

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ORTOPEDIA  
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ORTODONTIA

Tatiana da Silva Braga

UMA BUSCA PELAS CAUSAS GENÉTICAS  
DE AGENESIAS DENTÁRIAS NÃO SINDRÔMICAS

Porto Alegre

2009

C.D Tatiana da Silva Braga

UMA BUSCA PELAS CAUSAS GENÉTICAS  
DE AGENESIAS DENTÁRIAS NÃO SINDRÔMICAS

**Pesquisa apresentada ao Curso de  
Especialização em Ortodontia da Faculdade  
de Odontologia da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como trabalho de  
conclusão do Curso e requisito obrigatório  
à obtenção de Título de Especialista em  
Ortodontia.**

Professor Orientador: Dr. Carlos Alberto Mundstock

Professora Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Cátira Bortolini

Co-orientadora: Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes

Porto Alegre

2009

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Suzana e Luís Augusto**, e minhas irmãs, **Taís e Adriana**, pelo amor, carinho e dedicação que sempre demonstraram, me incentivando a buscar meus objetivos.

Ao meu irmão **Vinícius** que chegou para alegrar a família com seu jeito engraçado, meigo e carinhoso.

Aos meus avós, **Leviton e Cissa**, e aos meus dindos, **Dada e Edi**, pelo amor e pela disposição em ajudar e por acreditarem na realização dos meus sonhos.

Ao meu marido, **Marcelo**, seu carinho, amor, atenção e apoio incondicional, fizeram com que este projeto se realizasse.

À **Simone e Leonardo**, por cuidarem de meus pais e fazê-los felizes.

Amo todos vocês.

Ao **Professor Dr. Carlos Alberto Mundstock**, meu orientador, sua inteligência, seu carisma e sua humildade, o tornam um grande mestre. Sua dedicação à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul é admirável. Obrigada pela oportunidade e por ter acreditado na minha capacidade para desenvolver este projeto.

À **Professora Dr<sup>a</sup> Karina Santos Mundstock**, pela iniciativa de desenvolver esta pesquisa e pela confiança em entregar a mim este projeto.

À **Professora Dr<sup>a</sup> Maria Cátira Bortolini**, do Departamento de Genética, no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela atenção dada desde o início a este projeto, possibilitando a sua execução e contribuindo de forma importante com seu conhecimento.

À **Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes**, do Departamento de Genética, no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela dedicação que demonstrou durante todo o desenvolvimento desta pesquisa e que foi essencial para a realização desta.

Aos **Professores do Curso de Especialização em Ortodontia da UFRGS: Dr. Eduardo Silveira Ferreira, Dr. Enio J. B. Ferreira, Dr. José Renato Prietsch, e Dr. Telmo Bandeira Berthold**, pelos ensinamentos valiosos que estarão presentes na minha vida profissional.

## RESUMO

A agenesia dentária é uma das anomalias do desenvolvimento dentário mais comum em humanos. No entanto, sua etiologia permanece desconhecida. A agenesia pode ocorrer como parte de uma síndrome ou pode estar presente em um padrão familiar isolado, sendo sua frequência variável nas populações humanas. Estudos em nível molecular têm sido realizados a fim de se determinar suas causas. Os genes *MSX1* e *PAX9* possuem um papel importante no desenvolvimento craniofacial, incluindo na formação dos dentes. Mutações nos genes *PAX9* e *MSX1* já foram descritas como responsáveis por alguns tipos de agenesia dentária em humanos. Os objetivos do presente estudo foram: 1) Analisar a frequência da agenesia dentária em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico do Curso de Especialização da Faculdade de Odontologia da UFRGS e de consultório particular; 2) Identificar mutações na região codificadora do gene *PAX9* (exons, 2 3 e 4) e verificar se as mesmas estariam associadas à agenesia observada; 3) Verificar a existência de mutações no exon 2 do gene *MSX1* e se estas estão associadas à agenesia nos pacientes. Os dados relativos a 360 pacientes foram coletados quanto à presença ou não de agenesia. Destes 360 pacientes, 35 participaram do estudo do *PAX9* e 23 do estudo do *MSX1*, através da coleta de saliva para análise do DNA. Os dentes que apresentaram maior frequência de agenesia, excluindo os terceiros molares, foram os pré-molares inferiores e os incisivos laterais superiores. Na amostra não foram encontradas diferenças significativas, entre os gêneros e entre brancos e negros, quando observou-se a frequência da agenesia em relação aos grupos dentários. Entretanto, quando analisou-se a frequência dos dentes individualmente, diferenças significativas foram encontradas ao incluir os terceiros molares no cálculo da frequência. Mutações encontradas no exon 3 do gene *PAX9* e no exon 2 do gene *MSX1* devem estar contribuindo para o fenótipo de agenesia dentária de diferentes tipos, assim como outros genes da rede da odontogênese, conhecidos e desconhecidos e fatores epigenéticos devem também estar influenciando o processo de desenvolvimento dentário.

**Palavras-chave:** agenesia dentária, genética, gene *PAX9*, gene *MSX1*, ortodontia

## ABSTRACT

Tooth agenesis is one of the common anomalies of dental development in humans, however, its etiology remains unknown. Agenesis may occur as part of a syndrome or may be present in an isolated familiar pattern and its frequency is variable in human population. Studies have been conducted in order to determine the causes of tooth agenesis at the molecular level. Genes *MSX1* and *PAX9* have an important role during the craniofacial development period. Mutations in the genes *MSX1* and *PAX9* might be responsible for some types of tooth agenesis in human beings. The objectives of the present study were: 1) to analyze the frequency of tooth agenesis in patients undergoing orthodontic treatment at the Orthodontic Program of the Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS and private practice, 2) to identify mutations in coding region of the *PAX9* (exons 2, 3 e 4) and to verify if they are associated with agenesis ; 3) to verify the existence of mutations in exon 2 of the *MSX1* gene and to check if these are associated with tooth agenesis. Data from 360 patients were collected regarding the presence or absence of tooth agenesis. From these 360 patients, only 35 participated in the *PAX9* study and 23 in the *MSX1* study, selected by saliva analysis for DNA. The higher frequency of tooth agenesis, excluding third molars were lower premolars and upper lateral incisors. In the studied sample there were no statistically significant differences between genders and white or black people, when observing the frequency of tooth agenesis in relation to dental groups. However, when analyzing the frequency of teeth individually, statistically significant differences were found when the third molars were included in the frequency calculation. The mutations found in exon 3 of *PAX9* and exon 2 of *MSX1* genes contribute to tooth agenesis phenotype of different tooth groups, as well as others genes of the odontogenesis network, that are known and unknown, and epigenetic factors must also be influencing the process of tooth development.

**Key words:** tooth agenesis, genetics, *PAX9* gene, *MSX1* gene, orthodontics

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1 Biologia Evolutiva do Desenvolvimento .....	15
2.2 Os Genes <i>PAX</i> .....	16
2.3 O Gene <i>PAX9</i> .....	21
2.4 O Gene <i>PAX9</i> e o Desenvolvimento Dentário .....	22
2.5 Evolução Molecular do <i>PAX9</i> .....	22
2.6 Os Genes <i>MSX</i> .....	24
2.7 O Desenvolvimento Dentário e suas Alterações .....	27
2.8 Agenesia Dentária .....	27
2.9 Frequência da Agenesia Dentária .....	28
2.10 Etiologia da Agenesia Dentária .....	29
2.11 Morfogênese Dentária .....	32
2.12 Implicações Clínicas .....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1 Levantamento das amostras e construção do banco de dados .....	35
3.2. Seleção das Amostras .....	35
3.3 Procedimento para a coleta das amostras .....	36
3.4 Extração do DNA .....	36
3.5 Reação de Amplificação (PCR) .....	37
3.6 Sequenciamento do DNA .....	38
3.7 Análise dos dados .....	38
4 RESULTADOS .....	40

5 DISCUSSÃO .....	60
6 CONCLUSÕES .....	67
REFERÊNCIAS .....	68
GLOSSÁRIO .....	79
APÊNDICE .....	82
A. Ficha de Coleta de Dados dos Pacientes .....	82
B. Termo de Consentimento Informado .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

A: adenosina

Ala : alanina

Arg: arginina

ARCSUP: arcada superior

ARCINF: arcada inferior

*AXIN2: axis Inhibition protein 2*

Bmp : proteína morfogenética do osso, *bone morphogenetic protein*.

C: citosina

CAN: caninos

CSUP: canino superior

CINF: canino inferior

*Drosophila (Pox meso)*: espécie de mosca, chamada também de mosca da fruta

*EDA: ectodysplasin – A*

*Fgf*: fator de crescimento fibroblástico.

G: guanina

His: histidina

*HOX7*: antiga denominação do grupo de genes homeóticos *Msx*.

*HOX8* : antiga denominação do grupo de genes homeóticos *Msx*

I: inferior

INC: incisivos

ININF: incisivo inferior

INMOL-3M: molares inferiores, excluindo os terceiros molares

INSUPLAT: incisivos laterais superiores



INSUPCEN: incisivos centrais superiores

*Msx*: nomenclatura para *muscle segment homeobox* em ratos.

*MSX*: nomenclatura para *muscle segment homeobox* em humanos.

*Msh*: *muscle segment homeobox*

MOL-3M: molares, excluindo terceiros molares

*PAX* : nomenclatura para *paired base homeobox* em humanos.

*Pax*: nomenclatura para *paired base homeobox* em ratos

PCR: reação da polimerase em cadeia

Pb: pares de bases

PMSUP: pré-molar superior

PMOL: pré-molares

PMINF: pré-molar inferior

Primers: oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR.

Pro: prolina

QUADIR: quadrante direito

QUAESQ: quadrante esquerdo

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (Restriction Fragment Length Polimorphism)

S: superior

SNC: sistema nervoso central

T: timina

ml: mililitros ( $10^{-3}$ )

$\mu$ l: microlitros ( $10^{-6}$ )

pmol: picomolar( $10^{-12}$ )

ng: nanograma ( $10^{-9}$ )

$\beta$  : beta

3MOL: terceiros molares

3MOLSUP: terceiros molares superiores

3MOLINF: terceiros molares inferiores

## 1 INTRODUÇÃO

A dentição humana completa possui papel fundamental para o desenvolvimento pleno de algumas funções consideradas vitais para a existência do ser humano. Dentre elas estão: a fonação, a mastigação e a deglutição. O estabelecimento da harmonia destas funções proporciona ao indivíduo uma qualidade de vida compatível com um desenvolvimento normal. Sendo assim, a importância da manutenção das estruturas dentárias é evidente.

A odontologia moderna vem se aperfeiçoando a fim de solucionar os mais variados problemas relacionados a defeitos nas estruturas dos dentes, em sua morfologia, coloração e alterações numéricas. Algumas especializações surgiram na Odontologia justamente com a finalidade de devolver a função e a estética que estão prejudicadas quando essas modificações estruturais estão presentes. Dentre elas, pode-se citar a Dentística Restauradora, a Implantodontia associada à Prótese, Cirurgia e a Ortodontia. Em relação às alterações citadas, a Ortodontia está mais relacionada com o posicionamento dentário, ou quando existem falhas no desenvolvimento dentário ocasionados pela ausência de alguns dentes, o que denomina-se de agenesia.

Assim, a agenesia dentária constitui-se num fator muito importante no planejamento do tratamento ortodôntico, uma vez que o plano de tratamento deve ser estabelecido para proporcionar ao indivíduo o restabelecimento da função e da estética, redistribuindo os dentes da melhor forma possível. A fim de que seja elaborado o plano de tratamento ortodôntico mais adequado para o paciente, deve-se levar em consideração as variações genéticas e ambientais que estão envolvidas no processo de crescimento e desenvolvimento da dentição do indivíduo.

Características morfológicas, como a forma e o número de dentes, são definidas pelo processo de crescimento e desenvolvimento craniofacial e são dependentes de componentes genéticos e ambientais. A importância de cada um desses componentes é variável, dependendo da característica que está sendo analisada (CRUZ; OLIVEIRA, 2007).

O importante papel da genética tem aumentado reconhecidamente nos últimos anos em relação ao entendimento das diversas anomalias dentais, como a agenesia dentária. A falta de uma afirmativa consistente sobre a causa dessa

condição nos leva a usar os recursos da genética molecular para identificar os genes que perturbam o desenvolvimento dental normal (VASTARDIS, 2000).

Embora a ausência congênita de dentes esteja associada à pelo menos 49 síndromes (SCHALK-VAN DER WEIDE *et. al.*, 1994), estima-se que a prevalência na população humana dos tipos de agenesia dentária não-associada a síndromes, doenças sistêmicas ou a traumas, possa chegar a 20%, o que faria desta a mais comum anomalia de desenvolvimento craniofacial encontrada na nossa espécie (STOCKTON *et. al.*, 2000; FRAZIER-BOWERS *et. al.*, 2002).

Ainda segundo Stockton *et. al.* (2000), dentre estas a mais comum é a falta do terceiro molar que, junto com as ausências do segundo pré-molar e incisivo lateral superior, perfazem 95% das agenesias dentárias descritas na nossa espécie (PECK *et al.*, 1996).

Os casos podem ser de natureza esporádica ou familiar (STOCKTON *et. al.*, 2000), sendo que várias investigações em nível molecular têm buscado relacionar mutações com as diferentes formas de agenesia: oligodontia (ausência de seis ou mais dentes) e/ou hipodontia (falta de um número menor que seis dentes).

Há destacada diferença na distribuição de uma agenesia em particular, a do terceiro molar, entre populações humanas. De acordo com Dalhberg (1945), o siso (terceiro molar) estaria ausente em aproximadamente 45% dos húngaros, enquanto nos africanos do Sul do Saara, melanésios e egípcios é somente de 5%. Rozkovcová *et. al.* (1999) demonstraram que esse tipo de agenesia chega ao extremo, varia de zero a 100%, na Tasmânia e México, respectivamente.

Até o momento, principalmente três genes têm sido associados com agenesia não sindrômica: *PAX9*, *MSX1* e o *AXIN2* (LAMMI *et. al.*, 2004; MOSTOWSKA *et. al.*, 2003). Dentre estes, o *PAX9* e o *MSX1* tem sido os mais estudados.

Há cerca de 10 anos, o gene *PAX9* humano foi mapeado no cromossomo 14(14q12-q13), através da hibridização *in situ* (STAPLETON *et. al.*, 1993). O gene *PAX9* tem papel especial na organogênese, incluindo o desenvolvimento de uma estrutura específica dos vertebrados, os dentes (PETERS *et. al.*, 1998; FRAZIER-BOWERS *et. al.*, 2002; McKEOWN *et. al.*, 2002). Os estudos de mutações que provocam agenesia dos dentes em humanos e camundongos (PETERS E BALLING, 1999; CHEN *et. al.*, 2000; KIST *et. al.*, 2005) conjuntamente fornecem sólidas evidências de que o gene *PAX9* teria papel chave destacado na rota genética da odontogênese.

Outros estudos têm ainda mostrado que a agenesia do terceiro molar estaria associada a variações numéricas e estruturais, também predispondo ao tamanho reduzido e desenvolvimento retardado dos dentes. Além disso, de acordo com Garn e Lewis (1970), se o terceiro molar está ausente, os molares e pré-molares do mesmo quadrante estão atrasados na sua formação e erupção (VASTARDIS, 2000).

Algumas das várias características que distingue o *homo sapiens* de outras espécies primatas são o número e a morfologia da variação dentária (FLEAGLE, 1999). O modelo primitivo de dentição dos primatas inclui, em um determinado quadrante dois incisivos, um canino, três pré-molares e três molares, num total de 36 dentes. Este padrão ainda é conservado nos lemurs e nos macacos do Novo Mundo, enquanto nos grandes macacos e no homem são encontrados apenas dois pré-molares, totalizando 32 dentes (LEWIN, 1999). Os terceiros molares em humanos são freqüentemente impactados, o que já não ocorre com os grandes macacos (VARKI e ALTHEIDE, 2005). Além disso, apesar de muitos estudos demonstrarem uma redução apreciável do tamanho dentário em humanos modernos quando comparados com homínídeos (WOLPOFF, 1975; CALGAGNO, 1986, 1988), variações no número e no tamanho dos dentes são freqüentemente encontradas dentro da espécie humana. Por exemplo, a agenesia do terceiro molar, cuja etiologia é amplamente desconhecida, é até agora a forma mais comum de variação em número de dentes em humanos (DAHLBERG, 1945).

Considerando que mutações em genes importantes podem ser responsáveis por grandes mudanças morfológicas (NEI, 2007). Pereira *et. al.* (2006) avaliaram a possibilidade do gene *PAX9* estar envolvido em alterações dentárias normais encontradas na espécie humana e em espécies de primatas. Eles sugeriram que uma variação no número de molares pode ser uma vantagem numa perspectiva evolutiva da espécie humana. Pelo estilo de vida e pela dieta mais leve vivenciada desde a descoberta do fogo e do desenvolvimento de utensílios para cozinhar os alimentos, os terceiros molares, que foram essenciais para a sobrevivência dos primeiros homínídeos, tornaram-se sem função. Concomitante, os arcos dentários têm sido reduzidos ao longo da evolução humana. Como resultado, os terceiros molares tornaram-se freqüentemente impactados ou mal posicionados provendo o dente de sua posição funcional normal.

Além disso, devido à dificuldade de higienização e de posteriormente mantê-lo livre de doenças, os terceiros molares retidos ou mal posicionados levam a maior

suscetibilidade à doença periodontal, assim como infecções, lesões de cárie, cistos, tumores, destruição de dentes adjacentes e do osso. Esses problemas levam alguns autores a levantar a possibilidade da completa eliminação desses dentes em humanos (SILVESTRI e SINGH, 2003) e estudos para interromper intencionalmente o desenvolvimento do terceiro molar para uma possível aplicação clínica têm sido desenvolvidos (SILVESTRI *et. al.*,2004).

Tendo em vista o exposto acima os objetivos desta pesquisa, portanto, são: 1) Analisar a frequência da agenesia numa amostra de pacientes que estão em tratamento no Curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2) Identificar mutações no gene *PAX9* e verificar se estão associadas à agenesia encontrada; 3) Verificar a existência de mutações no gene *MSX1* e se essas estão associadas à agenesia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biologia Evolutiva do Desenvolvimento

O rápido desenvolvimento das modernas técnicas de biologia molecular nos últimos anos tem desencadeado verdadeiras revoluções científicas tanto nas áreas biomédicas quanto na esfera da biologia evolutiva. A publicação dos resultados do Projeto do Genoma Humano, por exemplo, corroborou de maneira contundente a idéia de que a maior parte dos genes humanos estaria relacionada com funções regulatórias (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001; VENTER *et. al.*, 2001). Além disso, tem sido possível compreender melhor os intrincados mecanismos moleculares envolvidos na regulação gênica de organismos complexos, seja durante ou após o desenvolvimento embrionário.

Detalhes sobre os mecanismos regulatórios em nível molecular, os quais estão diretamente envolvidos no desenvolvimento orgânico, incluindo o padrão tridimensional do embrião, a posição das estruturas ao longo do corpo, a morfogênese de órgãos individuais, bem como a diferenciação de vários tipos de células tem sido delineados (THESLEFF, 1998).

Sabe-se ainda que diferentes tipos de genes estão envolvidos no processo, sendo que alguns, devido a sua identidade estrutural, funcional e ou filogenética, formam as chamadas famílias gênicas. Os genes regulatórios mestres seriam um bom exemplo disso. Estes genes codificam fatores de transcrição específicos que regulam a expressão gênica, e normalmente são agrupados em subfamílias de acordo com as características estruturais da região que media a ligação da proteína com o DNA (gene alvo). Caracterizam-se, sobretudo, por apresentarem determinadas seqüências de DNA altamente conservadas ao longo da trajetória evolutiva dos animais, o que resulta em proteínas regulatórias com domínios também muito conservados (LEWIN, 2000).

Segundo Brakefield (2006), os genes de desenvolvimento que delineiam as formas dos animais são freqüentemente expressos em diversos tipos de células e tecidos, e em diferentes tempos durante o desenvolvimento. Eles são altamente pleiotrópicos (desempenham muitas funções) e há crescentes evidências de que mudanças evolutivas tendem a ocorrer através de ajustes no complexo aparato de regulação gênica. Muitas das diferenças em traços morfológicos complexos não

ocorrem devido à presença ou ausência de genes particulares, mas sim devido às mudanças nos mecanismos que os controlam, afetando quando e onde um gene é expresso.

Famílias dos genes reguladores do desenvolvimento são amplamente distribuídas pelo reino animal, e uma fração substancial destes genes é expressa de maneira similar em embriões de espécies pertencentes a filos distantes filogeneticamente (CARROLL, 2003; WRAY, 2003). Porém, existem diferenças marcantes entre todos os organismos vivos, sendo que parte delas poderia ser atribuída a mudanças em genes reguladores. Dessa forma, o desenvolvimento embrionário é considerado um momento crucial para o surgimento de mudanças evolucionárias, uma vez que a cascata de eventos é acionada quando o óvulo é fecundado. Este apresenta passos chaves (multiplicação, migração e diferenciação celular, apoptose) para a determinação do plano corporal e das estruturas do embrião. Sendo cada um desses passos controlados por fatores genéticos, é esperado que mutações nos genes envolvidos possam levar ao surgimento de grandes novidades evolutivas.

A maioria dos genes reguladores ativos no desenvolvimento embrionário são inativados ao seu término. Entretanto, é importante ressaltar, que alguns destes genes voltam a ter papel destacado após o estágio embrionário. Este é o caso do gene *PAX9* da família dos genes *PAX* (PAIXÃO-CÔRTEZ, 2008).

## 2.2 Os genes *PAX*

O reconhecimento da importância dos genes *PAX* para o desenvolvimento tem feito deles intensos objetos de investigação científica. Os genes *PAX* constituem uma grande família de genes para fatores de transcrição de importância fundamental no desenvolvimento de órgãos e tecidos. Inicialmente foram descobertos em *Drosophila* (*Pox meso*), estando associados a funções múltiplas durante a embriogênese (DAHL *et. al.*; 1997). Subseqüentemente, genes *PAX* foram encontrados no genoma de vertebrados, incluindo o homem, estando estes também relacionados ao desenvolvimento embrionário e a organogênese (DAHL *et. al.*, 1997; PETERS *et. al.*, 1998; 1999). Caracterizam-se por compartilhar um domínio conservado, chamado de domínio *paired* que apresenta normalmente 128 aminoácidos, com propriedade de se ligar a um elemento promotor do DNA alvo



(DAHL *et. al.*,1997; WILM *et. al.*,1998; PETERS e cols.,1999). Motivos de ligação para as proteínas *PAX* foram encontrados em diversas regiões promotoras de genes que codificam uma variedade de proteínas, incluindo outros fatores de transcrição, receptores, hormônios peptídios e proteínas de adesão. Por este motivo suas funções estão relacionadas à proliferação, especificação, migração e sobrevivência celular, particularmente, durante o período embrionário (ROBSON *et. al.*, 2006).

Da mesma maneira que aconteceu com as outras famílias gênicas encontradas no genoma eucarioto, é provável, na medida em que emergiram os animais mais complexos, que os genes *PAX* se diversificaram a partir de um gene ancestral comum, através de duplicação e subsequente divergência resultando, inclusive, no surgimento de novos domínios expressos (BALCZAREK *et. al.*,1997; PETERS *et. al.*,1998; OGASAWARA *et. al.*,1999, 2000). Em vertebrados foram encontrados nove genes *PAX* (*PAX1-9*) sendo que esses podem ser agrupados em quatro grupos parálogos (originados de um gene ancestral) (tabela 1). Tem sido considerado ainda que os quatro grupos de genes provavelmente originaram-se antes da radiação Cambriana, que se iniciou há 542 milhões de anos atrás (BREITLING *et. al.*, 2000; MILLER *et. al.*,2000; HETZER-EGGER, 2000).

Tabela 1: Estrutura e localização cromossômica dos genes das quatro famílias *Pax* de mamíferos.

GRUPO	GENE	ESTRUTURA			LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	
		Domínio- <i>paired</i>	Octapeptídeo	Homeodomínio	Rato	Homem
I	<i>Pax1</i>	Sim	Sim	Não	2	20p11
	<i>Pax9</i>				12	14q12-q13
II	<i>Pax2</i>	Sim	Sim	Sim	19	10q25
	<i>Pax5</i>				4	9p13
	<i>Pax8</i>				2	2q12-q14
III	<i>Pax3</i>	Sim	Sim	Sim	1	2q35
	<i>Pax7</i>				4	1p36
IV	<i>Pax4</i>	Sim	Não	Sim	6	7p32
	<i>Pax6</i>				2	11p13

Fonte: PETERS *et. al.* (1998) com adaptações

A classificação nestes quatro grupos é baseada na presença ou ausência de duas outras seqüências conservadas, um homeodomínio e um octapeptídeo, e outras características estruturais (figura 1), ou seja, no nível da organização genômica conservada (PETERS *et. al.*,1998; OGASAWARA *et. al.*,1999). *PAX1* e *PAX9* constituem o Grupo I, com estrutura homóloga ao *Pox meso* (*Drosophila*) e ao *AmphiPAX* (*Amphioxus*) que é caracterizado pelo domínio *paired*, além de um octapeptídeo (BALCZAREK *et. al.*,1997; BREITLING *et. al.*,2000). Curiosamente não apresentam homeodomínio.

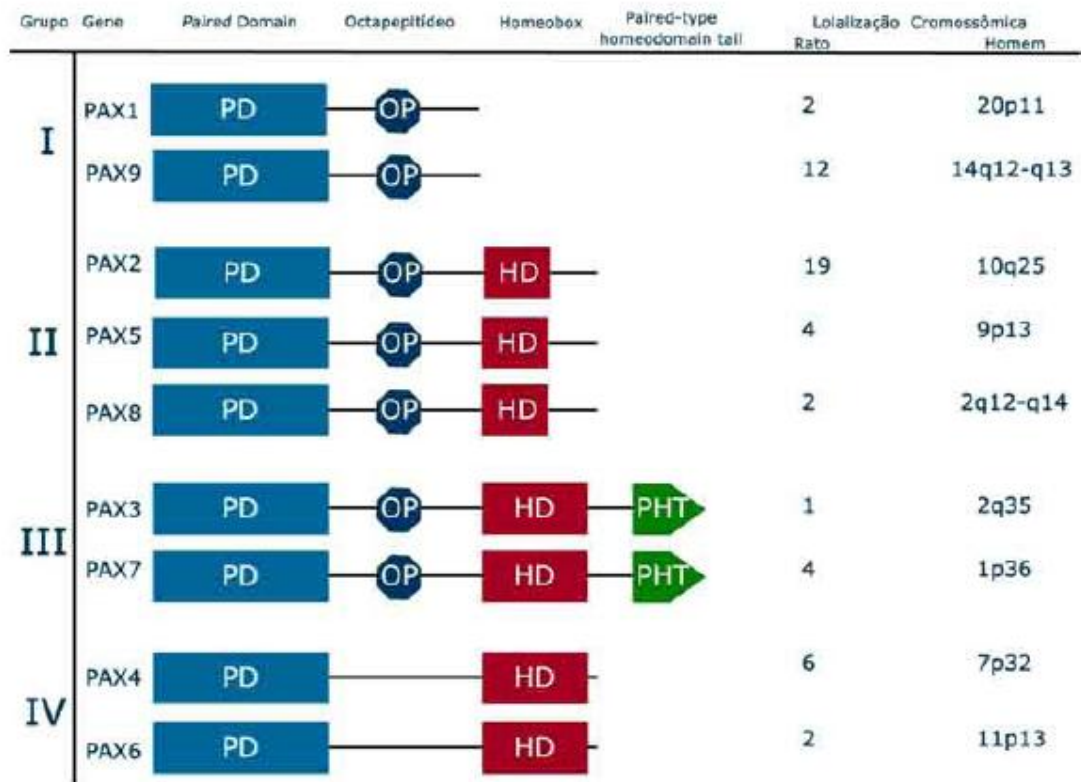


Figura 1: Esquema de classificação das subfamílias *PAX*.

Fonte: PAIXÃO-CÔRTEZ (2008).

Os 128 aminoácidos do domínio *paired* dos genes *PAX1* e *PAX9* apresentam alta similaridade (98%) (PETERS *et. al.*,1999). Também pouca variação foi observada quando as regiões codificadoras dos dois genes foram seqüenciadas (HETZER-EGGER *et. al.*,2000). Alguns estudos têm mostrado ainda que *PAX1* e *PAX9* são co-expressos e podem ter funções similares e complementares (WILM *et. al.*,1998; PETERS *et. al.*,1999). Já os grupos II (*PAX2*, *PAX5* e *PAX8*), III (*PAX3* e *PAX7*) e IV (*PAX4* e *PAX6*) apresentam tanto o domínio pareado quanto o homeodomínio. Assim como acontece com o *PAX1* e *PAX9*, a atividade de redundância funcional dos genes parálogos dentro das quatro subfamílias *PAX* parece ser um mecanismo geral que atua de maneira compensatória. Desta forma, a expressão de um contrabalançaria a não expressão do outro, levando a um fenótipo normal ou próximo do normal, pelo menos em algumas circunstâncias (PETERS *et. al.*,1999).

Um conjunto grande de estudos demonstra que estes genes têm um papel importante em inúmeras redes regulatórias (*PAX6* - desenvolvimento ocular; *PAX3* - migração da crista neural; *PAX2* - sobrevivência e morfogênese de tecidos como do fígado, orelhas e glândulas mamárias; *PAX8* - desenvolvimento da tireóide). Entretanto, a exata extensão das funções dos genes *PAX* em fenômenos biológicos relacionados ao desenvolvimento, sejam eles normais ou patológicos, bem como seus papéis em indivíduos adultos, ainda não é totalmente conhecida (tabela 2).

Tabela 2: Funções e fenótipos mutantes dos componentes da família *PAX*, em camundongos e humanos

Grupo	Gene	Domínio de expressão no Embrião	Camundongo			Homem
			Nulo	Fenótipo Heterozigotos	Homozigotos	Fenótipo Heterozigotos
I	<i>PAX1</i>	esqueleto, 3rd/4th fendas faríngeas, timo	<i>Undulated</i> ,	Normal	Hipoplasia do corpo de dos discos vertebrais	Síndrome de Klippel-Feil Síndrome de Jarcho-Levin
	<i>PAX9</i>	esqueleto, Crânio-facial, timo, glândulas paratiróides, dentes	*	Normal	Palato secundário fendido, duplicação dos dígitos anteriores, perda de dentes timo e Gld paratiróides	Oligodontia, hipodontia
II	<i>PAX2</i>	SNC, Rins	<i>Krd</i> ,	Redução dos rins, coloboma óptico	Sem rins ou trato genital, coloboma óptico	Síndrome Renal-Coloboma
	<i>PAX5</i>	SNC, Células B	*	Normal	Sem células B, Defeitos no Cerebelo e Colliculus inferior	Linfomas
	<i>PAX8</i>	SNC, Rins, Tiróide	*	Normal	Sem tiróide	Displasia da Tiróide, Carcinomas
III	<i>PAX3</i>	SNC, Crista Neural, músculos esqueléticos	<i>Spotch</i>	Falta de pigmentação	Sem músculo nos membros, falta ou hipoplasia dos derivados da crista neural, truncus arteriosus	Síndrome Waardenburg, rhabdomyosarcoma
	<i>PAX7</i>	SNC, músculos esqueléticos, Crânio-Facial	*	Normal	Falta de células musculares satélite, processo maxilar e cápsula nasal;	rhabdomyosarcoma
IV	<i>PAX4</i>	Pâncreas	-	Normal	-	Diabetes
	<i>PAX6</i>	SNC, pâncreas, Olhos	<i>Sey</i> , aniridia, *	Microftalmia corneal e defeito na íris	Sem olhos, bulbo olfatório, perda de estruturas cerebrais;	Aniridia, Cataratas

\* mutações alvo – transgênicos;

\*\* SNC: sistema nervoso central. Fonte: PAIXÃO-CÔRTEZ (2008).

### 2.3 O gene *PAX9*

O gene *PAX9* foi mapeado no cromossomo 14 (14q12-q13) em humanos (STAPLETON *et. al.*,1993). O *PAX9* possui aproximadamente 15.847 pares de bases (pb) e codifica uma proteína de 341 aminoácidos. Apresenta três íntrons, que correspondem a maior parte da sua seqüência nucleotídica (13.136 pb), duas regiões não traduzidas 5' UTR e 3' UTR e quatro exons (figura 2).



Figura 2: Esquema geral da estrutura do *PAX9*. PD: domínio *paired*. OP: octapeptídeo. 5'UTR: região 5' não traduzida. 3' UTR: região 3' não traduzida. Esquema gerado a partir dos dados de SANTAGATI *et. al.* (2001), modificado de PEREIRA *et. al.* (2006). Fonte: PAIXÃO-CÔRTEZ (2008).

O primeiro exon codifica unicamente a metionina inicial, os exons 3 e 4 são responsáveis pela região C-terminal da proteína que se supõe ser um domínio de transativação. O exon 2 codifica o octapeptídeo e o domínio *paired*. O domínio *paired* consiste de subdomínios C- e N- terminais que são estruturalmente independentes. Na metade da região N- terminal, se formam os motivos hélice-alça-hélice e um motivo alça- $\beta$  que conferem à proteína a capacidade de se ligar ao DNA (HETZER-EGGER *et. al.*,2000; STOCKTON *et. al.*,2000).

O fator de transcrição codificado pelo *PAX9*, como a maioria dos fatores de transcrição de eucariotos, provavelmente regula a expressão de dezenas de outros genes. Sua função tem sido considerada fundamental durante o desenvolvimento embrionário, pois atua na formação dos arcos branquiais, timo, glândulas paratireóides e ossos (vértebras, membros, face) (PETERS *et. al.*,1997; HETZER-EGGER *et. al.*, 2000; SANTAGATI *et. al.*; 2003).

## 2.4 O gene *PAX9* e o desenvolvimento dentário

O desenvolvimento dos dentes em vertebrados é um processo regulado temporal e espacialmente, devido a interações recíprocas entre células ectodermis e mesenquimais. Este processo envolve mais de duas dezenas de genes, que codificam uma variedade de fatores de transcrição, bem como de outras proteínas envolvidas na cascata molecular necessária para o desenvolvimento dentário normal (PETERS e BALLING, 1999; CHEN *et. al.*, 2000; THESLEFF, 2000; LINE, 2001; FRAZIER-BOWERS *et. al.*, 2002; KIST *et. al.*, 2005; MOSTOWSKA *et. al.*, 2006).

Vários estudos têm mostrado ainda que os efeitos combinatórios de um grupo de genes mestres formam gradientes e geram sub-regiões específicas. Esta rede regulatória é responsável por uma segmentação molecular, que resulta na formação, um tanto quanto independente, dos diferentes tipos de dentes encontrados, por exemplo, nos mamíferos (molares, pré-molares, caninos, incisivos). A perda total de um conjunto de dentes, mas não de outros, pode desta forma, ser explicada por esta segmentação genética ou modularidade (PETERS e BALLING, 1999; CHEN *et. al.*, 2000; LINE 2003; KIST *et. al.*, 2005; PERES, 2005).

Os estudos de mutações que provocam agenesia de dentes em humanos e camundongos (PETERS e BALLING, 1999; CHEN *et. al.*, 2000; KIST *et. al.*, 2005) conjuntamente fornecem sólidas evidências de que o gene *PAX9* teria papel destacado na rota genética da odontogênese. Além disso, demonstram através de abordagens que utilizam modelos animais, que alterações no *PAX9* estariam definitivamente relacionadas ao estabelecimento de diferentes fórmulas dentais, o qual estaria relacionado com as forças direcionadoras, as quais permearam a diversificação de inúmeras espécies, incluindo os mamíferos (KIST *et. al.*, 2005).

## 2.5 Evolução molecular do *PAX9*

Pereira *et. al.* (2006) avaliaram a possibilidade do gene *PAX9* estar envolvido em alterações dentárias normais encontradas na nossa e em outras espécies de primatas. Para isso foram seqüenciados todos os 4 exons do gene *PAX9* (1026 pb) em 86 indivíduos (europeus, asiáticos e ameríndios). Neste trabalho foi possível demonstrar que as variações na nossa espécie estavam praticamente limitadas ao exon 3. Os resultados mostraram que a seleção purificadora estaria atuando no

*PAX9*. Merece destaque, no entanto, que nos humanos foi detectada uma mutação G-C no exon 3 que resulta numa mudança não sinônima (alanina-prolina) na posição 240 da cadeia de aminoácidos, com distribuição polimórfica em todos os grupos humanos estudados. A presença do aminoácido prolina, numa região de alfa-hélice, poderia ser detrimental para a proteína em si, mas vantajosa em nível do organismo, já que poderia levar à agenesia dos terceiros molares. Assim, a presença do alelo derivado C/Pro resultaria numa redução no número de dentes e isso poderia ter tido alguma vantagem ao longo da trajetória evolutiva dos hominídeos, particularmente após mudanças importantes da dieta, como o hábito de comer alimentos cozidos (PEREIRA *et. al.*, 2006). Estes resultados demonstraram que um gene conservado pode deixar de sê-lo em algum(ns) ramo(s) de uma dada filogenia.

Além disso, o exon 3 poderia ser uma janela evolutiva num gene extremamente conservado. O conceito da janela evolutiva implica numa situação onde as mutações em um fator de transcrição incidem somente sobre um exon específico, pois esta região não estaria sob pressão de restrições funcionais. O relaxamento da seleção natural sob este exon em especial e a preservação de outras regiões do gene, promoveria, desta forma, a manutenção da função original, promovendo a transcrição de outros genes, mas poderia alterar o seu leque de atuação. Este último aspecto poderia representar uma forma alternativa de evolução molecular dentro de uma família gênica. Normalmente, a proliferação que resulta em famílias gênicas fornece material para inovações funcionais desde que após a duplicação de um dado gene, uma de suas cópias preserve sua função original enquanto outra acumule mutações que sob determinadas circunstâncias poderiam ser selecionadas e fixadas (WANG e GU, 2001).

Demonstrou-se que determinados exons de um gene específico também poderiam estar “livres” para acumular mutações, desde que outros exons do gene preservassem algumas das funções primordiais do gene como um todo (PEREIRA *et. al.*, 2006). Em fatores de transcrição, como é o caso do *PAX9*, tais alterações manteriam a estrutura tridimensional e não acarretariam modificações nos sítios ativos, preservando a função geral da proteína. Contudo, sutis alterações seriam suficientes para interromper a interação entre o fator de transcrição e alguns genes ou proteínas de sua via de atuação, gerando epistasia restrita. Como resultado, fenótipos específicos seriam gerados.

Frazier-Bowers *et. al.* (2002), estudando vários indivíduos afetados por oligodontia grave dos molares, seqüenciaram a região codificadora do *PAX9* (exons 2,3,4) e observaram em todos os pacientes uma mutação na posição do nucleotídeo 793 (exon 4) que resultava na terminação prematura da transcrição. Segundo esses autores, a descoberta desta mutação é particularmente importante porque esta foi a primeira vez que uma mutação no gene *PAX9* associada a uma anomalia dentária teria sido localizada fora do exon 2.

As mutações no *PAX9* humano oferecem uma oportunidade única de investigar como essas alterações modificam as funções dos genes e resultam no fenótipo dentário. A maioria das mutações está localizada no *paired-domain* (exon 2) (KAPADIA *et. al.*, 2007). Quanto ao efeito funcional das mutações, poderia-se dizer que as proteínas mutantes, especialmente aquelas resultantes de uma alteração de leitura (frameshift) ou de uma alteração de aminoácidos (nonsense mutation), poderiam resultar numa perda total de função (STOCKTON *et. al.*, 2000; DAS *et. al.*, 2002; KLEIN *et. al.*, 2005; MOSTOWSKA *et. al.*, 2006; TALLÓN-WALTON, 2007). Isso poderia implicar em haploinsuficiência e poderia ser a causa da agenesia dentária. Estudos recentes de proteínas mutantes mostram que a perda da ligação do DNA pode explicar mudanças na função (KAPADIA *et. al.*, 2006; OGAWA *et. al.*, 2006). Entretanto, os mecanismos precisos para o desenvolvimento da agenesia dentária permanecem não evidentes (WANG, 2008).

Esse conjunto de estudos envolvendo o *PAX9* mostra a amplitude de possibilidades envolvendo esse gene e o quanto ele pode estar envolvido em questões instigantes relativas a modificações morfológicas na nossa espécie.

## 2.6 Os genes *MSX*

Os genes *MSX* fazem parte de uma classe de genes homeóticos cujos produtos controlam a identidade posicional nos padrões corporais e a morfogênese ao longo do desenvolvimento. Foram inicialmente descobertos em espécies do gênero *Drosophila*, onde se pode observar que alterações nesses genes e/ou em suas expressões resultavam em transformações homeóticas, nas quais uma estrutura corporal substitui outra. Observaram, por exemplo, que patas poderiam surgir no lugar de antenas e mandíbulas (HEWITT *et. al.*, 1991, GEHRING, 2001, FERRIER *et. al.*, 2003).



Em vertebrados, os genes *MSX* compartilham grande homologia com o gene *msh* de *Drosophila*, sendo encontrados fisicamente separados ao longo do genoma. A família *MSX* nos vertebrados é composta por três membros: *MSX1* (*Msh homeobox 1-like (HOX7)*), *MSX2* (*Msh homeobox 2-like (HOX8)*), *MSX3* (*Msh homeobox 3-like*), sendo os dois primeiros os mais estudados até o momento. *MSX1* e *MSX2* são expressos em domínios sobrepostos tanto espacialmente quanto temporalmente durante o desenvolvimento do tubo neural e membros. Além disso, esses genes são fortemente expressos na região craniofacial, indicando um papel central dos mesmos na formação dessas estruturas, incluindo os dentes (HU *et. al.*, 2001; ALAPPAT *et. al.*, 2003; FINNERTY *et. al.*, 2009).

Camundongos nocauteados, independentemente, para os genes *msx1/msx2* exibem defeitos na ossificação das suturas calvárias, dentes, orelhas, membros, pelos e glândulas mamárias; resultado que demonstra que estes genes possuem padrão de expressão similar. Essa redundância, no entanto, parece estar restrita às fases iniciais do desenvolvimento, já que mutantes para cada um dos genes apresentam fenótipos específicos. Camundongos mutantes para o *msx2* apresentam a ossificação das suturas calvárias atrasada ou incompleta e dentes com defeitos no esmalte, enquanto camundongos mutantes para o *msx1* são incapazes de levar ao término do desenvolvimento dos dentes (PETERS *et. al.*, 1999; ALAPPAT *et. al.*, 2003; FLEISCHMANNOVA *et. al.*, 2008; FINNERTY *et. al.*, 2009)

O gene *MSX1* humano, localizado no cromossomo 4, possui dois exons, o exon 1 de 704 pb e o exon 2 de 1229 pb, separados por um íntron de 2332 pb (Figura 3). No exon 2, localiza-se o homeobox, ou seja, o domínio de ligação do DNA, estrutura conservada de aproximadamente 60 aminoácidos (GALLIOT, 1999). Possui ainda duas regiões de transcrições primárias, ambas com 1933 pb, uma com o códon de iniciação na posição 236 e a outra na posição 254. Dessa forma, dois polipeptídeos de 303 e 297 aminoácidos são produzidos, respectivamente.



Figura 3: Esquema geral da estrutura do *MSX1*. Esquema gerado a partir dos dados de PAWLOWSKA *et. al.* (2009).

A proteína *MSX1* com capacidade de se ligar ao DNA está envolvida em muitas interações eptélio-mesenquimais que ocorrem durante a embriogênese dos vertebrados, incluindo a odontogênese e outros padrões crânios-faciais (KOLLAR, 1970; THESLEFF, 1995, FINNERTY *et. al.*, 2009, PAWLOWSKA *et. al.*, 2009). Durante a odontogênese, o gene *MSX1* age como repressor da transcrição de outros genes, interagindo ainda com a proteína *PAX9* além de outras (VIEIRA *et. al.*, 2004; OGAWA *et. al.*, 2006).

A proteína *MSX1* é encontrada em altos níveis no mesênquima mandibular e maxilar desde o estágio de iniciação, destacando-se na região em contato com o botão dental até o estágio de capuz, estando menos presente no estágio de sino (MAAS e BEI, 1997). Nas regiões posteriores do palato em desenvolvimento, no entanto, não é observada a expressão do gene *MSX1* (ZHANG *et. al.*, 2002).

Pessoas com mutações no gene *MSX1* apresentam o palato secundário e/ou lábio fendido e agenesia dentária, preferencialmente ausência de segundo pré-molar superior e inferior e primeiro molar superior (PAWLOWSKA *et. al.*, 2009). No entanto, alterações no *MSX1* também já foram associadas com agenesia de segundo pré-molares e terceiros molares (VASTARDIS *et. al.*, 1996).

No estudo de Vastardis *et. al.* (1996) foi descrito uma troca de C→A na posição 752 do exon 1 do gene *MSX1*. Tal alteração criava um códon de parada e seria a responsável pela agenesia dentária ou lábio e/ou palato fendido em 12 indivíduos de uma mesma família. Todos eram heterozigotos para esta mutação. Outra mutação, porém no exon 2 (rs10213286), que acarreta troca de aminoácido Arg→Pro na posição 239, foi associada à agenesia de múltiplos dentes (VASTARDIS e cols, 1996, VAN DEN BOOGARD *et. al.*, 2000). Além dessas, várias outras mutações no gene *MSX1* que resultam em troca de aminoácidos ou alteração no quadro de leitura também tem sido descritas (HEWITT e cols, 1991, LIDRAL e

REISING, 2002; MOSTOWSKA *et. al.*, 2006; CHISHTI *et. al.*, 2006; XUAN *et. al.*, 2008; KIM *et. al.*, 2006).

Estes achados confirmam a importância do gene *MSX1* para o desenvolvimento normal da dentição humana, tornando-o um bom gene candidato para investigações que buscam desvendar as causas genéticas das agenesias comuns, ou não sindrômicas.

## **2.7 O desenvolvimento dentário e suas alterações**

A dentição humana desenvolve-se a partir de um longo processo que inicia-se durante o segundo mês da embriogênese e completa-se durante a adolescência quando os terceiros molares erupcionam. O processo é regulado por interações teciduais e por redes genéticas similares a outros órgãos ectodermis e envolve mecanismos interativos e auto-organizacionais essenciais para a formação de uma série de características dos dentes, sua forma e sua renovação (JERNVALL e THESLEFF, 2000; THESLEFF e NIEMINEN; 2006, KAVANAGH *et. al.*; 2007 APUDE NIEMINEN, 2009).

Vários tipos de anomalias são comuns em dentes e incluem anormalidades no esmalte e na dentina, na forma e no tamanho dos dentes assim como no número de dentes (THESLEFF e PIRINEN; 2006). Falhas no desenvolvimento normal dos 20 dentes decíduos e dos 32 permanentes estão entre as anomalias mais comuns de desenvolvimento e são denominadas de agenesia dentária (NIEMINEN, 2009).

## **2.8 Agenesia Dentária**

A agenesia dentária é classificada como uma condição clinicamente heterogênea que afeta muitas combinações de dentes. É a anomalia de desenvolvimento mais comum em humanos, ocorrendo entre 2 e 20% da população, excluindo os terceiros molares (KAPADIA *et. al.*, 2007). Esta desordem ocorre mais freqüentemente de forma bilateral e simétrica e mais na dentição permanente do que na decídua.

A agenesia dentária pode ocorrer como parte de uma síndrome afetando um sistema múltiplo de órgãos, ou pode estar presente em um padrão familiar isolado. A forma não sindrômica mais comum diagnosticada é a hipodontia, que é definida

como a ausência congênita de menos de seis dentes permanentes, enquanto que a forma rara, denominada oligodontia, é definida como a ausência de seis dentes ou mais (excluindo os terceiros molares). A forma não-sindrômica da agenesia pode ser esporádica ou familiar. A agenesia dentária familiar é herdada através da forma autossômica dominante, mas a forma autossômica recessiva e formas ligadas ao cromossomo X também têm sido relatadas (AHMAD *et. al.*, 1998; ERPENSTEIN, 1967).

## 2.9 Frequência da Agenesia Dentária

Mais de 20% dos humanos falham em desenvolver pelo menos um dos terceiros molares e 3 a 10% não formam outro dente permanente (ARTE, 2001, POLDER *et. al.*, 2004). Excluindo os terceiros molares, a agenesia de três ou mais dentes permanentes é observada em 1% e de pelo menos seis dentes em aproximadamente 0,1% da população de origem européia. A agenesia dentária na dentição decídua é rara com a prevalência de menos de 1% em europeus e seus descendentes (ARTE *et. al.*, 2001).

A frequência da agenesia é similar nos lados direito e esquerdo, e também quando calculada para os dentes superiores e inferiores. Entretanto, quando calculada para os dentes individualmente, em arcadas diferentes, a frequência difere (NIEMINEN, 2009).

Outros estudos, por sua vez, têm indicado que a prevalência da agenesia dentária (exceto a dos terceiros molares) varia de 5% a 10% em populações européias e asiáticas (ARTE, 1996). Os dentes mais afetados são os segundos pré-molares (3,4%) seguidos dos incisivos laterais superiores (2,2%) (SYMONS *et. al.* 1993). A agenesia de primeiros e segundos molares é extremamente rara.

A agenesia ou hipodontia de pelo menos um dente e a má posição dos caninos, em humanos, também são anomalias conhecidas por ocorrer concomitantemente e com frequência (PECK, PECK e KATAJA, 2002).

A prevalência de agenesia dentária parece ser menor na América do Norte do que na Europa e na Austrália (*p value* = 0.0007) e parece ser 1.37 vezes maior nas mulheres do que nos homens. Os dentes mais afetados são os segundos pré-molares inferiores, seguidos dos incisivos laterais superiores e dos segundos pré-molares superiores (POLDER *et. al.*, 2004).

Entre japoneses e chineses, a agenesia do incisivo inferior é mais comum do que entre europeus (GOYA *et. al.*, 2008).

Pequenas diminuições na média das dimensões mesio-distal dos dentes têm sido relatadas mesmo quando associadas com a agenesia dos terceiros molares. Outras diminuições significativas, assim como correlações entre o número de dentes faltantes e a extensão da redução de tamanho são associadas com a agenesia de outros dentes (NIEMINEN, 2009).

## **2.10 Etiologia da agenesia dentária**

O desenvolvimento dentário pode ser influenciado por diversos fatores externos, entre eles estão: tratamento com radioterapia em crianças com câncer, quimioterapia, transplante de células-tronco e exposição à dioxina. As alterações dentárias incluem agenesia (associado à dioxina), microdontia, atraso no desenvolvimento, anomalias radiculares, defeitos de calcificação e a dieta do homem moderno. A idade em que o tratamento é realizado vai determinar os dentes que serão afetados (NIEMINEN, 2009).

O papel da genética na etiologia da agenesia dentária é identificado pela ocorrência familiar, estudos em gêmeos, prevalência em diferentes populações, associação com síndromes hereditárias e, mais convincentemente, através da identificação de defeitos genéticos como já foi visto em exemplos citados em itens anteriores (NIEMINEN, 2007).

A genética molecular alavancou a busca pelas causas genéticas da agenesia dentária. Até agora o maior progresso foi realizado em relação à associação com síndromes e agenesias severas não sindrômicas em famílias.

Os primeiros genes identificados para a agenesia dentária não-sindrômica foram os fatores de transcrição *MSX1* e *PAX9* (VASTARDIS *et. al.*, 2000; STOCKTON *et. al.*, 2000).

A similaridade do fenótipo da agenesia parcial como resultado de deleções e outros tipos de mutações sugerem que as mutações causem perda da função de um dos alelos (DAS *et. al.*, 2002; NIEMINEN *et. al.*, 2003; LAMMI *et. al.*, 2003). Isto é suportado por evidências experimentais que mostram que a proteína mutante é incapaz de se ligar a uma seqüência conhecida da fita de DNA ou de ativar a transcrição (MENSAH, 2004; KAPADIA, 2006). Mutações que provocam uma parada

de leitura (stop códons) criando defeitos no exon 1 do *MSX1* e no exon 2 do *PAX9* podem fazer o mRNA carregar a mutação suscetível a degradação, pelo mecanismo de decaimento mediado pela perda de sentido, mas esse tem sido mostrado apenas para a mutação que afeta a junção exon 2-intron 2 do *PAX9*.

Esses resultados sugerem fortemente que o efeito principal das mutações é a redução da quantidade da proteína funcional, demonstrando haploinsuficiência desses genes para o desenvolvimento dentário. O conjunto dos fenótipos associados com as mutações no *MSX1* e no *PAX9* mostra que embora exista uma variação considerável nas famílias e nos pacientes, estes têm padrões típicos e diferentes para cada gene (KIM *et. al.*; 2006, NIEMINEN, 2007). Apesar de ambos os genes afetarem o terceiro molar, uma frequência significativamente maior de agenesia foi encontrada para o segundo pré-molar e primeiro pré-molar superiores associada com mutações no *PAX9* e no *MSX1*. Por outro lado a agenesia dos primeiros e segundos molares superiores e dos segundos molares inferiores foi significativamente mais comum em associação com defeitos no *PAX9*. Geralmente os incisivos superiores e os incisivos inferiores são afetados. Interessantemente, alguns relatos de mutações no *MSX1* descrevem a ocorrência de agenesia dos primeiros molares permanentes enquanto os segundos molares permanentes tenham se desenvolvido. A agenesia de dentes decíduos tem sido relatada em poucos casos associada às mutações no *PAX9* (NIEMINEN, 2009).

Muitos tipos de agenesia dentária podem ter sido causados por mecanismos quantitativos que afetam especialmente os dentes que se desenvolveram por último no seu grupo dentário. Nos termos da Teoria Morfogenética clássica do desenvolvimento dentário isto pode levar à exaustão ou à mudança na força do campo ou potencial odontogênico. Historicamente, a redução do tamanho da lâmina dental ou de germes dentários tem sido considerada como causa da agenesia. Segundo o pensamento atual baseado em estudos genéticos e moleculares do desenvolvimento dentário, a agenesia dentária é uma consequência de um defeito quantitativo ou qualitativo na função da cadeia genética, a qual regula o desenvolvimento dentário (THESLEFF, 2006). O entendimento de uma falha regulatória como uma causa da agenesia está de acordo com os conceitos clássicos da morfogenética e com os da auto-organização das populações de células. Entretanto, como foi demonstrado pela variabilidade de fenótipos associados com a perda da função causada pelas mutações em diferentes genes regulatórios, defeitos

quantitativos de regulação não afetam necessariamente apenas os últimos dentes em desenvolvimento, mas, por exemplo, afetam o equilíbrio da cascata do desenvolvimento dentário podendo levar a fenótipos muito mais complexos (KAVANAGH *et. al.*, 2007).

Até o momento, Kapadia *et. al.* (2007), e outros autores identificaram 11 diferentes mutações no gene *PAX9* e 5 mutações no gene *MSX1* que resultam em agenesia dos dentes posteriores. A maioria destas mutações está localizada no domínio *paired* do *PAX9* e no homeodomínio do *MSX1*. (VASTARDIS, 1996; STOCKTON *et. al.*, 2000; VAN DEN BOOGARD *et. al.*, 2000; NIEMINEN, 2001; FRAZIER-BOWERS *et. al.*, 2002; DAS *et. al.*, 2002 e 2003; MOSTOWSKA *et. al.*; 2003).

Enquanto têm se demonstrado que mutações no *PAX9* e no *MSX1* estão envolvidas na agenesia dentária em humanos, está se tornando cada vez mais evidente o papel de outros genes nesse processo. Essa idéia é suportada por motivos, tais como a classificação encontrada na literatura de que a agenesia dentária ocorre através de padrões específicos: um padrão de ausência posterior, de molares e pré-molares; um padrão anterior envolvendo agenesia de caninos e incisivos e um padrão misto com ausência de pré-molares e incisivos laterais (VASTARDIS, 2000). No entanto, a apresentação clínica da agenesia dentária sugere, claramente, que diferentes genes estão envolvidos na formação de cada grupo de dentes. Suportando essa teoria, resultados de inúmeros estudos em ratos sugerem que distintos padrões de sinalização moleculares envolvem combinações de fatores de transcrição e de crescimento, criando padrões de dentição (SHARPE e YOUNG, 2005; TUCKER e SHARPE, 2004). Além disso, estudos como o de Kapadia *et. al.* (2007), mostram que muitas famílias com padrão de agenesia de dentes posteriores não apresentaram mutações nos genes *PAX9* e *MSX1*, o que sugere que outros genes ainda não identificados contribuem para a agenesia de dentes posteriores. Segundo Kapadia *et. al.* (2007), a identificação de novos genes e mutações responsáveis pela agenesia de dentes posteriores pode ser feita através de mapeamento genético.

## 2.11 Morfogênese Dentária

A formação da dentição dos mamíferos é um dos processos marcantes no desenvolvimento e proporciona um modelo poderoso para o estudo das interações epitélio-mesenquimais que controlam o padrão e a morfogênese de uma variedade de processos do desenvolvimento. A aplicação de inúmeras estratégias *in vivo* e *in vitro* em ratos foi capaz de melhorar o entendimento de um mecanismo molecular intrincado que influencia os padrões da dentição. O desenvolvimento dentário apresenta-se como uma série complexa de interações genéticas que constitui-se de fatores de crescimento, fatores de transcrição, sinais receptores e hormônios, os quais interagem entre eles independentemente dos padrões de sinalização (THESLEFF, 2003) (figura 4).

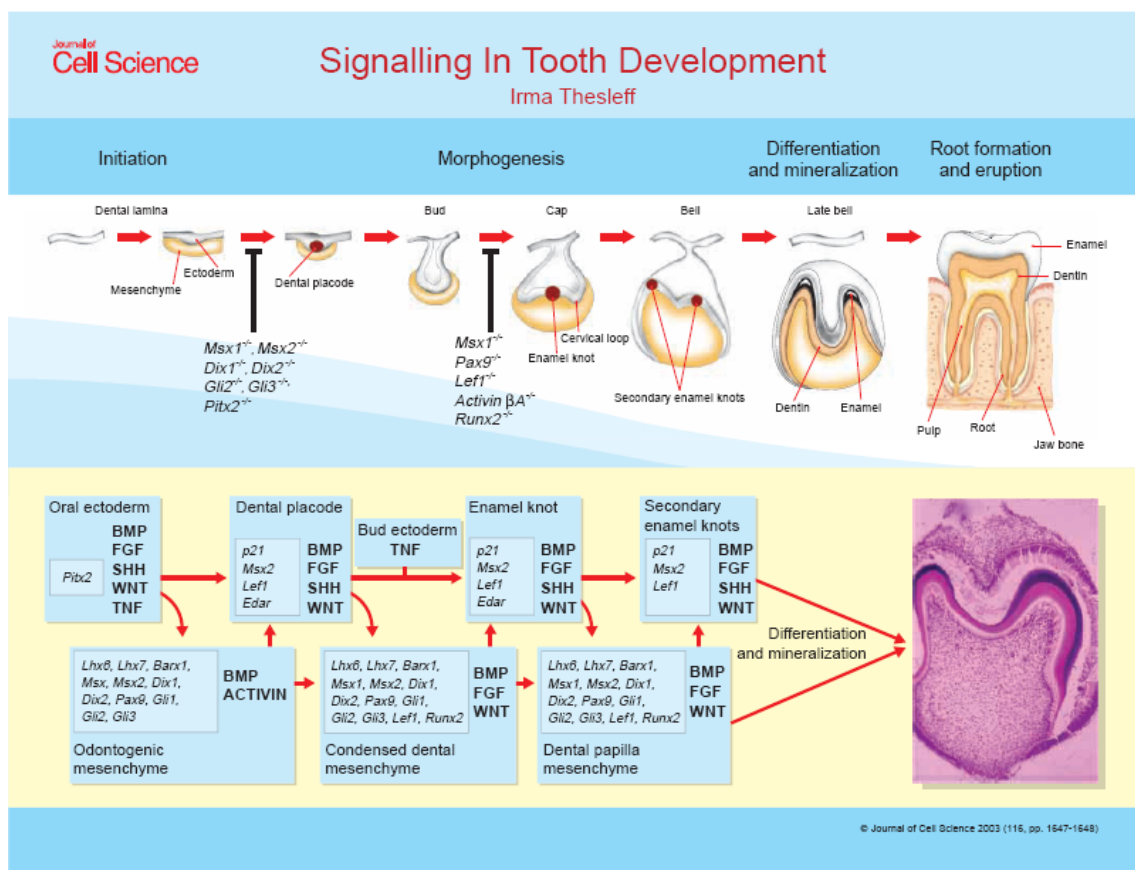


Figura 4: A sinalização no desenvolvimento dentário.

Fonte: THESLEFF, 2003.

Avanços têm sido realizados a fim de que se compreendam os mecanismos que determinam o local onde se inicia a formação do dente (PETERS e BALLING,



1999; JERNVALL e THESLEFF, 2000). Muitos estudos indicam que interações sinérgicas e antagonistas de moléculas sinalizadoras são utilizadas no desenvolvimento dentário. Este fato leva a ativação ou inibição de fatores de transcrição no epitélio dentário e no mesênquima (PETERS e BALLING, 1999).

Como já visto, o *PAX9* tem um importante papel durante o desenvolvimento dentário, como indicado pelo seu padrão de extensão, o fenótipo de ratos transgênicos com ausência de ambas as cópias do gene, e pela associação de agenesia da dentição posterior com mutações do *PAX9* em humanos (STOCKTON, 2000; PETERS e BALLING, 1998). Em embriões de ratos, o *PAX9* é um marcador inicial do desenvolvimento dentário, aparecendo no 10<sup>o</sup> dia no mesênquima antes do espessamento do ectoderma e antes da expressão de outros genes sinalizadores dentários. Altos níveis de expressão do *PAX9* são mantidos subseqüentemente durante a iniciação, nos estágios de botão e de capuz e são regulados para menos no estágio de campânula (PETERS e BALLING, 1998). A expressão mesenquimal do *PAX9* é regulada inicialmente pelos sinais antagonistas entre *Bmp4* e *Fgf8*. Enquanto o sinalizador *Bmp4* é inibitório e o *Fgf8* está ativado e a interação da dupla interação antagonista é mediada por esses dois sinalizadores moleculares epiteliais que restringem a expressão do *PAX9* a lugares específicos do desenvolvimento dentário. O *Bmp4* também é expresso no mesênquima, mas esta expressão ocorre mais abaixo na cadeia do *PAX9*.

Assim como outros membros da família *PAX* agem de maneira altamente específica nos tecidos, o *PAX9* parece mediar funções específicas nos dentes enquanto interage com outras proteínas. Muitos estudos mostram uma importante relação entre a proteína do domínio *paired* *PAX9* e a homeoproteína *MSX1* na regulação da expressão do gene no mesênquima dental. Estudos recentes de Kapadia *et. al.* (2007), mostram que o *PAX9* sozinho pode transativar os promotores do *MSX1* e do *Bmp4* e que a interação do *PAX9* com o *MSX1*, em nível de proteínas, é que modula essa transativação. Portanto, o *PAX9* parece estar integrado com o *MSX1* num “feedback loop” para regular a expressão do *Bmp4* no mesênquima. Isto é crítico para o avanço do estágio de botão do dente, já que o *Bmp4* está envolvido nos eventos sinalizadores da cadeia os quais são necessários pra a formação do nó do esmalte, um centro de sinalização transiente do epitélio que direciona para o próximo estágio de desenvolvimento (estágio de capuz). Kapadia *et. al.* (2007), apresentam a hipótese de que uma função chave do *PAX9* e do *MSX1*

é a manutenção e a regulação da expressão mesenquimal do *Bmp4* e que esta regulação envolve não somente o fator de ativação de ligação e transcrição do DNA, mas também uma interação em nível de proteína do *PAX9* com o *MSX1* e outras proteínas do homeo-domínio que são expressadas no mesênquima dental.

De acordo com Kist *et. al.* (2005), mudanças nos níveis de expressão do *PAX9* causam uma consequência direta no padrão dentário dos mamíferos e que uma dosagem mínima do gene *PAX9* é necessária a fim de que aconteça a diferenciação e morfogênese normal durante o desenvolvimento dentário.

### **2.12 Implicações clínicas**

As consequências da agenesia dentária incluem maloclusão devido à posição inadequada dos dentes adjacentes, deficiência de crescimento do processo alveolar associado à ausência dentária e excesso de espaço no arco dentário. A disponibilidade de espaço causa inclinação e supra-erupção dos dentes adjacentes ou antagonistas. Quando a agenesia se manifesta nos dentes posteriores pode-se observar a diminuição do osso alveolar em altura. Apesar dos dentistas clínicos observarem por muito tempo a agenesia dentária, o diagnóstico precoce, as medidas preventivas e interceptativas, e as opções de tratamento ainda apresentam limitações. A terapia é complicada e lenta, envolvendo pelo menos três especialidades da Odontologia, a Ortodontia, a Implantodontia e a Prótese. A Cirurgia também é uma especialidade envolvida quando há necessidade de enxertos ósseos nas regiões afetadas pela diminuição do osso alveolar em altura, o que muitas vezes, impossibilita a realização de implantes dentários no local.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Levantamento das amostras e construção do banco de dados**

Os dados de 360 pacientes do Curso de Especialização em Ortodontia e de consultório particular foram coletados em relação à presença ou não de agenesia e transferidos para uma planilha do software Excel (Microsoft Office)(anexo A). A agenesia dentária foi confirmada pelo exame das radiografias panorâmicas e pela história clínica pregressa do paciente. Na coleta de dados foram incluídos os pacientes que fizeram parte da amostra e tinham algum tipo de ausência congênita. Os dados foram analisados pelo software SPSS versão 16 e a partir deste, foram gerados os gráficos e as tabelas.

### **3.2 Seleção das amostras**

A seleção dos pacientes para a realização da pesquisa foi feita a partir da análise de radiografias panorâmicas de pacientes do Curso de Especialização em Ortodontia na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e de consultório particular. A presença de agenesia dentária foi observada nas radiografias e confirmada através de um exame clínico em 360 pacientes. A idade dos pacientes da amostra variou entre 12 e 38 anos de idade, uma vez que o terceiro molar é visualizado nas radiografias, em média, apenas após os 9 anos de idade.

Os critérios de inclusão da amostra selecionada para a coleta de DNA consistiram em: pacientes leucodermas com ausências dentárias, não-portadores de síndromes ou doenças sistêmicas e sem história de traumatismo dentário prévio.

Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

A coleta de saliva dos pacientes da amostra foi realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e em consultório particular. As amostras foram analisadas e os procedimentos laboratoriais da pesquisa foram executados no Departamento de Genética, no Instituto Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 3.3 Procedimento para a coleta das amostras

Inicialmente, os pacientes foram instruídos a realizar a escovação dos dentes com a finalidade de provocar a descamação das células dos tecidos moles da cavidade bucal. A coleta de 600 microlitros de saliva dos pacientes, foi obtida através do ato de cuspir em um microtubo de 1,5 ml (Eppendorf). Este recipiente foi imediatamente tamponado, identificado e colocado em congelador para garantir a manutenção das características da amostra e de transporte até a sua análise.

### 3.4 Extração de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizado o protocolo usado no Departamento de Genética através do kit QIAamp DNA mini Kit da Qiagen, e o procedimento foi feito conforme recomendações descritas pelo fabricante.

#### Protocolo

- 1º) Pipetar 20 µl de proteinase K no fundo de um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 2º) Adicionar 200 µl da amostra no tubo de centrifugação.
- 3º) Adicionar 200 µl de buffer AL à amostra. Misturar em vórtex por 15 segundos.
- 4º) Incubar a 56°C por 10 min.
- 5º) Centrifugar brevemente o tubo de 1,5 ml para microcentrífuga para remover pequenas quantidades de líquido da parte de dentro da tampa.
- 6º) Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) à amostra e misturar novamente um pulso no vórtex por 15 segundos. Depois de misturar, centrifugar brevemente o tubo 1,5 ml para microcentrífuga para remover pequenas quantidades de líquido de dentro da tampa.
- 7º) Aplicar cuidadosamente a mistura do passo 6 para o *QIAamp spin columns* (tubo de 2 ml da coleção) sem molhar a borda do tubo, fechar a tampa e centrifugar a 6000xG (8000 rpm) por 1 min. Colocar o *QIAamp spin columns* em um tubo da coleção (fornecido) de 2 ml limpo e descartar o tubo contendo o líquido filtrado.
- 8º) Abrir cuidadosamente o *QIAamp* e adicionar 500 µl do buffer AW1 (solução de lavagem) sem molhar a borda do tubo. Fechar a tampa e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar *QIAamp* em um tubo fornecido de 2 ml limpo e descartar o tubo de coleção que contém o líquido filtrado.

9º) Abrir cuidadosamente o *QIAamp* e adicionar 500 µl de buffer AW2 (solução de lavagem) sem molhar a borda do tubo. Fechar a tampa e centrifugar a alta velocidade (20000xG, 14000 rpm) por 3 minutos.

### 3.5 Reação de Amplificação (PCR)

A Reação em cadeia da polimerase é um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucleico). A amplificação dos exons 2, 3, 4 do *PAX9* e do exon 2 do *MSX1* foi feita em um volume total de 25µl por reação, 50 pmol de cada primer, PCR Master Mix segundo especificações dos fabricantes e 100 ng de DNA genômico (tabela 3). O PCR foi realizado nas seguintes condições: 35 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 58°C – 59°C e a extensão a 72°C.

A duração de cada passo dos ciclos foi de 50 segundos, com exceção do primeiro passo de desnaturação com 2 minutos, e da última etapa de extensão de 10 minutos. Ajustes nas condições de amplificação, particularmente relacionadas a temperatura de anelamento, foram realizados sempre que necessário. O resultado foi analisado através de uma eletroforese em gel de agarose.

Tabela 3: Primes utilizados na Reação de Amplificação ( PCR). Porto Alegre, 2009.

Primers	Sequências	Tamanho esperado(pb)	Design
Exon 3 - <i>PAX9</i>	Forward 5´-GTGGGTCAGAGAATTTGGAA-3´ Reverse 5´-CACGAAGGATCTGGCTCGT-3´	590	PEREIRA <i>ET.</i> AL. (2006)
Exon 2- <i>PAX9</i>	Forward 5´ - CCAGCCTTCGGGGAGGTGAA - 3´ Reverse 5´-GACGCTGCACATCCACACG - 3´	640	PAIXÃO- CÔRTEES (2008)
Exon4- <i>PAX9</i>	Forward 5´ - AGGCACCAAATGGTCTCCCAGCTGT -3´ Reverse 5´ - GAAGCCGTGACAGAATGACTA - 3´	247	PAIXÃO- CÔRTEES (2008)
Exon 2 – <i>MSX1</i>	Forward 5´ - AAGTCCGCCAGAAGCAGTA 3´ Reverse 5´ACATCTGTGTTTTCCCTGCC 3´	698	XUAN(2008)

### 3.6 Seqüenciamento do DNA

As purificações dos produtos amplificados foram feitas com as enzimas Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* comercializadas pela *GE Healthcare* seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O seqüenciamento de ambas as fitas de DNA foi realizado através dos equipamentos ABI3730XL de acordo com condições descritas pelos fabricantes.

### 3.7 Análise de dados

Análise Molecular:

As seqüências foram analisadas quanto à qualidade dos cromatogramas utilizando-se os programas Phred, Phrap e Consed. Adicionalmente, todos os cromatogramas foram visualizados e conferidos manualmente. Nesta análise buscou-se possíveis mutações na seqüência de nucleotídeos. Quando foram encontradas alterações nos indivíduos, essas foram anotadas e os genótipos foram montados. Todas as alterações foram checadas quanto ao seu registro nos bancos de dados de genoma ( Ensembl, UCSC Genome Browser) e nos bancos de SNPs (dbSNP,

Hapmap). Nestes sites, quando a mutação já era conhecida, obteve-se um número de registro do SNP(rs) e a posição real do nucleotídeo alterado no cromossomo.

Análise da frequência da agenesia:

Com as informações levantadas nas fichas dos pacientes submetidos a tratamento ortodôntico, foi montado um banco de dados a planilha Excel. Foram feitos cálculos de estatísticas descritivas de frequências e de porcentagens das agenesias dentárias utilizando-se o programa SPSS (versão 16). Neste programa também foram feitos testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e Chi-quadrado) para comparar diversas variáveis da amostra.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise do levantamento de dados da freqüência da agenesia dentária em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico

Ao analisar os dados obtidos através do levantamento realizado nas fichas clínicas dos pacientes (N= 360), os quais foram confirmados, quanto à presença ou não de agenesia, através do histórico odontológico e do exame de radiografias panorâmicas, observou-se um cenário de agenesias dentárias distribuídas em porcentagens de ausências de dentes individualmente ou em grupos.

Em relação à ausência dos terceiros molares superiores e inferiores, notou-se que o dente que apresentou maior porcentagem de agenesia foi o 38 (terceiro molar inferior esquerdo) com 15,28%. Em seguida apareceram o dente 18 (terceiro molar superior direito) com 14,17%, o dente 48 (terceiro molar inferior direito) com 13,06% e o dente 28 (terceiro molar superior esquerdo) com 12,78% (figura 5).

Na arcada superior, excluindo os terceiros molares, os dentes que apresentaram maior freqüência de agenesia foram os incisivos laterais. O dente 12 (incisivo lateral superior direito) aparece com 4,44% e o dente 22 (incisivo lateral superior esquerdo) com 4,72% (figura 5).

Ainda na arcada superior, os primeiros pré-molares superiores (dente 14 = 2,50%; dente 24 = 1,94%) apresentaram maior freqüência de agenesia do que os segundos pré-molares superiores (dentes 15 e 25 = 1,11%) (figura 5).

Na arcada inferior os dentes que apresentaram maior freqüência de agenesia, excluindo os terceiros molares, foram os segundos pré-molares superiores. O dente 45 (segundo pré-molar inferior direito) apareceu com 6,39% e o dente 35 (segundo pré-molar inferior esquerdo) com 4,72% (figura 5).

Em relação aos caninos no grupo examinado, não se observou falta dos inferiores, somente superiores e com uma baixa freqüência (dente 13= 0,83% e dente 23= 0,56%).

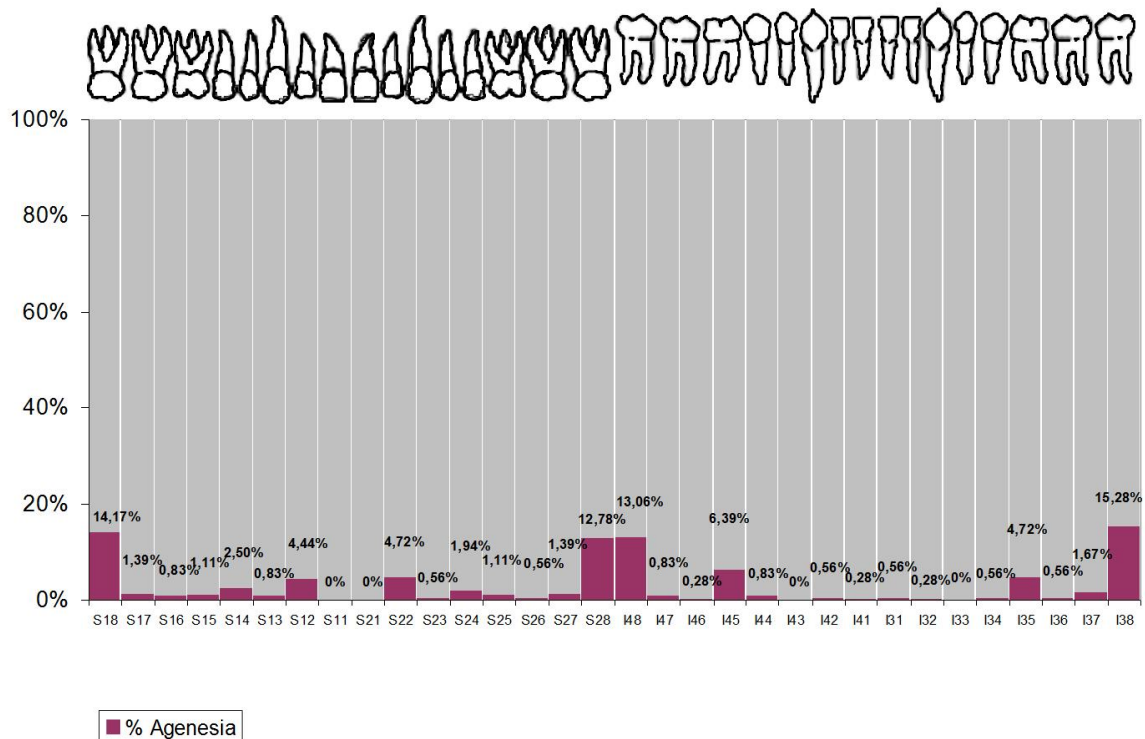
Uma das razões para explicar este fato, pode estar relacionada aos grupos dentários, pois estes possuem mais de um dente (os incisivos dividem-se em laterais e centrais, os pré-molares em primeiro e segundo pré-molar, os molares em primeiro, segundo e terceiro molar), porém o grupo dos caninos é o único grupo dentário composto de um elemento em cada quadrante, sendo ele o único da série



de caninos. Analisando antropologicamente, observa-se que os dentes que possuem maior freqüência de agenesia são os últimos dentro de cada grupo dentário (terceiro molar, segundo pré-molar, incisivos laterais), sendo a menor incidência a da agenesia de caninos por ele ser o único dente da sua série.

A freqüência de agenesia encontrada por arcada dentária, da maior até a menor porcentagem está apresentada na figura 5.

Figura 5: Gráfico da distribuição da freqüência de agenesia dentária nas arcadas superior e inferior em porcentagem. Porto Alegre, 2009.

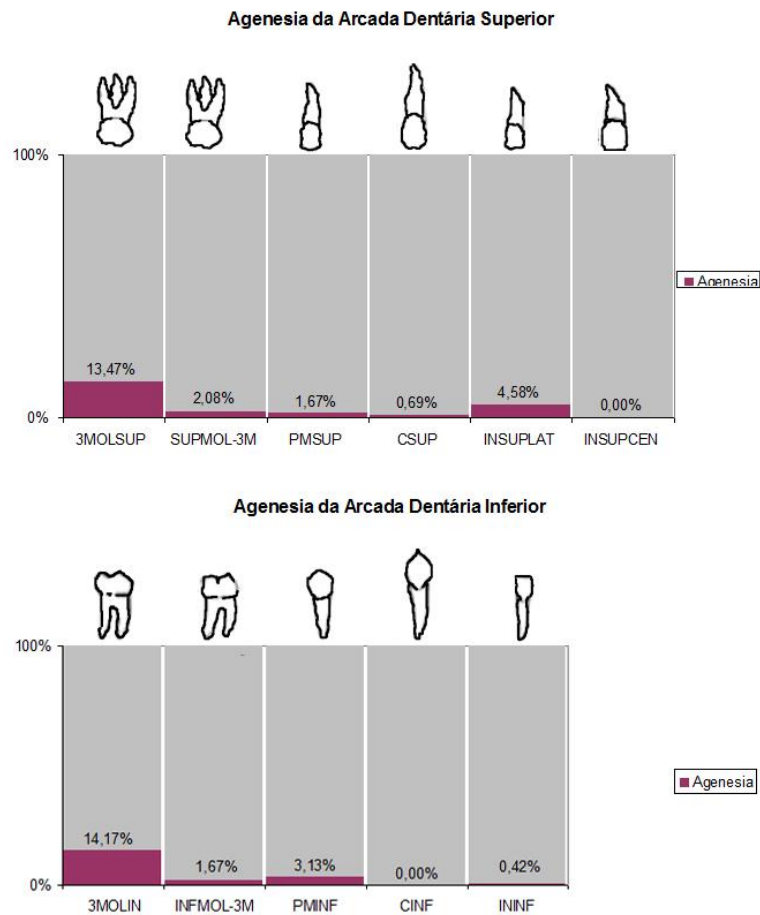


Os incisivos inferiores obtiveram uma freqüência baixa e apareceram com 0,42%. Os incisivos lateral e central inferiores foram colocados em um grupo único denominado de incisivos inferiores. Isso se deve à dificuldade de diferenciação anatômica existente entre incisivos lateral e central ao diagnosticar e identificar qual o incisivo faltante, ou seja, os incisivos inferiores são semelhantes entre si na sua morfologia (figura 6).

Com a exclusão dos terceiros molares, os dentes com maior freqüência de agenesia na arcada superior foram os incisivos laterais com 4,58%. E na arcada inferior foram os segundos pré-molares com 3,13% (figura 8).

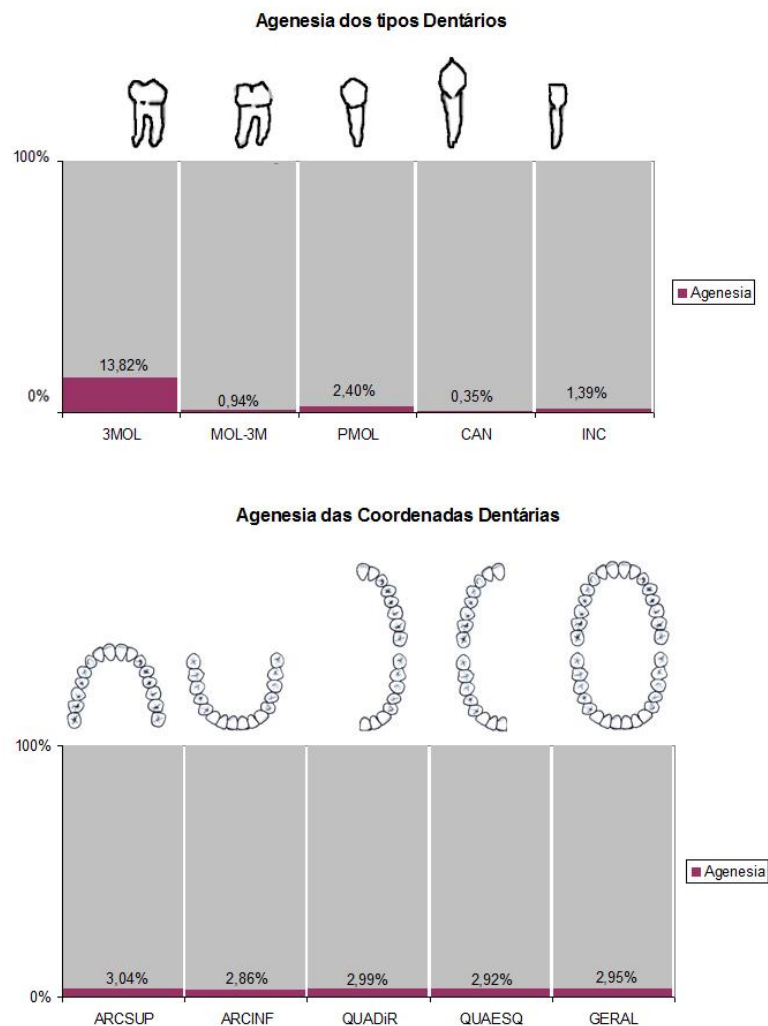
Observou-se que há maior freqüência da agenesia dos terceiros molares inferiores com 14,17% do que dos terceiros molares superiores com 13,47%. Esta diferença, entretanto, não é estatisticamente significativa ( $p\ value = 0,61$ ) (figura 6).

Figura 6: Gráfico da distribuição da freqüência de agenesia em grupos dentários por arcada dentária. Porto Alegre, 2009.



A freqüência da agenesia quando calculada sobre o número total de dentes, denominada freqüência absoluta, foi similar nos lados direito e esquerdo, e também quando calculada para os dentes superiores e inferiores. Entretanto, quando calculada para os dentes individualmente, em arcadas diferentes, a freqüência difere (figura 7).

Figura 7: Gráfico da distribuição da freqüência da agenesia por grupos de dentes e por quadrantes direito e esquerdo. Porto Alegre, 2009.



Na amostra analisada, a freqüência da agenesia de três ou mais dentes permanentes foi de 2,78%, e foi de 1,11%, quando existe agenesia de pelo menos seis dentes.

Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de homens e mulheres em relação à presença de agenesia dentária quando os tipos dentários são comparados. Comparando homens e mulheres na amostra, o único grupo de dentes onde a diferença entre os gêneros apresentou valor *borderline* de significância ( $p\ value = 0,058$ ) foi o de número de dentes superiores faltantes. Enquanto 25% das mulheres apresentaram agenesia de pelo menos um dos dentes superiores, 15,8% dos homens apresentaram este mesmo tipo de agenesia.

Os únicos dentes que apresentaram valores significativos na diferença entre homens e mulheres foram o terceiro molar superior direito (dente 18  $p$ -value = 0,01) e o terceiro molar inferior direito (dente 48 –  $p$ -value = 0,02), o incisivo lateral superior direito não apresentou uma diferença significativa (dente 12 –  $p$ -value = 0,18). Além disso, não houve diferença em relação ao segundo pré-molar inferior direito entre os gêneros (dente 45 –  $p$ -value = 0,27).

Analisando os pacientes em relação ao seu grupo de cor, a amostra foi composta de 317 indivíduos identificados como brancos e de 43 indivíduos identificados como negros (com sinal de ancestralidade africana através da cor da pele). Diferenças significativas foram encontradas quando analisou-se diferentes grupos dentários. Os brancos apresentaram maior frequência de agenesia dentária em alguns grupos de dentes avaliados do que os negros. Os grupos de dentes que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo de pertencimento e suas frequências estão relacionados na tabela 4.

Tabela 4: Comparação das frequências de agenesia dentárias entre os grupos de cor encontrados na amostra. Porto Alegre, 2009.

Grupo	indivíduos com dentes superiores faltantes (%)	indivíduos com dentes faltantes quadrante direito (%)	indivíduos com dentes faltantes quadrante esquerdo (%)	indivíduos com pré-molares inferiores faltantes (%)	indivíduos com molares faltantes (%)	indivíduos com pelo menos um tipo dentário faltante
Branco	23	31	29	8,20	16	36
Negro	4,70	7	7	0	2,30	9,30
$p$ value	0,007	0,001	0,003	0,52	0,009	0,001

$p$  value < 0,05 para ser estatisticamente significativo.

Quando as porcentagens das frequências da agenesia dos dentes foram comparadas individualmente, alguns dentes também apresentaram diferença estatística significativa. Nos incisivos laterais superiores e no segundo pré-molar inferior esquerdo só foi encontrada agenesia em brancos (5 a 5,4%), os valores dos demais dentes que apresentaram diferença significativa estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Comparação das freqüências de agenesia dentárias entre os dentes individuais entre os grupos de cor encontrados na amostra. Porto Alegre, 2009.

Grupo	Dente 18 (%)	Dente 28 (%)	Dente 48 (%)	Dente 38 (%)
Branços	15	14	14	16
Negros	5	5	5	7
p value	0,002	0,004	0,004	0,009

*p value* < 0,05 para ser estatisticamente significativo.

Na amostra de 360 pacientes, observou-se que 66,94%(241) dos pacientes não apresentavam agenesia. Quando considera-se somente agenesia de terceiros molares um percentual de 18,33%(66) dos pacientes apresentou esta anomalia. Em relação aos pacientes que apresentavam agenesia dentária de outros grupos de dentes, excluindo os terceiros molares, observou-se uma freqüência de 7,79%(28). Nos indivíduos que apresentavam agenesia de outros grupos dentários e de terceiros molares, a freqüência foi de 6,94%(25).

## 4.2 Análise Molecular

Constatadas as agenesias dentárias nos pacientes examinados, desencadeou-se um estudo molecular a fim de verificar uma possível associação entre as alterações genéticas e a agenesia dentária. Para isso, procedeu-se a coleta de amostra de parte dos pacientes tendo como objetivo buscar alterações genéticas nos genes *PAX9* e *MSX1* associadas às anomalias observadas.

### **PAX9**

Para a investigação da região codificadora do gene *PAX9*, dois grupos de pacientes foram considerados. Um grupo consistiu-se de indivíduos que apresentavam agenesia de terceiros molares e de outros grupos dentários, tais como pré-molares e incisivos, no qual foi realizado o seqüenciamento de todo o gene *PAX9*, isto é, os exons 2, 3 e 4 foram seqüenciados. Nesse caso, não foram encontradas alterações no exon 2 (domínio de ligação do *PAX9*) e no exon 4. No exon 3 foram encontradas alterações as quais estão descritas na tabela 6. Duas

delas são polimorfismos já conhecidos: His239His (rs12881240) e Ala240Pro (rs4904210; PEREIRA *et. al.*, 2006).

O outro grupo foi o de indivíduos que possuíam somente agenesia de terceiros molares, onde apenas o seqüenciamento do exon 3 foi realizado. Isso se deve ao fato de existir pelo menos uma mutação comum Ala240Pro no exon 3 a qual tem sido associada à agenesia de terceiros molares (PEREIRA *et. al.*, 2006). Mutações fora dos exons 2, 3 e 4 também têm sido associadas à agenesia dentária e foram encontradas nas regiões promotoras e nos íntrons (LINE 2003). Na amostra analisada, em dois indivíduos foi encontrada uma alteração no íntron 2, o qual teve apenas um pequeno segmento seqüenciado. Essa alteração já descrita anteriormente, não aparece associada à agenesia de terceiros molares nos bancos de dados analisados (dbSNP, Hapmap).

As alterações encontradas nos indivíduos analisados estão apresentadas na tabela 6, sendo que a tabela 7 descreve as freqüências genótípicas e alélicas na população investigada. Verificou-se que as freqüências genótípicas encontradas nos polimorfismos His239His (rs12881240) e Ala240Pro (rs4904210) não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 8).

Tabela 6: Genótipos dos pacientes investigados para três polimorfismos encontrados no gene *PAX9*. Porto Alegre, 2009.

Paciente <sup>a</sup>	AGENESIA <sup>b</sup>	<i>PAX9</i> <sup>c</sup>		
		I2 rs7143727	E3 His239His	E3 Ala240Pro
BCA001	18, 28,48, 45	G/C	C/C	G/G
BCA002	38, 48	G/G	C/T	G/G
BCA003	22, 18, 38, 48	G/G	C/C	C/C
BCA004	18, 28, 38, 48	G/G	C/T	G/G
BCA005	18, 17,15, 14, 13, 23, 24,25, 27,28, 38, 35, 34, 44, 45, 48	G/G	C/C	G/C
BCA006	18, 17, 16, 24, 25, 26, 27, 28, 48, 47, 46, 45, 44, 34, 35, 36, 37, 38	G/G	C/C	G/G
BCA007	48	G/G	C/C	G/C
BCA008	12	G/G	T/T	G/G
BCA009	14,24, 48, 45, 35, 38	G/C	C/C	G/G
BCA010	18, 28, 38	G/G	C/T	G/C
BCA011	18, 17, 15, 14,24,25,27,28, 48, 47, 44, 45	G/G	C/C	G/C
BCA012	18,12,22,28,48, 42,41,31,38	G/G	C/C	G/G
BCA013	18, 28, 37,38,48	G/G	C/T	G/G
BCA014	18, 28, 35, 45	G/G	T/T	G/G
BCA015	18, 28	G/G	C/T	G/G
BCA016	35, 45	G/G	C/C	G/C
BCA017	18, 28	G/G	C/T	G/C
BCA018	18, 28, 38, 48	G/G	C/C	G/G
BCA019	18	G/G	C/C	G/G
BCA020	12, 22, 38	G/G	C/C	C/C
BCA021	18, 28	G/G	C/T	G/C
BCA022	18, 28	G/G	C/T	G/G
BCA023	35, 45	G/G	C/C	G/G
BCA024	35, 45	G/G	C/T	G/G
BCA025	18, 28, 45, 48	G/G	C/T	G/G
BCA026	16	G/G	C/C	G/G
BCA027	12, 22	G/G	C/C	G/C
BCA028	18, 28, 38	NF	NF	NF
BCA029	38	G/G	C/C	G/G
BCA030	18, 28, 38, 48	G/G	C/T	G/G
BCA031	18, 28, 38, 48	NF	NF	NF
BCA032	45	G/G	C/T	G/C
BCA033	24	NF	NF	NF
BCA034	18, 28	G/G	C/C	G/G
BCA035	12, 22	G/G	C/C	G/G

a. BCA: código do paciente; b. Números dos dentes faltantes; c. rs : código de identificação do SNP. I2: intron 2; E3: exon 3. Em destaque: alterações encontradas.



Tabela 7: Freqüências gênicas e alélicas nos pacientes considerando três polimorfismos do gene *PAX9*. Porto Alegre, 2009.

Variação		<i>PAX9</i> <sup>a</sup>		
		I2 rs7143727	E3 His239His	E3 Ala240Pro
Genótipos Alelos	G	96,88%		
	C	3,13%		
	GG	93,75%		
	GC	6,25%		
	CC	0,00%		
Genótipos Alelos	C		75,00%	
	T		25,00%	
	CC		56,25%	
	CT		37,50%	
	TT		6,25%	
Genótipos Alelos	G			79,69%
	C			20,31%
	GG			65,63%
	GC			28,13%
	CC			6,25%

a. rs : código de identificação do SNP. I2: íntron 2; E3: exon 3.

Tabela 8: Teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg para três polimorfismos do exon 3 do gene *PAX9*. Porto Alegre, 2009.

SNP		P	q	P-value
rs7143727	E	0,9385	0,0615	0,25
	O	0,9688	0,0313	
His239His	E	0,5625	0,4375	<b>0,004</b>
	O	0,7500	0,2500	
Ala240Pro	E	0,6350	0,3650	<b>0,005</b>
	O	0,7969	0,2031	

rs : código de identificação do SNP. *p value* < 0,05 para ser estatisticamente significativo; p= freqüência do alelo mais freqüente; q= freqüência do alelo raro.

Embora não seja possível afirmar que a mutação Ala240Pro seja responsável pela presença da agenesia dos terceiros molares, observa-se que nenhum indivíduo homozigoto para esta mutação possuía todos os terceiros molares. Além disso, em um trio (figuras 8, 9 e 10), composto pelo paciente e seus pais, verifica-se que a paciente e seu pai, ambos homozigotos para a esta mutação, possuem agenesia dos terceiros molares. Embora deva haver outros fatores influenciando esta questão, esta mutação também deve ter um papel importante.

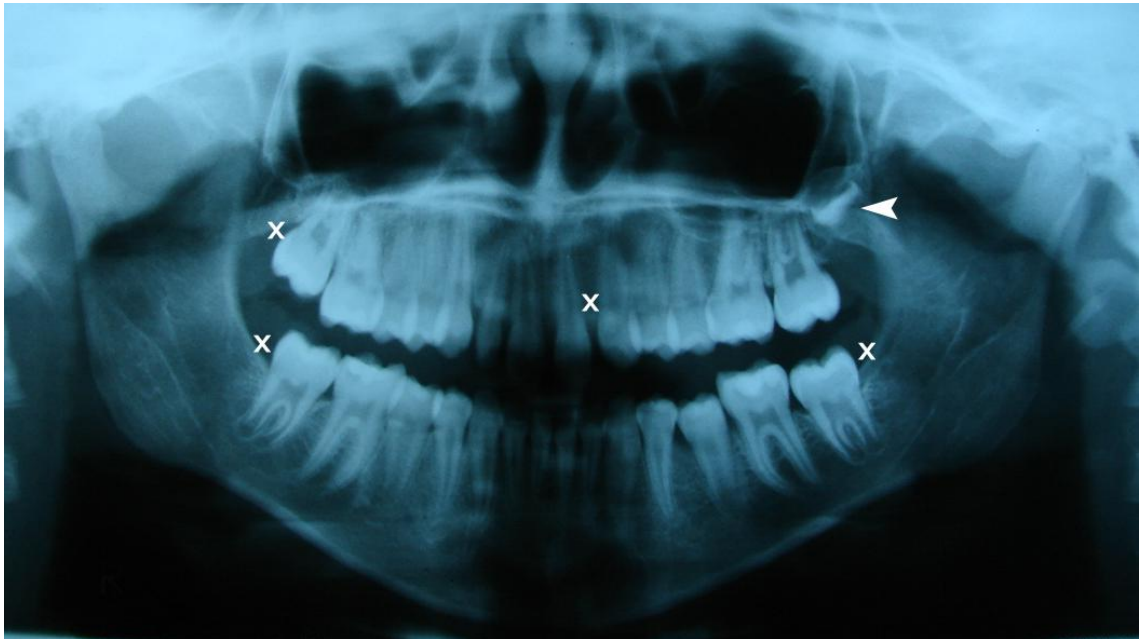


Figura 8 : Radiografia panorâmica de paciente ( BCA003), do gênero feminino de 12 anos com agenesia dos dentes 22, 18, 38 e 48. Observa-se que as ausências dentárias estão representadas com um “x” e, a formação da coroa do dente 28 está representada pela seta.

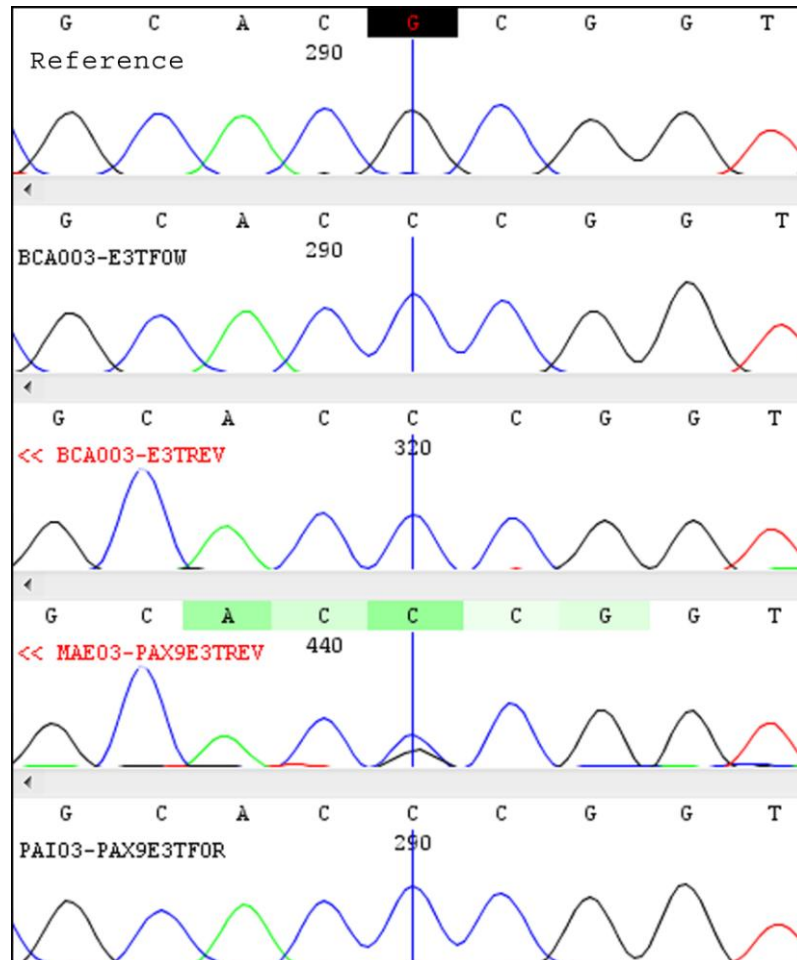


Figura 9. Cromatograma representativo da paciente com agenesia demonstrando que a mesma é homocigota para a mutação encontrada no exon 3 do gene *PAX9* (rs 4904210) já descrita.

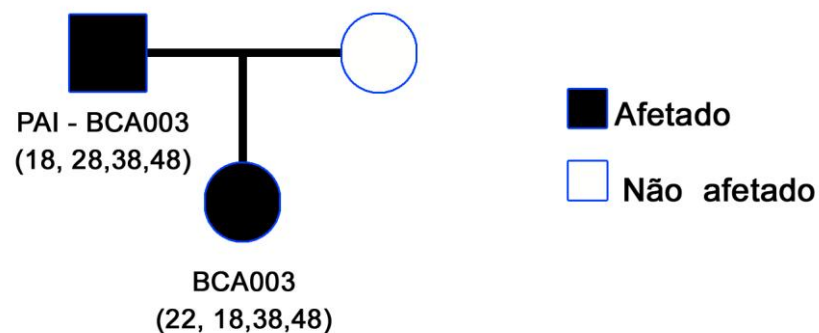


Figura 10: Heredograma da paciente BCA003, mostrando as agenesias dentárias presentes na paciente e no seu pai.

### ***MSX1***

Na amostra analisada, somente o exon 2 do gene *MSX1* foi seqüenciado, uma vez que em estudos anteriores foram encontradas mutações localizadas neste exon que estavam associadas à agenesia dentária de terceiros molares, pré-molares e incisivos, e à oligodontia (VASTARDIS *et. al.*, 1996; VAN DEN BOOGARD *et. al.*, 2000). Há relatos também da existência de mutações localizadas no exon 2 que estariam associadas com a fenda de lábio e palato (PAWLOWSKA *et. al.*, 2009). Na amostra analisada, no entanto, não estão incluídos pacientes com fenda lábio-palatina.

As alterações encontradas no exon 2 estão descritas na tabela 9. As freqüências genóticas e alélicas encontradas nos indivíduos investigados estão descritas na tabela 10. Os resultados do teste para verificar se as distribuições genóticas encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg estão na tabela 11.

Tabela 9: Genótipos dos pacientes investigados para três polimorfismos encontrados no gene *MSX1*. Porto Alegre, 2009.

Paciente <sup>a</sup>	AGENESIA <sup>b</sup>	MSX1 <sup>c</sup>		
		E2 rs8670	E2 rs1095	E2 rs12532
BCA001	18, 28, 48, 45	C/C	C/C	A/A
BCA002	38, 48	C/C	C/C	A/A
BCA003	22, 18, 38, 48	C/C	C/T	A/A
BCA004	18, 28, 38, 48	NF	NF	NF
BCA005	18, 17, 15, 14, 13, 23, 24, 25, 27, 28, 38, 35, 34, 44, 45, 48	C/C	C/C	A/G
BCA006	18, 17, 16, 24, 25, 26, 27, 28, 48, 47, 46, 45, 44, 34, 35, 36, 37, 38	C/C	C/T	A/A
BCA007	48	C/C	C/T	A/A
BCA008	12	C/C	C/C	A/A
BCA009	14, 24, 48, 45, 35, 38	C/T	C/C	A/A
BCA010	18, 28, 38	C/T	C/C	A/A
BCA011	18, 17, 15, 14, 24, 25, 27, 28, 48, 47, 44, 45	C/T	C/C	A/G
BCA012	18, 12, 22, 28, 48, 42, 41, 31, 38	C/T	C/C	A/A
BCA013	18, 28, 37, 38, 48	NF	NF	NF
BCA014	18, 28, 35, 45	C/T	C/C	A/G
BCA015	18, 28	C/C	C/C	A/A
BCA016	35, 45	T/T	C/C	A/A
BCA017	18, 28	C/C	C/C	A/A
BCA018	18, 28, 38, 48	C/C	T/T	A/A
BCA019	18	C/T	C/C	A/A
BCA020	12, 22, 38	C/T	C/C	A/A
BCA021	18, 28	C/C	C/C	A/G
BCA022	18, 28	C/C	C/C	A/A
BCA023	35, 45	C/T	C/C	A/A

a. BCA: código do paciente; b. Números dos dentes faltantes; c. rs : código de identificação do SNP; E2: exon 2 .  
Em destaque: alterações encontradas.

Tabela 10: Freqüências dos alelos e dos genótipos nos pacientes considerando três polimorfismos encontrados no gene *MSX1*.

Variação		MSX1 <sup>a</sup>		
		E2 rs8670	E2 rs1095	E2 rs12532
Genótipos Alelos	C	76,19%		
	T	23,81%		
	CC	57,14%		
	CT	38,10%		
	TT	4,76%		
Genótipos Alelos	C		88,10%	
	T		11,90%	
	CC		85,67%	
	CT		14,29%	
	TT		0,05%	
Genótipos Alelos	A			90,48%
	G			9,52%
	AA			80,95%
	AG			19,05%
	GG			0,00%

a. rs : código de identificação do SNP; E2: exon 2.

Tabela 11: Teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg para três polimorfismos do gene *MSX1*. Porto Alegre, 2009.

SNP		p	q	P –value
Rs8670	E	0,5805	0,4195	<b>0,005</b>
	O	0,7619	0,2381	
rs1095	E	0,7761	0,2239	<b>0,044</b>
	O	0,8810	0,1190	
Rs12532	E	0,8186	0,1814	0,07
	O	0,9048	0,0952	

rs : código de identificação do SNP. *p value* < 0,05 para ser estatisticamente significativo. p= frequência do alelo mais freqüente; q= frequência do alelo raro.

Os resultados obtidos até momento sugerem que a mutação rs8670 esteja associada à presença da agenesia dos terceiros molares, pré-molares e incisivos. Principalmente a agenesia dos pré-molares. Nas figuras 11, 12 e 13 observa-se que a paciente e sua mãe, ambas heterozigotas para a esta mutação, possuem agenesia dos pré-molares, e a paciente ainda possui agenesia de ambos os terceiros molares superiores. Embora deva haver outros fatores influenciando esta questão, esta mutação deve ter um papel importante da determinação deste fenótipo.



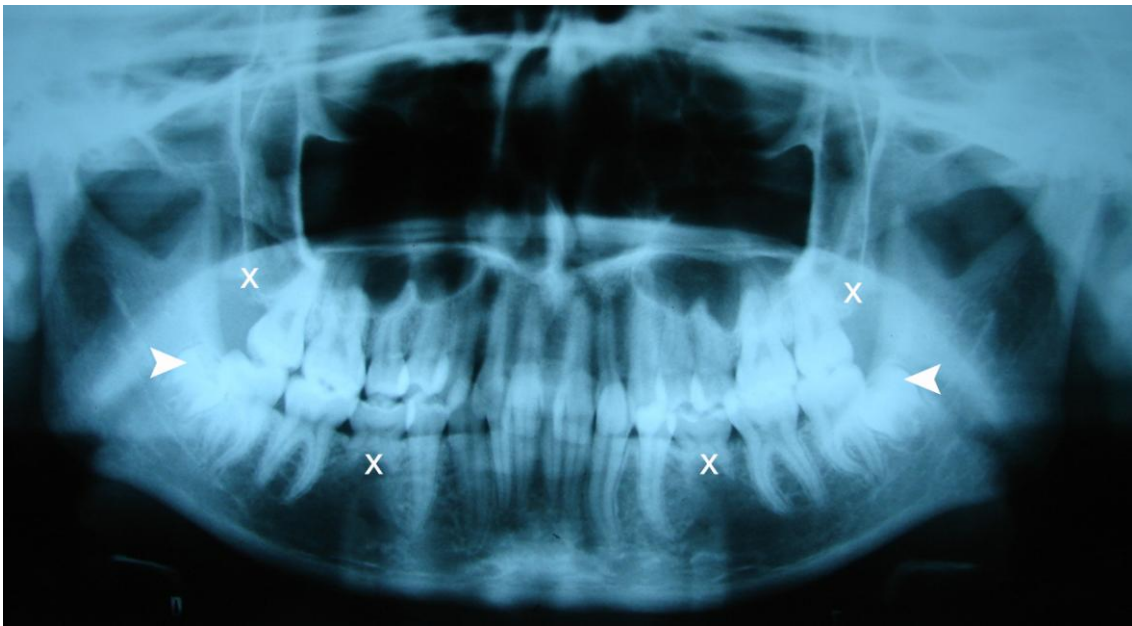


FIGURA 11: Radiografia panorâmica de paciente (BCA014), do gênero feminino de 18 anos com agenesia dos dentes 35, 45, 18, 28. . Observa-se que as ausências dentárias estão representadas com um "x". a formação da coroa dos dentes 38 e 48 está representada pela seta.

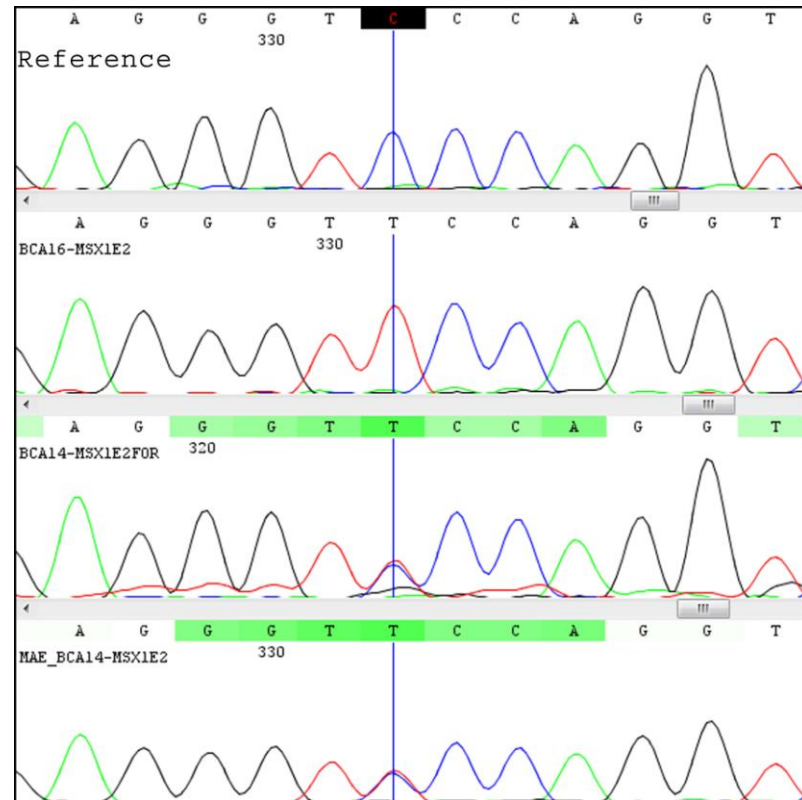


FIGURA 12: Cromatograma representativo da paciente com agenesia demonstrando que a mesma é heterozigota para a mutação encontrada no exon 2 do *MSX1* (rs 8670) já descrita.

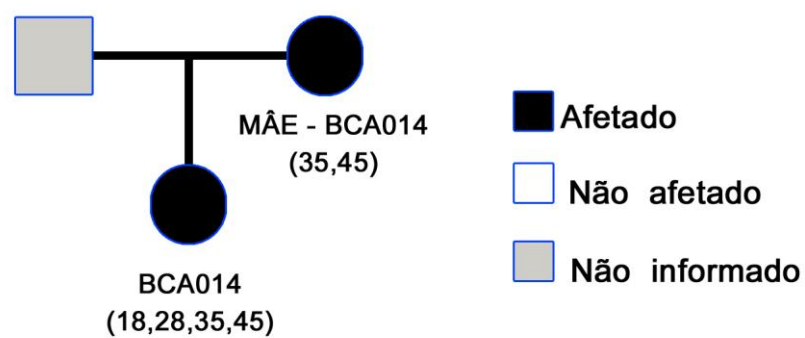


Figura 13: Heredograma da paciente BCA014, mostrando as agenesias dentárias presentes na paciente e na sua mãe.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo, abordou tanto a freqüência da agenesia dentária quanto a relação entre a agenesia de certos tipos e grupos dentários, bem como mutações genéticas envolvendo dois genes que participam do desenvolvimento dentário (*PAX9* e *MSX1*). Algumas diferenças de dados em relação à freqüência da agenesia com estudos já realizados foram encontradas. Em relação aos dentes que apresentaram maior freqüência de agenesia na amostra, excluindo-se os terceiros molares, a freqüência dos segundos pré-molares superiores aproximou-se dos dados relatados por Symons *et. al.* (1993). No entanto, a freqüência dos incisivos laterais superiores foi maior. O que pode ter colaborado para isso, é o fato de que a amostra foi composta de indivíduos que procuraram tratamento ortodôntico, o que pode ter determinado este aumento na freqüência da ausência destes dentes.

Ainda em relação aos grupos dentários analisados, o grupo do canino apresentou uma baixa freqüência de agenesia. Constatando-se que os dentes que possuem maior freqüência de agenesia são os últimos de cada grupo dentário e, sendo o canino, o único dente do seu grupo, pode-se explicar assim a baixa freqüência da sua ausência.

Em relação aos terceiros molares, neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas quando comparadas as suas freqüências nas arcadas superior e inferior. Na amostra analisada, este é o grupo dentário com maior freqüência de agenesia, seguido pelos pré-molares inferiores e os incisivos laterais superiores, concordando com Polder *et. al.* (2004) e Rolling e Poulsen (2009).

A freqüência de agenesia de três ou mais dentes foi encontrada em 2,78% em indivíduos da amostra e a freqüência de agenesia de pelo menos seis dentes foi vista em 1,11% dos pacientes. Estes valores distanciaram-se dos citados por Arte *et. al.* (2001). Os autores encontraram respectivamente 1% e 0,1%. Esta diferença pode ter ocorrido devido a fatores genéticos populacionais, uma vez que a população estudada foi diferente, ou pelo fato de que os pacientes fazem parte de uma amostra de indivíduos submetidos a tratamento ortodôntico, que poderia estar provocando uma tendência na amostra, embora não tenha se encontrado na bibliografia que indivíduos com agenesia procurem mais pelo tratamento ortodôntico.

A freqüência da agenesia quando calculada sobre o número total de dentes, denominada freqüência absoluta, foi similar nos lados direito e esquerdo, e também quando calculada para os dentes superiores e inferiores (figuras 7 e 8 ), o que corrobora com os achados de Nieminen (2009). Entretanto, quando calculada para os dentes individualmente, nas arcadas superior e inferior, a freqüência difere quanto à agenesia dos caninos e pré-molares superiores e inferiores. A agenesia de caninos superiores é mais comum (p value= 0,003) e a dos pré-molares inferiores é a mais freqüente ( p value= 0,003).

Quando foram comparados independentemente homens e mulheres na amostra, não foram encontradas diferenças significativas na observação da freqüência das agenesias em relação aos tipos de dentes, entretanto, ao analisar-se a freqüência dos dentes individualmente, diferenças significativas foram encontradas quando incluiu-se os terceiros molares no cálculo da freqüência da agenesia. A agenesia mostrou-se mais freqüente em mulheres, ao analisar-se o número de dentes superiores faltantes, e também, quando analisou-se o quadrante direito das arcadas dentárias. Esses dados diferem dos encontrados por Rolling e Poulsen (2009) que encontraram diferenças significativas entre os gêneros na freqüência da agenesia do incisivo lateral superior direito, do segundo pré-molar superior direito e do segundo pré-molar inferior direito. Os autores afirmam que as freqüências destes dentes foram maiores em mulheres do que em homens.

Na comparação entre pessoas identificadas como brancas e aquelas identificadas como negras, diferenças significativas foram encontradas quando observou-se os diversos grupos dentários. Os valores apresentaram-se estatisticamente significativos quando os terceiros molares foram incluídos no cálculo da freqüência. Existem estudos que demonstraram que a agenesia dos terceiros molares é maior em europeus do que em africanos (figura 15). A freqüência dos terceiros molares, quando calculada individualmente, foi maior nos indivíduos identificados como brancos. A agenesia dos incisivos laterais superiores e do segundo pré-molar esquerdo só foi encontrada em brancos.

Como encontrou-se diferenças na freqüência da agenesia entre a nossa amostra e a literatura, é importante relacionar esta diferença à fatores genéticos e populacionais.

Analisando os dados moleculares do gene *PAX9* e *MSX1*, um dado interessante é o de que, na amostra, mesmo contando com indivíduos com a

agenesia de diversos dentes, não encontramos nenhuma mutação nova nos domínios de ligação ao DNA, destes fatores de transcrição. O que nos direciona a levantar uma questão: estes indivíduos possuem mutações em outros genes integrantes da cadeia de desenvolvimento dentário ou as diversas mutações encontradas nas regiões estudadas estão contribuindo para o quadro de agenesia? A figura 14 mostra a rede envolvendo vários genes relacionados entre si.

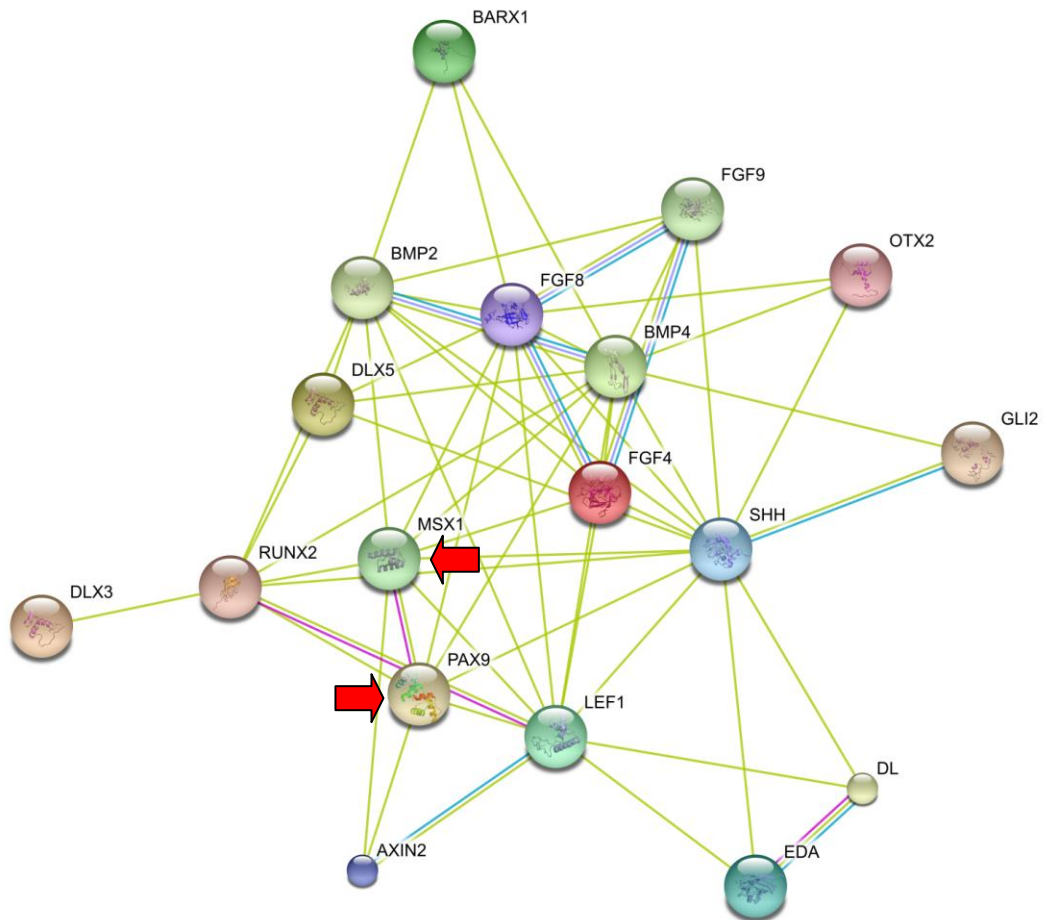


Figura 14: Rede de genes do desenvolvimento que interagem na cascata de formação dentária. Fonte: Imagem gerada por STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) no endereço eletrônico <http://string.embl.de/>

Um fato que chama a atenção é que as duas modificações na região codificadora (His239His e Ala240Pro) do *PAX9*, e duas na região transcrita, mas não traduzida do *MSX1*, rs8670 e rs1095, não encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentando freqüências significativamente diferentes do esperado.

Estes fatos podem ocorrer devido ao pequeno número amostral, mas também podem ser ocasionados pelo fato destas mutações estarem contribuindo para o quadro de agenesia destes pacientes.

O polimorfismo His239His é uma alteração sinônima e aparentemente não possui importância funcional. A frequência do alelo variante T em um painel multicultural, composto por descendentes de africanos e europeus, é de aproximadamente 10 % (dbSNP) enquanto que nos ameríndios é de cerca de 0,7%, nos esquimós 7%, asiáticos 0 % , europeus 27% e africanos 3% (PEREIRA, 2006; PAIXÃO-CÔRTEZ, 2008). Na amostra de pacientes sua frequência é de 25%. Como esta alteração não causa modificações na proteína *PAX9*, o motivo de ela não estar em equilíbrio pode ser o fato de estar ligada a outras mutações que tenham importância funcional.

Já no caso do polimorfismo Ala240Pro do exon 3 do gene *PAX9* maiores considerações devem ser feitas. Estudos antropológicos físicos, baseados em grandes amostras, determinaram que a agenesia do terceiro molar é variável entre e dentro dos grupos humanos, embora parte destes achados tenha sido obtida sem radiografias panorâmicas (BREDY *et. al.*,1991; IRISH,1993,1997,2003; TURNER,1986,1987,1990; ROZCOVCOVA *et. al.*,1999; 2004, DELGADO-BUENO, 2007). O principal resultado dessas investigações antropológicas parece ser uma tendência para a perda do traço dental ancestral, que consiste na presença do terceiro molar, com decréscimo em geral da sua presença. Existe um aumento da frequência da agenesia num gradiente do continente africano até Europa e à Ásia. A distribuição do alelo assemelha-se a distribuição da agenesia dos terceiros molares na Europa e Ásia, mas um fato a ser destacado é que enquanto a agenesia varia no continente africano de 0 à 13%, a frequência do polimorfismo é de 20%. Interessantemente, os resultados sugerem um pequeno aumento gradual da C/Pro em frequência da África a outros continentes. Os estudos antropológicos realizados com Nativos Americanos revelam que a ausência dos terceiros molares é relativamente frequente entre Eskimos (~20%), mas é difícil de estabelecer um padrão comum em relação aos Nativos Americanos como um todo, devido a uma ampla quantidade de variação ( de zero a ~40%; GÓMEZ-VALDÉS *et. al.*, 2005; ROZCOVCOVA *et. al.*,1999; TURNER, 1981,1986;; HYDENBLIT,1996). Paixão-Côrtes (2008), construiu um mapa com a distribuição da agenesia do terceiro molar no mundo (figura 15).

No mesmo trabalho, Paixão-Côrtés (2008) apresenta também a distribuição genotípica e alélica do Ala240Pro em 15 tribos Sul Ameríndias e outros grupos geográficos (tabela 12).

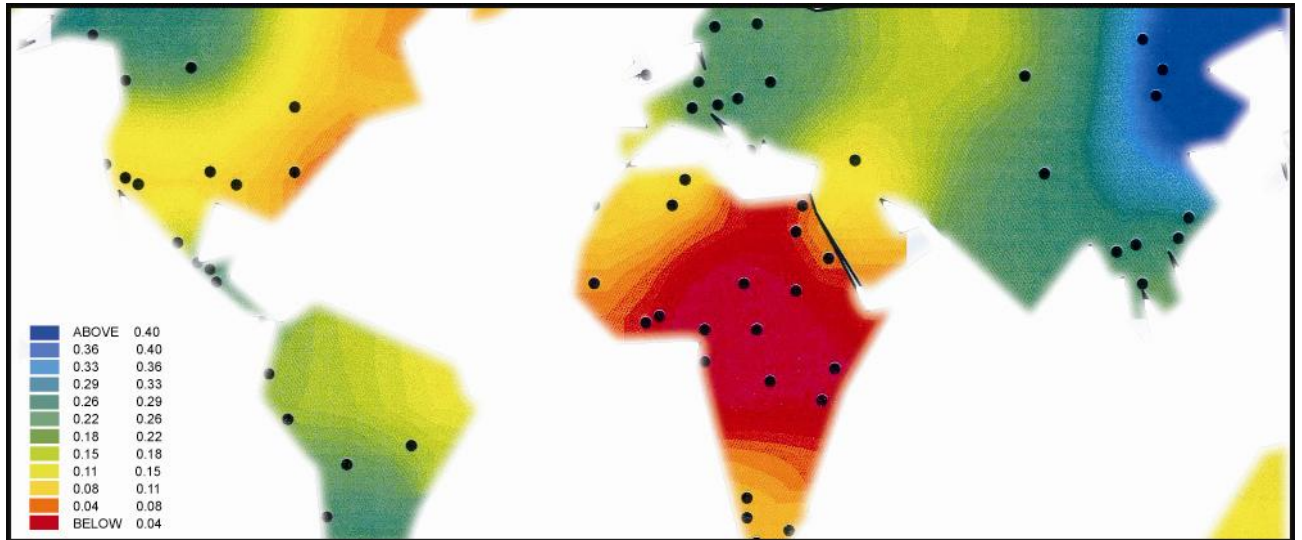


Figura 15: Mapa Mundial que apresenta o levantamento da distribuição da agenesia dos terceiros molares (PAIXÃO-CÔRTEES, 2008 – dados não publicados).

Tabela 12: Distribuição genotípica e alélica do Ala240Pro em 15 tribos Sul Ameríndias e outros grupos geográficos.

População	Ind.	Frequência Genotípica			Frequência		Referência
		Ala/Ala G/G (%)	Ala/Pro G/C (%)	Pro/Pro G/G (%)	G (Ala)	C (Pro)	
<i>Sul-ameríndios</i>							
Aché	20	20 (100)	0	0	1	0	Pereira e cols.(2006)
<b>Apalaí</b>	<b>9</b>	<b>7 (78)</b>	<b>2 (22)</b>	<b>0</b>	<b>0.89</b>	<b>0.11</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
<b>Arara</b>	<b>21</b>	<b>18 (86)</b>	<b>3 (14)</b>	<b>0</b>	<b>0.86</b>	<b>0.14</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
Bari	4	4 (100)	0	0	1	0	Pereira e cols.(2006)
<b>Cayapó</b>	<b>1</b>	<b>1 (100)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
<b>Galibi</b>	<b>7</b>	<b>6 (86)</b>	<b>1 (14)</b>	<b>0</b>	<b>0.86</b>	<b>0.14</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
Guarani	5	5 (100)	0	0	1	0	Pereira e cols.(2006)
<b>Jamamadi</b>	<b>5</b>	<b>2 (40)</b>	<b>2(40)</b>	<b>1(20)</b>	<b>0.6</b>	<b>0.40</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A) -</b>
Kaigang	20	15 (75)	5 (25)	0	0.88	0.12	Pereira e cols.(2006)
<b>Mekranoti</b>	<b>5</b>	<b>5(100)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
<b>Munducuru</b>	<b>8</b>	<b>7 (88)</b>	<b>1(12)</b>	<b>0</b>	<b>0.94</b>	<b>0.06</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
<b>Tenharim</b>	<b>8</b>	<b>6 (75)</b>	<b>2 (25)</b>	<b>0</b>	<b>0.88</b>	<b>0.12</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
Warao	4	4 (100)	0	0	1	0	Pereira e cols.(2006)
<b>Xikrin</b>	<b>17</b>	<b>15 (88)</b>	<b>2 (12)</b>	<b>0</b>	<b>0.94</b>	<b>0.06</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
Yucpa	4	4 (100)	0	0	1	0	Pereira e cols.(2006)
Total	138	119 (86)	18 (13)	1 (<1)	0.93	0.07	
<b>Esquimós</b>	<b>44</b>	<b>21(48)</b>	<b>20(45)</b>	<b>3 (7)</b>	<b>0.70</b>	<b>0.30</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>
Chineses	102*	29 (28)	45 (45)	28 (27)	0.50	0.50	Pan e cols. (2008)
Japoneses	14	11(79)	2 (14)	1 (7)	0.86	0.14	Pereira e cols.(2006)
Europeus	365*	169 (46)	172 (47)	24 (7)	0.70	0.30	Pereira e cols.(2006)
Afro-Americanos	15	15 (100)	0	0	1	0	HAPMAP/dbSNP
Euro-Americanos	14	10 (71)	0	4 (29)	0.71	0.29	HAPMAP/dbSNP
<b>Africanos</b>	<b>47</b>	<b>29 (61)</b>	<b>17 (38)</b>	<b>1 (&lt;1)</b>	<b>0.80</b>	<b>0.20</b>	<b>Paixão-Côrtes (2008-A)</b>

*Nos 350 europeus e nas amostras dos 102 chineses as frequências foram obtidas através de PCR RFLP.*  
 Fonte: Trabalho apresentado por Paixão- Côrtes(2008)

Os resultados aqui apresentados mostram que a distribuição dos alelos do polimorfismo Ala240Pro não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Além disso, o estudo com famílias revelou que a variante em homozigose, parece determinar a obrigatoriedade da agenesia e reforça a hipótese que este polimorfismo esteja associado à agenesia dos terceiros molares. Além disso, esta mutação está presente em pacientes que apresentam agenesia de outros dentes, e pode estar contribuindo também para estes fenótipos (BCA005 - 18, 17,15, 14, 13, 23, 24,25, 27,28, 38, 35, 34, 44, 45, 48; BCA011 -18, 17, 15, 14, 24, 25, 27, 28, 48, 47, 44, 45).



O polimorfismo rs8670, do gene *MSX1*, embora não seja traduzido e não provoque alterações funcionais na proteína, já foi estudado quanto a sua associação com a agenesia dentária. Esta mutação encontra-se localizada a 6 nucleotídeos após o códon de parada (stop codon). Desse modo, foi sugerido que devido a sua localização, a alteração poderia causar perturbações na terminação da transcrição, podendo assim levar ao fenótipo de agenesia. Como esta alteração é freqüente em algumas populações, em um painel multicultural composto por euro-descendentes, afro-americanos e descendentes de asiáticos, a freqüência do alelo mutante é de 16%, enquanto que na população japonesa é de 7 %. Além disso, a mutação parece ter efeito em heterozigose, de modo que seu efeito fenotípico deve ser pequeno (GEBAUER e HENTZE, 2004; PAWLOWSKA, 2009). Na amostra estudada a freqüência do alelo é de aproximadamente 24%, enquanto que indivíduos heterozigotos para este polimorfismo eram em torno de 38 % (BCA009- 14,24, 48, 45, 35, 38; BCA010 - 18, 28, 38; BCA11- 18, 17, 15, 14, 24, 25, 27, 28, 48, 47, 44, 45; BCA012 – 18, 12, 22, 28, 48, 42, 41, 31, 38; BCA014- 18, 28, 35, 45; BCA015 - 18, 28; BCA018 – 18, 28, 38, 48; BCA020 – 12, 22, 38 ; BCA023 – 35, 45), sendo que apresentaram agenesia de diferentes tipos dentários, dos terceiros molares, dos segundos molares, pré-molares e incisivos laterais. O indivíduo BCA016 (35, 45) que era o único homozigoto da amostra apresentou agenesia de pré-molares.

O polimorfismo rs1095 aparentemente não possui importância funcional. A freqüência do alelo T em um painel do CEPH (Centre d'Etude Du Polymorfisme Human), composto por descendentes de europeus é de aproximadamente 0 %, enquanto que na amostra de pacientes sua freqüência é de aproximadamente 12%. Ainda que não se conheça nenhuma associação clínica, é importante salientar que por esta alteração não estar em equilíbrio, e encontrar-se em uma freqüência considerável na amostra, este polimorfismo, portanto, pode estar ligado a outras mutações que tenham importância funcional.

Analisando o quadro geral, pode-se sugerir que ambos os genes, *PAX9* e *MSX1*, estão contribuindo para o fenótipo de agenesia dentária. Além disso, parece haver um conversa cruzada, onde hora um, ora outro, estão associados à agenesia dos terceiros molares, e ambos estariam contribuindo parcialmente ou diretamente para a agenesia de diferentes tipos dentários. O *MSX1* parece ter um papel determinante na agenesia dos pré-molares e eventualmente na falta dos incisivos.

Somente quando o estudo de associação for completado um cenário mais claro sobre esta complexa relação poderá ser delineado.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. A agenesia mais freqüente é a dos terceiros molares, seguida dos pré-molares inferiores e dos incisivos laterais superiores. Não há diferenças estatisticamente significativas da freqüência da agenesia entre as arcadas superior e inferior, e também entre os quadrantes direito e esquerdo. Não há diferenças significativas entre os gêneros em relação à freqüência da agenesia dentárias quando compara-se grupos dentários, entretanto, quando analisa-se os dentes individualmente, encontra-se diferença significativa na freqüência da agenesia dentária. As diferenças significativas entre brancos e negros parecem estar relacionadas diretamente a agenesia dos terceiros molares.
2. As mutações encontradas em ambos os genes *PAX9* e *MSX1*, envolvidos no desenvolvimento craniofacial, contribuem para o fenótipo de agenesia dentária.
3. Alterações nos dois genes estudados claramente mostram influência nos fenótipos de agenesia, assim como outros genes da rede, conhecidos e desconhecidos e fatores epigenéticos, devem estar influenciando o processo de desenvolvimento dentário.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, W. A locus for autosomal recessive hypodontia with associated dental anomalies maps to chromosome 16q12.1. **Am J Hum Genet**, Baltimore, n.62,v. 4, p.987-991, Apr 1998.

ARTE, S. Gene defect in hypodontia: exclusion of EGF, EGFR and FGF-3 as candidate genes. **J Dent Res**, Chicago, v.75, n.6, p. 1346-1352, Jun 1996.

ARTE, S. *et. al.*. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. **J Dent Res**, Chicago, v.80, p.1445-1450, May, 2001.

ALAPPAT, S.; ZHANG, Z.Y; CHEN, Y.P. Msx homeobox gene family and craniofacial development. **Cell Res**, Beijing , n.13, v.16, p.429-442,Dec 2003.

BALCZAREK, K.A; LAI, Z.C; ZUMAR,S. Evolution of functional diversification of the paired box(PAX) DNA-binding domains. **Mol Biol Evol**, Chicago, v.14, n. 8, p. 829-842, Aug, 1997.

BRAKEFIELD, P.M. Evo-devo and constraints on selection. **Trends Ecol Evol**, Amsterdam, v. 21, no 7, p. 362-368, July, 2006.

BREITLING, R.; GERBER, J.K. Origin of the paired domain. **Dev Genes Evol**, Berlin, v.210, no12, p.644-650, Dec, 2000.

BREDY,E.; ERBRING C.;HÜBENTHAL B. The incidence of hypodontia with the presence and absence of the wisdom teeth. **Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl**, Leipzig ,v.79, no 5, p. 357-363, 1991.

CALCAGNO, J.M. Dental reduction in post-pleistocene Nubia. **Am J Phys Anthropol**, Philadelphia, n 70,v.3, p.349-363, Jul 1986

CALCAGNO, J.M.; GIBSON, K.R. Human dental reduction : natural selection or the probable mutation effect. **Am J Phys Anthropol**, Philadelphia, n 77,v.4 p.505-517, Dec 1988.

CARROLL, S.B. Genetics and the making of Homo sapiens. **Nature**, London, v.422, p.849-857, Apr 2003.

CHEN, Y. *Et. al.*. Conservation of early odontogenic signaling pathways in Aves. **Proc Natl Acad Sci USA**; Washington, v. 9, p. 10044-10049, 2000.

CHISHTI, M.S. *et. al.*. A novel missense mutation in *MSX1* underlies autosomal recessive oligodontia with associated dental anomalies in Pakistani families. **J Hum Genet**, Tokyo, n.51, v.10, p.872-878, Aug, 2006.

CRUZ, R.M; OLIVEIRA, S.F. Análise genética de problemas craniofaciais – revisão de literatura e diretrizes para investigações clínico laboratoriais (parte 1). **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, Maringá, v. 12, no 5, p. 133-140, set/out 2007.

DAHL, E.; KOSEKI, H.; BALLING, R. PAX genes and organogenesis. **Bioessays**, Cambridge, n.19, v. 9 p.755-765, Sep 1997.

DALBERG, A.A.; The changing dentition in man. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 32, p. 676-690, 1945.

DAS, P. *et. al.*. Haploinsufficiency of *PAX9* is associated with autosomal dominant hypodontia. **Hum Genet**, Berlin, n.110, v. 4, p. 371-376, Apr 2002.

DELGADO-BUENO, M.E. Population affinities of African Colombians to Sub-Saharan Africans based on dental morphology. **Homo**, Stuttgart, v.58, n.4, p. 329-356, 2007.

ERPENSTEIN, H.; PFEIFFER, R.A. Sex-linked-dominant hereditary reduction in number of teeth. **Humangenetik**, Berlin, n. 4, v.3, p.280-293, Sep 1967.

FERRIER, D.E; MINQUILLÓN, C. Evolution of the Hox/Parahox gene clusters. **Int J Dev Biol**, Vizcaya, n.47, v.7-8, p. 605-611, 2003.

FINNERTY, J.R; MAZZA, M.E; JESEWSKI, P.A. Domain duplication, divergence, and loss events in vertebrate *Msx* paralogs reveals phylogenetically informed disease markers. **BMC Evol Biol**, London, n.20, 9:18, Jan 2009.

FRAZIER-BOWERS, S.A *et. al.*. A novel mutation in human *PAX9* causes molar oligodontia. **J. Dent. Res.** , Chicago, v.81, no 2, p. 129-133, Feb 2002.

FLEAGLE, J.G. Primate adaptation and evolution. **Academic New York**, 1999.

FLEISCHMANNOVA, J. *et al.*. Mouse models of tooth abnormalities. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, n.116, v.1, p. 1-10, Feb 2008.

GALLIOT, B. *et al.*. Evolution of homeobox genes: Q<sub>50</sub> Paired-like genes founded the paired class. **Deve Genes Evol**, Berlin, n.209,v.3, p.186-197, Mar 1999.

GARN, S.M, LEWIS, A.B. The gradient and the pattern of crown–size reduction in simple hypodontia. **Angle Orthod**, Appleton, n.40, v.1, p.51-58, Jan 1970.

GEBAUER, F.; HENTZE, M.W. Molecular mechanisms of translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol**, London, n.5, v.10, p.827-835, Oct 2004.

GEHRING, W.J. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. **Zoology**, Jena, n.104,v. 3-4, p.171-183, 2001.

GÓMEZ- VALDÉS, J. Antropología dental em poblaciones Del Occidente de Mesoamérica. Tesis para optar al grado de Licenciado em Antropologia Física. Escuela Nacional de Antropología e Historia. México, 2005.

GOYA, H.A. *et al.*. An orthopantomographic of hypodontia in permanent teeth of japanese pediatric patients. **J Oral Sci**, Tokyo, v.50, n.2, p.143-150, Jun 2008.

HETZER-EGGER,C.; SCHORPP,M.; BOEHM, T. Evolutionary conservation of gene structures of the PAX1/9 gene family. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1492, no 2-3,p. 517-521, Jul 2000.

HEWITT, J.E *et al.*. Structure and sequence of the human homeobox gene HOX7. **Genomics**, San Diego, n.11,v.3, p.670-678, Nov 1991.

HYDENBLIT, R. Dental Variation among four prehispanic Mexiacan populations. **Am J of Phys Anthrop**, Philadelphia, n. 100, p. 225-246, 1996.

HU, G. *et al.*. Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1. **Development**, Cambridge, n.128, v.12, p.2373-2384, Jun 2001.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME CONSORTIUM. Inicial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, London, v.409, p.860-921, 2001.

IRISH,J.D; Biological affinities of late pleistocene through modern african aboriginal populations: the dental evidence. Ph.D. Dissertation, Arizona State University, Tempe, 1993.

IRISH,J.D. Characteristic high- and low-frequency dental traits in sub-Saharan African populations. **Am J Phys Anthropol**, Philadelphia, v. 102, no 4, p.455-467, Apr 1997.

IRISH,J.D; GUATELLI-STEINBERG,D. Ancient teeth and modern human origins: na expanded comparison of African Plio-Pleistocene and recent world dental samples. **J Hum Evol**, London, v.45, no 2, p.113-144, Aug 2003.

JERNVALL, J.; THESLEFF, I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. **Mech Dev**, Shannon, n.92,v. 1, p.19-29, Mar 2000.

KAPADIA, H; MUES, G; D`SOUZA, R. Genes affecting tooth morphogenesis. **Orthod Craniofac Res**, Oxford , n. 10,v.4, p. 237-244, Nov 2007.

KAPADIA, H.; e tal. Molecular characterization of a novel *PAX9* missense mutation causing posterior tooth agenesis. **Eur J Hum Genet**, New York, n.14,v.4, p. 403-409, Apr 2006.

KAVANAGH,K.D; EVANS, A.R; JERNVALL,J. Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. **Nature**, London, v.449, p.427-433, Sep, 2007.

KIST, R; *et. al.*. Reduction of *PAX9* dosage in na allelic series of mouse mutants causes hypodontia and oligodontia. **Hum Molec Genet**, Oxford, n. 14, v. 23, p. 3605-3617, Dec 2005.

KIM, J.W. *et. al.*. Novel *MSX1* frameshift causes autosomal-dominant hypodontia. **J Dent Res**, Chicago, n.85, v. 3, p.267-271, Mar 2006.

KLEIN, M.L *et. al.*. Novel mutation of the initiation códon of *PAX9* causes oligodontia. **J Dent Res**, Chicago, n.84, v.1, p.43-47, Jan 2005.

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

LAMMI, L.; HALONEN, S.; PIRINEN, I.; THESLEFF, S.; ARTE, P.; NIEMINEN. A missense mutation in *PAX9* in a family with distinct phenotype of oligodontia. **Eur J Hum Genet**, New York, v. 11, p. 866-871, Nov 2003.

LAMMI, L. *et. al.*. Mutations in *AXIN2* cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. **Am J Hum Genetic**, Baltimore, n.74,v.5 p.1043-1050, May 2004.

LEWIN, B. Genes VII. **Oxford University Press**, New York, 2000.

LEWIN, R. Evolução Humana. Atheneu, São Paulo. 1999.

LINE, S.R. Variation of tooth number in mammalian dentition: connecting genetics, development and evolution. **Evol Dev**, Malden, v.5, n 3, p.295-304, May/Jun 2003.

LINE, S.R. Molecular morphogenetic fields of development of human dentition. **J Theor Biol**, London, v.211, p.67-75, 2001

LIDRAL, A.C; REISING, B.C. The role of *MSX1* in human tooth agenesis. **J Dent Res**, Chicago, n.81, v.4, p.274-278, Apr 2002.

MAAS, R.; BEI, M. The genetic control of early tooth development. **Crit Rev Oral Biol Med**, Alexandria, n.8, v. 1, p. 4-39, 1997.

McKEOMN, H.F.; ROBINSON, D.L.; ELCOCK, C.; AL-SHAROOD, M.; BROOK, A.H. Tooth dimension in hypodontia patients, their unaffected relatives and a control group measured by a new image analysis system. **Eur J Orthod.**, London, n.24, v.2, p.131-141, Apr 2002.

MENSAH, J.K; *et. al.*. Functional analysis of a mutation in *PAX9* associated with familial tooth agenesis in humans. **J Bio Chem**, Baltimore, n. 279, v.7, p.5924-5933, Feb 2004.

MILLER, D.J. *et. al.*. PAX gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the PAX gene family. **Proc Natl Acad Sci USA**, Whasginton, v.97, no 9, p.4475-4480, Apr 2000.

MOSTOWSKA, A.; KOBIELAK, A.; TRZECIAK, W.H.; Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of *MSX1* and *PAX9* reflect their role in patterning human dentition. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, n.111, v. 5, p. 365-370, Oct 2003.



MOSTOWSKA,A.; KOBIELAK, A.; TRZECIAK, WH.; Novel mutation in the paired Box sequence of *PAX9* gene in a sporadic form of oligodontia. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, n.111, v. 3, p. 272-276, Jun 2003.

MOSTOWSKA,A.; BIEDZIAK, B.; JAGODZINSKI, P.P. Axia inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis. **J Hum Genet**, Tokio, n.51, v. 3, p. 262-266, Jan 2006.

NEI, M. The new mutation theory of phenotypic evolution. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washignton, n. 104, v.30, p.12235-12242, Jul 2007.

NIEMINEN, P. Genetic basis of tooth agenesis. **J Exp Zool (Mol Dev Evol)**, Hoboken, 312 B:Page range, Feb 2009.

NIEMINEN, P. *et. al.* *MSX1* gene is deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome patients with oligodontia. **J Dent Res**, Chicago, n.82, p.1013-1017, Dec 2003.

OGASAWARA, M. *et. al.* Development expression of *PAX1/9* genes in urochordate and hemichordate gills: insight into function and evolution of the pharyngeal epithelium. **Development**, Cambridge, n. 126,v.11 p.2539-2550, Jun 1999.

OGASAWARA, M. *et. al.* *PAX1/PAX9*-Related genes in na agnathan vertebrate, *Lampetra japônica*: expression pattern of *LjPAX9* implies sequential evolutionary events toward the gnathostome body plan. **Dev Biol**, New York, n.223,v. 2, p.399-410, Jul 2000.

OGAWA, T. *et. al.* Functional consequences of interactions between *PAX9* and *MSX1* genes in normal and abnormal tooth development. **J Biol Chem**, Baltimore, n.281, v. 27, p. 18363-18369, Jul 2006.

PAIXÃO- CÔRTEES, V. R. **PAX 9: Uma ferramenta evolutiva?** 2008, 136 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PAIXÃO-CÔRTEES, V. R. *et. al.* O gene *PAX9* e a agenesia dos terceiros molares. In: X Congresso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica (ALAB), 2008, La Plata. X Congreso ALAB. La Plata, 2008.

PECK,S.; PECK, L.; KATAJA, M. Site-specificity of tooth agenesis in subjects with maxillary canine malpositions. **Angle Orthod**, St Louis, v. 66, no 6, p. 473-476, 1996.

PECK,S.; PECK, L.; KATAJA, M. Concomitant occurrence of canine malposition and tooth agenesis: evidence of oral facial genetic fields. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** Appleton, v. 122, no 6, p. 657-660, Dez 2002.

PEREIRA,T.V *Et. al.*. Natural selection and molecular evolution in primate *PAX9* gene, a major determinant of tooth development.**Proc Natl Acad Sci USA**, Washington , v. 103, no 15, p. 5676-5681, Apr 2006.

PERES, R.C. *et. al.*. Association between *PAX9* promoter polymorphisms and hypodontia in humans. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.50, n.10, p.861-871, Oct 2005.

PETERS, H.; BALLING, R. Teeth. Where and how to make them. **Trends Genet**, Amsterdam, n. 15, v.2, p. 59-65, Feb 1999.

PETERS, H.; NEUBUSER, A.; BALLING, R. Pax genes and organogenesis: *PAX9* meets tooth development. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen , v. 106, suppl 1, p. 38-43, Jan 1998.

PAWLOWSKA, E. *et. al.*. Mutations in the human homeobox *MSX1* gene in the congenital lack of permanent teeth. **Tohoku J Exp Med**, Sendai , n.217,v. 4, p. 307-312, April 2009.

POLDER, B.J. *et. al.*. A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. **Community Dental Oral Epidemiol**, Copenhagen, n.32,v.3, p.217-226, 2004.

ROBSON, E.J; HE, S.J; ECCLES,M.R. A panorama of PAX genes in câncer and development. **Nat Rev Cancer**, London , v.6, n. 1, p.52-62, Jun 2006.

ROLLING,S.; POULSEN,S. Agenesis of permanent teeth in 8138 Danish schoolchildren: prevalence and intra-oral distribution according to gender. **Int J Paediatric Dent**, Oxford, n.19,v.3, p.172-175, May 2009.

ROZKOVCOVÁ, E.; MARKOVÁ, M.; DOLEJSI,J. Studies on agenesis of third molars amongst populations of different origin. **Sbo Lek**, Praha, n. 100, v.2, p. 71-84, 1999.

ROZKOVCOVÁ, E. *et. al.*. Development of third molar in the Czech population. **Prague Med Rep**, Prage, n. 105, v. 4, p. 391-422, 2004 a

ROZKOVCOVÁ, E. *et. al.*. Agenesis of third molars in Young Czech population. **Prague Med Rep**, Prague, n. 105, v. 1, p. 35-52, 2004 b

SANTAGATI, F. *et. al.*. Comparative analysis of the genomic organization of *PAX9* and its conserved physical association with *Nkx2-9* in the human, mouse, and pufferfish genomes. **Mamm Genome**, New York , v.12, no3, p.232-237, Mar 2001.

SANTAGATI, F. *et. al.*. Identification of Cis-regulatory elements in the mouse *PAX9/Nkx2-9* genomic region: implication for evolutionary conserved synteny. **Genetics**, Austin, n. 165, v.1, p.235-42, Sep 2003.

SCHALK-VAN DER WEIDE, Y.; *et. al.*. Symptomatology of patients with oligodontia. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 21, p. 247-261, May 1994.

SILVESTRINI, A.R; SINGH, I. The unresolved problem of the third molar: would people be better off without it? **J Am Dent Assoc**, Chicago n. 134, v.4, p.450-455, 2003.

SHARPE, P.T.; YOUNG, C.S. Test-tube teeth. **Sci Am**, New York, n.293, v.2, p.34-41, Aug 2005.

STAPLETON, P. *et. al.*. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, *PAX9*. **Nat Genet**, New York, n. 3, v.4, p. 292-298, Apr 1993.

STOCKTON, D.W.; *Et. al.*. Mutation of *PAX9* is associated with oligodontia. **Nat Genet**, New York , n. 24,v.1, p. 18-19, Jan 2000.

SYMONS, A.L.; STRITZEL, F.; STAMATION, J. Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisor and second premolar. **J Clin Pediatr Dent**, Birmingham, n.17, v.2, p. 109-111, Winter 1993.

THESLEFF, I. Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, n.53, v.3, p.129-134, Jun 1995.

THESLEFF, I. The genetics basis of normal and abnormal craniofacial development. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, v. 56, p.321-325, 1998.

THESLEFF, I. Genetic basis of tooth development and dental defects. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, n. 58, v.5, p.191-194, Oct 2000.

THESLEFF, I.; PIRINEN, S. Dental anomalies: genetics. John Wiley & Sons, Inc. <http://www.els.net>, 2006.

THESLEFF I, NIEMINEN P. Tooth induction. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Inc. <http://www.els.net>. 2006.

THESLEFF, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. **Journal of Cell Science**, London, n. 116, v.1, p. 1647-1648, May 2003.

THALLÓN- WALTON, V; *et. al.*. Identification of a novel mutation in *PAX9* gene in a family affected by oligodontia and other dental anomalies. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 115, p. 427-432, Dec 2007.

TUCKER, A.; SHARPE, P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. **Nat Rev Genet**, London, n.5, v. 7, p.499-508, Jul 2004.

TURNER, C.G.II. The first americans: the dental evidence. **Natl Geogr Res**, Washington, v.2, p.37-46, 1986.

TURNER, C.G.II. Late Pleistocene and holocene population history of East Asia based on dental variation.. **Am J Phys Anthropol**, Philadelphia, n. 73, v. 3, p.305-321, Jul 1987.

TURNER, C.G.II.; MARKOWITZ, M. Dental discontinuity between late Pleistocene and recent Nubians.I. Peopling of the Eurafrikan-South Asian Triangle. **Homo**, Stuttgart, v.41, p.32-41, 1990.

VAN DEN BOOGARD, M.J. *et. al.*. *MSX1* mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. **Nat Genet**, New York, n.24, v.4, p. 342-343, Apr 2000.

VARKI, A.; ALTHEIDE, T.K. Comparing the human and chimpanzee genomes: searching for needles in a haystack. **Genome Res**, Cold Spring Harbor, New York, n. 15, v.12, p. 1746-1758, Dec 2005.

VASTARDIS,H. *et. al.*. A human *MSX1* homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. **Nat Genet**, New York, v. 13, n. 4,p. 417-421, Aug 1996.

VASTARDIS,H. The Genetics of human tooth agenesis: New discoveries for understanding dental anomalies. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, New York, v. 117, no 6,p. 650-656, Jun 2000.

VENTER, J.C *et. al.*. The sequence of the human genome. **Science**, Washington, v. 291, p.1304-1351, Feb 2001.

VIEIRA AR, MEIRA R, MODESTO A, MURRAY JC. *MSX1*, *PAX9*, and *TGFA* contribute to tooth agenesis in humans. **J Dent Res**, Chicago, n. 83, p.723–727, 2004.

WANG,Y.; GU, X. Functional divergence in the Caspase gene family and altered functional constraints: statistical analysis and prediction. **Genetics**, Austin, v. 138, p.1311-1320, 2001.

WANG, Y. *et. al.*. Identification and functional analysis of two novel *PAX9* mutations. **Cells Tissue Organs**, New York, n.189, p. 80-87, 2008.

WRAY, G.A. Transcriptional regulation and the evolution of development. **Int J Dev Biol**, Vizcaya, v.47, n. 7-8, p.675-684, 2003.

WILM, B. *et. al.*. Targeted disruption of *PAX1* defines its null phenotype and proves haploinsufficiency. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, n. 95, v.15, p.8692-7869, Jul 1998.

WOLPOFF, M.H. Dental reduction and the probable mutation effect. **Am J Phys Anthropol**, Philadelphia, n. 43, v. 2, p. 307-308, Sep, 1975.

XUAN, K. *et. al.*. Identification of a novel missense mutation of *MSX1* gene in chinese family with autosomal dominant oligodontia. **Archives of Oral Biology**, Oxford, n.53, v.8, p.773-779, Aug 2008.

ZHANG, Z. *et. al.*. Rescue of cleft palate in *MSX1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of the mammalian palatogenesis. **Development**, Cambridge, n.129, v.17, p. 4135-4146, Sep 2002.

## **Referências *Online*- sites de busca, ferramentas *online* e programas**

### **dbSNP/ NCBI**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

### **HAPMAP**

<http://www.Hapmap.org/CGI-perl/gbrowse/hapmap B35/>

### **Ensembl**

<http://www.Ensembl.org/index.html>

### **Phred, Phrap and Consed**

<http://www.Genome.washington.edu>

### **UCSC Genome Browser on Human**

<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=human>

## GLOSSÁRIO

**Alelo:** Uma das formas variantes de um gene em um locus específico em um dado cromossomo. Os alelos diferentes podem produzir variações nas características herdadas, tais como a cor dos olhos, do cabelo, ou o tipo sanguíneo. Em organismos haplóides, cada alelo é herdado separadamente, um do pai e o outro da mãe. Se os alelos herdados forem iguais teremos um indivíduo homocigoto, enquanto se forem diferentes teremos um heterocigoto.

**Aminoácidos:** Grupo de 20 diferentes tipos de pequenas moléculas disponíveis na natureza, que através da síntese protéica são unidas em uma longa cadeia para formar as proteínas. Diferentes combinações formam diferentes proteínas.

**Autossômico dominante:** Padrão de herança mendeliana onde um indivíduo afetado possui somente uma cópia de um alelo mutante e outra de um alelo normal, e ainda assim manifesta o caráter mutante. Indivíduos com doenças autossômicas dominantes têm uma chance de 50% de transmitir o alelo mutante e, conseqüentemente o distúrbio, para seus filhos.

**Cromossomo:** Longa seqüência de DNA, que contém além dos genes outras seqüências de nucleotídeos. Diferentes tipos de organismos apresentam diferentes números de cromossomos. Os humanos possuem 23 pares de cromossomos, 46 no total: 44 autossomos e 2 cromossomos sexuais (X e Y).

**Códon:** Três bases da seqüência do DNA que especificam um único aminoácido.

**DNA:** Molécula responsável pelo armazenamento da informação hereditária e que está presente nos seres vivos.

**Eletroforese:** Processo pelo qual moléculas podem ser separadas de acordo com o tamanho e carga elétrica. A aplicação de uma corrente de baixa voltagem força as moléculas a se deslocarem através dos poros de uma fina camada de gel. Os fragmentos menores correm com maior velocidade do que os maiores. É um processo capaz de separar fragmentos de DNA.

**Exon:** Região codificadora do gene, ou seja segmento que será transcrito e traduzido. Em eucariotos (incluindo os humanos), os exons de um gene normalmente estão separados por longo segmentos de DNA (chamados de íntrons) cuja função é controversa.

**Gene:** Unidade funcional e física da herança passada dos pais aos seus filhos. Genes representam a porção do genoma com informação para fabricar uma proteína específica.

**Gene candidato:** um gene, localizado numa região do cromossomo suspeita de estar envolvida em um determinado fenótipo.

**Genótipo:** É a identificação genética de um indivíduo.

**Haploinsuficiência:** Uma situação na qual uma proteína é produzida por um único alelo, mas cuja quantidade não é suficiente para garantir o funcionamento normal.

**Projeto Genoma Humano:** Projeto de pesquisa internacional realizado para sequenciar todo o DNA da espécie humana.

**Íntron:** uma sequência de DNA não-codificadora que é copiada inicialmente para o RNAm, mas é cortada no final do processamento do RNAm.

**Locus:** Refere-se à localização de um gene específico em um cromossomo.

**Mutação:** Alteração permanente na estrutura do DNA. Em muitos casos, mudanças no DNA podem ou não causar danos. Ocasionalmente uma mutação pode aumentar as chances de sobrevivência de um organismo, e assim, a mesma pode ser mantida e transmitida para seus descendentes.

**Nucleotídeo:** Um dos componentes da estrutura do DNA ou RNA. O nucleotídeo consiste em uma base (adenina(A), timina(T), guanina(G), citosina(C) ) mais uma molécula de açúcar e um grupo fosfato.



**Fenótipo:** Traços ou características que podem ser observadas em um organismo. As características fenotípicas não são necessariamente genéticas.

**Polimorfismo:** Variação comum na sequência de DNA entre os indivíduos. Significa a presença de mais de um alelo em nível populacional com a frequência do alelo menos frequente maior que 1%.

**Seqüenciamento do DNA:** Determinação da ordem exata dos nucleotídeos (bases: G, A, T e C) em um segmento do DNA.

**SNP:** Do inglês: single nucleotide polymorphism – mutação de um único nucleotídeo, levando a existência de mais de um alelo por locus, sendo que a frequência do alelo menos comum é maior do que 1% em determinada população.



## **APÊNDICE B**

### **Termo de Consentimento Informado**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Odontologia  
Departamento de Cirurgia e Ortopedia  
Departamento de Genética – Instituto Biociências

### **Termo de Consentimento Informado**

#### **Prezado(a) Senhor(a):**

A presente pesquisa visa identificar as possíveis causas da agenesia dentária (ausência de dentes), através da análise de material genético denominado DNA (ácido desoxirribonucléico), o qual será extraído da saliva. A coleta de saliva será de uma pequena quantidade (600 microlitros) após escovação. A amostra será obtida com a utilização de um Kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (pequeno tubo) e analisada através de métodos laboratoriais específicos para identificar os genes relacionados com a ausência de dentes.

O material coletado será armazenado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sem descrição de nome, e com um número de código com chave de conhecimento exclusivo dos pesquisadores. Caso haja interesse futuro na utilização dos dados obtidos para outras linhas de investigação, os pacientes somente serão incluídos após a assinatura de um novo termo de consentimento.

Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara e detalhada:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos ou benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;
- da liberdade de retirar meu consentimento informado, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer prejuízo a continuação do meu tratamento.

Em caso de qualquer dúvida, os pacientes são orientados a entrar em contato com o pesquisador responsável, Dr. Carlos Alberto Mundstock (3308-5201) ou o executor deste trabalho, Dra. Tatiana da Silva Braga, na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Uma Cópia do Consentimento Informado ficará com o paciente.

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_  
recebi as orientações necessárias para entender o presente estudo, assim como li a informação do mesmo.

\_\_\_\_\_  
Paciente e/ou Responsável

\_\_\_\_\_  
Pesquisador