

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Centro de Ciência da Saúde**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Departamento de Odontopediatria e Ortodontia**

**Erika Calvano Kuchler**

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE ANOMALIAS DO  
DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL E A RELAÇÃO DA  
AGENESIA DENTÁRIA COM OS GENES MMP1, MMP3 e  
MMP20**

**Rio de Janeiro**  
**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Centro de Ciência da Saúde**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Departamento de Odontopediatria e Ortodontia**

**Erika Calvano Kuchler**

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE ANOMALIAS DO  
DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL E A RELAÇÃO DA  
AGENESIA DENTÁRIA COM OS GENES MMP1, MMP3 e  
MMP20**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Orientadores:

**Prof. Dr. Marcelo de Castro Costa**  
**Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira**

**Rio de Janeiro**  
**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Kuchler, Erika Calvano

Avaliação quantitativa de anomalias do desenvolvimento craniofacial e a relação da agenesia dentária com genes MMP1, MMP3 e MMP20 / Erika Calvano Kuchler. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia, 2008. xii, 90, f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Marcelo de Castro Costa e Alexandre Rezende Vieira.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/FO, Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, 2008.

Referências bibliográficas: f. 59-64

1. Anodontia. 2. Polimorfismo genético. 3. Dentição permanente. 4. Anormalidades dentárias. 5. Odontogênese. 6. Metaloproteinases da Matriz. 7. Humanos. 8. Odontopediatria – Tese. I. Costa, Marcelo de Castro II. Vieira, Alexandre rezende. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, FO, Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria. IV. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**ERIKA CALVANO KUCHLER**

**“AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA QUANTITATIVA DE ANOMALIAS DO DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL E A RELAÇÃO DA AGENESIA DENTÁRIA COM OS GENES MMP1, MMP3 e MMP20”**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Rio de Janeiro, 18 de novembro de 2008.

---

Prof. Dr. Marcelo de Castro Costa  
DO-Prof. Adjunto do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria e Ortodontia FO-UFRJ

---

Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira  
Prof. Assistente e Diretor de Pesquisa Clínica do Dept<sup>o</sup> de Biologia Oral  
Universidade de Pittsburgh

---

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro  
Prof. Adjunto do Dept<sup>o</sup> de Biologia Celular e Molecular UFF

---

Prof. Dr. Luise Gomes da Mota  
Prof. Adjunto do Dept<sup>o</sup> de Materiais Dentários FO-UFF

---

Prof. Dr. Rogério Gleiser  
DO-Prof. Adjunto do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria e Ortodontia FO-UFRJ

## DEDICATÓRIA

*...A todos aqueles que foram fundamentais para a realização desse trabalho.*

*À minha mãe Helena e ao meu pai Joaquim, que sempre me apoiaram nesse difícil caminho que eu escolhi. Sempre respeitaram e compreenderam minhas decisões e meus ideais, pois entendem que nem sempre nossas realizações vêm pelos caminhos mais fáceis e sabem da minha luta para realizar meus sonhos.*

*Ao meu irmão Patrick, pela cumplicidade, amizade leal e por ser um exemplo de generosidade. Só quem tem um irmão como eu, poderia entender a importância de você em minha vida.*

*À minha querida prima Lidiane e minha amiga-cunhada Sofia, por terem plantado a primeira semente na minha mente e por serem minhas companheiras nessa jornada.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Aos meus orientadores... Palavras não seriam suficientes para expressar minha gratidão...*

*Ao Prof. Dr. Marcelo de Castro Costa, um grande amigo, sempre animado me apoiando em minha caminhada, pois com seu otimismo e amizade leal me compreendeu me incentivou e foi essencial para que eu continuasse a cumprir e seguir o meu caminho. Agradeço principalmente pela sua imensa generosidade e por sempre ter acreditado em mim. Foi maravilhoso trabalhar com você! Você estará sempre em meu coração.*

*Ao Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira, que muito admiro, agradeço pelos valiosos ensinamentos, pela confiança, pelo apoio ao longo desses anos e por ter sido fundamental nessa jornada, sem você eu não chegaria até aqui. Um exemplo admirável de orientador e de dedicação à pesquisa. Obrigada pela gratificante oportunidade de aprender com você! Meus eternos agradecimentos.*

## AGRADECIMENTOS

À **Vida**, por ter me proporcionado essa experiência única; por ter permitido que passasse por mim pessoas incríveis que tanto me ensinaram; e até mesmo por ter colocado obstáculos e dificuldades nesse percurso, porque são eles que nos fazem crescer.

À **minha Professora e amiga Bárbara**, por ter sido minha segunda mãe, meu ombro amigo e pela sua importante participação na minha vida. Obrigada pela sua amizade leal e pelo tempo que passamos juntas!

Aos meus queridos amigos de turma **Ana Carolina, Daniel, Patrícia, Raquel e Senda**, pelos maravilhosos e incríveis momentos que passamos todos juntos! Nós somos um exemplo de superação e amizade.

À **Profa. Lucianne Cople Maia**, por sua, preocupação, ensinamentos e amizade. Você teve um papel essencial ao longo do curso pra mim.

À **Profa. Glória**, por sua amizade, sua alegria e pelos nossos prazerosos momentos de aprendizagem durante os seminários.

À **Profa. Dra. Ivete Pomarico**, por nos compreender nos momentos difíceis e nos ajudar a crescer.

Ao **Prof. Rogério Gleiser**, sempre atencioso, com seu jeito amigo nos proporcionou prazerosos momentos de aprendizagem.

Ao **Prof. João Farinhas** por ter sido meu mestre na clínica e ter me ensinado a devolver tantos sorrisos. Vou sentir sua falta!

À **Profas. Andréa, Cláudia, Fátima, Marta, Nena, Rosana e Vanessa**, pelos agradáveis momentos de convivência.

À **Profa. Áurea Simone** *in memoriam*, pela sua alegria espontânea que contagiava a todos. Pelos momentos de amizade e apoio nas horas difíceis.



À **minha amiga Patrícia Risso**, por ter estado ao meu lado em todo tempo, incentivando e dando força durante a caminhada no curso. Obrigada pelo carinho e amizade!

Ao **amigo Rafael Pedro**, pela nossa fraterna convivência ao longo de tantos anos.

À **minhas amigas do M0 e M1 Adriana, Marina e Tatiana** pela amizade e ajuda.

Aos demais colegas do Departamento, **Andréa, Márcia, Roberta, Viviane, Maristela, Cristiana, Camila, Elaine, Erika, Joseane, Júlia, Paula e Renata** pela companhia e principalmente a **Lívia** pela nossa amizade.

Aos funcionários **Andréa, Mere, Neide, Robson, Zezé, Marilda, Luíza, Marília, Isabel, Bruna, Jorge e Ednaldo** pelo convívio harmonioso e alegre. Principalmente, a **Gina e Kátia**, pelo grande carinho.

Ao **João Carlos Monteiro**, sempre disponível e bem humorado para nos “salvar”. Muito Obrigada!

Ao **Prof. José Mauro**, à **Profa. Lídia** e à **Profa. Luise** pela amigável recepção, confiança e pelos valiosos ensinamentos que nos tem transmitido. E aos demais amigos do laboratório **Larissa, Marcelo, Priscila e Taliria** pelos agradáveis momentos de aprendizagem juntos.

À todas as **famílias voluntárias**, pela compreensão da importância de sua colaboração para a realização deste trabalho e para a Ciência.

À **Capex**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

*“Talvez...  
Talvez eu sofra inúmeras decepções no decorrer de minha vida.  
Mas farei que elas percam a importância diante dos gestos de  
amor que encontrarei.  
Talvez eu não tenha forças para realizar todos os meus ideais.  
Mas jamais irei me considerar um derrotado.  
Talvez em algum instante eu sofra uma terrível queda.  
Mas não ficarei por muito tempo olhando para o chão.  
Talvez uma dessas noites frias, eu derrame muitas lágrimas.  
Mas não terei vergonha desse gesto.  
Talvez a vontade de abandonar tudo torne-se a minha  
companheira,  
Mas ao invés de fugir, irei correr atrás do que almejo.  
  
.... no final saberei que mesmo com incontáveis dúvidas,  
Eu sou capaz de construir uma vida melhor.”*

*Aristóteles Onassis*

## RESUMO

KUCHLER, Erika Calvano. **Avaliação Radiográfica Quantitativa de Anomalias do Desenvolvimento Craniofacial e a Relação da Agenesia Dentária com os Genes MMP1, MMP3 e MMP20.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

A agenesia dentária é uma condição heterogênea, tanto no seu aspecto clínico quanto genético. Padrões específicos de associações entre as anomalias dentárias auxiliam na identificação de subfenótipos, que podem apresentar componentes genéticos específicos. Variantes genéticas de genes expressos no desenvolvimento dentário podem estar associados com agenesia dentária isolada. Desta forma, o presente estudo apresenta os seguintes objetivos: (1) avaliar um grupo de crianças para definir subfenótipos de agenesia dentária humana e (2) investigar se existe associação entre os genes MMP1, MMP3 e MMP20 e agenesia dentária. Na primeira fase do estudo (1), radiografias panorâmicas de 1198 crianças foram avaliadas e 1167 foram incluídas nesse estudo. Na segunda fase do estudo (2), foram analisados 167 trios (pai-mãe-filho) de duas populações diferentes (116 brasileiros e 51 turcos). O filho afetado apresentava pelo menos um dente ausente congenitamente (excluindo os terceiros molares). As amostras de DNA foram obtidas de sangue ou de saliva. (1) A prevalência de agenesia dentária foi de 4,8%. A razão de proporção masculino/feminino variou de 2:1 em incisivos laterais superiores para 0,5:1 em pré-molares. Foi observada uma associação entre agenesia dentária, anquilose de molares decíduos e geminação/fusão de dentes decíduos. (2) Foi observada associação entre agenesia dentária e MMP1 ( $p=0,007$ ) e MMP20 ( $p=0,03$ ) em famílias de origem brasileira. A prevalência de agenesia dentária está de acordo com outros autores e apresentou subfenótipos, demonstrando ainda associação com genes expressos no desenvolvimento dentário.

**Palavras-chave:** Agenesia dentária, Alterações do Desenvolvimento Dentário, Polimorfismo, metaloproteinases da matriz.

## ABSTRACT

KUCHLER, Erika Calvano. **Avaliação Radiográfica Quantitativa de Anomalias do Desenvolvimento Craniofacial e a Relação da Agenesia Dentária com os Genes MMP1, MMP3 e MMP20.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Tooth agenesis is classified as a clinically and genetically heterogeneous dental anomaly. The identification of specific patterns of dental anomalies would allow testing the hypothesis that certain genetic factors contribute to distinct dental anomaly subphenotypes. It is proposed that variation in genes that are critical for tooth formation contributes to tooth agenesis. The aim of this study was (1) to investigate a group of children to define dental anomaly subphenotypes and (2) to investigate the possible association between MMP1, MMP3 and MMP20 and human tooth agenesis. (1) Orthopantomograms of 1198 subjects were examined and 1167 were used in this study. (2) One hundred sixty seven nuclear families (father-mother-affected child) from two different populations, 116 were from Brazil and 51 were from Turkey were analyzed. Probands had at least one missing tooth, excluding third molars. DNA samples were obtained from whole blood or saliva samples and genotyping was performed. (1) The frequency of tooth agenesis in the studied population was 4.8%. Male:female ratios varied from 2:1 in the agenesis of upper lateral incisors to 0.5:1 in premolar agenesis. The risk of ankylosis of primary molars and double formation of primary incisors was increased in individuals with tooth agenesis. (2) Association between tooth agenesis and MMP1 ( $p=0.007$ ) and MMP20 ( $p=0.03$ ) was found in families of Brazilian origin. In the total dataset, MMP20 continued to be associated with tooth agenesis ( $p=0.01$ ). The prevalence was in agreement with others authors and presented subphenotypes. Tooth agenesis demonstrated association with genes expressed in dental development.

**Key-words:** Dental developmental alteration, tooth agenesis, SNP, matrix metalloproteinase

## LISTA DE TABELAS, FIGURAS

<b>ARTIGO 1</b> .....	
<b>Tabela 1:</b> Frequency of tooth agenesis and taurodontismo.....	16
<b>Tabela 2:</b> Teeth affected by agenesis.....	16
 <b>ARTIGO 2</b> .....	
<b>Tabela 1:</b> Frequency of teeth type affected by agenesis .....	27
<b>Tabela 2:</b> Frequency of subjects with unilateral and bilateral agenesis based on the type of teeth and gender.....	28
<b>Tabela 3:</b> Frequency of dental anomaly in the group with tooth agenesis and without tooth agenesis.....	29
<b>Figure 1:</b> Proposed models for gender differences in frequency.....	30
 <b>ARTIGO 3</b> .....	
<b>Tabela 1:</b> Details on the genetic markers studied.....	42
<b>Tabela 2:</b> Aspects of the study populations.....	43
<b>Tabela 3:</b> Summary of FBAT association results.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD - Agenesia Dentária

DNA - Deoxyribonucleic Acid

FL/P - Fissura de lábio e/ou Palato

FO/UFF – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense

FO/UFRJ - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro

HUCFF - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

MMP - Metaloproteinase da Matriz

MSX - Muscle Segment Homeobox

PAX - Paired Box

PTTPO - Programa de Treinamento Teórico-Prático em Odontopediatria

SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms

TIMP - Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases

**SUMÁRIO**

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>DELINEAMENTO DA PESQUISA .....</b>	<b>5</b>
<b>4.</b>	<b>ARTIGOS .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1</b>	<b>Artigo 1 .....</b>	<b>8</b>
<b>4.2</b>	<b>Artigo 2 .....</b>	<b>17</b>
<b>4.3</b>	<b>Artigo 3 .....</b>	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
	<b>ANEXOS</b>	

# 1. INTRODUÇÃO

A formação craniofacial é extremamente complexa por envolver diversas estruturas anatômicas e processos moleculares. Alterações durante o desenvolvimento podem resultar em anomalias craniofaciais. Dentre as alterações do desenvolvimento dentário destaca-se a Agenesia Dentária (AD), por ser a anomalia congênita mais comum nos seres humanos (Thesleff, 1998).

A AD caracteriza-se pela não formação de um ou mais elementos dentários e pode afetar tanto a dentição decídua quanto a permanente. A dentição decídua é menos acometida, com a prevalência variando entre 0,5% a 1,0% (Jarvinen, 1981). Na dentição permanente, a prevalência apresenta uma grande variação de 1,6 a 11,3% (Larmour, Mossey *et al.*, 2005), excluindo-se a ausência de terceiros molares que ocorre em aproximadamente 20% da população (Graber, 1978; Zhu, Crevoisier *et al.*, 1996). Os dentes mais freqüentemente ausentes são os segundos pré-molares seguidos pelos incisivos laterais superiores, podendo se apresentar unilateralmente ou bilateralmente (Larmour, Mossey *et al.*, 2005). Estudos sugerem que o gênero feminino é o mais afetado, numa razão de proporção de 3:2 quando comparado ao gênero masculino (Backman e Wahlin, 2001; Larmour, Mossey *et al.*, 2005).

A AD pode ser um achado isolado ou estar associada a uma síndrome, como parte de seu aspecto fenotípico. Na literatura, tal associação foi descrita com mais de 50 síndromes, entre as quais a síndrome de Rieger, Robinson, a displasia ectodérmica e a síndrome de Down (OMIN).



As alterações do desenvolvimento dentário também são freqüentes em pacientes portadores de fissura de lábio com ou sem fissura de palato (FL/P). A prevalência de AD fora da região da fissura é mais comum nos pacientes com FL/P quando comparados com a população em geral (Letra, Menezes *et al.*, 2007). Além disso, o número de dentes ausentes está diretamente relacionado à gravidade da fissura (Larson, Hellquist *et al.*, 1998; Slayton, Williams *et al.*, 2003; Karsten e Larson, 2004). Em alguns casos a AD e a FL/P fazem parte do mesmo componente genético (Vieira, 2003; Vieira, Modesto *et al.*, 2007; Vieira, 2008).

A AD pode ainda estar associada a outras alterações do desenvolvimento dentário, tais como a microdontia e o conoidismo de incisivos laterais (Lai e Seow, 1989; Arte, Nieminen *et al.*, 2001; Backman e Wahlin, 2001), a taurodontia (Lai e Seow, 1989; Seow e Lai, 1989; Schalk-Van Der Weide, Steen *et al.*, 1993), a infra-oclusão de molares decíduos, a geminação e a fusão dos dentes decíduos antecessores (Razak e Nik-Hussein, 1986; Whittington e Durward, 1996), a transposição de caninos e pré-molares (Peck, Peck *et al.*, 1993; Peck, Peck *et al.*, 2002; Ely, Sherriff *et al.*, 2006) e o atraso na formação e erupção dos demais dentes permanentes (Burzynski, 1983). Os estudos de associação são importantes para a identificação de variantes genéticas que predispõe à alterações complexas (Li M, 2005).

Os dentes são órgãos que se desenvolvem a partir do tecido epitelial e mesenquimal. O desenvolvimento dentário é controlado por mecanismos genéticos diferentes. Desta forma, alterações em um ou mais genes que regulam as interações epitélio-mesênquima, durante o desenvolvimento dentário, podem causar agenesia dentária (Lyngstadaas, Nordbo *et al.*, 1996).

Diversos genes candidatos foram relacionados à AD. Formas autossômicas dominantes de oligodontia estão associadas a mutações ou deleções em: *PAX9* (Klein, Nieminen *et al.*, 2005; Hansen, Kreiborg *et al.*, 2007); (Stockton, Das *et al.*, 2000; Nieminen, Arte *et al.*, 2001; Frazier-Bowers, Guo *et al.*, 2002; Das, Hai *et al.*, 2003; Lammi, Halonen *et al.*, 2003; Mostowska, Kobiela *et al.*, 2003; Mostowska, Biedziak *et al.*, 2006), *MSX1* (Vastardis, Karimbux *et al.*, 1996; Jumlongras, Bei *et al.*, 2001; Lidral e Reising, 2002; De Muynck, Schollen *et al.*, 2004; Kim, Simmer *et al.*, 2006), *AXIN2* (Lammi, Arte *et al.*, 2004).

Os genes metaloproteinases da matriz (MMPs) estão entre os possíveis genes candidatos à agenesia dentária isolada, devido à importante função destas enzimas durante o desenvolvimento craniofacial (Iamaroon, Wallon *et al.*, 1996). As MMPs são responsáveis pela remodelação e degradação da matriz extracelular, desempenhando um papel fundamental na homeostase das matrizes extracelulares em adultos e controlando seu remodelamento durante o desenvolvimento embrionário (Birkedal-Hansen, Moore *et al.*, 1993). Diversas evidências biológicas (Iamaroon, Wallon *et al.*, 1996; Morris-Wiman, Burch *et al.*, 2000) sugerem que os genes de diferentes MMPs e suas variações podem estar envolvidos nas anomalias de desenvolvimento craniofacial, pois estão associadas a mineralização dos tecidos, tais como: ossos e dentes (Birkedal-Hansen, Moore *et al.*, 1993; Iamaroon, Wallon *et al.*, 1996; Morris-Wiman, Burch *et al.*, 2000) e ainda desempenham função na degradação dos componentes dentais (Goldberg, Septier *et al.*, 2002).

Neste contexto, as diversas apresentações clínicas das agenesias dentárias, bem como os complexos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento craniofacial impulsionam a investigação da etiologia desta anomalia.

## **2. PROPOSIÇÃO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar os subfenótipos das agenesias dentárias e avaliar sua associação com variações nos genes MMP1, MMP3 e MMP20.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1 Avaliar a prevalência de agenesia dentária isolada em um grupo de crianças brasileiras.

2.2.2 Avaliar a associação entre os tipos de agenesia dentária e outras alterações do desenvolvimento dentário (subfenótipos).

2.2.3 Avaliar a associação entre agenesia dentária e os polimorfismos nos genes MMP1, MMP3 e MMP20 em famílias brasileiras e turcas.

### **3. DELINEAMENTO DA PESQUISA**

Após a aprovação pelo Comitê de Ética local do HUCFF (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil (Anexo 1), a presente pesquisa foi iniciada.

A população estudada foi constituída por dois grupos distintos: crianças com idade variando de 6 a 12 anos, que foram atendidas no Programa de Treinamento Teórico-prático em Odontopediatria no período de 1997 à 2007 e pacientes portadores de agenesia dentária isolada e seus familiares. Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devidamente explicado e assinado pelo responsável legal da criança e anuência da mesma (Anexo 2).

Visando concretizar os objetivos da presente pesquisa, foram elaborados três artigos científicos descrevendo as metodologias empregadas e os resultados obtidos.

O artigo 1 avaliou a prevalência de agenesia dentária isolada, de taurodontia de molares inferiores e uma possível associação entre ambas anomalias em um grupo de 975 crianças brasileiras.

O artigo 2 avaliou, em 1167 crianças brasileiras, a associação entre agenesia dentária isolada e outras alterações do desenvolvimento dentário, tais como: infra-oclusão de molares decíduos, microdontia/conoidismo de incisivos laterais superiores, transposição, dentes supranumerários, taurodontia de molares e geminação e fusão de dentes decíduos. Foram avaliadas também as diferenças entre os gêneros.

O Artigo 3 avaliou a associação de variações nos genes MMP1, MMP3 e MMP20 com agenesia dentária isolada em 116 famílias brasileiras e 51 famílias turcas.

## 4. ARTIGOS

**Artigo 1:** Assessing the proposed association between tooth agenesis and taurodontism in 975 paediatric subjects. **International Journal of Paediatric Dentistry**; 2008; 18: 231–234

**Artigo 2:** Studies of dental anomalies in a large group of school children. **Archives of oral Biology**; 2008; 53: 941-946.

**Artigo 3:** *MMP1* and *MMP20* May Contribute to Tooth Agenesis in Humans.

Será submetido à **European Journal of Oral Science**.

## 4.1 Artigo 1

### **Assessing the Proposed Association between Tooth Agenesis and Taurodontism in 975 Pediatric Subjects**

Erika Calvano Küchler, DDS<sup>1</sup>; Patrícia de Andrade Risso, DDS<sup>2</sup>; Marcelo de Castro Costa, DDS, PhD<sup>3</sup>; Adriana Modesto, DDS, MS, PhD<sup>4</sup>; Alexandre Rezende Vieira, DDS, MS, PhD<sup>5</sup>

*<sup>1</sup>Master student in Pediatric Dentistry, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro; <sup>2</sup>Master's Student, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro; <sup>3</sup>Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro; <sup>4</sup>Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh; <sup>5</sup>Assistant Professor, Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh.*

## ABSTRACT

An association between tooth agenesis and taurodontism has been suggested. The aim of this work was assessing a large cohort to verify if this association was present. Panoramic radiographs of 1002 cases were examined. The presence of tooth agenesis and taurodontism was assessed in the study population. The frequency of tooth agenesis was 4.6% and the frequency of taurodontism was 1.6%. However, there were no observations of concomitant tooth agenesis and taurodontism. Our data does not support the hypothesis that isolated tooth agenesis is associated with isolated taurodontism.

## STRUCTURED ABSTRACT

**Objective:** Test the hypothesis that tooth agenesis is associated with taurodontism.

**Study Design:** Panoramic radiographs from a cohort of 1002 cases were examined and the presence of tooth agenesis and taurodontism were determined. **Results:** No cases with concomitant tooth agenesis and taurodontism were found.

**Conclusion:** Isolated tooth agenesis is not associated with isolated taurodontism.

## INTRODUCTION

Tooth agenesis is the most common congenital anomaly in humans and most cases are likely to be the result of many genes acting alone or in combination. Tooth agenesis has been associated with 49 syndromes (OMIM). Of particular interest is the association of tooth agenesis with clefts of the lip and palate, which suggests that, in some instances, tooth agenesis and clefts share the same genetic factors<sup>1</sup>. Tooth agenesis has been also reported in association with other dental anomalies,



including taurodontism<sup>2-6</sup>. Taurodontism is a variation in tooth shape, characterized by an apical dislocation of the pulpar chamber of a molar, also commonly showing bifurcated roots<sup>7-9</sup>.

Both tooth agenesis and taurodontism are reported to be common defects. Tooth agenesis has a frequency between 1.6 and 10%<sup>10, 11</sup>, excluding third molars that are absent in 20% of the general population<sup>11</sup>. The frequency of taurodontism varies from 0.3% to 11.3%<sup>2, 3, 9, 12-14</sup>, depending on the definition of taurodontism.

The identification of sub-populations with specific associated dental anomalies (subphenotype) would allow testing the specific hypothesis that certain genetic factors contribute to the specific subphenotype. Therefore, the aim of this work was to verify if tooth agenesis and taurodontism were associated and could define a subphenotype for future genetic studies of dental development.

## **METHODS**

Panoramic radiographs from 1002 patients assisted by the Federal University of Rio de Janeiro's Continuing Education Clinical Program in Pediatric Dentistry were examined. Patients, whose ages varied from 5 to 12 years old, were assisted between January 1999 and July 2006. The protocol of this study was reviewed by the Federal University of Rio de Janeiro's institutional review board and each subject in the project signed an age appropriate informed consent form along with his/her parents that signed a detailed informed consent form.

Tooth agenesis was defined radiographically according to an established protocol<sup>8</sup>. Taurodontism was assessed in the first and second lower permanent molars and was defined by the apical enlargement of the pulpar chamber<sup>15</sup>. Cases

with radiographs of poor quality were excluded. No cases were found to have an underlying syndrome.

## RESULTS

From the 1002 radiographs, 26 were excluded due to poor quality; therefore 975 radiographs were available for the study. The average age of the population studied was 8.02 years (standard deviation = 1.67).

Forty-five cases (19 males and 25 females) presented with tooth agenesis (4.6%). Sixteen cases (7 males and 9 females) presented with taurodontism (1.6%)(Table 1).

In the 45 tooth agenesis cases, 3 had four congenitally missing teeth, 4 had three missing teeth, 11 had two missing teeth and the remaining 27 cases just one missing teeth. Sixteen cases had maxillary missing teeth, 23 cases had mandibular missing teeth, and 6 cases had tooth agenesis in both arches. The most commonly absent teeth was the second mandibular premolar (Table 2).

Taurodontism affected 40 mandibular molars, 28 first molars and 12 second molars. No tooth agenesis cases presented with taurodontism. The average age of children with taurodontism was 7.93 years (standard deviation = 1.72).

## DISCUSSION

Our results do not support the hypothesis that tooth agenesis is associated with taurodontism. The frequency of taurodontism we found (1.6%) is within the range reported in the literature (0.3% to 11.3%)<sup>2, 3, 9, 12-14</sup>. Also, the frequency we found for tooth agenesis (4.6%) is within the range described in the literature<sup>10, 11</sup>.

Previous studies reported that second and third molars are more affected by taurodontismo<sup>9, 12</sup>. We found more first molar cases of taurodontism and this difference may be due to the low age population and the impossibility to ascertain third molars.

The studies that suggested association between tooth agenesis and taurodontism suggest that the association is more likely in cases of severe tooth agenesis (oligodontia or six or more absent teeth)<sup>2-4</sup>. The most severe cases we found had four missing teeth only and this may explain our findings. However, severe tooth agenesis cases are much less common in the population (frequency of 0.25%)<sup>16</sup>, and the reports of families with known gene mutations segregating with tooth agenesis did not describe associated taurodontism<sup>1</sup>.

A DLX3 frameshift mutation was identified in the amelogenesis imperfecta hypoplastic-hypomaturation with taurodontism syndrome<sup>17</sup>. One can argue that variation in DLX3 or other DLX family gene members could contribute to isolated forms of taurodontism. This model of using syndromes as models for isolated traits that are part of the syndromic spectrum have being successfully used in the case of isolated cleft lip and palate, isolated tooth agenesis and IRF6 (which mutations in IRF6 cause Van der Woude syndrome, which presents with oral clefts, lower lip pits, and in 40% of the cases tooth agenesis)<sup>18, 19</sup>.

There is some evidence that taurodontism could be linked to oral clefts. A Finish study that investigated 39 cleft twin pairs (13 monozygotic and 26 dizygotic) reported four of 13 monozygotic pairs with taurodontism were concordant for the trait, as were nine of 12 dizygotic pairs. Taurodontism was symmetric in 91% of the affected molar pairs<sup>20</sup>. Concomitant taurodontism and tooth agenesis was observed in 8 of 16 taurodontic twin pairs, which makes us believe tooth agenesis and

taurodontism associated with clefts may have different genetic contributing factors than the isolated forms.

In summary, our data do not support the hypothesis that tooth agenesis is associated with taurodontism and that could comprise a subphenotypic craniofacial trait.

## REFERENCES

1. Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res* 2003;82:162-5.
2. Lai PY, Seow WK. A controlled study of the association of various dental anomalies with hypodontia of permanent teeth. *Pediatr Dent* 1989;11:291-6.
3. Seow WK, Lai PY. Association of taurodontism with hipodontia: a controlled study. *Pediatr Dent* 1989;11:214-9.
4. Scalk-van der Weid Y, Steen WH, Bosman F. Taurodontism and length of teeth in patients with oligodontia. *J Oral Rehabil* 1993;20:401-12.
5. Lyngstadaas SP, Nordbo H, Gedde-Dahl T Jr., Thrane PS. On the genetics of hypodontia and microdontia: synergism or allelism of major genes in a family with six affected members. *J Med Genet* 1996;33:137-42.
6. Arte S, Nieminem P, Apajalahti S, Haavikko, Thesleff I, Pirinem S. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. *J Dent Res* 2001;80:1445-50.
7. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1983. p. 837.
8. Moyers RE. Handbook of orthodontics. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1988. p. 483.
9. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot J. Oral & maxillofacial pathology. Philadelphia: W. B. Saunders; 2001. p. 711.
10. Eidelman E, Chosack A, Rosenzweig KA. Hypodontia prevalence among Jewish populations of different origin. *Am J Phys Anthropol* 1973;39:129-33.
11. Graber LW. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns. *J Am Dent Assoc* 1978;96:266-75.
12. Shifman A, Chanannel I. Prevalence of taurodontism found in radiographic dental examination of 1,200 young adult Israeli patients. *Community Dent Oral Epidemiol* 1978;6:200-3.
13. Jorgenson RJ, Salinas CF, Shapiro SD. Prevalence of taurodontism in a select population. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1982;2:125-35.
14. Backman B, Wahlin YB. Variations in number and morphology of permanent teeth in 7-year-old Swedish children. *Int J Paediatr Dent* 2001;11:11-7.
15. Durr DP, Campos CA, Avers CS. Clinical significance of taurodontism. *J Am Dent Assoc* 1980;100:378-81.
16. Silverman NE, Ackerman JL. Oligodontia: a study of its prevalence and variation in 4032 children. *J Dent Child* 1979;46: 470-7.

17. Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu T, Escamilla M, MacDougall M. DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Am J Med Genet A* 2005;133:138-41.
18. Zucchero T, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al. Interferon regulatory factor (IRF6) is a modifier for isolated cleft lip and palate. *New Engl J Med* 2004;351:769-80.
19. Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa ARS, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) and fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A* (In Press).
20. Laatikainen T, Ranta R. Taurodontism in twins with cleft lip and/or palate. *Eur J Oral Sci* 1996;104:82-6.

**Table 1.** Frequency of tooth agenesis and taurodontism.

Dental Anomaly	Frequency				Total	
	Males		Females			
	(n)	(%)	(n)	(%)		
Not present	438	44.9 %	476	48.9 %	914	93.8%
Tooth Agenesis	19	1.9 %	26	2.6 %	45	4.6%
Taurodontism	7	0.7 %	9	0.9 %	16	1.6%
<b>Total</b>	464	48.0 %	511	52.0 %	975	100%

**Table 2.** Teeth affected by agenesis.

Teeth	Frequency
Second mandibular premolar	27
Second maxillary premolar	18
Upper lateral incisor	14
Lower lateral incisor	10
Lower central incisor	4
First mandibular premolar	2
Lower canine	2
Upper canine	1
<b>Total</b>	79

## 4.2 Artigo 2

### **Studies of Dental Anomalies in a Large Group of School Children**

Erika Calvano KÜchler, DDS<sup>1</sup>; Patrícia de Andrade Risso, DDS, MS<sup>2</sup>; Marcelo de Castro Costa, DDS, PhD<sup>3</sup>; Adriana Modesto, DDS, MS, PhD<sup>4</sup>; Alexandre Rezende Vieira, DDS, MS, PhD<sup>5</sup>.

*<sup>1</sup>Master's student in Pediatric Dentistry, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, <sup>2</sup>Doctor's Student, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro; <sup>3</sup>Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro; <sup>4</sup>Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh; <sup>5</sup>Assistant Professor, Departments of Oral Biology and Pediatric Dentistry and Center for Craniofacial and Dental Genetics, School of Dental Medicine, and Department of Human Genetics, Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh.*



## ABSTRACT

The identification of specific patterns of dental anomalies would allow testing the hypothesis that certain genetic and environmental factors contribute to distinct dental anomaly subphenotypes. A sexual dimorphism in tooth agenesis and its association with others dental anomalies has been suggested. The aim of this study was to investigate a large cohort of children to define dental anomaly subphenotypes that may aid future genetic studies. Orthopantomograms of 1198 subjects were examined and 1167 were used in this study. The frequency of tooth agenesis in the studied population was 4.8%. Male:female ratios varied from 2:1 in the agenesis of upper lateral incisors to 0.5:1 in premolar agenesis. The risk of ankylosis of primary molars and double formation of primary incisors was increased in individuals with tooth agenesis.

**Key words:** tooth agenesis, dental anomalies, disturbances in dental development

## Structured Abstract

**Objective:** Investigate if specific patterns of tooth agenesis are associated with other dental anomalies. **Study Design:** Orthopantomograms from a cohort of 1167 cases were examined. The presence of tooth agenesis, other dental anomalies and differences between the genders were determined. **Results:** The frequency of tooth agenesis in the studied population was 4.8%. Male:female ratios varied from 2:1 in the agenesis of upper lateral incisors to 0.5:1 in premolar agenesis. Individuals with tooth agenesis have a higher risk of ankylosis of primary molars and double formation of primary incisors. **Conclusion:** Our results suggest there is a common genetic background for tooth agenesis and a subset of developmental dental anomalies.

## INTRODUCTION

Tooth agenesis is the most common congenital anomaly in humans and it is characterized by developmental absence of teeth. Reports on the overall prevalence

of missing permanent teeth, excluding third molars, vary substantially, from 2.6% to 11.3%. Second premolars are most frequently recorded absent. A sexual dimorphism has been suggested and prevalence rates are higher in females compared to males (1). Approximately 80% of tooth agenesis cases involve only one or two teeth (2).

Tooth agenesis is commonly found in syndromes (3). This congenital defect is more common in patients with cleft lip and palate than in the general population (4, 5), which suggests that, in some instances, tooth agenesis and clefts share the same genetic factors (3).

Many dental anomalies have also been reported to be associated with tooth agenesis, including small tooth size (6), peg-shaped upper lateral incisor (7-9), taurodontism (7, 10, 11), dental transposition (12, 13) and double formation (14-16).

The etiology of dental anomalies remains largely unclear. Some investigations have already shown that different phenotypic forms of tooth agenesis are probably caused by different genes (3, 17-20). The identification of specific patterns of associated dental anomalies would allow testing the hypothesis that certain genetic and environmental factors contribute to distinct dental anomaly subphenotypes. Therefore, the aim of this study was to investigate if specific patterns of tooth agenesis are associated with other dental anomalies to define dental anomaly subphenotypes that may aid future genetic studies of these craniofacial abnormalities.

## **METHODS**

Clinical records and orthopantomograms from 1198 patients treated at the Federal University of Rio de Janeiro's Continuing Education Clinical Program in

Pediatric Dentistry were examined. Patients' records were from January 1999 to July 2007. Subjects' ages varied from 6 to 12 years old (the average age was 8.9 years with a standard deviation of 1.7 years).

This study protocol was approved by the Federal University of Rio de Janeiro's institutional review board and his/her guardians that signed a detailed informed consent document. All radiographs were examined by the same professional using the same protocol (21).

Cases with radiographs of poor quality were excluded. No cases were found to have an underlying syndrome or cleft lip and palate.

### **Determination of dental Anomalies**

For tooth agenesis (excluding third molars), microdontia, peg-shaped teeth, supernumerary teeth, taurodontism, and dental transposition, the inclusion criterion was that at least one permanent tooth was affected.

For ankylosis and double formation (gemination or fusion), the inclusion criterion was that at least one primary tooth was affected.

### **Diagnostic criteria**

All cases were clearly evident from the orthopantomograms alone. Tooth agenesis was defined based on the age of the subjects and when initial tooth formation should be visible in the radiographs [according to this criterion, second premolar agenesis was only considered in cases older than 8 years of age] (22). Taurodontism was assessed in first and second molars (multiradicular teeth) and was defined by the apical enlargement of the pulpar chamber (23). Peg-shaped upper lateral incisors were registered when the incisal mesio-distal width of the tooth crown was narrower than the cervical (9). Double-formation (gemination/fusion) was

registered when there was an incomplete division of a tooth or a union between two separately developed normal teeth (24). Ankylosis was diagnosed if a tooth showed infra-occlusion of at least one millimeter (7).

The data was subsequently processed and analyzed using the Epi Info3.3.2 statistical software package. Odds ratio calculations and chi-square or Fisher's exact tests at a level of significance of 0.05 were used to determine if any dental anomalies were preferentially associated with tooth agenesis.

## RESULTS

From the 1198 orthopantomograms, 31 were excluded due to poor quality; therefore 1167 radiographs were available for the study.

Fifty-six (4.8%) subjects presented tooth agenesis. Thirty-one were females and 25 were males defining the ratio female:male at 1.24 to 1. No statistically significant differences in the frequency of tooth agenesis based on gender were found ( $p = 0.43$ ).

In the 56 subjects with tooth agenesis, one had seven congenitally missing teeth, four had four congenitally missing teeth, five had three missing teeth, 15 had two missing teeth and the remaining 31 subjects just had one missing tooth. The mean number of congenitally missing teeth was 1.7 (standard deviation=1.16).

Nineteen subjects had maxillary missing teeth, 28 subjects had mandibular missing teeth, and nine subjects had tooth agenesis in both arches ( $p=0.1$ ).

The most commonly absent teeth was the lower second premolar, followed by the upper second premolar (Table 1).

Thirty-three subjects had only premolar agenesis, with 17 having two or more premolars missing. The mean number of missing premolars in these cases was 1.7 (standard deviation=1.3).

### **Distribution of tooth agenesis based on gender**

No statistically significant differences in the frequency of tooth agenesis based on gender and arch (upper versus lower;  $p=0.6$ ) was found. Also, the distribution of tooth agenesis based on gender and number of missing teeth ( $p=0.9$ ) was not statistically different. The frequency of types of teeth affected by agenesis based on gender is described in Table 1.

The differences between subjects with unilateral and bilateral missing teeth based on the type of teeth were demonstrated in Table 2.

No differences in the frequency of tooth agenesis based on side (right and left) were found ( $p=0.6$ ).

The male-to-female ratio of incisor agenesis was 1.4:1, however the upper lateral incisors ratio was 2:1, whereas the lower incisors ratio was 1:1. On the other hand, the male-to-female ratio of premolar agenesis was 0.5:1, with the upper second premolar ratio as 0.3:1 and the lower second premolar ratio 0.5:1.

### **Tooth agenesis association with other dental anomalies**

One hundred thirty-nine (11.9%) subjects presented at least one developmental dental anomaly. The most commonly was tooth agenesis, followed by taurodontism (Table 3).

Tooth agenesis increased the risk of ankylosis of primary molars and double formation of primary incisors. Cases with premolar agenesis had an increased risk to have an ankylosed primary molar (OR= 13.4; 95% C.I. 2.7-59.7). Maxillary dental

transposition was observed in a subject with upper lateral incisor and premolar agenesis. Double formation was present in a case with lower incisor agenesis.

In contrast, in the group without tooth agenesis, supernumerary teeth were observed in 27 subjects (16 males and 11 females  $p=0.3$ ). Subjects with supernumerary teeth did not present concomitant tooth agenesis and this result suggests tooth agenesis is not associated with supernumerary teeth.

There were no statistically significant differences between the groups when other dental anomalies such as taurodontism and microdontia were observed.

Taurodontism affected 51 subjects (28 males and 23 females  $p=0.5$ ). In the tooth agenesis group taurodontism was present in one subject with severe tooth agenesis (seven missing teeth) and two subjects with one and two missing teeth.

Thirteen subjects, seven males and six females presented small upper lateral incisors. There were fifteen microdontic teeth and five peg-shaped teeth. Unilateral upper lateral agenesis did not increase the risk of having the contralateral tooth affected by microdontia or peg-shaped.

## **DISCUSSION**

The reported frequency of tooth agenesis depends on the population studied. There is great variation in the literature depending on ethnic groups; in Africans and Australian Aborigines the prevalence is 1%, but it is thirty times higher in Japanese (25). The frequency of tooth agenesis in our study population was 4.8%, which is similar to previous reports in other populations (1, 7, 15, 26). Although there is some conflict in the literature, our study agrees with the majority of the reports that describe lower second premolars as the most commonly missing tooth, excluding third molars

(27, 28). Absence of maxillary central incisors, maxillary and mandibular first molars and canines were very rare in our study, confirming previously reported data(1, 29, 30).

Some multifactorial conditions show gender prevalence discrepancies. Cleft lip is more common in males, and cleft palate is more common in females (31). This gender preference in tooth agenesis has also been reported and higher incidences were found in females (1, 9, 15, 26, 32, 33). However, very few reports associated gender with types of missing teeth (9, 15). In our study we found differences in the male:female ratios never previously reported: 2:1 for agenesis of upper maxillary lateral incisors and 0.5:1 for agenesis of premolars. Bilateral second premolar agenesis was more common in males whereas unilateral lower second premolar agenesis was more common in females. These asymmetric forms of tooth agenesis can be a consequence of environmental and/or genetic factors. Our results may be interpreted as if there are specific genetic factors that contribute to laterality of tooth agenesis and they may be differentially expressed depending on the gender.

The differences in sex ratios depending on the specific tooth type affected raises interesting possibilities. It has been proposed that a number of families with cases of dental anomalies cannot be accounted for by simple Mendelian models(3, 34-37), but can be explained in terms of a continuous variable, "liability," with a threshold value beyond which individuals will be affected. This system is called multifactorial because both genetics and environmental factors determine liability. Based on this concept, we can derive two possibilities: the same genetic model has different thresholds for males and females, or each gender is influenced by an independent genetic model, each having its own threshold (Figure 1). To test this hypothesis, study designs should take into consideration recurrence risks within

families. If the correct model is one genetic factor with two different thresholds, one for each gender, families with one affected individual of the least commonly affected gender will have a higher recurrence risk compared to families with affected individuals of the gender more commonly affected. On the other hand, if two independent genetic models contribute to the occurrence of the defect in each gender, recurrence risks should be similar independent of the gender.

Individuals with tooth agenesis presented a higher risk of having double formations and ankylosis of primary molars. Dental transposition has been associated with several dental anomalies including tooth agenesis (12, 13). The only case found in our study was associated with incisor and premolar agenesis. Although it is generally accepted that upper lateral incisor agenesis is commonly associated to a reduction in the contralateral tooth size (7, 32, 38, 39), we did not find such association in our study population.

We did not find association between tooth agenesis and taurodontism. However the studies that reported this association indicate it is more likely in cases of oligodontia (six or more congenitally absent teeth) (10, 11, 39). The most severe case we found had seven missing teeth and was associated with taurodontism.

There were no observations of concomitant tooth agenesis and supernumerary teeth, and indeed this is a very rare association in the general population (40). Interestingly, this association is more common in subjects with cleft lip and palate (5, 41).

Our results demonstrated that the disturbances in dental development were twice more common in patients with tooth agenesis than in patients without tooth agenesis. This observation may suggest there is a common genetic background for tooth agenesis and a subset of these developmental anomalies.



**REFERENCES:**

1. Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, Stirrups DR. Hypodontia--a retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence Int.* 2005;**36**:263-70.
2. Lidral AC, Reising BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res.* 2002;**81**:274-8.
3. Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res.* 2003;**82**:162-5.
4. Larson M, Hellquist R, Jakobsson OP. Dental abnormalities and ectopic eruption in patients with isolated cleft palate. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1998;**32**:203-12.
5. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res.* 2007;**86**:986-91.
6. Goldenberg M, Das P, Messersmith M, Stockton DW, Patel PI, D'Souza RN. Clinical, radiographic, and genetic evaluation of a novel form of autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res.* 2000;**79**:1469-75.
7. Lai PY, Seow WK. A controlled study of the association of various dental anomalies with hypodontia of permanent teeth. *Pediatr Dent.* 1989;**11**:291-6.
8. Arte S, Nieminen P, Apajalahti S, Haavikko K, Thesleff I, Pirinen S. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. *J Dent Res.* 2001;**80**:1445-50.
9. Backman B, Wahlin YB. Variations in number and morphology of permanent teeth in 7-year-old Swedish children. *Int J Paediatr Dent.* 2001;**11**:11-7.
10. Seow WK, Lai PY. Association of taurodontism with hypodontia: a controlled study. *Pediatr Dent.* 1989;**11**:214-9.
11. Schalk-van der Weide Y, Steen WH, Bosman F. Taurodontism and length of teeth in patients with oligodontia. *J Oral Rehabil.* 1993;**20**:401-12.
12. Peck S, Peck L, Kataja M. Concomitant occurrence of canine malposition and tooth agenesis: evidence of orofacial genetic fields. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;**122**:657-60.
13. Ely NJ, Sherriff M, Cobourne MT. Dental transposition as a disorder of genetic origin. *Eur J Orthod.* 2006;**28**:145-51.
14. Razak IA, Nik-Hussein NN. A retrospective study of double teeth in the primary dentition. *Ann Acad Med Singapore.* 1986;**15**:393-6.
15. Altug-Atac AT, Erdem D. Prevalence and distribution of dental anomalies in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;**131**:510-4.

16. Whittington BR, Durward CS. Survey of anomalies in primary teeth and their correlation with the permanent dentition. *N Z Dent J.* 1996;**92**:4-8.
17. Nieminen P, Arte S, Pirinen S, Peltonen L, Thesleff I. Gene defect in hypodontia: exclusion of MSX1 and MSX2 as candidate genes. *Hum Genet.* 1995;**96**:305-8.
18. Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000;**117**:650-6.
19. Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A.* 2007;**143**:538-45.
20. Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res.* 2004;**83**:723-7.
21. KÜchler ECR, P.A.; Costa, M.C; Modesto, A; Vieira, A.R. Assessing the proposed association between tooth agenesis and taurodontism in 975 paediatric subjects. *International Journal of Paediatric Dentistry.* 2007;in press.
22. Moyers RE. Desenvolvimento da dentição e da oclusão. In: Moyers, RE. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p.87-105.
23. Durr DP, Campos CA, Ayers CS. Clinical significance of taurodontism. *J Am Dent Assoc.* 1980 Mar;**100**:378-81.
24. Neville BWD, Allen CM, Bouquot JE. Alterações de desenvolvimento dos dentes. In: *Patologia oral & Maxilofacial.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. p.59-64.
25. Nunn JH, Carter NE, Gillgrass TJ, Hobson RS, Jepson NJ, Meechan JG, et al. The interdisciplinary management of hypodontia: background and role of paediatric dentistry. *Br Dent J.* 2003 8;**194**:245-51.
26. Graber LW. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns. *J Am Dent Assoc.* 1978;**96**:266-75.
27. Symons AL, Stritzel F, Stamation J. Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisor and second premolar. *J Clin Pediatr Dent.* 1993;**17**:109-11.
28. Stritzel F, Symons AL, Gage JP. Agenesis of the second premolar in males and females: distribution, number and sites affected. *J Clin Pediatr Dent.* 1990;**15**:39-41.
29. Dhanrajani PJ. Hypodontia: etiology, clinical features, and management. *Quintessence Int.* 2002;**33**:294-302.
30. Kirzioglu Z, Koseler Sentut T, Ozay Erturk MS, Karayilmaz H. Clinical features of hypodontia and associated dental anomalies: a retrospective study. *Oral Dis.* 2005;**11**:399-404.

31. Carinci F, Rullo R, Laino G, Festa V, Mazzarella N, Morano D, et al. Orofacial cleft in Southern Italy. *Minerva Stomatol.* 2003;**52**:427-31.
32. Brook AH. A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size. *Arch Oral Biol.* 1984;**29**:373-8.
33. Zhu JF, Marcushamer M, King DL, Henry RJ. Supernumerary and congenitally absent teeth: a literature review. *J Clin Pediatr Dent.* 1996;**20**:87-95.
34. Peck L, Peck S, Attia Y. Maxillary canine-first premolar transposition, associated dental anomalies and genetic basis. *Angle Orthod.* 1993;**63**:99-109.
35. Peck S, Peck L, Kataja M. The palatally displaced canine as a dental anomaly of genetic origin. *Angle Orthod.* 1994;**64**:249-56.
36. Bishara SE. Clinical management of impacted maxillary canines. *Semin Orthod.* 1998;**4**:87-98.
37. Segura JJ, Hattab F, Rios V. Maxillary canine transpositions in two brothers and one sister: associated dental anomalies and genetic basis. *ASDC J Dent Child.* 2002;**69**:54-8, 12.
38. Alvesalo LP, P. . The inheritance pattern of missing, peg-shaped and strongly mesio-distally reduced upper lateral incisors. *Acta Odontol Scand.* 1969;**27**:563-75.
39. Lyngstadaas SP, Nordbo H, Gedde-Dahl T, Jr., Thrane PS. On the genetics of hypodontia and microdontia: synergism or allelism of major genes in a family with six affected members. *J Med Genet.* 1996;**33**:137-42.
40. Bateman G, Mossey PA. Ectopia or concomitant hypohyperdontia? A case report. *J Orthod.* 2006;**33**:71-7.
41. Ranta R. Numeric anomalies of teeth in concomitant hypodontia and hyperdontia. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1988;**8**:245-51.

**Table 1.** Frequency of teeth type affected by agenesis.

Teeth	Males	Females	Total	<i>p</i> - value*
MAXILLA				
Lateral incisor	11	8	<b>19</b>	0.3
First premolar	2	2	<b>4</b>	1.0
Second premolar	6	16	<b>22</b>	0.0025
Canine	1	1	<b>2</b>	1.0
MANDIBLE				
Central incisor	3	2	<b>5</b>	0.5
Lateral incisor	2	3	<b>5</b>	0.5
First premolar	2	-	<b>2</b>	0.4
Second premolar	15	23	<b>38</b>	0.06
Canine	-	2	<b>2</b>	0.4
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>57</b>	<b>99</b>	

\* *p*-values indicate difference between males and females.

**Table 2.** Frequency of subjects with unilateral and bilateral agenesis based on the type of teeth and gender.

	Teeth	Males		Females		Total	
		Unilateral	Bilateral	Unilateral	Bilateral	Unilateral	Bilateral
<b>Maxilla</b>	Lateral incisor	5	3	2	2	7	5
	First premolar	1	1	-	1	1	2
	Second premolar	1	2	4	6	5	8
	Canine	1	-	1	-	2	-
<b>Mandible</b>	Central incisor	3	-	1	-	4	-
	Lateral incisor	-	2	3	1	3	3
	First premolar	-	2	-	1	-	3
	Second premolar	3*	6*	11*	6*	14	12
	Canine	-	-	-	1	-	1
	<b>Total</b>	14	16	22	18	36	34

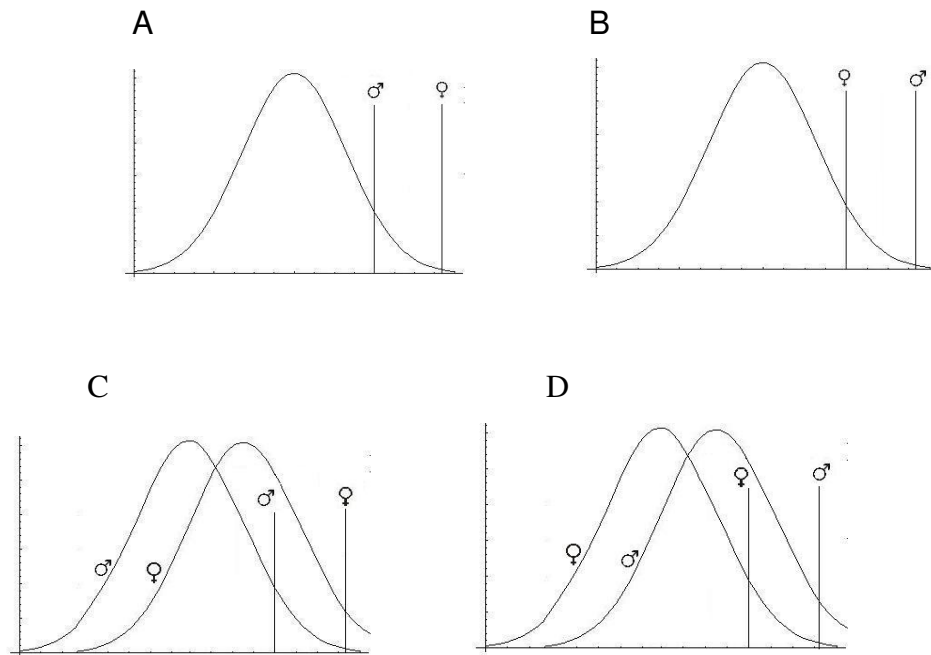
\*statistical significance p=0.002

**Table 3.** Frequency of dental anomaly in the group with tooth agenesis and without tooth agenesis.

Dental Anomaly	Tooth agenesis		Total N=1167	OR (95%C.I.)*
	Yes (n=56)	No (n=1111)		
Small lateral incisor	1	12	13	1.66 (0.21-13.04)
Taurodontism	3	48	51	1.25 (0.38-4.16)
Supernumerary	-	27	27	-
Transposition	1	-	1	-
Ankylosis	3	8	11	7.8 (2.01-30.26)
Double formations	1	1	2	20.18 (1.25-326.96)
Total	9	96	105	2.02 (0.96-4.26)

Note: OR (95% C.I.) = Odds ratios; 95% confidence intervals.

**Figure 1:** Proposed models for gender differences in frequency. The same genetic model has different thresholds for males and females (A and B), or each gender is influenced by an independent genetic model, each having its own threshold (C and D). X axis = number of individuals in the population; Y axis = liability; vertical lines = threshold for each gender.



### 4.3 Artigo 3

#### ***MMP1 and MMP20 May Contribute to Tooth Agenesis in Humans***

Erika C. K uchler <sup>1</sup>; Renato Menezes <sup>2</sup>; Nicholas Callahan <sup>2</sup>; Marcelo C. Costa <sup>1</sup>;  
Adriana Modesto <sup>3</sup>; Raquel Meira <sup>5</sup>; Asli Patir <sup>6</sup>; Figen Seymen <sup>6</sup>; Alexandre R.  
Vieira<sup>2, 3, 4</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>2</sup>Department of Oral Biology and Center for Craniofacial and Dental Genetics; <sup>3</sup>Department of Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, and <sup>4</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA; <sup>5</sup>Department of Pediatric Dentistry, Brazilian Lutheran University, Canoas, RS, Brazil; <sup>6</sup>Department of Pedodontics, Istanbul University, Istanbul, Turkey.



## ABSTRACT

Tooth agenesis is classified as a clinically and genetically heterogeneous dental anomaly. It is proposed that variation in genes that are critical for tooth formation contributes to the phenotype. *Matrix metalloproteinases (MMPs)* are potential candidate genes for dental alterations based on expression and the roles they play during embryogenesis. This is the first report to investigate the possible association between *MMP1*, *MMP3* and *MMP20* and human tooth agenesis. We analyzed 167 nuclear families (father-mother-affected child) from two different populations, 116 were from Brazil and 51 were from Turkey. Proband had at least one missing tooth, excluding third molars. DNA samples were obtained from whole blood or saliva samples and genotyping was performed by TaqMan assays. Association between tooth agenesis and *MMP1* ( $p=0.007$ ) and *MMP20* ( $p=0.03$ ) was found in families of Brazilian origin. In the total dataset, *MMP20* continued to be associated with tooth agenesis ( $p=0.01$ ). Our findings provide evidence that *MMP1* and *MMP20* may play a role in isolated human tooth agenesis.

**Key words:** tooth agenesis, dental anomalies, matrix metalloproteinases

Será submetido à **Revista Euro Journal Oral Sci**

## INTRODUCTION

Tooth agenesis, which is defined as congenital absence of one or more teeth, is the most common human developmental anomaly (1). The incidence varies with tooth class. Reports on the overall prevalence of missing permanent teeth vary substantially from 2.6% to 11.3% (2-4), excluding third molars that are absent in 20% of the general population(5). Tooth agenesis can occur in association with other genetic diseases or as an independent trait. Non-syndromic tooth agenesis shows wide phenotypic heterogeneity and is classified as sporadic or familial (6-9).

Evidence supporting a genetic etiology for tooth agenesis is well established and genes implicated in epithelial–mesenchymal interactions serve as potential candidates. To date, severe forms of tooth agenesis (oligodontia) have been linked to mutations or deletions in *MSX1*(10-14), *PAX9* (15-26) and *AXIN2*(27). In most of these families, tooth agenesis is segregating in an autosomal dominant fashion. However, the origin of the most common forms of tooth agenesis (hypodontia) remains largely unknown.

Animal models, have contributed to the understanding of tooth development (28) and dental alterations. Molecular studies of odontogenesis, using the mouse tooth as a model system, have indicated that tooth formation is regulated by interactions between epithelial and mesenchymal cells and requires protein products of a number of genes. Mutations in several of these genes can cause an alteration in tooth development (7, 8). In mice, matrix metalloproteinases (MMPs) are expressed in craniofacial structures, suggesting that the expression of these genes is critical for the early craniofacial development and development of the dentition (29). MMPs constitute an important family of zinc-dependent endopeptidases, which are able to degrade components of extracellular matrix (ECM)(30). ECM plays an important in mechanisms involved in tissue interactions that regulate tooth development (31).

The aim of the present work was to investigate if genetic variation in *MMP1*, *MMP3* and *MMP20* is associated with isolated human tooth agenesis.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was approved by the University of Pittsburgh Institutional Review Board (IRB), as well as the appropriate Ethical Committee at the Federal University

of Rio de Janeiro and Istanbul University, and appropriate informed consent was obtained from each family member.

The study group consisted of 167 nuclear families (father-mother-affected child) whose proband presented with at least one permanent tooth congenitally absent, with the exception of third molars. The patients were from two different populations, 116 were from Brazil, which is an admixed population of Europeans and Africans, with a very small percentage of Native South Americans. The second populations consisted of 51 trios from Turkey.

None of the families reported history for clefts and dental alterations were the sole disorder affecting these patients. Information regarding family history for tooth agenesis was obtained and positive family history was defined as any proband's relative with reported congenital tooth agenesis.

After informed consents were obtained, cheek swab DNA was obtained from family-trios and extracted by modifications of published protocols (32). Samples were analyzed as a Brazil population, Turkey population and combined cases.

### ***MMP1*, *MMP3* and *MMP20* SNP Genotyping**

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *MMP1*, *MMP3* and *MMP20* was carried out by real-time PCR using the Taqman method(33) in an ABI 7900 automatic instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA). Assays and reagents were supplied by Applied Biosystems. Marker information is included in Table 1.

### **Statistical Analysis**

Chi-square was used to test if the observed genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. The proband, father and mother genotypes were compared to determine the transmitted alleles vs. the nontransmitted alleles. The

FBAT software was used to detect transmission distortion (34, 35). Significance was established for alpha lower than 0.05.

## **RESULTS**

The Brazilian dataset contains 71 sporadic cases and 45 familial cases. Seventy-four were females and 42 were males. Forty-one cases presented positive family history for tooth agenesis and 16 cases were associated with others tooth developmental alterations, such as hypoplastic enamel, peg-shaped upper lateral incisors, and microdontia. The Turkish dataset consisted of 51 trios. Twenty-six were females and 25 were males. All Turkish cases were of sporadic origin. The details about these two populations are presented in Table 2.

All SNPs showed Hardy–Weinberg equilibrium in both the affected probands and unaffected individuals.

Association could be seen between tooth agenesis and MMP1 and MMP20 in families of Brazilian origin (Table 3).

## **DISCUSSION**

The etiology of developmental dental alterations is almost certainly heterogeneous, which genetic and environmental factors contribute to distinct phenotypes. Nowadays, the genetic etiology of the dental anomalies becomes more clearly defined with the discoveries of novel genes and mutations. As part of our ongoing effort to understand the molecular mechanism underlying tooth agenesis, we report here a genetic epidemiological approach to identifying genetic factors contributing to isolated human tooth agenesis. This is the first report to investigate

*MMP1*, *MMP3* and *MMP20* with human tooth agenesis. One previous report also in Brazilians did not find association between variation in *MMP9* and hypodontia (36).

MMPs are a family of proteolytic enzymes that are capable of degrading almost all extracellular matrix (ECM) proteins(37). The MMP family is composed of 23 enzymes that share significant sequence homologies. It can be classified into subfamilies: collagenases, stromelysins, gelatinases, and membrane-type MMPs, and others, including a few of the most recently identified (38, 39). The MMPs and their endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) mediated the maintenance and degradation of the ECM. It has been demonstrated that MMPs play a critical role controlling the remodelling of the ECM during development (30) and MMPs contribute to both normal and pathological tissue remodeling. Physiological roles for MMPs include cell migration, tissue remodeling during organogenesis and growth, wound healing, angiogenesis and tooth formation (29, 39, 40).

Previous studies have suggested MMPs as potential candidate genes for craniofacial alterations based on expression patterns and the roles they play in craniofacial tissues during early embryogenesis (29, 41).

*MMP1*, is also known as collagenase, is able to initiate breakdown of the interstitial collagens, types I, II, and III. Collagens are the most abundant proteins in the body means that *MMP1* is important in the remodeling events(42). During craniofacial development, *MMP1* is expressed and playing a key role in facial and early tooth development. In the bud stage, *MMP1* is expressed within both epithelial and mesenchymal cells (43). Our results provide evidence that variation in *MMP1* may contribute to tooth agenesis.

We also investigated a polymorphism in *MMP3* (stromelysin-1), but did not find evidence for association. *MMP3* was chosen for this because an association between the same *MMP3* polymorphism and cleft lip and/or palate has been previously observed (44). It has been suggested that tooth, lip, and palate development are influenced by the same genes and evidence for that comes from studies that showed an association between a cleft and tooth agenesis outside the cleft area. Patients born with oral clefts have a higher risk of presenting tooth agenesis than general population (45). Recently, *MSX1*, *TGFA* (32), *IRF6* and *FGFR1* (46), all genes that contribute to oral clefts, were associated with tooth agenesis in humans.

To date, *MMP20* (enamelysin) is known to be almost exclusively expressed by tooth-forming cells. It is well established that *MMP20* has an important role during enamel development and is involved at the cleavage and removal of most of the protein components of the extracellular enamel matrix (47, 48). *MMP20* is related to enamel alterations (49, 50). *Mmp20* knock-out mouse does not process amelogenin properly resulting in altered enamel matrix that enamel is hypoplastic and delaminates from the dentin (48). In the developing teeth, *MMP20* is expressed primarily during the secretory to late transition stages of amelogenesis and is considered a predominant enzyme for the processing of enamel matrix. Previous investigations revealed the presence of *MMP20* in ameloblasts, odontoblasts and pulp cells (47, 51). Our results suggest that variation in *MMP20* contributes to tooth agenesis. This could suggest that *MMP20* also participate in the remodeling of tooth matrices during the early phases of tooth organogenesis.

In conclusion, this is the first report to suggest a role for *MMP1* and *MMP20* in human tooth agenesis. MMPs are involved in critical processes of early tooth morphogenesis and are viable candidate genes for dental alterations. Further

investigations should focus on replicating these findings, which will warrant functional studies aiming to define the specific roles of MMPs in the development of dental alterations.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank the families that enthusiastically participated in this study. Drs. Rogério Gleiser, Mária Bárbara Guimarães, Rafael Pedro, Senda Charone, Patrícia Tannure, Raquel Pinheiro, Daniel Brito, Ana Carolina Valinoti, Tatiana Fidalgo and Marina Jesus critically revised this manuscript.

## REFERENCES

1. Burzynski ME, V. Classification and genetics of numeric anomalies of dentition. . *Birth Defects Orig Artic Ser* 1983; **19**: 95-106.
2. Kuchler EC, Risso PA, Costa MC, Modesto A , Vieira AR. Assessing the proposed association between tooth agenesis and taurodontism in 975 paediatric subjects. *Int J Paediatr Dent* 2008; **18**: 231-234.
3. Kuchler EC, Risso PA, Costa MD, Modesto A , Vieira AR. Studies of dental anomalies in a large group of school children. *Arch Oral Biol* 2008; **53**:941-6
4. Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH , Stirrups DR. Hypodontia--a retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence Int* 2005; **36**: 263-270.
5. Graber LW. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns. *J Am Dent Assoc* 1978; **96**: 266-275.
6. Arte S, Nieminen P, Apajalahti S, Haavikko K, Thesleff I , Pirinen S. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. *J Dent Res* 2001; **80**: 1445-1450.
7. Thesleff I. The genetic basis of normal and abnormal craniofacial development. *Acta Odontol Scand* 1998; **56**: 321-325.
8. Thesleff I. Genetic basis of tooth development and dental defects. *Acta Odontol Scand* 2000; **58**: 191-194.
9. Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res* 2003; **82**: 162-165.
10. Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG , Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 1996; **13**: 417-421.
11. Kim JW, Simmer JP, Lin BP , Hu JC. Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res* 2006; **85**: 267-271.
12. De Muyck S, Schollen E, Matthijs G, Verdonck A, Devriendt K , Carels C. A novel MSX1 mutation in hypodontia. *Am J Med Genet A* 2004; **128A**: 401-403.
13. Jumlongras D, Bei M, Stimson JM, Wang WF, DePalma SR, Seidman CE, Felbor U, Maas R, Seidman JG , Olsen BR. A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. *Am J Hum Genet* 2001; **69**: 67-74.
14. Lidral AC , Reising BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res* 2002; **81**: 274-278.



15. Zhao JL, Chen YX, Bao L, Xia QJ, Wu TJ , Zhou L. [Novel mutations of PAX9 gene in Chinese patients with oligodontia]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2005; **40**: 266-270.
16. Klein ML, Nieminen P, Lammi L, Niebuhr E , Kreiborg S. Novel mutation of the initiation codon of PAX9 causes oligodontia. *J Dent Res* 2005; **84**: 43-47.
17. Jumlongras D, Lin JY, Chapra A, Seidman CE, Seidman JG, Maas RL , Olsen BR. A novel missense mutation in the paired domain of PAX9 causes non-syndromic oligodontia. *Hum Genet* 2004; **114**: 242-249.
18. Mostowska A, Kobiela A, Biedziak B , Trzeciak WH. Novel mutation in the paired box sequence of PAX9 gene in a sporadic form of oligodontia. *Eur J Oral Sci* 2003; **111**: 272-276.
19. Mostowska A, Biedziak B , Trzeciak WH. A novel mutation in PAX9 causes familial form of molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 2006; **14**: 173-179.
20. Das P, Stockton DW, Bauer C, Shaffer LG, D'Souza RN, Wright T , Patel PI. Haploinsufficiency of PAX9 is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet* 2002; **110**: 371-376.
21. Das P, Hai M, Elcock C, Leal SM, Brown DT, Brook AH , Patel PI. Novel missense mutations and a 288-bp exonic insertion in PAX9 in families with autosomal dominant hypodontia. *Am J Med Genet A* 2003; **118A**: 35-42.
22. Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN , Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet* 2000; **24**: 18-19.
- Frazier-Bowers SA, Guo DC, Cavender A, Xue L, Evans B, King T, Milewicz D , 23. D'Souza RN. A novel mutation in human PAX9 causes molar oligodontia. *J Dent Res* 2002; **81**: 129-133.
24. Nieminen P, Arte S, Tanner D, Paulin L, Alaluusua S, Thesleff I , Pirinen S. Identification of a nonsense mutation in the PAX9 gene in molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 743-746.
25. Lammi L, Halonen K, Pirinen S, Thesleff I, Arte S , Nieminen P. A missense mutation in PAX9 in a family with distinct phenotype of oligodontia. *Eur J Hum Genet* 2003; **11**: 866-871.
26. Hansen L, Kreiborg S, Jarlov H, Niebuhr E , Eiberg H. A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with marked variability in number of missing teeth. *Eur J Oral Sci* 2007; **115**: 330-333.
27. Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S , Nieminen P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 2004; **74**: 1043-1050.
28. Gene expression in tooth. <http://bite-it.helsinki.fi/>, 2008.

29. Iamaroon A, Wallon UM, Overall CM, Diewert VM. Expression of 72-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. *Arch Oral Biol* 1996; **41**: 1109-1119.
30. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; **4**: 197-250.
31. Lesot H, Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Mitolo V, Ruch JV. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 2001; **15**: 8-13.
32. Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res* 2004; **83**: 723-727.
33. Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, Pesich R, Hebert J, Chen YD, Dzau VJ, Curb D, Olshen R, Risch N, Cox DR, Botstein D. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 2001; **11**: 1262-1268.
34. Thomson G. HLA disease associations: models for insulin dependent diabetes mellitus and the study of complex human genetic disorders. *Annu Rev Genet* 1988; **22**: 31-50.
35. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993; **52**: 506-516.
36. Peres RC, Line SR. Analysis of MMP-9 and TIMP-2 gene promoter polymorphisms in individuals with hypodontia. *Braz Dent J* 2005; **16**: 231-236.
37. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007; **65**: 1-13.
38. Nagase HB, A. J.; Woessner, J. F., Jr. : , . Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992: 421-424.
39. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; **69**: 562-573.
40. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; **92**: 827-839.
41. Morris-Wiman J, Burch H, Basco E. Temporospatial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 2000; **202**: 129-141.
42. Brinckerhoff CE, Ruby PL, Austin SD, Fini ME, White HD. Molecular cloning of human synovial cell collagenase and selection of a single gene from genomic DNA. *J Clin Invest* 1987; **79**: 542-546.

43. Randall LE , Hall RC. Temperospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9 during early tooth development. *Connect Tissue Res* 2002; **43**: 205-211.
44. Letra A, Silva RA, Menezes R, Astolfi CM, Shinohara A, de Souza AP , Granjeiro JM. MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: Association with MMP3 but not MMP1. *Arch Oral Biol* 2007.
45. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM , Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res* 2007; **86**: 986-991.
46. Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC , Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A* 2007; **143**: 538-545.
47. Caterina J, Shi J, Sun X, Qian Q, Yamada S, Liu Y, Krakora S, Bartlett JD, Yamada Y, Engler JA, Birkedal-Hansen H , Simmer JP. Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin. *J Dent Res* 2000; **79**: 1697-1703.
48. 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; **277**: 49598-49604.
49. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH , Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res* 2004; **83**: 909-913.
50. Stephanopoulos G, Garefalaki ME , Lyroudia K. Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 2005; **84**: 1117-1126.
51. Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee SK, Ryu OH, Murakami C, Wakida K, Simmer JP, Yamada Y , Bartlett JD. Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res* 1998; **77**: 1580-1588.

**Table 1.** Details on the genetic markers studied.

<i>Gene</i>	<i>Location in the gene</i> <sup>1</sup>	<i>SNP</i>	<i>Flanking sequence</i> <sup>2</sup>	<b>Locus</b>
MMP1	Intron 2	rs470747	ATTTTCTGTAATGA[C/T]TTTCAGAGTGCAC	11q22-q23
MMP3	Near 5'UTR	rs3025058	GGACAAGACATGG[-/T]TTTTTCCCCCATC <sup>3</sup>	11q23
MMP20	Intron 1	rs1784418	GCTATCCTTTCTGT[A/G]GGCACAGTCCTTT	11q22.3-q23

Notes: <sup>1</sup>Locations obtained from the UCSC Genome Browser on Human Mar. 2006 Assembly (<http://genome.ucsc.edu>); <sup>2</sup>Flanking sequences obtained from ENTREZ SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>); <sup>3</sup>Alleles are commonly designated as 5A and 6A in the literature.

**Table 2:** Aspects of the study populations.

Population Characteristic	Brazilian n (%)	Turkish n (%)	Combined n (%)
<u>Gender</u>			
Males	42 (36)	24 (47)	<b>66(39.6)</b>
Females	74 (64)	27 (53)	<b>101(60.4)</b>
<u>Number of missing teeth</u>			
1	44 (38)	7 (14)	<b>51(30.6)</b>
2	46 (40)	17 (33)	<b>63(37.7)</b>
3 or more	26 (22)	27 (53)	<b>53(31.7)</b>
<u>Type of teeth affected</u>			
Second premolar	104 (37.9)	75 (36.2)	<b>179(37.3)</b>
Lateral incisor	82 (29.9)	54 (26)	<b>136(28.3)</b>
First premolar	26 (9.7)	8 (3.8)	<b>34(7)</b>
Second molar	24 (8.7)	11 (5.3)	<b>35(7.2)</b>
Central incisor	16 (5.8)	32 (15.4)	<b>48(10)</b>
First molar	11 (4)	9 (4.3)	<b>20(4.2)</b>
Canines	11 (4)	18 (8.6)	<b>29(6.0)</b>
<u>Associated dental anomalies</u>			
Associated dental anomalies	16 (13.8)	–	<b>16(9.5)</b>
Positive family history	41 (35.3)	–	<b>41(24.5)</b>

**Table 3:** Summary of FBAT association results.

Gene	SNP	Allel e	Brazil			Turkey			Combined		
			S	E(S)	p- value	S	E(S)	p- value	S	E(S)	p- value
MMP1	rs470747	C	21.0	16.5	0.00	18.0	18.5	0.82	40.0	36.5	0.22
		T	1.0	5.5		16.0	15.0		18.0	21.5	
MMP3	rs302505	5A	66.0	71.5	0.28	31.0	27.5	0.26	97.0	36.0	0.78
		6A	104.0	98.5		33.0	36.5		135.	36.0	
MMP20	rs178441	A	63.0	73.5	0.03	20.0	23.8	0.17	86.0	100.	0.01
		G	73.0	62.5		30.0	26.1		104.	89.5	
	8					7		0			

Notes: FBAT output variables: S=test statistic (i.e., genotypic distribution in the offspring conditioned on affection status and parental genotypes); E(S)=expected value for S.

## 5. DISCUSSÃO

Dentre as alterações do desenvolvimento dentário, a ausência congênita é a mais comumente encontrada e sua denominação é variada. Agenesia dentária (AD) é o termo mais informal, pois aborda a falha no desenvolvimento dentário (Vastardis, 2000). O termo hipodontia refere-se a uma anomalia caracterizada pela ausência congênita no arco dentário de um ou poucos dentes decíduos ou permanentes. A hipodontia grave também é chamada de oligodontia, e indica a falta de seis ou mais dentes (excluindo os terceiros molares) (Shafer, 1983). A anodontia é caracterizada pela ausência total de dentes, podendo envolver tanto a dentição decídua quanto a permanente, sendo uma condição rara na população geral e freqüentemente está relacionada a uma síndrome (Moyers, 1991).

O diagnóstico da AD é dependente da anamnese e dos exames clínico e radiográfico realizados com acuidade pelo cirurgião-dentista. Além disso, no diagnóstico precoce da AD, o uso de radiografias panorâmicas tornou-se imprescindível, uma vez que em outras tomadas radiográficas, tal anomalia poderia passar despercebida (Costa, 2005).

A prevalência da AD na população em geral apresenta uma grande variação. Na dentição decídua, a prevalência varia de 0,5 a 1% e a sua ocorrência é mais freqüente na região dos incisivos e na maxila (Jarvinen, 1981). No presente estudo, a prevalência de AD não foi avaliada na dentição decídua, pois as crianças incluídas apresentavam entre 6 e 12 anos de idade na época em que o exame radiográfico foi realizado. Nesta faixa etária, há um predomínio da dentição mista, impossibilitando o diagnóstico de AD em dentes decíduos.

Na dentição permanente, a freqüência desta anomalia varia de 1,6 a 11,3% (Larmour, Mossey *et al.*, 2005). Neste estudo, a prevalência encontrada foi similar a outros estudos (Graber, 1978; Lai e Seow, 1989; Larmour, Mossey *et al.*, 2005; Altug-Atac e Erdem, 2007). Tal variação observada entre os estudos pode ser atribuída a alguns fatores, como: diferentes metodologias empregadas no diagnóstico de AD e diversidade étnica dos grupos estudados. Neste estudo o diagnóstico de AD foi realizado por radiografias panorâmicas associadas a prontuários completamente preenchidos, o que assegurou a precisão no diagnóstico de anomalias do desenvolvimento dentário.

Discordâncias são observadas quanto ao grupo dentário e arco mais afetado. De forma geral, quando somente um ou poucos dentes estão ausentes congenitamente, há uma tendência a ausência do dente mais a distal de cada grupo dentário. Os terceiros molares são os dentes mais ausentes na população, no entanto o segundo dente mais afetado gera controvérsias. Alguns autores abordam que os incisivos laterais superiores são os dentes mais acometidos (Zhu, Crevoisier *et al.*, 1996; Silva Meza, 2003), enquanto outros descrevem os segundos pré-molares. Nossos resultados corroboram com a segunda hipótese, onde os estudos apresentam uma freqüência relativa de 2,2 a 4,1% (Stritzel, Symons *et al.*, 1990; Symons, Stritzel *et al.*, 1993). Assim como neste estudo, AD de incisivos centrais superiores e primeiros molares são considerados casos raros na população em geral (Dhanrajani, 2002; Larmour, Mossey *et al.*, 2005).

Quanto ao arco dentário mais afetado, foi observada uma predominância pela mandíbula, o que está de acordo com o achados de outros autores (Stritzel, Symons *et al.*, 1990; Symons, Stritzel *et al.*, 1993).



A análise de associações entre algumas alterações do desenvolvimento dentário e os subtipos de AD, é de interesse para a identificação de alguns subfenótipos. A AD isolada pode estar associada a outras alterações dentárias, tais como: microdontia, dentes com forma conóide (Brook, 1984; Seow e Lai, 1989; Lyngstadaas, Nordbo *et al.*, 1996; Kotsomitis e Freer, 1997), distúrbios de espaço, erupção ectópica de dentes permanentes (Zhu, Crevoisier *et al.*, 1996), infra-oclusão de molares decíduos (Zhu, Crevoisier *et al.*, 1996; Kotsomitis e Freer, 1997), apinhamento dentário, atraso na formação e erupção dos dentes permanentes (Burzynski, 1983), hipoplasia do primeiro molar permanente (Suarez, 1974), taurodontismo (Seow e Lai, 1989; Lyngstadaas, Nordbo *et al.*, 1996), transposição de caninos com pré-molares (Peck, Peck *et al.*, 1993; Peck, Peck *et al.*, 2002; Ely, Sherriff *et al.*, 2006), geminação e fusão dos elementos decíduos antecessores (Razak e Nik-Hussein, 1986; Barac-Furtinovic e Skrinjaric, 1991; Kotsomitis e Freer, 1997) e atraso na formação, calcificação e erupção dos demais elementos dentários de pacientes portadores de AD (Burzynski, 1983).

Alguns autores indicam uma relação entre as alterações do desenvolvimento na dentição decídua e na dentição permanente. Quando há AD de dentes decíduos, ocorre também AD na dentição permanente. Tal alteração é explicada pelo fato de que o germe dentário do dente permanente se forma à partir do germe dentário do dente decíduo (Razak e Nik-Hussein, 1986; Barac-Furtinovic e Skrinjaric, 1991). Nos molares decíduos sem sucessores permanentes possuem uma tendência à anquilose, e estes dentes normalmente apresentam-se clinicamente em infra-oclusão. Nestes casos os dentes decíduos, em geral, apresentam retenção prolongada na arcada dentária e a rizólise encontra-se retardada quando comparada aos demais dentes decíduos (Symons, Stritzel *et al.*, 1993). Nossos resultados

corroboram com esses achados, uma vez que a ausência congênita de pré-molares demonstrou estar associada com a infra-oclusão de molares decíduos.

Assim como neste estudo, foi observado anteriormente que no caso de geminação/fusão dos dentes decíduos, há uma ocorrência de ausência congênita dos sucessores permanentes em aproximadamente 50% dos casos (Razak e Nik-Hussein, 1986; Barac-Furtinovic e Skrinjaric, 1991).

Foi observada uma associação entre transposição de canino com pré-molar superior e ausência de incisivo lateral e pré-molar superior. Outros estudos além de associarem a transposição dentária com AD, também associaram com outras alterações do desenvolvimento, como dentes supranumerários, microdontia (Peck, Peck *et al.*, 2002; Ely, Sherriff *et al.*, 2006) e fissura lábio-palatina (Letra, Menezes *et al.*, 2007).

Já está bem estabelecido na literatura, que existe uma associação entre a ausência congênita dos incisivos lateral superiores e a redução do tamanho méso-distal do contralateral. Essa redução seria uma expressão variável da AD e poderia se expressar clinicamente com microdontia ou dentes conóides (Alvesalo, 1969; Brook, 1984; Lai e Seow, 1989; Lyngstadaas, Nordbo *et al.*, 1996). No entanto, nesta população, tal associação não foi estatisticamente significativa. Este achado poderia ser resultado do tamanho reduzido da amostra.

Neste estudo não foi observada associação estatisticamente significativa entre AD e taurodontia de molares permanentes, divergindo de outros autores que demonstraram uma associação entre essas anomalias, na qual a prevalência de taurodontia aumentava proporcionalmente ao número de dentes ausentes congenitamente (Lai e Seow, 1989; Seow e Lai, 1989; Schalk-Van Der Weide, Steen *et al.*, 1993; Lyngstadaas, Nordbo *et al.*, 1996). Esses estudos demonstraram que

essa associação estava preferencialmente relacionada com os casos mais graves, como as oligodontias. A oligodontia é rara afetando aproximadamente 0,25% da população (Silverman e Ackerman, 1979). Neste estudo, o caso mais grave de AD apresentava sete dentes ausentes, e apresentava taurodontia concomitantemente.

Não foi observado nenhum caso de AD e dentes supranumerários concomitantemente, corroborando com a literatura em que a associação destas anomalias dentárias de número é rara na população geral, não havendo estudos que estimem essa prevalência (Bateman e Mossey, 2006).

Em resumo, os resultados deste estudo demonstram que a prevalência de alterações do desenvolvimento dentário em indivíduos com AD foi maior do que indivíduos sem AD. Estes achados sugerem que o fenótipo da AD pode ser mais complexo do que se presume, podendo apresentar diversos marcadores clínicos (baseado no desenvolvimento dentário). Estes marcadores podem ser considerados subfenótipos para agenesia dentária, e os mesmos devem ser incluídos nas análises genéticas.

As análises genéticas devem considerar que alguns traços multifatoriais apresentam predileção por algum gênero. Este fenômeno, o dimorfismo sexual, é decorrente das diferenças nas expressões de genes presentes nos cromossomos X e Y (Alvesalo, 1997). No complexo crânio-facial, tais diferenças já foram observadas nas fissuras orais (Carinci, Rullo *et al.*, 2003), no tamanho, na forma e no número de dentes (Alvesalo, 1997). As fissuras labiais são mais comuns no gênero masculino, enquanto as fissuras palatinas são mais frequentes no gênero feminino (Carinci, Rullo *et al.*, 2003). Nas anomalias dentárias de número, os dentes supranumerários afetam mais o gênero masculino (Acikgoz, Acikgoz *et al.*, 2006; Altug-Atac e Erdem, 2007) e as agenesias dentárias afetam mais o gênero feminino (Mitchell, Magna *et*

*al.*, 1996; Alvesalo, 1997; Larmour, Mossey *et al.*, 2005). No presente estudo, o gênero feminino também foi o mais afetado pela AD. No entanto, quando avaliado cada grupo dentário isoladamente, constatou-se que a ausência dos incisivos laterais superiores, afetava mais o gênero masculino, enquanto a ausência de pré-molares afetou mais o gênero feminino.

Alguns genes candidatos a AD têm sido sugeridos através de resultados de estudos biológicos em modelos animais que demonstram a expressão desse gene durante o desenvolvimento embrionário. O desenvolvimento craniofacial bem como seu mecanismo de remodelação tecidual são extremamente complexos e ainda não estão completamente esclarecidos (Iamaroon, Wallon *et al.*, 1996). Sabe-se que o remodelamento da matriz extracelular desempenha um papel fundamental na embriogênese, envolvendo inúmeros processos biológicos que atuam na formação de várias estruturas (Werb, Alexander *et al.*, 1992).

O desenvolvimento dentário é um mecanismo complexo, controlado por mecanismos genéticos diferentes. Evidências do início do desenvolvimento dentário podem ser observadas desde a sexta semana de vida intra-uterina (Mc Donald, 2001). Esse processo se inicia a partir da migração de células mesenquimais da crista neural para o interior da zona de formação dentária nos arcos maxilar e mandibular. As células mesenquimais induzem o espessamento do epitélio, formando o germe dentário (Thesleff, 1996; Mc Donald, 2001). Tal formação requer uma interação epitélio-mesênquima, no entanto, os mecanismos moleculares que a regulam essa interação ainda não estão totalmente esclarecidos.

Desta forma, alterações em um ou mais genes que regulam as interações epitélio-mesênquima, durante o desenvolvimento dentário, podem estar relacionados à AD (Lyngstadaas, Nordbo *et al.*, 1996). Neste contexto, os estudos que

demonstraram a importante atuação das MMPs na remodelação da matriz extracelular durante a formação craniofacial e dentária, suportam a hipótese de que esses são genes candidatos a AD (Iamaroon, Wallon *et al.*, 1996; Hall, Septier *et al.*, 1999; Morris-Wiman, Burch *et al.*, 2000).

As MMPs formam o maior grupo de enzimas proteolíticas que regulam a composição da matriz celular. Elas são zinco e cálcio-dependentes, isto é, utilizam o zinco para as suas atividades. Coletivamente, são capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno, a fibronectina, a laminina e os proteoglicanos (Birkedal-Hansen, Moore *et al.*, 1993; Figueredo, 2003).

A família MMP é composta por 23 enzimas extracelulares que apresentam domínios estruturais funcionais e mecanismos de ativação similares. As MMPs humanas são divididas em subgrupos de acordo com a sua homologia, baseados na sua estrutura e no seu substrato específico. Estes subgrupos incluem as collagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), as gelatinases (MMP2 e MMP9), as estromelinas (MMP3, MMP10 e MMP11) e tipo membrana (MT-MMP) entre outros que apenas recentemente foram identificadas (Nagase e 1992; Nagase, Visse *et al.*, 2006).

As MMPs são responsáveis pela degradação e remodelação da MEC e por isso são fundamentais no desenvolvimento embrionário (Figueredo, 2003; Gremlich, Nguyen *et al.*, 2007). Elas atuam removendo moléculas indesejadas e influenciando em diversas funções celulares tais como: migração e proliferação celular e modulação de moléculas biologicamente ativas (Nagase, Visse *et al.*, 2006).

A degradação e a manutenção da MEC são em parte mediadas pelas MMPs e pelo seu inibidor endógeno, a proteína inibidora tecidual de metaloproteinase (TIMP). Elas desempenham um papel fundamental na homeostase das matrizes

extracelular em adultos e controla seu remodelamento durante o desenvolvimento embrionário (Birkedal-Hansen, Moore *et al.*, 1993).

No desenvolvimento embrionário e na morfogênese, as MMPs e as TIMPs são essenciais (Mohan, Rinehart *et al.*, 1998), atuando na formação de diversas estruturas como o cérebro, o nariz, os olhos, a mandíbula, o palato (Werb, Alexander *et al.*, 1992) e os dentes (Iamaroon, Wallon *et al.*, 1996).

Em processos patológicos, as MMPs também desempenham um importante papel, a saber: a inflamação, a artrite, as doenças cardiovasculares, pulmonares e o câncer (Figueredo, 2003; Lei, Hemminki *et al.*, 2007).

Polimorfismos nos genes MMPs podem apresentar efeitos alelo-específicos sobre as atividades transcricionais, o que poderia contribuir para as diferenças entre os indivíduos (Ye, 1996). Poucos estudos foram realizados para avaliar a relação de variações nos genes MMPs com alterações do desenvolvimento craniofacial. Na literatura consultada, apenas um estudo investigou a relação entre o polimorfismo na região promotora do gene MMP9 e AD e não demonstrou associação (Peres e Line, 2005).

A MMP1, também conhecido como colagenase, é capaz de degradar o colágeno do tipo I, II e III. Como o colágeno é a proteína mais abundante do corpo humano, MMP1 desempenha um papel fundamental nos eventos de remodelação (Brinckerhoff, Ruby *et al.*, 1987). Durante o desenvolvimento dentário, a MMP1 se expressa na formação da face e nos estágios precoces do desenvolvimento dentário tanto em células epiteliais quanto em células mesenquimais (Randall e Hall, 2002). Nos resultados apresentados nesse estudo, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre MMP1 e AD em famílias brasileiras ( $p=0,007$ ).

Este achado sugere que variação em MMP1 pode estar relacionada com AD humana.

A MMP3, também conhecido como estromelina -1 é capaz de degradar proteoglicanas, fibronectinas, lamininas e colágeno do tipo IV (Sellers e Murphy, 1981). Durante o desenvolvimento embrionário, MMP3 demonstra extensa distribuição durante a formação do palato, ocorrendo na porção medial da membrana basal, no epitélio oral e no germe dentário (Morris-Wiman, Burch *et al.*, 2000), expressando-se em estágios precoces do desenvolvimento dentário (Hall, Septier *et al.*, 1999).

Um polimorfismo funcional no gene MMP3 é resultado de uma variação numa série de adenosina (A), localizadas na região promotora do gene. Onde podem existir 5 ou 6 A (os quais são denominados de Alelo 5A e Alelo 6A, respectivamente). Em estudos *in vitro*, o alelo 5A foi associado à maior expressão de MMP3 (Ye, 1996). Neste estudo, a avaliação deste polimorfismo em MMP3 não apresentou associação com AD nem nas famílias brasileiras ( $p=0,28$ ) nem nas famílias turcas ( $p=0,26$ ).

A MMP20, também conhecida como enamelin, até o momento é considerada exclusivamente expressa em células envolvidas na formação dos dentes. No entanto, também já foi detectado em tumores odontogênicos (Takata, Zhao *et al.*, 2000) e em carcinoma de língua (Vaananen, Srinivas *et al.*, 2001). A MMP20 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do esmalte dentário, degradando proteínas da matriz do esmalte (Caterina, Shi *et al.*, 2000; Caterina, Skobe *et al.*, 2002; Bartlett, Beniash *et al.*, 2004). Nos odontoblastos, MMP20 se expressa na secreção da pré-dentina, podendo também estar envolvida

na organização da matriz orgânica da dentina e posteriormente na mineralização deste tecido (Begue-Kirn, Krebsbach *et al.*, 1998).

Em modelo animal, a deleção do gene *Mmp20*, demonstrou um esmalte resultante alterado, onde o mesmo se apresentava hipoplásico e solto da dentina (Caterina, Skobe *et al.*, 2002). Em humanos, o MMP20 foi associado com alterações do desenvolvimento do esmalte, como a amelogênese imperfeita (Ozdemir, Hart *et al.*, 2005).

Neste estudo a variação em MMP20 demonstrou associação estatisticamente significativa com AD, quando apenas as famílias brasileiras foram analisadas ( $p=0,03$ ) e quando ambas as populações (brasileiros e turcos) foram analisadas simultaneamente ( $p=0,01$ ). Esse achado pode indicar que MMP20 participa do remodelamento dentário nos estágios iniciais de sua formação.

Os resultados deste estudo reforçam a natureza heterogênea e complexa da AD. Investigou-se pela primeira vez a associação entre MMP1, MMP3 e MMP20 e a AD. Como as MMPs são fundamentais no desenvolvimento craniofacial e na formação dos dentes, cabe ressaltar que futuras investigações devem ser realizadas com as variações nos genes MMPs.



## **6. CONCLUSÕES**

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. A prevalência de Agenesia Dentária na população estudada está de acordo com a variação encontrada por outros autores em outras populações.
2. A agenesia dentária foi associada a outras alterações do desenvolvimento dentário, ocorrendo uma preferência por determinadas associações (subfenótipos).
3. Os genes MMP1 e MMP20 mostraram-se associados à Agenesia Dentária na população brasileira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acikgoz, A., G. Acikgoz, *et al.* Characteristics and prevalence of non-syndrome multiple supernumerary teeth: a retrospective study. Dentomaxillofac Radiol, v.35, n.3, May, p.185-90. 2006.

Altug-Atac, A. T. e D. Erdem. Prevalence and distribution of dental anomalies in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.131, n.4, Apr, p.510-4. 2007.

Alvesalo, L. Sex chromosomes and human growth. A dental approach. Hum Genet., v.101, n.1, Nov, p.1-5. 1997.

Alvesalo, L. P., P. . The inheritance pattern of missing, peg-shaped and strongly mesio-distally reduced upper lateral incisors. Acta Odontol Scand., v.27, n.6, dec, p.563-575. 1969.

Arte, S., P. Nieminen, *et al.* Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. J Dent Res, v.80, n.5, May, p.1445-50. 2001.

Backman, B. e Y. B. Wahlin. Variations in number and morphology of permanent teeth in 7-year-old Swedish children. Int J Paediatr Dent, v.11, n.1, Jan, p.11-7. 2001.

Barac-Furtinovic, V. e I. Skrinjaric. [Double teeth in primary dentition and findings of permanent successors]. Acta Stomatol Croat, v.25, n.1, p.39-43. 1991.

Bartlett, J. D., E. Beniash, *et al.* Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. J Dent Res, v.83, n.12, Dec, p.909-13. 2004.

Bateman, G. e P. A. Mossey. Ectopia or concomitant hypohyperdontia? A case report. J Orthod, v.33, n.2, Jun, p.71-7. 2006.

Begue-Kirn, C., P. H. Krebsbach, *et al.* Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. Eur J Oral Sci, v.106, n.5, Oct, p.963-70. 1998.

Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med, v.4, n.2, p.197-250. 1993.

Brinckerhoff, C. E., P. L. Ruby, *et al.* Molecular cloning of human synovial cell collagenase and selection of a single gene from genomic DNA. J Clin Invest, v.79, n.2, Feb, p.542-6. 1987.

Brook, A. H. A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size. Arch Oral Biol, v.29, n.5, p.373-8. 1984.

Burzynski, M. E., V. Classification and genetics of numeric anomalies of dentition. . Birth Defects Orig Artic Ser, v.19, n.1, p.95-106. 1983.

Carinci, F., R. Rullo, *et al.* Orofacial cleft in Southern Italy. Minerva Stomatol, v.52, n.10, Oct, p.427-31, 432-3. 2003.

Caterina, J., J. Shi, *et al.* Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin. J Dent Res, v.79, n.9, Sep, p.1697-703. 2000.

Caterina, J. J., Z. Skobe, *et al.* Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. J Biol Chem, v.277, n.51, Dec 20, p.49598-604. 2002.

Costa, M. C. Estudo da relação de genes e agenesia dentária em uma população brasileira. Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005. 112 p.

Das, P., M. Hai, *et al.* Novel missense mutations and a 288-bp exonic insertion in PAX9 in families with autosomal dominant hypodontia. Am J Med Genet A, v.118A, n.1, Apr 1, p.35-42. 2003.

De Muynck, S., E. Schollen, *et al.* A novel MSX1 mutation in hypodontia. Am J Med Genet A, v.128A, n.4, Aug 1, p.401-3. 2004.

Dhanrajani, P. J. Hypodontia: etiology, clinical features, and management. Quintessence Int, v.33, n.4, Apr, p.294-302. 2002.

Ely, N. J., M. Sherriff, *et al.* Dental transposition as a disorder of genetic origin. Eur J Orthod, v.28, n.2, Apr, p.145-51. 2006.

Figueredo, C. M. S. C., A. F.; Tinoco, E. M. B. Níveis elevados de metaloproteinase da matriz-9 em sítios com destruição tecidual de pacientes com periodontite crônica generalizada. Rev Cien Med Biol, v.2, n.1, jan./jun, p.40-47. 2003.

Frazier-Bowers, S. A., D. C. Guo, *et al.* A novel mutation in human PAX9 causes molar oligodontia. J Dent Res, v.81, n.2, Feb, p.129-33. 2002.

Goldberg, M., D. Septier, *et al.* The dentino-enamel junction revisited. Connect Tissue Res, v.43, n.2-3, p.482-9. 2002.

Graber, L. W. Congenital absence of teeth: a review with emphasis on inheritance patterns. J Am Dent Assoc., v.96, n.2, Feb, p.266-275. 1978.

Gremlich, S., D. Nguyen, *et al.* Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. J Reprod Immunol, v.74, n.1-2, Jun, p.143-51. 2007.

Hall, R., D. Septier, *et al.* Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. Histochem J, v.31, n.12, Dec, p.761-70. 1999.

Hansen, L., S. Kreiborg, *et al.* A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with marked variability in number of missing teeth. Eur J Oral Sci, v.115, n.4, Aug, p.330-3. 2007.

Iamaroon, A., U. M. Wallon, *et al.* Expression of 72-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. Arch Oral Biol, v.41, n.12, Dec, p.1109-19. 1996.

Jarvinen, S. L., L. . Supernumerary and congenitally missing primary teeth in finish children: an epidemiologic study. Acta Odontol Scand, v.39, n.2, p.83-86. 1981.

Jumlongras, D., M. Bei, *et al.* A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. Am J Hum Genet, v.69, n.1, Jul, p.67-74. 2001.

Karsten, A. e M. Larson. The relationship between hypodontia in the second premolar region and heredity of cleft, lip and palate in children with isolated cleft palate. Swed Dent J, v.28, n.1, p.47-52. 2004.

Kim, J. W., J. P. Simmer, *et al.* Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. J Dent Res, v.85, n.3, Mar, p.267-71. 2006.

Klein, M. L., P. Nieminen, *et al.* Novel mutation of the initiation codon of PAX9 causes oligodontia. J Dent Res, v.84, n.1, Jan, p.43-7. 2005.

Kotsomitis, N. e T. J. Freer. Inherited dental anomalies and abnormalities. ASDC J Dent Child, v.64, n.6, Nov-Dec, p.405-8. 1997.

Lai, P. Y. e W. K. Seow. A controlled study of the association of various dental anomalies with hypodontia of permanent teeth. Pediatr Dent, v.11, n.4, Dec, p.291-6. 1989.

Lammi, L., S. Arte, *et al.* Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. Am J Hum Genet, v.74, n.5, May, p.1043-50. 2004.

Lammi, L., K. Halonen, *et al.* A missense mutation in PAX9 in a family with distinct phenotype of oligodontia. Eur J Hum Genet, v.11, n.11, Nov, p.866-71. 2003.

Larmour, C. J., P. A. Mossey, *et al.* Hypodontia--a retrospective review of prevalence and etiology. Part I. Quintessence Int, v.36, n.4, Apr, p.263-70. 2005.

Larson, M., R. Hellquist, *et al.* Dental abnormalities and ectopic eruption in patients with isolated cleft palate. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, v.32, n.2, Jun, p.203-12. 1998.

Lei, H., K. Hemminki, *et al.* Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinases and their inhibitors: few associations with breast cancer susceptibility and progression. Breast Cancer Res Treat, v.103, n.1, May, p.61-9. 2007.

Letra, A., R. Menezes, *et al.* Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. J Dent Res, v.86, n.10, Oct, p.986-91. 2007.

Li M, B. M., Abecasis Gr, . Efficient study designis for test of genetic association using sibship data and unrelated cases and controls. Am J Hum Genet, v.78, n.5, p.731-9. 2005.

Lidral, A. C. e B. C. Reising. The role of MSX1 in human tooth agenesis. J Dent Res, v.81, n.4, Apr, p.274-8. 2002.

Lyngstadaas, S. P., H. Nordbo, *et al.* On the genetics of hypodontia and microdontia: synergism or allelism of major genes in a family with six affected members. J Med Genet, v.33, n.2, Feb, p.137-42. 1996.

Mc Donald, R. E. A., D.R. . Desenvolvimento e morfologia dos dentes decíduos. . In: (Ed.). Odontopediatria. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Desenvolvimento e morfologia dos dentes decíduos. , p.37-42

Mitchell, P. G., H. A. Magna, *et al.* Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest, v.97, n.3, Feb 1, p.761-8. 1996.

Mohan, R., W. B. Rinehart, *et al.* Gelatinase B/lacZ transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling. J Biol Chem, v.273, n.40, Oct 2, p.25903-14. 1998.

Morris-Wiman, J., H. Burch, *et al.* Temporospacial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. Anat Embryol (Berl), v.202, n.2, Aug, p.129-41. 2000.

Mostowska, A., B. Biedziak, *et al.* A novel mutation in PAX9 causes familial form of molar oligodontia. Eur J Hum Genet, v.14, n.2, Feb, p.173-9. 2006.

Mostowska, A., A. Kobiela, *et al.* Novel mutation in the paired box sequence of PAX9 gene in a sporadic form of oligodontia. Eur J Oral Sci, v.111, n.3, Jun, p.272-6. 2003.

Moyers, R. E. Desenvolvimento da dentição e da oclusão. In: (Ed.). MOYERS, R.E. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.6, 1991. Desenvolvimento da dentição e da oclusão, p.87-105

Nagase, H., R. Visse, *et al.* Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res, v.69, n.3, Feb 15, p.562-73. 2006.

Nagase, H. B., A. J.; Woessner, J. F., Jr. : e Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. Matrix Suppl., p.421-424. 1992.

Nieminen, P., S. Arte, *et al.* Identification of a nonsense mutation in the PAX9 gene in molar oligodontia. Eur J Hum Genet, v.9, n.10, Oct, p.743-6. 2001.

Ozdemir, D., P. S. Hart, *et al.* MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta. J Dent Res, v.84, n.11, Nov, p.1031-5. 2005.

Peck, L., S. Peck, *et al.* Maxillary canine-first premolar transposition, associated dental anomalies and genetic basis. Angle Orthod, v.63, n.2, Summer, p.99-109; discussion 110. 1993.

Peck, S., L. Peck, *et al.* Concomitant occurrence of canine malposition and tooth agenesis: evidence of orofacial genetic fields. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.122, n.6, Dec, p.657-60. 2002.

Peres, R. C. e S. R. Line. Analysis of MMP-9 and TIMP-2 gene promoter polymorphisms in individuals with hypodontia. Braz Dent J, v.16, n.3, p.231-6. 2005.

Randall, L. E. e R. C. Hall. Temperospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9 during early tooth development. Connect Tissue Res, v.43, n.2-3, p.205-11. 2002.

Razak, I. A. e N. N. Nik-Hussein. A retrospective study of double teeth in the primary dentition. Ann Acad Med Singapore, v.15, n.3, Jul, p.393-6. 1986.

Schalk-Van Der Weide, Y., W. H. Steen, *et al.* Taurodontism and length of teeth in patients with oligodontia. J Oral Rehabil, v.20, n.4, Jul, p.401-12. 1993.

Sellers, A. e G. Murphy. Collagenolytic enzymes and their naturally occurring inhibitors. Int Rev Connect Tissue Res, v.9, p.151-90. 1981.

Seow, W. K. e P. Y. Lai. Association of taurodontism with hypodontia: a controlled study. Pediatr Dent, v.11, n.3, Sep, p.214-9. 1989.

Shafer, W. G. H., M.K.; Levy, B.M. . Developmental disturbances of teeth. In: Philadelphia (Ed.). A textbook of oral pathology, 1983. Developmental disturbances of teeth, p.45-47

Silva Meza, R. Radiographic assessment of congenitally missing teeth in orthodontic patients. Int J Paediatr Dent, v.13, n.2, Mar, p.112-6. 2003.

Silverman, N. E. e J. L. Ackerman. Oligodontia: a study of its prevalence and variation in 4032 children. ASDC J Dent Child, v.46, n.6, Nov-Dec, p.470-7. 1979.

Slayton, R. L., L. Williams, *et al.* Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. Cleft Palate Craniofac J, v.40, n.3, May, p.274-9. 2003.

Stockton, D. W., P. Das, *et al.* Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. Nat Genet, v.24, n.1, Jan, p.18-9. 2000.

Stritzel, F., A. L. Symons, *et al.* Agenesis of the second premolar in males and females: distribution, number and sites affected. J Clin Pediatr Dent, v.15, n.1, Fall, p.39-41. 1990.

Suarez, B. K. S., A. . The genetics of hypodontia. J Dent Res. Washington, v.53, n.4, Jul./Aug, p.781-785. 1974.

Symons, A. L., F. Stritzel, *et al.* Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisor and second premolar. J Clin Pediatr Dent, v.17, n.2, Winter, p.109-11. 1993.

Takata, T., M. Zhao, *et al.* Immunohistochemical detection and distribution of enamelysin (MMP-20) in human odontogenic tumors. J Dent Res, v.79, n.8, Aug, p.1608-13. 2000.

Thesleff, I. Two genes for missing teeth. Nat Genet, v.13, n.4, Aug, p.379-80. 1996.

\_\_\_\_\_. The genetic basis of normal and abnormal craniofacial development. Acta Odontol Scand, v.56, n.6, Dec, p.321-325. 1998.

Vaananen, A., R. Srinivas, *et al.* Expression and regulation of MMP-20 in human tongue carcinoma cells. J Dent Res, v.80, n.10, Oct, p.1884-9. 2001.

Vastardis, H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.117, n.6, Jun, p.650-6. 2000.

Vastardis, H., N. Karimbux, *et al.* A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. Nat Genet, v.13, n.4, Aug, p.417-21. 1996.

Vieira, A. R. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. J Dent Res, v.82, n.3, Mar, p.162-5. 2003.

\_\_\_\_\_. Unraveling human cleft lip and palate research. J Dent Res, v.87, n.2, Feb, p.119-25. 2008.

Vieira, A. R., A. Modesto, *et al.* Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. Am J Med Genet A, v.143, n.6, Mar 15, p.538-45. 2007.

Werb, Z., C. M. Alexander, *et al.* Expression and function of matrix metalloproteinases in development. Matrix Suppl, v.1, p.337-43. 1992.

Whittington, B. R. e C. S. Durward. Survey of anomalies in primary teeth and their correlation with the permanent dentition. N Z Dent J, v.92, n.407, Mar, p.4-8. 1996.

Ye, S. E., P.; Hamsten, A.; Kurkinen, M.; Humphries, S. E.; Henney, A. M. . Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. . J. Biol. Chem., v.271, p.13055-13060. 1996.

Zhu, J. F., R. Crevoisier, *et al.* Congenitally missing permanent lateral incisors in conjunction with a supernumerary tooth: case report. Pediatr Dent, v.18, n.1, Jan-Feb, p.64-6. 1996.

## **ANEXOS**



## ANEXO 1

## PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP/CONEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho  
Faculdade de Medicina  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

CEP - MEMO - n.º 479/07

Rio de Janeiro, 18 de Junho de 2007

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Prof. Marcelo de Castro Costa

Assunto: Parecer sobre adendo ao protocolo.

Referência: Projeto nº. 213/04 - CEP

Título: "Estudo da relação de genes e agenesia dentária em uma população brasileira."

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V.S.a. que em reunião deste CEP realizada em 14/06/2007, foi apreciado e considerado "APROVADO", o parecer sobre adendo ao protocolo, referente ao projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Profª. Alice Helena Dutra Violante  
Coordenadora do CEP

## **ANEXO 2**

Faculdade de Odontologia  
Departamento de Odontopediatria e Ortodontia  
Disciplina de Odontopediatria

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**PROJETO:** ESTUDO DA RELAÇÃO DE GENES E AGENESIA DENTÁRIA EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA **PESQUISADOR:** MARCELO DE CASTRO COSTA

#### **Proposta:**

Estamos convidando pessoas para participar de uma pesquisa sobre diferentes tipos de ausências de dentes. A proposta desse estudo é descobrir se há diferenças genéticas entre indivíduos com e sem ausências dentárias. Esta informação poderá ser útil para identificar a causa principal de ausência de dentes. Esta pesquisa é um passo em busca de meios de prever e/ou prevenir essa alteração no futuro. Este estudo envolverá um exame específico de DNA, seu material genético. Necessitamos fazer o teste em um grande grupo de indivíduos que tenham ausência de dentes. Você poderá solicitar a qualquer momento que seus dados sejam desconsiderados e/ou destruídos. Nesse caso, qualquer registro seu será apagado e qualquer amostra de DNA sua ainda existente será destruída.

Pedimos também que você nos autorize a verificar seu prontuário odontológico e consultar suas radiografias. É possível que solicitemos uma nova radiografia para você, no caso de acharmos que precisamos olhar um exame mais atualizado, ou caso suspeitemos que você possa apresentar um problema que precise ser investigado. Essa nova radiografia será realizada por nós sem nenhum custo para você.

Pedimos a sua autorização para contactá-lo novamente para podermos fornecer informações de seu interesse no futuro, sobre essa pesquisa.

#### **Procedimentos:**

Se você concordar em participar, realizaremos um procedimento no qual uma pequena escova (similar a uma escova de dente) será girada sobre a parte interna da bochecha, coletando células das quais o DNA será extraído para análise.

**Risco:**

O procedimento de coletar células da bochecha causa pouco ou nenhum desconforto e tem uma possibilidade mínima de infecção. Vale destacar que os procedimentos realizados não trarão prejuízos a saúde dos pacientes.

**Benefícios:**

Não há benefício direto para você e seu filho em participar deste estudo. A sociedade deve se beneficiar da identificação de genéticas moleculares de ausências dentárias em pacientes. Isto é um projeto de pesquisa, e não uma forma de tratamento ou diagnóstico para você e seu filho de qualquer condição que vocês possam apresentar, todavia, durante a coleta do material, uma avaliação da cavidade bucal será feita, verificando-se a presença de lesões cariosas, periodontais e disfunções oclusais. Caso uma possível condição que necessite atenção especializada de um dentista ou médico seja constatada, você será comunicado e orientado a procurar atendimento. Com isso, acreditamos que além dos riscos serem insignificantes, seus benefícios indiretos serão relevantes.

**Custo e compensação:**

Nenhum pagamento será realizado para participação nesta pesquisa.

**Confidência:**

Sua amostra de DNA será armazenada pelo Centro de Pesquisa da Universidade de Pittsburgh (Estados Unidos) por um período de até no máximo 5 anos. Informações sobre os dados clínicos e da pesquisa serão armazenados em dois bancos de dados, um no Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e outro no Centro de Pesquisas da Universidade de Pittsburgh. Estes bancos de dados conterão os nomes dos participantes, os endereços, as idades e os diagnósticos que continuarão arquivados para que possamos contactar os participantes no futuro com relação a esta pesquisa. Esta informação estará protegida por senha de acesso para identificadores pessoais limitados a certos indivíduos. Os participantes que desejarem poderá ter acesso aos dados da pesquisa em qualquer momento, ou mesmo ter suas informações pessoais removidas deste arquivo bastando para isso um contato com o pesquisador responsável por este projeto, Dr. Marcelo de Castro Costa, telefone (21) 2562-2101. Um registro de sua participação nesta pesquisa será

mantido, mas de forma confidencial, através do uso de códigos numéricos e arquivos fechados. Os resultados, em sua totalidade, serão publicados em literatura científica especializada, estando também disponíveis, para consulta na Biblioteca Setorial da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ, localizada no Departamento de Odontopediatria e Ortodontia ou na Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFRJ).

#### **Injúria decorrente da participação na pesquisa:**

Se houver qualquer tipo de injúria resultante diretamente da participação nesta pesquisa, tratamento médico estará disponível na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Nenhuma compensação será obtida do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a menos que esta injúria seja comprovada ser o resultado direto de negligência dos empregados da Universidade.

#### **Participação voluntária:**

A sua participação e de seu filho são voluntários. Nenhuma punição, discriminação, estigmatização ou perda de benefícios ao qual você e seu filho têm direito na Faculdade de Odontologia da UFRJ ocorrerá se vocês decidirem não participar. Vocês podem desistir da participação em qualquer momento sem punição ou perda de benefícios aos quais vocês têm direito. Se vocês cancelarem a participação, seus dados não serão mais incluídos em nenhuma análise e serão completamente apagados do banco de dados. Nenhuma análise posterior será realizada e suas amostras serão destruídas.

#### **Perguntas:**

As perguntas são bem-vindas. Você receberá uma cópia do documento de consentimento e resumo de informações. Se existirem dúvidas sobre este projeto de pesquisa ou se você precisar ser atendido por nós por causa de algo que aconteceu depois que coletamos a sua amostra, por favor, entrar em contato com o pesquisador responsável por este projeto Marcelo de Castro Costa, Rua Visconde de Pirajá, 303 Sala 803 – Ipanema – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 22410-001, telefone(21) 2247-3592 ou 2562-2101. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)– Sala 01D-46- 1º andar, telefone: (21) 2562-2480 – e-mail:cpp@hucff.ufrj.br

Estou certo do que foi exposto acima e autorizo minha participação nesta pesquisa.

_____	____/____/____
Nome do paciente	Data
_____	____/____/____
Assinatura do paciente	Data
_____	____/____/____
Assinatura do Representante Legal	Data

Eu discuti os pontos acima com o participante ou representante legal. É minha opinião que o participante entendeu os riscos, benefícios e obrigações envolvidas na participação neste projeto.

_____	____/____/____
Marcelo de Castro Costa	Data
_____	____/____/____
Alexandre Rezende Vieira	Data

**ANEXO 3****PROTOCOLO AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DAS ALTERAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO**

As radiografias foram examinadas em uma sala escura com a utilização de um negatoscópio medindo 13 cm x 37 cm, coberto com uma moldura de cartolina preta e uma lupa de 4X de aumento.

A avaliação foi realizada em condição ideal, isto é, na sala cuja única luz era a do negatoscópio.

**ANEXO 4**

FICHA CLÍNICA

**Família**

Código / Diagnóstico:

Pr - \_\_\_\_\_

M - \_\_\_\_\_

P - \_\_\_\_\_

Heredograma:

## ANEXO 5

### PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO DNA

#### EXTRAÇÃO DO DNA

- 1) Posicionar os swabs no interior da embalagem com a tampa para cima em uma placa com orifícios, deixando um espaço e uma linha entre as amostras. Remover a tampa e deixar os swabs secar à temperatura ambiente por no mínimo 2 horas.
- 2) Colocar cada swab em um tubo *eppendorf* de 1,5 ml e cortar a haste com um alicate para corte de fio que deve ser imerso em Álcool Etílico (EtOH) 100% previamente a cada corte.
- 3) Adicionar 500 µl PBS (pH 7) a cada tubo
- 4) Adicionar 20 µl de solução de protease e 500 µl de Buffer AL em cada amostra
- 5) Agitar em um *Vortex* por 15 seg.
- 6) Incubar em banho à 56°C por 10 min.
- 7) Centrifugar brevemente para remover o líquido das tampas
- 8) Com uma pinça, remover a escova, limpando a pinça em EtOH 100% entre cada amostra.
- 9) Adicionar 500 µl de EtOH à cada amostra e novamente agitar em um *Vortex* por 15 seg.
- 10) Aplicar 700 µl da mistura em uma coluna (em um tubo de coleta) sem deixar a borda molhada. Centrifugar a 8.000 rpm durante um minuto. Repetir até que a mostra esteja filtrada por completo, usando um novo tubo de coleta a cada vez. Descarte o filtrado



11) Após a colocação da coluna em um novo tubo de coleta, adicionar 500  $\mu$ l de *Buffer AW1*. Centrifugar por 1 min. a 8.000 rpm e descartar o filtrado

12) Após a colocação da coluna em um novo tubo de coleta, adicionar 500  $\mu$ l de *Buffer AW2*. Centrifugar por 3 min. a 14.000 rpm e descartar o filtrado

13) Colocar a amostra em um tubo limpo. Adicionar 150  $\mu$ l de *Buffer AE* e incubar à temperatura ambiente por 1 min. Em seguida, centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto.

14) Repetir o passo 13 duas vezes mais utilizando o mesmo tubo. Assim a diluição total é de 450  $\mu$ l.

O DNA está pronto para o PCR. Usar 1  $\mu$ l por 10  $\mu$ l de reação.

**ANEXO 6****PACIENTES COM ANOMALIAS DENTÁRIAS DO PROGRAMA DE TREINAMENTO TEÓRICO-PRÁTICO EM ODONTOPEDIATRIA**

<b>Prontuário</b>	<b>Idade</b>	<b>Gênero</b>	<b>Dente Ausente</b>	<b>Outras Alterações/dente</b>
05/2691	5	m	12	Microdontia/22
05/2732	12	m	-	Supranumerário/23
05/2748	10	f	45	-
05/2753	10	f	-	Infra-oclusão 54/55/64/65
06/2755	9	f	45/35	-
06/2766	10	f	35	Infra-oclusão/75
05/2667	9	m	-	Infra-oclusão/85
05/2655	6	f	35/45	-
05/2643	10	m	13/22/12	-
05/2621	11	m	-	Supranumerário/35
05/2617	7	m	42	-
05/2556	9	f	12 e 22	-
05/2541	6	f	25	-
05/2509	8	m	-	Infra-oclusão/74/84
05/2501	10	m	15	-
05/2486	6	f	-	Taurodontia 36/46/26/16
05/2414	7	f	-	Supranumerário/53
05/2424	8	f	12	Retenção prolongada/36
05/2428	12	f	-	Pré-inferiores com raízes supranumerárias
04/2334	7	f	35	-
04/2336	9	f	-	Retenção prolongada/75

04/2346	9	f	-	Microdontia/12/22
04/2391	8	m	15/25/34/44	-
02/1776	7	m	45/35	-
02/1797	8	f	15	Cíngulo proeminente/12
02/1819	7	f	32	-
02/1861	5	m	31	Fusão/ Geminação/71 e 72
02/1880	8	f	15/25	Taurodontia/16/26
02/1893	5	m	45	-
02/1943	8	m	-	Taurodontia 16/26
02/1951	8	m	-	Taurodontia 46/36
02/1953	8	m	-	Infra-oclusão/74
03/2031	7	f	15	-
03/2037	7	f	-	Taurodontia 16/26/36/46
03/2054	7	f	-	Taurodontia 16/26/36/46
03/2086	7	f	-	Supranumerário/21
03/2094	6	f	-	Supranumerário/21
03/2095	8	m	-	Supranumerário/21
03/2200	9	f	45	-
03/2111	9	m	-	Forma conóide/22
03/2132	7	m	-	Microdontia/12/22
03/2241	6	f	-	Fusão/61 e 62
02/1766	8	f	45, 15 e 25	-
02/1746	7	m	-	Microdontia/22 e 12
97/020	10	m	-	Retenção prolongada/22/12
97/032	6	f	32/42/35/45	-

97/232	6	f	35	Infra-oclusão/75
97/264	9	f	45	-
97/274	7	f	-	Retenção prolongada/21
97/288	6	f	-	Taurodontia/16/26/36/46
97/283	6	f	11 por interrupção da formação do germe dentário	-
97/298	9	f	22 e 12	-
97/301	7	m	35/45	-
98/337	7	f	-	Supranumerário/mésio-dente
98/372	7	m	-	Taurodontia/16/26/36/46
98/437	7	m	-	Infra-oclusão/74/84
98/493	8	f	-	Taurodontia/16/26
98/508	9	m	22	-
98/516	11		35/45	-
99/527	8	m	-	Supranumerários: 34/44
98/551	10	f	-	Taurodontia 17/27/37/47
98/591	5	m	35	Infra-oclusão/75
98/601	6	f	-	Taurodontia 16/26/46/36
98/605	9	m	-	Supranumerários/34/44
98/613	8	m	15/25/35	-
98/622	7	f	-	Supranumerário/mésio-dente
98/656	7	m	-	Taurodontia/16/26
98/661	10	f	-	Retenção prolongada/21
98/692	6	m	-	Taurodontia 46/36
98/695	10	m	-	Taurodontia 17/16/26/27/37/47

98/709	8	f	-	Supranumerário/26
98/806	7	f	12	-
98/809	10	m	-	Taurodontia/16/26
98/817	7	m	15	-
98/808	6	m	-	Taurodontia 16/26
99/873		m	-	Taurodontia 16
99/1131	9	m	31	-
99/1142	7	f	25	-
99/1163	7	m	-	Supranumerário/mesiodente
00/1232	10	m	12	-
99/923	8	m	-	Taurodontia 16/26/36/46
99/1082	12	m	-	Supranumerário/ 24
99/1085	9	m	22	-
99/1096	8	f	33/43	-
00/1245	12	m	-	Taurodontia 17/16/26/27/37/47/36/46
00/1266	10	f	34/45	-
00/1298	8	f	-	Conóide 12 e 22
00/1323	8	m	-	Taurodontia 16/26
00/1407	10	m	-	Taurodontia 16/26/36/46
01/1523	8	m	-	Supranumerário/ mesiodente
01/1528	10	f	15/25/35/45	-
01/1556	9	f	32	-
01/1591	10	f	-	Taurodontia 17/27/37/47
01/1602	8	f	32	-

01/1609	8	f	31/41	-
01/1634	8	m	32	-
05/2701	10	m	-	Odontoma na região/11
01/1660	10	f	-	Taurodontia 37
01/1697	5	f	14/15/23/24/25/35/45	Taurodontia 16/26
01/1742	7	m	-	Taurodontia 16/26
02/1758	6	m	22	Taurodontia 16/26
02/1783	10	m	-	Supranumerário/mesiodente
02/1800	9	f	-	Taurodontia 16/26
02/1804	9	m	-	Taurodontia 36/46
02/1810	10	m	-	Taurodontia 16/26/36/46
02/1844	10	f	-	Supranumerário na região 45
02/1847	10	m	-	Taurodontia 16/26
02/1868	11	f	-	Supranumerário 45
02/1874	9	m	-	Supranumerário na região/13
02/1875	12	m	-	Taurodontia 17/27
02/1892	9	f	-	Taurodontia 16/26/36/46
02/1901	12	f	14/24/35/45	-
02/1909	11	f	-	Taurodontia 16/26/37/47 e Infra-occlusão 74/84
02/1910	11	f	-	Taurodontia 17/27
02/1940	10	m	-	Microdontia 12
02/1950	8	m	-	Microdontia 12/22
02/1960	8	f	-	Taurodontia 16/26/46/36
02/2003	10	m	-	Taurodontia 16/26

03/2040	11	m	-	Taurodontia 17/27/37/47
03/2077	10	f	-	Taurodontia 16/26/46/36
03/2116	10	m	-	Taurodontia 16/26
03/2224	5	f	15/25	-
03/2027	10	m	45/35	-
04/2250	10	f	45	-
05/2596	12	f	-	Taurodontia 36/76

## ANEXO 7

## BANCO DE DADOS DOS GENÓTIPOS E DESCRIÇÃO DAS FAMÍLIAS

Família	indivíduo	MMP1		MMP3		MMP20	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
1	Pr	C	C	5A	6A	A	G
	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	C	C	5A	5A	A	G
2	Pr	C	C	5A	6A	A	A
	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	C	C	5A	5A	A	G
3	Pr	C	C	6A	6A	G	G
	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
4/28	Pr	C	C	5A	5A	G	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
	P	C	C	5A	5A	A	G
5	M	C	C	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
	P	C	C	6A	6A	A	G
6	M	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	5A	X	X
	P	0	0	5A	5A	A	A
7	M	0	0	5A	6A	G	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
	P	C	C	5A	5A	G	G
8	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
	P	C	C	5A	6A	A	G
9/69	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	0	0	6A	6A	A	G
	P	0	0	6A	6A	A	G
10	M	0	0	5A	6A	G	G
	Pr	0	0	5A	6A	A	G
	P	0	0	5A	5A	A	A
11	M	0	0	5A	5A	G	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
	P	C	C	6A	6A	G	G
12/19	M	C	C	5A	5A	G	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
	P	C	C	5A	6A	A	A
13	M	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	A
	P	C	C	5A	6A	A	A
14	M	C	C	5A	5A	A	A
	Pr	0	0	5A	6A	A	A
	P	0	0	5A	5A	A	G
	M	0	0	5A	6A	A	G



	Pr	C	C	5A	5A	A	G
	Pr	0	0	5A	6A	A	G
15/38	P	0	0	5A	6A	G	G
	M	0	0	0	0	G	G
	Pr	0	0	5A	6A	A	G
16	P	0	0	5A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	A
17	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	A
18	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
20	P	C	C	6A	6A	X	X
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
21	P	C	C	5A	6A	G	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	A
22	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
23	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	X	X
24	P	C	C	0	0	X	X
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	A
25	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	0	0	5A	6A	A	G
	Pr	0	0	6A	6A	A	G
26	P	0	0	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	0	0	A	A
27/74	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
29	P	0	0	5A	5A	A	A
	M	0	0	5A	6A	A	G
	Pr	0	0	6A	6A	A	G
30	P	0	0	0	0	X	X
	M	C	C	0	0	X	X
	Pr	C	C	6A	6A	X	X
31	P	C	C	5A	6A	G	G
	M	C	C	5A	6A	X	X
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
32	P	C	C	6A	6A	A	A
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	5A	A	G
33	P	C	C	5A	6A	G	G
	M	0	0	5A	5A	A	A
	Pr	0	0	6A	6A	A	G
34	P	C	C	5A	6A	A	G

	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
35	P	C	C	0	0	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	A
36	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	X	X
37	P	0	0	5A	5A	X	X
	M	C	C	5A	6A	X	X
	Pr	C	T	6A	6A	A	G
39	P	C	C	6A	6A	A	A
	M	C	T	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	X	X
40	P	0	0	6A	6A	X	X
	M	0	0	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
41	P	C	C	6A	6A	A	A
	M	C	C	5A	6A	G	G
	Pr	0	0	6A	6A	A	G
42	P	0	0	5A	6A	A	G
	M	0	0	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
43	P	C	T	5A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	G	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
44	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	5A	A	G
	Pr	C	C	5A	5A	X	X
45	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	5A	X	X
	Pr	C	C	5A	6A	A	A
46	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	C	C	5A	6A	A	A
	Pr	C	T	5A	6A	X	X
47	P	0	0	5A	6A	G	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
48	P	C	C	6A	6A	G	G
	M	C	T	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
49	P	C	C	5A	5A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
50	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	0	0	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
51	P	C	T	5A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	0	0	5A	6A	A	G
52	P	0	0	6A	6A	A	A
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
53	P	C	C	6A	6A	G	G

	M	C	C	5A	5A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
54	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	5A	A	G
55	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
56	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	5A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
57	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	A
58	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
59	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
60	P	C	C	5A	5A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	0	0	6A	6A	A	A
61	P	C	C	6A	6A	X	X
	M	C	C	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
62	P	C	C	6A	6A	G	G
	M	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
63	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	5A	G	G
64	P	C	C	5A	6A	X	X
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	X	X
65	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
66/76	Pr	C	C	5A	6A	A	G
	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	G	G
67	P	C	C	5A	6A	G	G
	M	C	C	6A	6A	G	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
68	P	C	C	6A	6A	G	G
	M	C	C	5A	6A	G	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
70/71/ 72	Pr	C	C	6A	6A	G	G
	P	C	C	5A	6A	A	G
	M(PR)	C	C	6A	6A	A	G
	P	C	C	6A	6A	A	G
		C	C	5A	6A	G	G

	Pr	C	C	5A	6A	X	X
77	P	C	C	6A	6A	X	X
	M	C	C	5A	6A	X	X
	Pr	0	0	6A	6A	X	X
78/79	Pr	C	C	6A	6A	G	G
	P	C	C	5A	6A	X	X
	M	0	0	6A	6A	X	X
80	Pr	C	C	5A	6A	G	G
	P	C	C	5A	6A	G	G
	M	C	C	6A	6A	A	G
81	Pr	C	C	6A	6A	G	G
	P	0	0	5A	6A	X	X
	M	0	0	6A	6A	A	G
82	Pr	C	C	5A	6A	A	A
	P	C	T	5A	5A	A	A
	M	C	C	6A	6A	A	A
83	Pr	0	0	5A	6A	A	A
	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	5A	A	A
84	Pr	C	C	6A	6A	A	A
	P	C	T	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	A
85	Pr	0	0	5A	6A	X	X
	P	0	0	6A	6A	X	X
	M	0	0	5A	5A	X	X
86	Pr	C	C	5A	6A	A	A
	P	C	C	5A	5A	A	G
	M	C	C	5A	6A	X	X
87	Pr	0	0	5A	6A	X	X
	P	0	0	6A	6A	X	X
	M	C	C	5A	6A	X	X
88	Pr	0	0	6A	6A	X	X
	P	0	0	5A	6A	X	X
	M	T	T	6A	6A	G	G
89	Pr	0	0	5A	5A	A	G
	P	0	0	5A	6A	X	X
	M	0	0	5A	5A	A	A
90	Pr	0	0	0	0	X	X
	P	0	0	0	0	X	X
	M	0	0	6A	6A	X	X
91	Pr	0	0	5A	6A	X	X
	P	C	C	5A	5A	A	G
	M	0	0	6A	6A	X	X
92	Pr	0	0	6A	6A	X	X
	P	0	0	5A	6A	X	X
	M	0	0	0	0	X	X
93	Pr	0	0	0	0	X	X
	P	0	0	5A	6A	X	X
	M	C	C	0	0	X	X
94/10/ 89	Pr	C	C	5A	5A	A	A
	Pr	C	C	5A	5A	A	A
	P	C	T	5A	5A	A	A
	M	C	C	5A	5A	A	A

	Pr	C	C	6A	6A	G	G
95	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	G	G
96	P	C	C	5A	6A	G	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	0	0	5A	6A	X	X
97	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
98	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
99	P	C	C	5A	5A	A	G
	M	0	0	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	G	G
100	P	0	0	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
101	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	6A	6A	G	G
102	P	C	C	5A	6A	G	G
	M	C	C	6A	6A	G	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
103	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
104	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	C	C	0	0	G	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
105	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	C	T	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
106	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	C	C	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
107	P	C	C	6A	6A	A	G
	M	0	0	5A	6A	A	A
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
110	P	C	C	5A	6A	A	A
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	6A	6A	G	G
111	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	0	0	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	5A	G	G
112	P	C	C	5A	6A	A	G
	M	C	C	5A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
113	P	C	C	5A	5A	G	G
	M	C	T	6A	6A	A	A
	Pr	C	C	6A	6A	A	G
116	P	0	0	5A	6A	G	G
	M	C	C	6A	6A	A	A

117	Pr	C	C	5A	6A	A	A
	P	C	C	5A	5A	A	A
	M	C	C	6A	6A	A	G
	Pr	C	C	5A	6A	A	G
119	Pr	C	C	6A	6A	A	G
/120	P	C	C	5A	5A	A	A
	M	C	C	5A	6A	A	G

Família	Sexo	Idade (anos)	Dente Ausente	Malformações	Ausência Mãe	Mãor. Mãe	Ausência Pai	Mãor. Pai	Parentes afetados
1	M	31	12	22-conóide					
2	F	11	12		35				
3	F	12	15	29					
4	M	27	13,23						irmã
5	F	12	15,35,45	12,22-conóide					
6	M	16	35,45		sim				
7	F	23	12,24,14,44,35				12,22,34,44,14,24		
8	F	22	25		35				
9	F	24	36,37,47	12,22-conóide	12,22,35,45,25,15				irmã
10	F	21	22,35						
11	M	10	32						
12	F	27	24						irmão
13	M	12	45						
14	F	13	15,25,35						
15	M	7	31,41						irmã
16	F	10	7,15,13,12,22,23,24,25,27,32,31,41,4						
17	F	17	15,14,23,24,25,35,45						
18	M	17	22	AS- microdontia			12,22,45,35,34		irmã, tia e avô paternos
19	M	28	35						irmã
20	M	13	15,22,25,35,44,45	12-conóide					tia paterna
21	M	15	34,35,44,45		4,15,24,25,34,35,44,4				tios, prima e avó materna
22	M	12	35,45						
23	M	21	35						
24	M	13	35,45						
25	F	14	45						
26	F	9	15,25,35						
27	F	15	12,22						irmão
28	F	23	13,15,25,35,45						irmão
29	F	10	43						
30	F	12	15						
31	F	15	44,45						
32	M	30	25,35						
33	M	19	12,22						
34	M	18	45						
35	M	13	35						
36	M	13	15,25,45						
37	F	49	36						
38	F	9	14,15,24,25,44,45,34,35						irmão
39	M	26	12,22						
40	F	8	31						







# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)