

Investigação de polimorfismos na região promotora do gene BMP - 4 em indivíduos com agenesia dental

Investigation of polymorphisms in the BMP-4 gene promoting region in individuals with dental agenesis

Ferdinando De Conto¹
Elisângela Ribeiro da Silva²
Regina Célia Rocha Peres³
Raquel Scarel-Caninaga³
Sérgio Roberto Peres Line⁴

Resumo

A hipodontia é a ausência congênita de um a seis dentes permanentes e/ou decíduos. Essa é uma das mais frequentes alterações da dentição humana, que, embora não represente um problema de saúde pública, pode causar disfunções mastigatórias e da fala, além de problemas estéticos. Trabalhos recentes mostraram que mutações no gene *Msx1* estão associadas com hipodontia de segundos pré-molares e terceiros molares em humanos. A proteína BMP-4 tem sido identificada como um sinal indutivo do epitélio na formação dos dentes. É produzida no epitélio dental (lâmina dental) e regula a expressão de genes mais diretamente envolvidos na odontogênese presentes no mesênquima dental, incluindo o *Msx1*. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de polimorfismos na região promotora do gene BMP-4 em indivíduos com formas isoladas de agenesia dental (formas não síndromicas e sem padrão mendeliano de transmissão). A partir do DNA obtido de células da mucosa bucal de cinquenta indivíduos com agenesia nos segundos pré-molares ou terceiros molares e de cinquenta indivíduos de controle, a região promotora do gene BMP-4 foi amplificada pela técnica de PCR. Os produtos de PCR purificados foram, então, submetidos à técnica de sequenciamento automático e não revelaram alterações na região do gene estudado. Esses resultados indicam que outros genes, ou outras regiões do gene BMP-4, poderiam estar envolvidos na etiologia da hipodontia nos indivíduos estudados.

Palavras-chave: agenesia dental, BMP-4, polimorfismo genético, sequenciamento.

Introdução

A agenesia dental ou hipodontia é a ausência congênita de um a seis dentes permanentes e/ou decíduos (SCHALK-VAN DER WEIDE et al., 1994). Nos últimos anos, muitos esforços têm sido feitos na investigação de genes relacionados à odontogênese (THESLEFF, 1995). Foi comprovado que a hipodontia é uma das alterações mais frequentes da dentição humana e que, em alguns casos, pode causar alterações no aparelho mastigatório e fonético, além de ocasionar, eventualmente, desconforto estético e social ao indivíduo (LINE, 2003).

A agenesia dental pode ocorrer como uma entidade isolada. Neste caso, essa característica parece ser resultado de uma ou mais mutações pontuais num sistema poligênico estreitamente ligado, transmitidas mais frequentemente de modo autossômico dominante, de penetrância incompleta e ex-

pressividade variável (GRABER, 1978).

O gene humano BMP-4 está localizado no braço longo do cromossomo 14, mais precisamente na região (22q-23q). Durante o desenvolvimento embrionário, muitos fatores de crescimento atuam como sinalizadores entre as camadas dos tecidos embrionários. A interação tissular, também chamada “indução embrionária”, tem uma importância central na regulação do desenvolvimento embrionário. Os fatores de crescimento estão agrupados em famílias, sendo que o TGF- β (fator de crescimento transformante – beta) e o FGF (fator de crescimento fibroblástico) são extremamente importantes no desenvolvimento embrionário (BEI e MAAS, 1998).

A família dos fatores de crescimento TGF- β apresenta uma classe de proteínas denominada BMP (proteína morfogenética do osso), que regula o desenvolvimento de ossos e cartilagens. As BMPs

¹ Mestre em Anatomia pela Unicamp, professor das disciplinas de Anatomia e Escultura Dental e Fisiologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFP.

² Mestre em Histologia Bucodental pela Unicamp.

³ Alunas do curso de Doutorado em Histologia Bucodental pela Unicamp.

⁴ Doutor em Patologia pela USP, professor Titular da disciplina de Histologia e Embriologia da Unicamp e do curso de mestrado e doutorado em Biologia Bucodental da Unicamp.

Recebido em: 07-07-2003 / aceito em: 19-08-03

são moléculas sinalizadoras essenciais para o desenvolvimento embrionário e desempenham um papel regulador na embriogênese. Em mamíferos, ao menos 12 BMPs têm sido clonadas e estão divididas em distintos subgrupos. As proteínas BMP-4 e BMP-2 apresentam função sinalizadora no epitélio-mesênquima durante a organogênese (VAINIO et al., 1993). As BMPs parecem participar da interação célula-célula durante o desenvolvimento de vários órgãos e estruturas (BITGOOD e MACMAHON, 1995). A proteína BMP-2 guarda uma homologia de 95% com a BMP-4, mas é expressa somente no epitélio dental (MAAS e BEI, 1997).

No início do desenvolvimento dentário do embrião de camundongo, no décimo dia, o BMP-4 transcrito já pode ser detectado no epitélio (ABERG, WOZNEY, THESLEFF, 1997) e passa a atuar no mesênquima no dia seguinte. No E11.5, com a formação da lâmina dental, o primeiro sinal morfofisiológico de desenvolvimento dentário aparece como um espessamento do epitélio dental. É possível, ainda, perceber a expressão de alguns genes e fatores de crescimento no epitélio dental, como o FGF8 e 9, BMP-2, 4 e 7, Shh, Wnt10a e 10b (para a observação da expressão destes e de outros genes no desenvolvimento dental, consulte-se o *site* <http://bite-it.helsinki.fi>).

Essa sinalização molecular no epitélio é responsável pela indução da expressão dos genes no adjacente mesênquima dental, incluindo MSX1 e MSX2, Lef1, Dlx1, Dlx2, Patched (Ptc), Gli I e II (revisões abrangentes sobre esse assunto foram publicadas recentemente por JERVALL e THESLEFF, 2000; STOCK, 2001). Mina e Kollar, em 1987, realizaram uma recombinação desses tecidos e mostraram que o potencial de desenvolvimento dentário reside no epitélio dental nesse estágio. Nesta fase, o BMP-4 atua tanto no epitélio como no mesênquima até a fase de botão, quando passa a atuar exclusivamente no mesênquima (ABERG, WOZNEY, THESLEFF, 1997).

A fase seguinte é denominada de “botão”, no E12.5 – 13.5, na qual o espessamento do epitélio dental invagina para o subjacente mesênquima para formar o botão dental por condensação das células mesenquimais (ZHAO et al., 2000) e apresenta BMP-4 condensado no mesênquima em torno do epitélio do botão, estando mais concentrado em sua face bucal. A expressão do BMP-4 passa do epitélio para o mesênquima neste estágio, provavelmente, pela influência do mesênquima sobre o epitélio (VAINIO et al., 1993).

Após esse estágio, segue a fase de capuz, onde uma intensa expressão continua na papila dental mesenquimal e reaparece no epitélio na porção distal do órgão do esmalte. A proliferação de células diferenciadas do epitélio dental causa a formação das cúspides dos dentes. Moléculas de Shh, BMP-2, 4 e 7, FGF4 e 9 são expressas nessa fase (ZHAO et al., 2000).

Por último, na fase de sino, a expressão do BMP-4 desaparece do epitélio dental com a remoção do órgão do esmalte e parece ter atuação nas cúspides da papila dental, incluindo a camada de células pré-odontoblásticas. A região central da papila revela pouca ou nenhuma expressão (ABERG, WOZNEY, THESLEFF, 1997).

Materiais e método

A casuística foi composta pelo DNA genômico de cinquenta indivíduos (não aparentados) portadores de agenesia dental de terceiros molares e/ou primeiros pré-molares e de cinquenta indivíduos normais. Os indivíduos eram de ambos os sexos e de idades entre 11 e 50 anos. Indivíduos portadores de síndromes, malformações de qualquer natureza ou com formas mendelianas de agenesia dental foram excluídos do estudo.

Obtenção do DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de bochecho de 5 mL de uma solução autoclavada de glicose a 3%, por cerca de 2 min; a solução resultante do bochecho foi centrifu-

gada por 10 min a 2.000 rpm (raio da centrífuga de 15 cm). Ao precipitado de material celular foram acrescentados 500 µL de tampão de extração (pH 8,0), contendo Tris.Cl a 10 mM (pH 8,0), EDTA a 0,1 M (pH 8,0), SDS a 0,5%. A solução foi homogeneizada e armazenada a -20 °C até o momento de extração do DNA.

Amplificação da região promotora do gene *BMP-4* por PCR (reação em cadeia da Taq DNA polimerase)

Os *primers* utilizados para amplificar a região promotora do gene BMP4 foram 5' CGGATGC CACTCACCTAGCTTC 3' (*primer F*) e 5' AGTGAGCTCATTTA CTGGGTCTACC 3' (*primer R*). Esses *primers* amplificaram um fragmento de 744 pares de bases, que compreendem 632 pares de base da região 5' e 112 pares de base do primeiro exon do gene. Para as reações de PCR foram utilizadas quantidades aproximadas de 500 ng de DNA num volume de 50 µL, contendo Tris.Cl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50 mM, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) e 5 µL de cada *primer*. O DNA genômico de cada amostra foi desnaturado a 95 °C por 6 min e submetido a 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 68 °C por 1 min (para o *primer*), 72 °C por 1 min; finalizou-se a reação com uma extensão final na mesma temperatura por 7 min. As reações de PCR foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Nas reações de PCR utilizou-se o método de “Hot Start”, que consiste em aplicar a enzima Taq polimerase um minuto após a desnaturação inicial em temperatura de 95 °C.

Eletroforese das amostras

As seqüências amplificadas foram submetidas à eletroforese em géis de poli-acrilamida: bis-acrilamida (29:1) a 7.5%. O volume de DNA aplicado em gel era de 4 µL, acrescidos de 3 µL de tampão

carreador (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicérol a 30%).

Purificação dos produtos amplificados por PCR para análise de seqüenciamento automático

Selecionaram-se vinte pacientes que apresentaram boa qualidade na reação de PCR, sendo dez para o grupo de controle e dez do grupo com agenesia dental. Os produtos amplificados desses pacientes passaram por um processo de purificação para retirada de segmentos inespecíficos, assim como de reagentes da PCR que, provavelmente, estariam em excesso. As bandas de interesse foram excisadas e o DNA foi extraído do gel utilizando o GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit – Amersham Pharmacia Biotech, conforme instruções do fabricante.

Seqüenciamento automático

Para cada amostra foi feita uma reação de PCR contendo, aproximadamente, 100 ng de DNA, 2 µL de *primer* (apenas um do par), 4 µL de tampão carreador (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 0,25% e glicérol a 30%), 4 µL do Big Dye Terminator Kit (Perkin Elmer) e água Milli-Q para o volume final de 20 µL. A suspensão foi desnaturada a 95 °C por 6 min e submetida a 35 ciclos de 95 °C por 1 min, a 68 °C (para o *primer reverso* BMP-4), por 1 min, 72 °C por 1 min. Finalizou-se a reação com uma extensão final na mesma temperatura por 7 min – realizada utilizando o método de “Hot Start”.

Polimorfismo por comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)

O produto da PCR dos oitenta pacientes restantes foi submetido à digestão com enzimas de restrição para análise de RFLP com as seguintes enzimas: Hha I (GCG↓C); Rsa I (GT↓AC); Hpa I (C↓CGG) e Mnl I (CCGG↓n7); todas contendo 3,0 µL de DNA, 1,5 de tampão 10 x, 2 U de enzima.

Técnica de heteroduplex

A técnica de heteroduplex foi empregada para as amostras digeridas pelas enzimas Hha I, Hpa II, Rsa I e Mnl I. Ao volume total da digestão foi acrescido tampão carreador na proporção de 4:1 (produto da digestão: tampão carreador), sendo, portanto, de 5 µL. O conteúdo do eppendorf foi desnaturado a 95 °C por 10 min e resfriado a 0 °C imediatamente. As amostras foram, então, aplicadas em gel de poliacrilamida: bis-acrilamida (49:1), na concentração de 7,5%, e a eletroforese foi feita em temperatura ambiente a 20 mA. Os géis foram corados pela técnica de nitrato de prata.

Resultados

A amplificação dos fragmentos de 744 pares de base do gene BMP-4 apresentou 99% de sucesso; esses fragmentos por apresentarem excelente quantidade de DNA, foram utilizados para o estudo. Os segmentos amplificados pelo *primer* BMP-4 foram submetidos à técnica de heteroduplex, a qual revelou padrão semelhante de bandas, ou seja, não houve indicação de qualquer polimorfismo ou mutação na amostra nessa técnica.

A análise por seqüenciamento automático foi realizada em vinte pacientes, e todas as seqüências foram alinhadas e analisadas pelo programa Clustalw (www.ebi.ac.uk/clustalw), por meio do qual foi detectado polimorfismo na base -40 do gene em seis pacientes, sendo três do grupo de controle e três do grupo com agenesia. A partir da seqüência-consenso obtida pelo programa Sequencher™, a comparação com o GenBank confirmou serem as amostras seqüenciadas pertencentes à região promotora do gene BMP-4. O achado foi considerado conclusivo e optou-se por analisar as amostras restantes com utilização de enzimas de restrição.

A seqüência amplificada dos pacientes que apresentaram ou não agenesia dental foi submetida à digestão com enzimas de restri-

ção Hha I, Hpa II, Rsa I e Mnl I. A digestão com essas enzimas não acusou polimorfismo na região promotora do gene BMP-4.

Discussão

A alteração do número dos elementos dentários ocasionada pela falta congênita de dentes é definida na literatura como “agenesia dental” ou “hipodontia”. As variações em número de dentes em desenvolvimento são comuns. Vários termos são úteis na discussão das variações numéricas dos dentes: “anodontia” refere-se à ausência completa de desenvolvimento do dente; “hipodontia” denota a falta de desenvolvimento de um ou mais dentes; “oligodontia” (subdivisão da hipodontia) indica a falta de seis ou mais dentes (SCHALK-VAN DER WEIDE et al., 1994). Definições como anodontia completa (todos os elementos dentários ausentes) e parcial (um ou vários dentes ausentes) são antigas e consideradas obsoletas (SHAFFER, HINE, LEVY, 1987).

Os processos de amplificação e seqüenciamento no estudo de polimorfismos genéticos requerem DNA genômico em quantidade e nível de pureza satisfatórios para o sucesso das reações. Os resultados obtidos mostram que células do epitélio bucal oferecem um material de boa qualidade para técnicas de análise em biologia molecular, como, no caso, para pesquisa de polimorfismos genéticos. Esse método se constitui num meio simples, de baixo custo e inofensivo ao paciente (SCAREL et al., 2000).

A técnica de seqüenciamento automático promove a identificação das bases nucleotídicas que compõem a fita de DNA, com o objetivo de se detectarem ou de se confirmarem polimorfismos/mutações. No seqüenciamento a partir de um produto de PCR, são produzidas rapidamente as seqüências desejadas, pois não é executado o complexo procedimento de clonagem. No entanto, para serem obtidas seqüências de qualidade, é necessário, antes, purificar o produto de PCR (SCAREL, 2000).

O polimorfismo relatado na base - 40 da região sequenciada não foi considerado conclusivo por se tratar de uma região de baixa qualidade para leitura do programa de sequenciamento nos seis pacientes que apresentaram tal alteração. Além disso, deve-se considerar que a alteração de base ocorreu tanto em três pacientes do grupo de controle como em três pacientes com agenesia, não determinando, assim, relação direta com a manifestação da patologia. Diante dessa situação, optou-se por análise de polimorfismo com enzimas de restrição (RFLP-PCR) para o restante dos pacientes.

A RFLP-PCR é útil numa análise preliminar na busca de polimorfismos, principalmente na investigação de grandes sequências. Existem, no entanto, limitações técnicas em termos de resolução na observação dos resultados. Por exemplo, se o sítio de reconhecimento da enzima se encontrar nas extremidades ou se sítios de restrição estiverem muito próximos e houver mutação, não há discriminação suficiente para a precisa interpretação do que realmente está ocorrendo em nível molecular. Além disso, mesmo que se utilize um número considerável de enzimas de restrição, as sequências reconhecidas por estas, na maior parte das vezes, perfazem apenas uma porcentagem pequena de todo o segmento estudado (TREVILATTO, 1999).

No caso do uso da enzima *MnI*, utilizada para identificação do sítio polimórfico detectado na técnica de sequenciamento, acredita-se que não houve diferenças entre os pacientes em virtude da existência de uma sequência de restrição idêntica à procurada iniciando na base - 41, ou seja, possivelmente mascarando qualquer possível alteração.

A análise por heteroduplex permite que as duplas fitas de DNA desnaturadas renaturem-se à temperatura ambiente para que, quando submetidas à eletroforese, tenham mobilidade diferente no gel, se existirem diferenças entre as bases que as compõem. Assim,

é possível detectar polimorfismos ou indivíduos heterozigotos (PROSSER, 1993). É importante observar que a técnica de análise heteroduplex não substitui o sequenciamento, pois somente esta última técnica identifica o polimorfismo (ou mutação) por demonstrar a base (ou sequência) que se mostra alterada.

Os voluntários com hipodontia que participaram deste estudo não eram aparentados e apresentavam padrão heterogêneo de dentes ausentes. A mutação não foi evidenciada, possivelmente, porque a agenesia dental é determinada por vários genes, com penetração incompleta e expressividade variável (GRABER, 1978). Além disso, a regulação de tais genes não é bem conhecida e, provavelmente, existem outros genes e fatores envolvidos na odontogênese ainda não identificados. Portanto, mesmo que dois indivíduos não aparentados apresentem igual padrão de agenesia dental, a determinação genética pode ser completamente diferente de um para outro (SCAREL, 2000).

A inexistência de alterações significativas na sequência da região promotora do gene BMP-4 reforça a idéia de que outros genes estão implicados na odontogênese. Portanto, alterações na sequência desses genes não estudadas neste trabalho seriam a causa genética da hipodontia nos indivíduos abordados.

Quando forem identificadas as sequências promotoras e codificantes de todos os genes envolvidos na odontogênese, bem como o padrão de expressão esclarecido, talvez seja possível até mesmo prever quando um indivíduo irá apresentar hipodontia e quais dentes serão afetados.

No entanto, não parece sensato desconsiderar-se a possível influência ambiental na odontogênese. Estudos paleoantropológicos enfocando os aspectos evolutivos da dentição referem a potencial contribuição de fatores ambientais ao longo do processo (SCAREL, 2000). Mecanismos epigenéticos, como interações gene-ambiente, podem ter contribuí-

do para a redução do complexo mastigatório, por exemplo. A contínua tendência de redução do número de dentes (terceiro molar) pode ser vista como um processo evolutivo, e o gene BMP-4 seria uma das moléculas mais relacionadas com tal efeito. Aliando-se a perspectiva evolutiva com técnicas de biologia molecular, seria possível compreender mais amplamente a odontogênese. Assim, não só os fatores genéticos seriam considerados, mas seria investigado um provável papel que interações gene-ambiente tenham desempenhado ao longo do processo (MACHO e MOGGI-CECCHI, 1992).

Considerações finais

1. A extração do DNA a partir de células descamadas da mucosa jugal é um método simples, de baixo custo e inofensivo ao paciente, o qual permite a obtenção de um material intacto e de boa qualidade para técnicas de biologia molecular, como, no caso, a pesquisa de existência de polimorfismos genéticos.
2. Não foi detectado polimorfismo significativo na região promotora do gene BMP-4, tanto com as técnicas de sequenciamento como com heteroduplex e RFLP-PCR.
3. Sugere-se, então, que polimorfismos presentes em outros genes ligados à odontogênese ou em outras regiões do gene BMP-4 estejam relacionados à agenesia dental em humanos.

Abstract

Hypodontia is the congenital absence of one to six deciduous and/or permanent teeth. This is one of the most frequent alterations of the human dentition. Although it does not represent a problem of public health, it may cause masticatory and speech dysfunctions, as well as esthetic problems. Recent studies have showed that mutations in the gene *Msx1* are associated with hypodontia of second premolars and third molars in humans. The protein BMP-4 has been identified as an inductive sign of the epithelium in the formation of the teeth. It is produced in the dental epithelium where it regulates the expression of genes directly involved in tooth morphogenesis. The aim of this study was to investigate the presence of polymorphism in the BMP-4 gene promoting region in individuals with isolated forms of dental agenesis. Genomic DNA was obtained from buccal epithelial cells of 50 individuals with agenesis in second premolars or third molars and 50 control individuals. The BMP-4 gene promoting region was amplified by the PCR technique. The products of purified PCR were submitted to automatic sequencing and did not reveal any alterations in the region of the studied gene. These results indicate that other genes or regions of BMP-4 must be involved in the etiology of hypodontia in humans.

Key words: hypodontia, BMP-4, polymorphism, sequencing.

Referências

- ABERG, T.; WOZNEY, J.; THESLEFF, I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Developmental Dynamics*, n. 210, p. 383-396, 1997.
- BEI, M.; MAAS, R. FGFs and BMP4 induce both *Msx1*-independent and *Msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development*, n. 125, p. 4325-4333, 1998.
- BITGOOD, M. J.; MACMAHON, A. P. Hedgehog and BMP genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interactions in the mouse embryo. *Developmental Biology*, n. 172, v. 126-138, 1995.
- GRABER, L. W. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns. *JADA*, v. 96, p. 266-275, 1978.
- JERWALL, J.; THESLEFF, I., Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms of Development*, n. 92, p. 19-29, 2000.
- LINE S. R. P. Variation of tooth number in mammalian dentition: connecting genetics, development, and evolution. *Evolution and Development*, n. 5, p. 295-304, 2003.
- MAAS, R.; BEI, M. The genetic control of early tooth development. *Crit Ver Oral Biol Med*, v. 8, n. 1, p. 4-39, 1997.
- MACHO, T.; MOGGI-CECCHI, A. Reduction of maxillary molars in *Homo sapiens*: a different perspective. *Am J Phys Anthropol*, 87(2), p. 151-59, 1992.
- MINA, M., KOLLAR, E. J. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch. Oral Biol.*, v. 32, n. 2, p. 123-127, 1987.
- PROSSER, J. Detecting single base mutations. *TIBTECH*, v. 11, p. 238-246, 1993.
- SCAREL, R. M.; TREVILATO, P. C.; DI HIPÓLITO, O. et al. Absence of mutations in the homeodomain of the *MSX1* gene in patients with hipodontia. *American Journal of Medical Genetics*, p. 92, p. 346-349, 2000.
- SCAREL, R. M. *Análise de polimorfismo no gene MSX1 em indivíduos com agenesia dental*. 2000. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- SCHALK VAN DER WEIDE, Y. et al. Symptomatology of patients with oligodontia. *J Oral Rehab*, v. 21, p. 247-261, 1994.
- SHAFFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. *Tratado de patologia bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1987.
- STOCK D.W., The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B- Biological Sciences*, v. 356 (1414), p. 1633-1653, Oct. 2001.
- THESLEFF, I. Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis. *Acta Odontol Scand*, v. 53, p. 129-134, 1995.
- TREVILATTO, P. C. *Análise de polimorfismo do gene da amelogenina X*. 1999. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- VAINIO, S. et al, Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*, v. 75, p. 45-58, Oct. 1993.
- ZHAO, X. et al, Transgenically ectopic expression of BMP-4 to the *MSXL* mutant dental mesenchyme restores downstream gene expression but represses *Shh* and *Bmp2* in the enamel knot of wild type tooth germ. *Mechanisms of Development*, n. 99, p. 29-38, 2000.

Endereço para correspondência

Ferdinando De Conto
Rua Rui Silveira, 497 - Morada da Colina
CEP 99010-330 - Passo Fundo - RS
E-mail: ferdi@upf.br