Amelogenin; AMELX. In: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University School of Medicine; 2011. [acesso em: 2011 jan 27]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/300391

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.

Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. J Biol Chem. 2002;20(277):49598-604.

Caterina J, Shi J, Sun X, Qian Q, Yamada S, Liu Y, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin. J Dent Res. 2000;79:1697-703.

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.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Hum Mutat. 2000;15(1):7-12.

Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu T, Escamilla M, MacDougal lM. DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. Am J Med Genet A 2005;133A:138-41.

Duque C, Dalben GS, Aranha AM, Carrara CF, Gomide MR, Costa B. Chronology of deciduous teeth eruption in children with cleft lip and palate. Cleft Palate Craniofac J. 2004 May;41(3):285-9.

Eerens K, Vlietinck R, Heidbüchel K, Van Olmen A, Derom C, Willems G, Carels C. 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;85:699–705.

European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Sanger Institute. e!Ensembl. Ensembl Project. Human (Homo sapiens). Download Human genome sequence. Cambridge, United Kingdom: Wellcome Trust Genome Campus, CB10 1SD; 2011a. [acesso em: 2011 jun 14]. Disponível em: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index.

European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Sanger Institute. e!Ensembl. Ensembl Project. Human (Homo sapiens). Gene: AMELX (ENSG00000125363). Cambridge, United Kingdom: Wellcome Trust Genome Campus, CB10 1SD; 2011b. [acesso em: 2011 jun 14]. Disponível em: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000125363;r=X:11311533-11318881)

Ferraris MEG, Muñoz AC. Histologia e embriologia bucodental. 2ª ed. São Paulo: Guanabara/Koogan; 2006. p. 245-86.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. J Struct Biol. 1999;126(3):270-99.

Frazier-Bowers SA, Simmons D, Koehler K, Zhou J. Genetic analysis of familial non-syndromic primary failure of eruption. Orthod Craniofac Res. 2009 May;12(2):74-81.

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.

Fukumoto S, Yamada A, Nonaka K, Yamada Y. Essential roles of ameloblastin in maintaining ameloblast differentiation and enamel formation. Cells Tissues Organs. 2005;181(3-4):189-95.

Galante JM, Costa B, de Carvalho Carrara CF, Gomide MR. Prevalence of enamel hypoplasia in deciduous canines of patients with complete cleft lip and palate. Cleft Palate Craniofac J. 2005 Nov;42(6):675-8.

Gomes AC, Neves LT, Gomide MR. Enamel defects in maxillary central incisors of infants with unilateral cleft lip. Cleft Palate Craniofac J. 2009 Jul;46(4):420-4.

Grant GM, Giambernardi TA, Grant AM, Klebe RJ. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18 and MMp-20) in cultured human cells. Matrix Biology. 1998;18:145-8.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Introdução à Genética. 7. ed. Traduzido por Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Hart PS, Aldred MJ, Crawford PJ, Wright NJ, Hart TC, Wright JT. Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. ArchOral Biol. 2002;47(4):261-5.

Hartz PA et al. 613214 WD Repeat-containing protein 72; WDR72. In: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University School of Medicine; 2010. [acesso em: 2011 out 19]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/611927

Haubek D, Gjørup H, Jensen LG, Juncker I, Nyegaard M, Børglum AD, Poulsen S, Hertz JM. Limited phenotypic variation of hypocalcified amelogenesis imperfect in a Danish five-generation family with a novel FAM83H nonsense mutation. Int J Paediatr Dent. 2011 Nov;21(6):407-12.

Hoffmann RHS, Sousa MLR, Cypriano S. Prevalência de defeitos de esmalte e a sua relação com cárie dentária nas dentições decídua e permanente, Indaiatuba, São Paulo, Brasil. Cad Saúde Pública 2007;23:465-44.

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 May;10(2):45-52.

Hu JC, YamakoshiY. Enamelin and autosomal-dominant Amelogenesis imperfecta. Crit Rev Oral Biol Med 2003;14:387–98.

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.

Jalevik B, Klingberg G, Barregard L, Norén JG. The prevalence of demarcated opacities in permanent first molars in a group of Swedish children. Acta Odontologica Scandinavica. 2001;59:255-60.

Kang SW, Yoon I, Lee HW, Cho J. Association between AMELX polymorphisms and dental caries in Koreans. Oral Dis. 2011 May;17(4):399-406.

Kapadia H, Mues G, D'Souza R. Genes affecting tooth morphogenesis. Orthod Craniofac Res. 2007 Nov;10(4):237-44.

Karger BL, Guttman A. DNA sequencing by CE. Electrophoresis. 2009 Jun;30 Suppl 1:S196-202.

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, Lin BP, Kiziltan B, Gencay K, Simmer JP, Hu JC. ENAM mutations in autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. J Dent Res. 2005a Mar;84(3):278-82.

Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD, Hu JC. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. J Med Genet. 2005b Mar;42(3):271-5.

Lagarde A, Kerebel B, Ajacques JC. Structure, ultrastructure and microanalysis of the enamel of teeth near maxillary clefts. Ann Pathol. 1987;7:113-21.

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, Lee KE, Jeong TS, Hwang YH, Kim S, Hu JC, Simmer JP, Kim JW. FAM83H mutations cause ADHCAI and alter intracellular protein localization. J Dent Res. 2011 Mar;90(3):377-81.

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 enamelin gene causes local hypoplastic autossomal dominant amelogenesis imperfecta (AIH2). Hum Mol Genet 2002;11:1069-74.

Markovic D, Petrovic B, Peric T. Case series: Clinical findings and oral rehabilitation of patients with amelogenesis imperfecta. Eur Arch Paediatr Dent. 2010 Aug;11(4):201-8.

McKusick VA et al. 600525 Distal-less homeobox 3; DLX3. In: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University School of Medicine; 1995. [acesso em 2011 out 21]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/600525

McKusick VA et al. 611927 Family with sequence similarity, member H; FAM83H. In: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University School of Medicine; 1995. [acesso em 2011 out 21]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/611927

Milos PM. Emergence of single-molecule sequencing and potential for molecular diagnostic applications. Expert Rev Mol Diagn. 2009 Oct;9(7):659-66.

Muju KM, Wright JT. Diagnosis and treatment of molar incisor hypomineralization. Compendium. 2006;27:604-11.

Nagano T, Oida S, Ando H, Gomi K, Arai T, Fukae M. Relative levels of mRNA encoding enamel proteins in enamel organ epithelia and odontoblasts. J Dent Res. 2003;82(12):982-6.

National Center for Biotechnology Information. dbSNP Short Genetic Variations; 2011. [acesso em 2011 set 26]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp

National Center for Biotechnology Information. BLAST Assembled RefSeq Genomes; 2009. [acesso em: 2011 set 26]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast

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

Neves LT. Triagem de mutação no éxon 3 do gene IRF6 em indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia dentária: padronização de protocolo para seqüenciamento de DNA genômico a partir de saliva. 2009. 103p. Tese

(Doutorado em Biologia Oral) – Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo.

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.

Patir A, Seymen F, Yildirim M, Deeley K, Cooper ME, Marazita ML, Vieira AR. Enamel formation genes are associated with high caries experience in Turkish children. Caries Res. 2008;42(5):394-400.

Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J, Larsson C, Karsten A. Familial non-syndromic cleft lip and palate--analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. Eur J Orthod. 2008 Apr;30(2):169-75.

Pioto NR, Costa B, Gomide MR. Dental development of the permanent lateral incisor in patients with incomplete and complete unilateral cleft lip. Cleft Palate Craniofac J. 2005 Sep;42(5):517-20.

Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, Vieira AR, Dodé C, Mohammadi M, Marazita ML, Murray JC. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Mar 13;104(11):4512-7.

Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. Eur J Oral Sci. 1998;106:282-291.

Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press. 2000; 65-386. Disponível em: http://fokker.wi.mit.edu/primer3/.

Ryu O, Hu JC, Yamakoshi Y, Villemain JL, Cao X, Zhang C, Bartlett JD, Simmer JP. Porcine kallikrein-4 activation, glycosylation, activity, and expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. Eur J Oral Sci. 2002;110(5):358-5.

Santos CF, Oliveira EB, Salgado MC, Greene AS. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. J Cardiovasc Pharmacol. 2002 May;39(5):628-35.

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. 2010 Jun 30. [Epub ahead of print].

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 pratical guidelines. Int Dent J. 1997;47:173-83.

Sherman PM et al. 603345 Soljute Carrier Family 4 (Sodium Bicarbonate Cotransporter), Member 4; SLC4A4. In: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University School of Medicine; 2008. [acesso em: 2011 nov 21]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/603345.

Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. Connect Tissue Res. 2002;43(2-3):441-9.

Slayton RL, Williams L, Murray JC, Wheeler JJ, Lidral AC, Nishimura CJ. Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. Cleft Palate Craniofac J. 2003 May;40(3):274-9.

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, Lyroudia K. Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. J Dent Res. 2005 Dec;84(12):1117-26.

Tiller GE et al. 606585 Enamelin; ENAM. In: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University School of Medicine; 2008. [acesso em 2011 nov 21]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/613214.

Trindade IEK, Silva Filho OG. Fissuras Labiopalatinas – Uma abordagem interedisciplinar. São Paulo: Ed. Santos; 2007. 337p.

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

Urzúa B, Ortega-Pinto A, Morales-Bozo I, Rojas-Alcayaga G, Cifuentes V. Defining a new candidate gene for amelogenesis imperfecta: from molecular genetics to biochemistry. Biochem Genet. 2011 Feb;49(1-2):104-21.

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

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. Am J Med Genet A. 2008a Jun 1;146A(11):1406-13.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. Genet Med. 2008b Sep;10(9):668-74.

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

Wizmann Institute of Ciencie. GeneCards. The Human Gene Compendium. amelogenin, X-linked. 2011. [Acesso em: 2011 jan 16]. Disponível em: http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AMELX&search=amelx.

Wright JT. The molecular etiologies and associated phenotypes of Amelogenesis imperfecta. Am J Med Genet A 2006;140:2547–55.

Wright JT, Deaton TG, Hall KI, Yamauchi M. The mineral and protein content of enamel in amelogenesis imperfecta. Connect Tissue Res. 1995;32(1-4):247-252.

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, Hart PS, Hart TC. Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. Cells Tissues Organs. 2011;194(2-4):279-83.

Apêndices

APÊNDICE A - Comitê de Ética

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão
Seção de Apoio à Pesquisa

Ofício nº 57/2010-SVAPEPE-CEP

Bauru, 16 de abril de 2010.

Prezado(a) Senhor(a)

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "**Estudo genético da mutação dos genes AMELX e ENAM na malformação dentária de pacientes com e sem fissura labiopalatina**", de autoria de Fernanda Veronese de Oliveira, desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de **30 de março de 2010**, o parecer do relator **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes para início da pesquisa. Solicitamos a V.Sa. a gentileza de comunicar o parecer ao(à) pesquisador(a) e anexar o presente ofício ao projeto pois o mesmo será necessário para futura publicação do trabalho.

O(A) pesquisador(a) fica responsável pela entrega na SVAPEPE – Apoio ao Projeto de Pesquisa dos relatórios semestrais, bem como, comunicar ao CEP todas as alterações que possam ocorrer no projeto.

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

Atenciosamente,

PROFA. DRA. IZABEL MARIA MARCHI DE CARVALHO
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

Ilmo(a) Sr(a)
Profª. Drª. Thaís Marchini de Oliveira
Odontopediatria - FOB/USP

Rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru SP Brasil
Caixa Postal 1501 CEP 17.012-900
Tel. 55 14 3235 8421
E-mail: cep@centrinho.usp.br

APÊNDICE B - Comitê de Ética – Alteração de Título

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão
Seção de Apoio à Pesquisa

Ofício nº 294/2011-SVAPEPE-CEP

Bauru, 4 de outubro de 2011.

Prezada Senhora

O projeto de pesquisa intitulado "**Estudo genético da mutação dos genes AMELX e ENAM na malformação dentária de pacientes com e sem fissura labiopalatina**", de autoria de V.Sa., foi aprovado pelo CEP em 30 de março de 2010. Na reunião realizada em **27 de setembro de 2011**, a alteração de título para "**Estudo genético da mutação do gene AMELX na malformação dentária de pacientes com e sem fissura labiopalatina**" foi **aprovada.**.

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

Atenciosamente,

PROFA. DRA. MARCIA RIBEIRO GOMIDE
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

Ilma. Sra.
FERNANDA VERONESE DE OLIVEIRA
A/C
DRA. THAÍS MARCHINI OLIVEIRA
Odontopediatria – FOB/USP

Rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru SP Brasil
Caixa Postal 1501 CEP 17.012-900
Tel. 55 14 3235 8421
E-mail: cep@centrinho.usp.br

APÊNDICE C – 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: **"**Estudo genético da mutação dos genes AMELX e ENAM na malformação dentária de indivíduos com e sem 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: Analisar, por meio da coleta de saliva, os genes AMELX e ENAM que caso apresentem alguma mutação ou alteração podem estar relacionados com a ocorrência de alterações no esmalte dentário. 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 _____.

--- ---

* 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 Sílvio 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, Ortodontia e Saúde Coletiva
Cidade: Bauru – SP
CEP: 17100-000

Anexos

ANEXO A – Sequência do gene AMELX, éxons e *primers*

Homo sapiens chromosome X: GRCh 37.p5 (11311533 - 11318881)
NCBI Reference Sequence: NC_000023.10

```
GGCTTTGTCCCCTGTTTTGGTGGACACCAGAGGGGTGATAAAGGAGTAGCCAAGGGGAACAGAGAAAAAATACCTTCA
ATGGAAGCAGATAATAGAGCAGTGGTGATCCCAAAATTATAATTCCTCAGAGAGAAACTAGAGAGAGCTTTGGGGTTT
TACCCAAATGGGAATTTGAATCAATTTCTCCTGATCTGAAAGGGCTGGAAAAATCCTGGAGGATATCCAGATTACACT
AGAGAATCTCAACCACCTACCTTGATTTTTGTAAAGAACAACGTTGTTTGCTAGAACTGAGGAAAAGGCGATGGCAGA
GAAGCTTTTTAAAAATAAATCTGAATATATCAACATGTACAGTCAACTAATTTGCTGACTTCAAAATAGCGTGATGAA
ACTCTTTGCCTGTTAAACCTATTATTGCCCATAATGAAAGATTCCATATGCACTAATCACAACATACAGCCTTATGTC
TGATCATAGCTTCTAAAAAATCATGATACAGGGATTTTTAGTTATACTCAACACATTTTTCCTTTAGAAACTGGATTG
GTTGTTACAGATGCCATGAATGATATAAATTGAGCTTATAGTTGGAAGAAATCTAAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTT
CAAACAGAAACTTGCACTGAATACATTCAAAGGTATGTGGATTTTATTTATAATTTGATATCCTTTTTATTGTGCTTA
TTTCTTTCTCTGCATTTCTTTTAAAAGATATAAATGTATTCTACATTTCTAATACTATATGCCATCAATAGTTACTTT
TTAGTTGGCCCATAATTAAATTAGACTCTGATTACTGAAATGATTTTTAACTTTATAATGCAACAAAGTGCTTGTCTA
ATTCCAAAGGTCTTTCTTGGCCACATTTCACAGTAAAATATTTATTTTAATTAATTATCGATTAAAGTAAAAATAATA
CATTCACAGGCTGTGATCTACTACTTTGAAAAGCTTTTTATTTAATTACATAAAATAGAACCATCCATGAAGTGTTTT
TTCTCATTAACCCAAACAAACAAACAAACAAAAAACAAATTTAGGAGTTAGAAAACTTTAGTGTACTTTTCATAGACA
GCATTATCACATGTAATATTCACTTCTTATACAAAATTTAAGGTCTTTCTTCTGACAGTTTTCCCAGTAATTTGTGCC
ACAAATCAATGTGCACATTTTAGGAGGACCTGTTTTGCTTAATGTCCCAAGGGTCTTATTTATAGAATAATTACAGTG
CAACATCAAACAAAATGAAGATTCCATTGAAAGAAAATGAAACCTCTTAGGGAGAAAGTATTCAAAATTCATTGAAGA
ATCACATAAAATTCGTACCATCCTCTCCTGTTGGTTCAGCCACATCTTTTGCTCCACAATCTGGAGCTCAGAGATGTT
ACTGGAGGGTCTTGCCTGAAGTTCTGTAGATAGGAATTTCTGGAACTAAAATCTATCTTGGCAAATTAATATATTTTC
TCAAATGATTAGTCCTTGTTTTTAACAGTAGCAATGTCCAGGTAGACTGTGCACGAGACATTTCTGTGCCTCCTTGTT
CTAAAATTATAAAATACTGTGCACTTTGATGATCTTCCCAACCTTTAGAGCCAACTTTATTCCTTTAATCATTAATTA
TAAATACAATTTAGCTTCTATGACTAAGGGCTGTATAGGCATAGGAAAATGGCATGCAAAGTCATATGAAGATAGATC
ATTCATGTCCCTGTAACTTGTTTAGCCCTCAACCTAAATTAAATGCATCTTTATCACTACTGTGACTCCAGAAACAAT
GAAATAGGCTGAGAGCTGGAAATCACATATGACTGAAGTAAATTCACAAACAATGGCTCCATCCTTCTTACTAGCAAT
AGACTAATGTAGATTATGTGTGTTTTATGGAGCATTCATTACATCCATGTTTCAGAAGAGATAAGAAAAGTGGATGTT
GACTTACATTTCAGAACCATCAAGAAATGGGGACCTGGATTTTATTTGCCTGCCTCCTGGGAGCAGCTTTTGCCATGC
CTGTGAGTAAAACACCCCTTGCATAAGTCAGTGTCCAATTTCACAAACTTGGACATAAAAATCTGCTCATAGTTGGTG
AAATTAGGGTTTAAAACAGTATGAGATCAGATGTCTTCATATGTCTCTGGGTTGAAGAAACACTTCAGGAGCTTGTTT
TAAAAAGGTATATTCTCAAATGCCGCTACCAAAAATTCTGATTTGGTACAGCTGGGGCGGGGCCCAGGACTCTGCATT
TTTATAAGCACCCCAGGAGATTCTGTTGGAACTGTTAGCTTGTAAATATCACCACCCATCTCTAGATGGAGGAAGCTT
TTGGAAGGGACCCTTGAAAGGTCTCCAGAGAAAGTGCTTAACCAGCTTTGGACAAATATTACAGAGATGCCAGTTTTG
TCTAAAACCCAATTCCTCTCAAGATTCCAAATCTCTTCCTGCCCTCCACATATTGCTGCTCTTACCCCTCAGGGGGTA
AGATTTTTGTGTTAGGAATCCACTTTTTGAGCCACATTCCTGTTCTCAGAGGCCCCACCCCTTTGGGTACATCTGATG
AGTACGTGACTTTTTTGTGGTTGCCCGGGATCCTGCCTACACCCAATACATAGTGATATATTTTATATTCAAATGTAT
TAAAGATCAGGACATTAGACCCACTCTGTCTGGACACAGGTGCATAAGGGCAGAGAACTTAGATCACATGCATGCCAA
GCAGGCTGCATCTGCTTTTTGGTGGAATAAAGAGCAGTTGATACAACCAGAAGCCAGCAAGCTTGCACCCTTGCCTCC
TCTCTTCCTCTCTCACCCACAAAACCAAGATTCTGTGCTCTGACTTCCTGAAATCCTGCATTGCAGCGATTCCTAGTT
TCCTCAGGGGTCCCTGCCTTACAAATTCAGCCCTTTTCCCACTCTCTAAGATGGTATTGTTCAAGAGGGTATAGGACC
TGACTAAAACCATTCACATCCAGATGAGAGAGAATAAACCTTCCCATGAAATGTGAGCATTTTTAAAGAATATAATAG
AGCCAATCCTAAATGAGGCCAATGTCTGAGGGAGATTTTCTGCATGACCGTCTCTCCTCCCTGGACCCCAGGCACAAC
CAGAGTTCCACAATACAGGCACCAGACACTTGGGCCCCACTTTTGAGAGGACAGACAGTCCTGATTCAGATCATCATT
CAGGTGGCCTTTTATTTTTAACTTGAAAATTTTTCTGCCATAAAACCGTTGGCAGAATAATAAAAAAAGATCGGCCTA
AACGTCATAAATCAACTCTTTCATTTTCCATGGGATTTATAATGTTTCCACTTTGCTCCACCCATCTTGTTCTGGCAT
TCATCAATAATTCCCACCTTGTGGTTTCTTTTGTGGCTTCTTTTGTTGTATGGAAGTGTTGTTTACTTTGCATGTCAA
TTATGAGAAATCCCTTTGATACTTAAAAGTACTTGACCACCTCCTGATCTACAAGGGAACATTCGTGAGACAATTCTC
TCCTTGTTGATATTTCTTTATTGTGAAAGAGAAACACACTTCTCTCCCCATTATGGGGTGAGTTTTATCAGCAAGTAA
ACTGTTGGGCAGGATAGGGTAGGATTCATTGAAAACACTGGGCGTGGGGGTGGGATGCTGTCCAAAGATCACTGGAGA
ATAAATGTGTGCTGGTTTCTGCTTCCAGGTCTCCAGCCATAAGGCTATAACCCCAGGAACAGTCATTTAGCTGTTCTG
AACCTCTTTAAAATAAAAGGTCTCCTCTTCTATACAGCACATTTGTTCAAACTAAAAACAGACCTCAAGTATATTCTG
CACTATATAGATTTTTTTAAAGTAGCTTCAGTCTCCTTTAATGTGAACAATTGCATACTGACTTAATCTCTTCCTCTC
TCTTCTCTTCCTTCACTCTCTCCCTTCCTCTCTCTTTCTATTCTCCTCCCCTCCTCCCTGTAAAAGCTACCACCTCAT
CCTGGGCACCCTGGTTATATCAACTTCAGCTATGAGGTAATTTTTCTCTTTACTAATTTTGACCATTGTTTGCGTTAA
CAATGCCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTGTGTTGATTCTTTATCCCAGATGTTTCTCAAGTGGTCCTGATTTTACAGT
TCCTACCACCAGCTTCCCAGTTTAAGCTCTGATGGTTGGCCTCAAGCCTGTGTCGTCCCAGCAGCCTCCCGCCTGGCC
ACTCTGACTCAGTCTGTCCTCCTAAATATGGCCGTAAGCTTACCCATCATGAACCACTACTCAGGGAGGCTCCATGAT
AGGGCAAAAAGTAAACTCTGACCAGCTTGGTTCTAACCCAGCTAGTAAAATGTAAGGATTAGGTAAGATGTTATTTAA
AACTCTTTCCAGCTCAAAAAACTCCTGATTCTAAGATAGTCACACTCTATGTGTGTCTCTTGCTTGCCTCTGCTGAAA
TATTAGTGACTAAGTGGTATAGGAGAGACTCCGCAGAACAGCGGAATGCATGAGTTTTGGACGTCGGGTTTGAGGTTC
TCCTCAACCTCTTACTAACTTTGTGATTTTGGGCAAATCATTTCCTCTTTCTGGAACCCTGGTTTCCTCATCTGGAGA
```

AAGGAAATAATTATAATAACCATATTTCAAAATATTGTTTGGAGAGTAATATAGTTAATGAATATGAAAAGTGCTTTG
TCAAGTATAATATGAGCAAGGTTACTGATTATTTTTTGTATCGATTAAATGCCGTATTACTATATGAAGAATCCTCAA
ACCTAAGGCTAACCAAGTATATATACTGTTCAGAAAGGAATAAGATTCTTACTTCTCTCACAGGTTCAGGTAACAATC
TATGAGTTTATTTACTTATAAAAGCTGAAGACAAATGTTAGTAAGATTTTGAGGCAAGATTTTCTGTTGAACCGAAAA
GATTGACACATCTGATCAGTCAATCTGTGTTTCTAGGATGAGGGACAGTGTTTGCACCTCTCTTTTTCCCATTGTGAC
ATCAAAGAAAAAAATGAAATTAACATCATGTCATATTATTATGTCATAATTTTGTGTTTGTTTTGCTCTTACAATGAA
AAGAAGGAACTATGGAATTAAACAGATTTACTCCCTGTGTAACCTCAGTCAAGTTAATGAATCTCTTTAACTCCCCAT
AACCTTATCTAAAAAGTGAGAGTAATAATACTTGCCTCCTAGCATATAAGAAAAGATGAAGAATGTGTGTGATGGATG
TAAACACAGTGCCTGTCACACAGGAAGCACCCAACAAATTTTTACCTTCTTCTTTCTTTTGTAGAACTCACATTCTCA
GGCTATCAATGTTGACAGGACTGCATTAGTGAGTCTATATTTCCTACTGCATCAGTGAGTTTCTATATTGGATGAAAG
TAAATTAAATCAAATGGGTTCTAATATCTTTTTCTCTTAAGGTGCTTACCCCTTTGAAGTGGTACCAGAGCATAAGGC
CACCGGTATGTAGACATTTTGTTCCTTATTCCCTGAAAATATTAGGCATGCATTAAAATTCCCATATTAAGTGAAATA
TCATGTCTACTCCACATGCAGACATTAATGGGAAATTTAGTTTGTAAAAAATCATATCTGTGTACACAGTTACAAATT
TTTGCAAAGGAAAAATGAATAAAATATTCCTATAGCCATAATGGCAAAGAAAACACTGCTGCTTCTCTGGTTGGAGTC
ACCTGAGCCAATGGTAAACCTGCCTCTCTGTTTCTCACCAGTACCCTTCCTATGGTTACGAGCCCATGGGTGGATGGC
TGCACCACCAAATCATCCCCGTGCTGTCCCAACAGCACCCCCCGACTCACACCCTGCAGCCTCATCACCACATCCCAG
TGGTGCCAGCTCAGCAGCCCGTGATCCCCCAGCAACCAATGATGCCCGTTCCTGGCCAACACTCCATGACTCCAATCC
AACACCACCAGCCAAACCTCCCTCCGCCCGCCCAGCAGCCCTACCAGCCCCAGCCTGTTCAGCCACAGCCTCACCAGC
CCATGCAGCCCCAGCCACCTGTGCACCCCATGCAGCCCCTGCCGCCACAGCCACCTCTGCCTCCGATGTTCCCCATGC
AGCCCCTGCCTCCCATGCTTCCTGATCTGACTCTGGAAGCTTGGCCATCAACAGACAAGACCAAGCGGGAGGAAGTGG
TGAGTATATTTTGAAGCCACTACAATGCAAATCCTGTGAAAATGGTGCAGCAAAATAGGCCCCAGAGTTCTAAGGTCT
CCGACAACCAAGGATCTAGAGTTGTAGTAGTTACAGGTCTATGATTCTATTAGTCCAAGCAATATGCTATACCTTTAT
GTTAAAGACAAATTCCTCTAAATGGCTTGGTAATTAAGACCACAGTTTTTATGGTAGGTTTCAATTTTACTATTACTG
AATTTCTACCAGAATATGTATTACCAAAACCCATTAATAGAAATATATATTACTAAACCCCATGAATTTTAAGGGCAA
CAGTATAAGGGAATATCAGTTCTCCTTATATTTCAAAGGTTTGACTAGCAAGAATAGGCTAGAGTTGCACTGAAGGCT
TAAGACAAGAGGGAGCGGATAATTTTGAGAGTGCAAATATCTGAACAGGCTACAAAAGGTAGACGGGAAATCTCTTCA
AAAACCTACAGGAAGATTCCCCATTTCCAGTAGTTTTCAATCTAACTTGGAGGCGGCTAAACTAAACATACTGTTAGA
TTCCTTTTCTGTACTGGGGTTCTATAGATGATTAAGCTTTTAGCAAGAAGTTACTGCAATTTAGCACTAAATCTTCCA
TTACAGGTAGCTCTTACAAATGAATGGGAATAGTCAACAAAACAAACTTAATCTACATCCATAAAGTCTTACTTCTAT
GTATACGAGATTATGTGATCCTATCATGTATATGTATCCAACTGTAATTCCAATTTATACATGTTATTGATGATTTGC
TACTGAGAAGAAGAGAGAAGTGAGGTGGAAATGACCAGGATAAGAAGCCAGGACACAAAGGTTCCAATTCTGGCTTTG
CCCTCAAAGACGAGGCAGTATTGTAAAAGTTACTTCAAATGTATCGGTGTTTTATTTTCTTTTAAATGGGGGAAAATG
ACGAAATCAGATTATTTTCAAGTCTCTGTCCAATTATAAATACCATAGTTTCTGAATTTAAAAAAATCATAATATATG
TCATAAATGGCTTCATAATTGTGAGCATGTTTACGGAAAATATGGGGCAGAATTTTTTGAAAATTGATTGAATCCCAA
GTAATCGGTGCCTATCATTGGCTATTCTAGTCCAAGGCACATGTTCTCTCTGTACATAGAAAATGCATTTACTTCTTT
ATGAATAATTAATACCATGAACTTTATAATGTGCTCACATCTTGACAAAGCTATTTATGGAAAGGTGACTTTGGGCAG
ATAGTTTGAACTCTTTAAAACTCAGTTTCTTTTTGTGTAAAATTTGAGTATAAACATTGATAGTTTCTTAGAGTTGTT
TTATGGAAAACAAAATAGCGTGATAAGCTTGGAGCCTGACATGCAAGACGTACCCCCCAAAAAGGTAGCAATTGTTAT
TTTATTATAAAATAATAGGCTTTAAGTGTCCTGAAGGTGGAAGCAGTCCTCATGGACACCTAATATCTAATGACAACG
AAATAACAAAGAAACTTCAGAAATTATAGAGTTCAACTTAAATGGTTGTACATTGTTTTGACAAAACTGAAGCCAGAC
ATGTTATTGTAAATGGTACTCACTAGGAACATTTGTAAATTATTTTAACTGTTCTTTTGCAATTTTTTTCAGGATTAA
AAGATCAGAAGATGAGAGGGGAATGAATACTTCAGATGCTTTCAGGAGTGACACAAGAACACAATGATTTTTGCTTAT
AATCACTTTACTTAGCAAATTCTGTAACTAAAAAAGTACCATTAGCAGACAATAAAATGCATTAAAAATCATTCATGT
CTTTGTGTTGAATGAAACTTAAATTTTCCTATCATTTGAGATGATATATTATGAATGAGTATTCTTGAATCAGGTAGG
AACTGCTCATTTAGTCATACAAATTCACCATTTGGCAAGCAAATAAGGAATATATTTCTTTTTAGAGAAAATTTAAAT
TATACTGTCTCAAATCTTTTTTAAAAAACAAAGTTTATACATCAGTTAAAACAGTTGATAAAATGAAAATTTATGAAT
ATGTACAATAACTAAAACCTGAACCAAATGAAGGGAAGTTTATATGAAAAATTCTTTACATTAAGAAAGATAAACTTT
TGAAGAATGTTTATATTATGAAACAAAATAGGACATGGAACACTGGCTTTACACTTCACACCACACTGGCAATCAAAA
TCTGGTCTTTTGATCTCATTCTATGGAAAAAAGATTTTTAAATGAAATTATGTGATATGCATAATAATGTACTGAATT
TAAAGTTATTCAAGTAATTTGTTTTCCTCAAAAAATGTTATCAATGGAGCTTCAAATAGAGAATTGCAGTGATTTTAA
ACACAAGTCATTTCTTTCACCTCATAACTTTAAGATAAATTGTACTG

Éxons 1-7: sequências grifadas em cinza
Primers: sequências grifadas em amarelo

ANEXO B - Tabela de 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 C - Tabela de Abreviação dos Aminoácidos

Aminoácido	3 Letras	1 Letra
Alanina	ALA	A
Arginina	ARG	R
Asparagina	ASN	N
Ác. Aspártico	ASP	D
Cisteína	CYS	C
Ác. 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 D - Tabela das bases para formação dos códons

5'	2ª BASE				3'
	T	**C**	**A**	**G**	
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**
Códigos de Parada: Amber, Ocher, Opa					