



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Prevalência dos polimorfismos do gene DLX3 em pacientes diagnosticados com
Taurodontismo na Clínica Dentária Universitária de Viseu*

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para
a obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária*

Por

Maria Leonor de Freitas Gabão Veiga

Setembro 2012



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prevalência dos polimorfismos do gene DLX3 em pacientes diagnosticados com Taurodontismo na Clínica Dentária Universitária de Viseu

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para
a obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária*

Orientador: Professora Doutora Maria José Correia

Co-Orientador: Mestre Pedro Braga

Por

Maria Leonor de Freitas Gabão Veiga

Setembro 2012

*“Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos
pequenos começos”*

Laio Tse

Aos meus Pais,

por acreditarem em mim, pelas oportunidades que me concederam,

e por todo o incentivo ao longo deste percurso.

Agradecimentos

À minha Orientadora, Professora Doutora Maria José Correia, sem a qual a realização deste trabalho teria sido impossível, gostaria de expressar não apenas a minha gratidão, mas também a minha profunda admiração pela sua competência, dedicação e determinação.

Ao meu co-Orientador, Mestre Pedro Braga pela orientação, apoio e conhecimentos transmitidos.

À Mestre Mariana Seabra e Mestre Andreia Figueiredo por toda a dedicação, disponibilidade e incentivo para a concretização deste trabalho.

Aos meus Pais, pela transmissão dos seus conhecimentos e pelo apoio incondicional.

À minha binómia Brenda, pela amizade e companheirismo.

Ao Frederico, pela Pessoa que é, paciente, amiga e compreensiva.

Ao Marcelo Cigarro, Maria Isabel Nunes e Inês Silveira pelo ânimo e incentivo nesta última fase do percurso académico.

Ao Doutor Fernando Mendonça do Círculo Médico, pelas ilustrações.

Ao Mestre Paulo Ribeiro pela disponibilidade e ajuda informática.

A todos os participantes que se disponibilizaram em participar neste estudo.

A todos aqueles que directa ou indirectamente, tornaram possível a realização deste trabalho.

Lista de abreviaturas

A - Adenina

ADN - ácido desoxirribonucleico

DNA - *deoxyribonucleic acid*

Amp - amplificado

BMP – Proteína morfogenética do osso

C - Citosina

CDU-UCP – Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa

UDC-CUP (University's Dental Clinic - Catholic University of Portugal)

CID – Classificação Internacional Doenças

DLX – *Distal-less Homeobox*

DODD – Displasia Oculo-Dento-Digital

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – Factor epidérmico de crescimento

EPFN - Epiprofina

FGF – Factor fibroblástico de crescimento

G - Guanina

GJA1- *Gap-Junction-Alpha 1*

Hb – globulina Beta

HD – Homeodomínio

JAC – junção amelo-cementária

Min – minutos

MM – Marcador Molecular

°C - graus centígrados

OMIM - *Online Mendelian Inheritance*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Pares de bases

PCR - reacção em cadeia de polimerase

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PUBMED – Publisher Medline

RPM – rotações por minuto

SHH – gene *Sonic Hedgehog*

SPSS – *Statistical Package for the Social Science*

T – Timina

TE - Tris-EDTA

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TDO – Síndrome Trico- Dento- Ósseo

WHO – *World Health Organization*

WNT – gene *Wingless*

Resumo

Introdução: O processo de desenvolvimento da dentição humana é complexo e distúrbios durante este processo dão origem a manifestações dentárias únicas. O taurodontismo é uma anomalia do desenvolvimento dentário, caracterizada pelo aumento da câmara pulpar e pelo deslocamento apical do soalho pulpar. A etiologia desta anomalia de tamanho continua incerta, contudo existem estudos que indicam a possibilidade de o taurodontismo ser geneticamente transmissível. O objectivo deste estudo foi verificar a prevalência de taurodontismo numa amostra de pacientes da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa (CDU-UCP) e adicionalmente verificar a prevalência dos polimorfismos do gene DLX3 nestes pacientes e seus familiares.

Materiais e Métodos: Realizou-se um estudo-piloto desenhado como sendo um estudo epidemiológico observacional transversal onde se avaliou uma amostra de pacientes com idade compreendida entre os 10-30 anos de idade, que dispunham de ortopantomografia no ficheiro informático da CDU-UCP, com o intuito de verificar a existência de taurodontismo. Após a selecção de ortopantomografias com dentes taurodonticos, utilizou-se o método de classificação de Shifman & Chanannel para avaliar as peças dentárias quanto ao grau de severidade. Depois de avaliados e identificados os pacientes com taurodontismo, procedeu-se à recolha de uma amostra de saliva aos próprios e familiares, para pesquisa do polimorfismo no gene DLX3.

Resultados: A prevalência de taurodontismo numa amostra de 1369 ortopantomografias foi de 1,75%. A idade média observada nos pacientes com taurodontismo foi de 21,7 e a distribuição de acordo com o género não foi diferente ($p < 0,05$). Dos 627 dentes analisados, 6,54% eram taurodonticos e na sua maioria (58,5%) hiperturodonticos. O tipo de dente mais prevalente foram os pré-molares (51,2%), e a dentição mais afectada foi a permanente.

Conclusão: A prevalência de taurodontismo na população avaliada da CDU-UCP está dentro dos valores encontrados noutros estudos, assim como o grau de severidade do taurodontismo. Contudo, o tipo de dente mais afectado é diferente, sendo o taurodontismo mais prevalente em molares na maioria dos estudos publicados. A falta de resultados na pesquisa do polimorfismo do gene DLX3 com amostras de saliva, leva a concluir que é necessário ajustar procedimentos de recolha e isolamento do ADN para que seja possível a amplificação por PCR dos fragmentos do gene DLX3 contendo a mutação.

Palavras-chave: Taurodontismo, DLX3.

Abstract

Introduction: The process of the human dental development is very complex and any disturbs during such period could originate unique dental manifestations. Taurodontism is an abnormality of the dental development, which is characterized by the elongation of the pulp chamber and by apical floor displacement of the pulp. The etiology of this abnormality remains uncertain, but there are studies which indicate the possibility of Taurodontism being genetically transmissible. The aim of this study was to assess the prevalence of Taurodontism in a sample of patients of the UDC-CUP (University's Dental Clinic - Catholic University of Portugal), and additionally assess the prevalence of polymorphisms in DLX3 gene in patients and their relatives.

Materials and Methods: We conducted a pilot study characterized as a cross-sectional epidemiological study to evaluated a sample of patients, aged 10-30 years, with panoramic radiography in the informatics file of the UDC-CUP, with the purpose of assessing the prevalence of Taurodontism. After the selection of the panoramic radiographies containing taurodontic teeth, we used the Shifman & Chanannel classification to evaluate the dental pieces concerning the degree of severity of this trait. After the identification of the patients with Taurodontism, we proceeded to the collection of saliva samples of some patients and their relatives to detect the presence of polymorphisms in the DLX3 gene.

Results: The prevalence of Taurodontism in a sample of 1369 panoramic radiographies was 1,75%. The mean age of the patients with the trait was 21,7 and there are no statistical differences (at a 5% level) between the prevalence by genre. From the 627 teeth analyzed, 6,54% were taurodontic. Hipertaurodontism was the most prevalent form of the trait (58,5%). Premolars were the teeth where taurodontism was most prevalent (51,2%) and the permanent dentition was the most affected .

Conclusion: The prevalence of taurodontism evaluated in CDU-CUP's population is within the range found in other studies. The degree of taurodontism's severity most prevalent (Hypertaurodontism) is also identical to the values observed in other studies, yet the type of tooth was different, for in other studies molars were the most affected teeth. The lack of results in the search for polymorphisms in the DLX3 gene prompts us to suggest that changes to the methods of collection and DNA isolation (the use of commercial DNA extraction kits) are needed in order to successfully amplify the DLX3 fragments containing mutations.

Key-words: Taurodontism, DLX3.

Índice

Agradecimentos.....	I
Lista de abreviaturas.....	III
Resumo.....	V
Abstract	VII
Índice.....	IX
I. Introdução	1
II. Revisão Bibliográfica	5
1. Odontogênese.....	7
2. Anomalias do desenvolvimento dentário.....	13
3. Taurodontismo	15
3.1 Conceito de Taurodontismo	15
3.2 Etiologia	16
3.3 Epidemiologia	17
3.4 Síndromes e patologias associadas.....	19
3.5 Diagnóstico.....	20
3.6 Classificação.....	21
3.7 Considerações Clínicas	24
3.7.1 Considerações Endodônticas.....	24
3.7.2 Considerações em Dentisteria Operatória.....	25
3.7.3 Considerações Cirúrgicas	25
3.7.4 Considerações Periodontais.....	25
3.7.5 Considerações Protéticas.....	26
3.7.6 Considerações Ortodônticas	26
3.8 Determinantes genéticas do taurodontismo.....	27

3.8.1 DLX3.....	27
3.8.1.1 Mutação por remoção do nucleótido GGGG	28
3.8.1.2 Mutação por remoção do nucleótido CT.....	28
3.8.2 GJA1.....	29
III. Objectivos.....	31
IV. Materiais e Métodos.....	35
1. Desenho do estudo e caracterização da amostra	37
2. Avaliação dos registos clínicos	37
3. Diagnóstico de taurodontismo	38
4. Recolha de amostras de saliva	38
5. Pesquisa do polimorfismo no gene DLX3	39
5.1 Extracção de ADN	39
5.2 Verificação espectrofotométrica da quantidade e qualidade de ADN isolado.....	39
5.3 Amplificação de ADN em reacção de PCR	39
5.4 Separação dos amplificados por electroforese	40
6. Análise estatística.....	40
V. Resultados	41
1. Caracterização da amostra	43
2. Classificação de dentes com taurodontismo	46
3. Análise Genética	49
VI. Discussão	53
VII. Conclusão	61
VIII. Referências Bibliográficas	65
IX. Anexos	73
Anexo 1 – Índice de Figuras	75

Anexo 2 – Índice de Tabelas	77
Anexo 3 – Dados	79
Anexo 4 – Diagnóstico Taurodontismo	81
Anexo 5 – Consentimento informado	83
Anexo 6 – Dados da recolha de amostras de saliva	85
Anexo 7 – Protocolos	87
Protocolo 1: Extracção de DNA	87
Protocolo 2: Extracção de DNA	89
Protocolo 3: Extracção com kit DNA Genotek	91
Protocolo 4: Reacção de PCR	93
Protocolo 5: Gel agarose NuSieve a 4%	95

I. Introdução

O taurodontismo é uma anomalia do desenvolvimento dentário, devida a uma falha da invaginação da bainha epitelial de Hertwig a nível horizontal, que se caracteriza pelo deslocamento apical da bifurcação ou trifurcação das raízes, apresentando assim os dentes, câmara pulpar alongada e canais radiculares curtos ⁽¹⁾. Os molares permanentes são os mais afectados, podendo afectar também pré-molares. Esta alteração pode ser detectada em dentição permanente e decídua, unilateral ou bilateral, e em qualquer combinação de dentes ou quadrantes ⁽²⁾. Esta anomalia é classificada em hipo-, meso- e híper- taurodontismo, baseado no grau de deslocamento apical do soalho da câmara pulpar ⁽³⁾. O diagnóstico só é possível através de ortopantomografia.

Apesar de serem escassos, os estudos epidemiológicos sobre o taurodontismo em dentição decídua e permanente, existe uma grande variabilidade nas taxas de prevalência a nível mundial ⁽⁴⁾ entre as diversas populações. O motivo para tal discrepância, pode ser não só as diferentes etnias, mas também diferenças de critérios utilizados para a interpretação e classificação do taurodontismo.

É sugerido que o Taurodontismo é geneticamente transmitido e que possa estar associado a várias síndromes. Concretamente têm sido descritas alterações no gene DLX3 ⁽⁵⁾ comuns em pacientes que apresentam taurodontismo e variações do gene GJA1, apesar de estas não estarem definitivamente estabelecidas como essenciais para o estabelecimento dos sinais clínicos ⁽⁶⁾.

Neste trabalho um dos objectivos é o estudo da prevalência de taurodontismo em pacientes da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa (CDU-UCP). Adicionalmente à descrição e classificação dos sinais radiográficos que determinaram o diagnóstico, é feita também a comprovação genética da existência de mutação no gene DLX3 de alguns pacientes aos quais foi possível recolher saliva.

II. Revisão Bibliográfica

1. Odontogénese

Por volta da 6^a semana de vida intra-uterina começa o processo de desenvolvimento dentário. Embora os dentes se desenvolvam em diferentes momentos, o processo de formação dentária, também conhecido como odontogénese, ocorre da mesma maneira para todos os dentes ⁽⁷⁾. A Odontogénese é um processo contínuo e complexo, que resulta de interacções recíprocas e sequenciais, entre células epiteliais e mesenquimais derivadas da crista neural, que regulam as actividades celulares - como a proliferação, condensação, adesão, migração, diferenciação e secreção ⁽⁸⁾.

A formação dentária pode ser dividida em três fases morfológicas contínuas: a iniciação, a morfogénese (ou proliferação) e a histogénese ⁽⁹⁻¹¹⁾.

A iniciação consiste no estabelecimento da localização dos futuros dentes, através do surgimento dos gérmens dentários ao longo de uma invaginação do epitélio oral, denominada de lâmina dentária. A morfogénese consiste na determinação da forma do dente através da combinação da proliferação e movimentos celulares. Por sua vez, a histogénese é uma continuação da diferenciação celular para se originarem os tecidos dentários completamente formados, tanto os mineralizados (esmalte, dentina e cemento), como os não mineralizados (polpa dentária e ligamento periodontal) ^(10, 11).

Fases da odontogénese

Entre a 5^a e a 6^a semana de gestação, as células da camada basal do epitélio oral proliferam e invaginam para o mesênquima subjacente para formar uma banda epitelial primária. Pela 7^a semana, a banda epitelial primária vai dar origem à lâmina vestibular e lâmina dentária ⁽¹²⁾. A primeira está relacionada com o desenvolvimento do vestíbulo oral, delineamento dos lábios e mucosas jugais, enquanto que a segunda contribui para a formação dentária ⁽⁸⁾, que através de uma actividade proliferativa e localizada leva à formação do órgão de esmalte.

A partir deste ponto, a formação dentária prossegue com os 3 estádios, classificados com base em propósitos descritivos, de acordo com o grau de morfodiferenciação e histodiferenciação dos seus componentes epiteliais ^(10, 12).

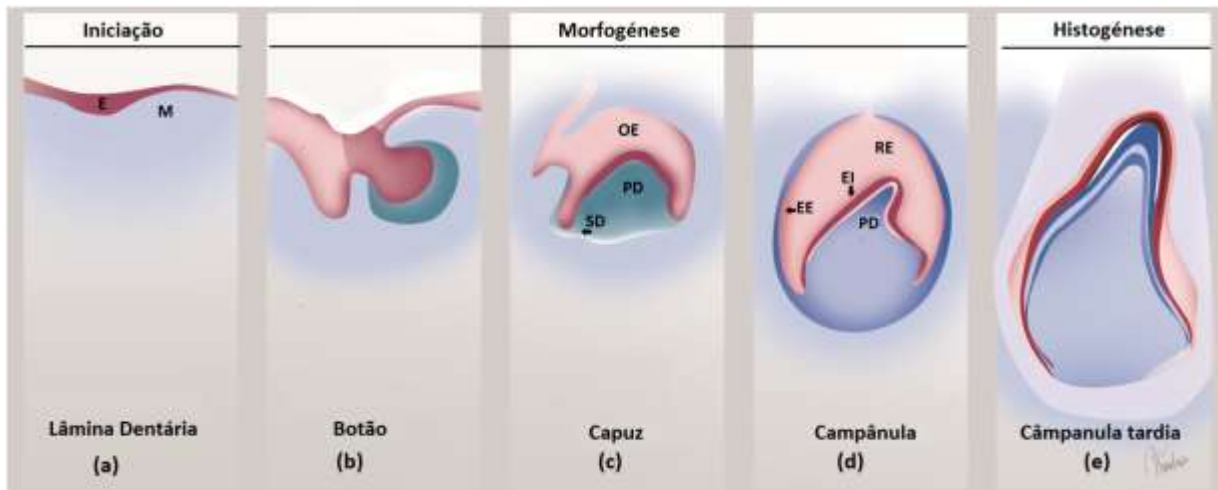


Figura 1: Estádios do desenvolvimento dentário. Adaptado de Riviere ⁽¹³⁾. **(a) Lâmina Dentária:** E (epitélio) M (mesênquima) **(b) Botão** **(c) Capuz:** OE (órgão de esmalte), PD (papila dentária), SD (saco dentário); **(d) Campânula:** RE (retículo estrelado), EI (epitélio interno), EE (epitélio externo); **(e) Campânula tardia:** a vermelho encontra-se o epitélio oral e os seus derivados (esmalte), e a azul o mesênquima e os seus derivados (dentina).

No estádio de botão, durante a 7^a e 8^a semanas intra-uterinas, ocorre a proliferação da lâmina dentária, adquirindo a forma de um botão, e proliferação do mesênquima adjacente. Cada botão e mesênquima envolvente vão dar origem ao dente e tecidos de suporte. Inicia-se a formação do órgão do esmalte que se apresenta com uma forma ovóide ^(8, 10, 12, 14).

Entre a 11^a e a 13^a semana intra-uterina, decorre o estádio de capuz, onde a lâmina dentária continua a sua proliferação adquirindo a forma de um capuz. Neste estádio é possível identificar os elementos formadores do dente e dos tecidos de suporte, o órgão de esmalte (futuro esmalte), a papila dentária (futuras dentina e polpa) e o saco dentário (futuro ligamento periodontal e osso alveolar). Nesta fase a lâmina dentária forma uma extensão para lingual/palatino, iniciando a formação da dentição permanente ^(8, 10, 12, 14).

O estádio de campânula inicia-se por volta da 14^a semana do desenvolvimento intra-uterino. Nesta fase com avanço da morfodiferenciação e da histodiferenciação, o gérmen dentário atinge a fase de campânula. É nesta altura que ocorre a diferenciação e especialização celular. As camadas de células epiteliais que eram até este ponto semelhantes, tornam-se

morfológica e histologicamente distintas, ficando o órgão de esmalte diferenciado e constituído por: epitélio interno, estrato intermédio, retículo estrelado e epitélio externo ^(8, 10, 12).

Por último, na 18^a semana inicia-se o estadio de campânula tardia, ou morfodiferenciação, onde ocorrem duas novas fases de diferenciação: fase aposicional, em que a dentina, esmalte e cemento são segregados em sucessivas camadas, e a fase de maturação onde há mineralização dos tecidos dentários ^(8, 10, 12).

Neste estadio de campânula tardia, quando a amelogénese (formação de esmalte) e a dentinogénese (formação de dentina) estão bem avançadas, o epitélio do esmalte externo e interno formam uma bainha epitelial, designada por bainha epitelial de Hertwig, com duas camadas, que se desenvolvem apicalmente, esboçando o formato da futura raiz ^(8, 10, 15). O início do desenvolvimento radicular (rizogénese) coincide com a fase axial da erupção dentária. As células da camada interna do folículo dentário diferenciam-se em cementoblastos e inicia-se então a cementogénese. Pouco tempo depois do início da formação da raiz o dente inicia o processo de erupção até assumir a sua posição final na arcada dentária, em oclusão com o dente antagonista ^(10, 15). A aposição de cemento e dentina na raiz continua após a erupção, estando a raiz completamente formada após 2/3 anos após a erupção dentária ⁽⁹⁾.

A odontogénese não ocorre simultaneamente nas duas arcadas dentárias mas sim por sectores, primeiro na mandíbula anterior, depois na maxila anterior e por fim nos segmentos posteriores de ambas as arcadas ⁽¹⁰⁾.

Se os distúrbios ocorrerem na fase da iniciação, devido a falta de iniciação ou interrupção na proliferação de células, poderemos estar perante uma anomalia dentária de número, como a agenesia dentária. Se ocorrer na fase de morfodiferenciação, poderemos estar perante uma anomalia dentária de tamanho e de forma, como o taurodontismo, macrodontia e microdontia. A tabela seguinte enumera as várias anomalias dentárias que podem ocorrer durante as fases da dentinogénese (tabela 1).

Tabela 1: Diferentes fases da odontogénes e anomalias dentárias associadas. (Adaptado de Cameron)⁽¹⁶⁾

Fase da odontogénes	Alteração desenvolvimento dentário	Tipo de anomalia
Iniciação e Proliferação	Indução da ectoderme oral pelo mesênquima.	Oligodontia; Dentes supranumerários; Geminção /Fusão; Quistos primordiais; Ameloblastoma; Odontoma (composto).
Histodiferenciação	Desenvolvimento de múltiplos defeitos nos tecidos dentários.	Odontoma (complexo); Odontodisplasia regional.
Morfodiferenciação	Anomalias de tamanho e de forma.	Macrodonia; Microdonia; Dentes invaginados e evaginados; Incisivos de Hutchinson's Cúspide de Carabelli; Cúspide talão; Taurodontismo.
Aposição	Aposição da matriz orgânica e primeiro estadio de mineralização.	Dentinogénes imperfeita; Displasia da dentina; Quistos; Amelogénes Imperfeita (hipoplásica); Hipoplasia de esmalte.
Calcificação	Estadio secundário de mineralização do esmalte e da dentina	Amelogénes imperfeita (hipomineralizada); Opacidades de esmalte; Fluorose severa.
Maturação	Remoção de água e proteínas do esmalte	Amelogénes imperfeita; Fluorose suave.

Interacções epitélio-mesênquima

Os eventos primários da formação dentária dependem de uma interacção sequencial e recíproca entre epitélio e o mesênquima, que envolve a secreção de moléculas sinalizadoras⁽⁷⁾. Estas moléculas sinalizadoras controlam os estadios da formação dentária através da coordenação da proliferação celular, diferenciação, apoptose, síntese da matriz extracelular e deposição mineral, e induzem a expressão de factores de transcrição na resposta tecidular, que são dependentes em cada estadio^(17, 18). Falhas funcionais que envolvam peças importantes nestes sistemas de sinalização acabam por impedir o desenvolvimento normal do dente⁽¹⁹⁾.

A maior parte dos estudos têm sido realizados com ratos, que são o principal modelo utilizado pelos biólogos para investigar o desenvolvimento dentário nos mamíferos. Os escassos conhecimentos directos das bases moleculares da odontogénese humana derivam do estudo de patologias em que se verificam anomalias no desenvolvimento ^(18, 20). Estima-se que sejam mais de 300 os genes envolvidos na odontogénese ^(17, 21) e que estes determinam o número, posição, tamanho e a forma dos diferentes dentes. Mutações nestes genes têm sido descritas como causa de anomalias dentárias no ser humano ⁽⁷⁾.

Durante o desenvolvimento dentário, a interacção entre o epitélio e o mesênquima é feita por diferentes famílias de moléculas de sinalização e os seus receptores. Estas compreendem as proteínas morfogenéticas do osso (BMP); factor fibroblástico de crescimento (FGF); genes *sonic hedgehog* (SHH), genes *wingless* (WNT) e o factor epidérmico de crescimento (EGF) ^(7, 18, 21-24). Recentemente, a Epiprofina/Sp6 (Epf) foi apontada como um factor de transcrição essencial na morfogénese e diferenciação dentária ⁽¹⁷⁾. Estas vias de sinalização envolvem moléculas como receptores de superfície celular e factores de transcrição que regulam a expressão genética ⁽²²⁾. A Figura 2 ilustra a complexidade deste processo, envolvendo múltiplos intervenientes necessários para o normal desenvolvimento dentário.

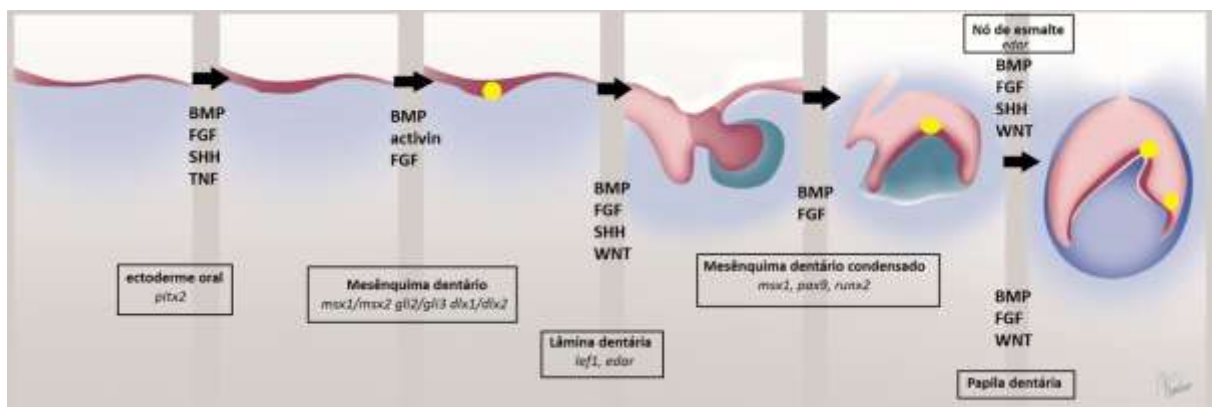


Figura 2: Regulação molecular do desenvolvimento dentário. Adaptado de Bailleul-Forestier *et al.* ⁽⁷⁾ e Thesleff *et al.* ⁽²⁵⁾. Interacções entre o epitélio (vermelho) e mesênquima (azul) são mediadas por sinais moleculares (BMP, FGF, SHH, TNF, WNT). Estes sinais actuam durante o desenvolvimento dentário e regulam a expressão de genes (itálico) nos diferentes tecidos (caixas). A amarelo estão representados os centros de sinalização.

Uma característica do desenvolvimento dentário é o aparecimento de centros de sinalização transitórios no epitélio durante as etapas morfogénicas. Estes centros de sinalização são conjuntos de células responsáveis pela expressão de mais de dez moléculas sinalizadoras diferentes, como SHH, BMPs, FGF e Wnts. Os primeiros centros de sinalização aparecem na lâmina dentária quando se inicia a fase do botão. Posteriormente, na transição da fase de botão para capuz, aparecem os centros de sinalização do nó de esmalte. Estes regulam a morfogénese avançada da coroa do dente e controlam a iniciação dos nós de esmalte secundários nos locais das dobras epiteliais que marcam a formação das cúspides ^(25, 26).

2. Anomalias do desenvolvimento dentário

O processo de desenvolvimento da dentição humana é complexo ^(10, 15). Sabe-se que no decorrer deste processo, as dentições são susceptíveis de sofrer influências extrínsecas ou intrínsecas. A ocorrência de distúrbios em qualquer estadio do desenvolvimento dentário pode dar origem a manifestações únicas, tanto na dentição decídua como na dentição permanente ⁽²⁷⁾.

Relativamente à origem das anomalias dentárias de desenvolvimento, estas resultam de irregularidades na diferenciação da lâmina dentária e/ou nos gérmenes dentários. Estas irregularidades podem advir de factores congénitos, herdados, adquiridos ou idiopáticos ⁽⁷⁾, ocorrendo durante o período de formação dentária, antes e/ou após o nascimento.

As alterações na formação do órgão dentário podem compreender variações nos tecidos constituintes do dente e consequentes anomalias estruturais, de forma, tamanho ou número de dentes ⁽²⁸⁾. Existem vários sistemas de classificação de anomalias dentárias: alguns autores adoptam a anatomia dentária e estruturas de suporte para reunir alterações semelhantes, outros agrupam-nas segundo o seu comportamento morfológico e funcional em anomalias de número, volume, posição, forma e tamanho. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou as anomalias do desenvolvimento dentário entre outras, como: anomalias de número, de forma e tamanho, de cor, de estrutura e textura, de erupção e esfoliação ⁽²⁹⁾ (Tabela 2).

Estas classificações são importantes, na medida em que facilitam o conhecimento e diagnóstico precoce das alterações dentárias, de maneira a otimizar o plano de tratamento e prognóstico das mesmas ⁽³⁰⁾.

As anomalias dentárias são alvo de estudo da antropologia dentária e da genética de populações ⁽³¹⁾. A pesquisa de antecedentes genéticos é desejável, não só para nomenclatura ou definição da condição verificada, como também pela possibilidade de fornecer informações importantes relacionadas com o prognóstico, bem como o risco de ocorrência de tais anomalias na descendência de gerações futuras ⁽²⁸⁾. Concomitantemente, a implicação de alguns genes no desenvolvimento de anomalias dentárias permite ainda o esclarecimento dos detalhes moleculares do desenvolvimento dentário.

Tabela 2: Classificação das anomalias dentárias de desenvolvimento segundo a OMS. (adaptado da *World Health Organization*)⁽²⁹⁾.

K00 Distúrbios do desenvolvimento e da erupção
K00.0 Anodontia
Hipodontia
Oligodontia
K00.1 Dentes supranumerários
Distomolar
Quarto molar
Mesiodens
Paramolar
Dente suplementar
K00.2 Anomalias do tamanho e da forma dos dentes
Concrescência
Fusão
Geminação
Dente evaginado
Dente invaginado ["dens in dens"]
Pérolas de esmalte
Macrodonia
Microdonia
Dentes conóides
Taurodontismo
Tubérculo paramolar
Exclui: tubérculo de Carabelli, considerado uma variação normal e não deve ser codificado
K00.3 Anomalias de cor
Fluorose Dentária
Manchas do esmalte
Opacidade do esmalte não associadas ao flúor
K00.4 Anomalias na formação dos dentes
Aplasia e Hipoplasia do cimento
Dilaceração
Hipoplasia do esmalte pré-natal, neonatal, pós natal
Odontodisplasia regional
Dente de Turner
Exclui: incisivos de Hutchinson's e molares em amora que se observam na sífilis congênita (A50.5), dentes manchados (K00.3)
K00.5 Anomalias hereditárias da estrutura dentária, não classificadas em outra parte
Amelogénese imperfeita
Dentinogénese imperfeita
Odontogénese imperfeita
Dente em concha
Displasia da dentina
K00.6 Anomalias da erupção dentária
Dentes natais
Dentes neonatais
Erupção prematura dos dentes ["dentia praecox"]
Dentes temporários [decíduos] retidos [persistentes]
Erupção tardia
Queda prematura de dentes temporários (decíduos)
K00.7 Sinais e Sintomas de erupção dentária
K00.8 Outros distúrbios do desenvolvimento dos dentes
Alterações de cor durante a formação dos dentes
Manchas intrínsecas dos dentes
K00.9 Distúrbio não especificado do desenvolvimento dentário
Distúrbios da odontogénese

3. Taurodontismo

3.1 Conceito de Taurodontismo

O taurodontismo é uma patologia referida pela OMS, na classificação estatística internacional de doenças (CID-10), no capítulo das patologias do sistema digestivo (K00-K93), na divisão das patologias da cavidade oral, glândulas salivares e maxilares (K00-K14), mais concretamente nos distúrbios de desenvolvimento e da erupção dos dentes (K00), e subdivisão das anomalias dentárias do tamanho e da forma (K00.2) ⁽²⁹⁾.

O taurodontismo é uma alteração morfológica que ocorre durante o desenvolvimento dentário e que se caracteriza pelo aumento da câmara pulpar e pelo deslocamento apical do soalho da câmara pulpar ^(32, 33). Os dentes com esta anomalia apresentam uma desproporção a nível longitudinal, apresentando uma câmara pulpar alongada verticalmente, deslocação apical da bifurcação ou trifurcação das raízes, ausência de constrição a nível da junção amelo-cementária e raízes curtas ^(30, 32-34).

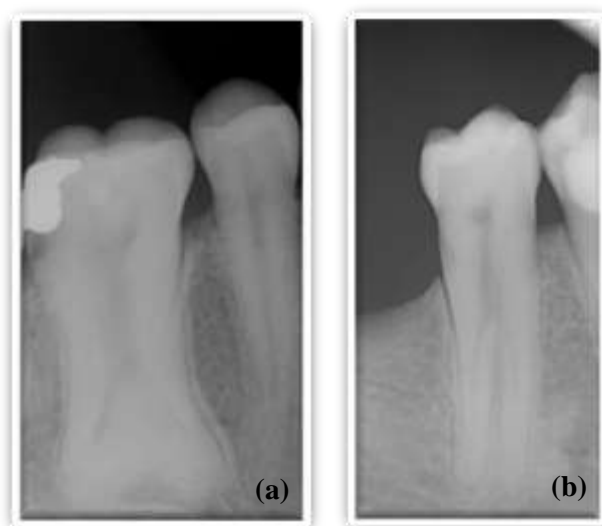


Figura 3: Radiografias periapicais que evidenciam casos de taurodontismo. (a) dente 2.6 Hipertaurodontico (b) dente 4.4 hipertaurodontico.

O Taurodontismo foi descrito primordialmente em remanescentes de Hominídeos pré-históricos por Terra em 1903 ⁽³⁵⁾ e Gorjanovic-Kramberg em 1908 ^(1, 2).

O termo “Taurodontismo” foi usado pela primeira vez por Arthur Keith em 1913 ^(1, 2), para descrever os dentes pré-históricos do homem Neandertal. O termo foi cunhado como “Tauros”, que em latim significa touro, e “odontos”, que em grego significa dente, devido a sua aparência similar com os dentes de ruminantes ^(36, 37).

Por esta razão, alguns autores consideraram durante muitos anos o Taurodontismo como típico do homem de Neandertal ⁽³⁸⁾, por ser um padrão primitivo, e porque a anomalia era mais encontrada em populações onde os dentes eram usados como ferramentas ⁽³⁹⁾. Contrariando esta ideia, Mena ⁽⁴⁰⁾ afirmou que a anomalia não podia ser considerada como uma característica racial, pois tem sido encontrada em diferentes raças, e em zonas geográficas amplamente separadas ⁽³⁵⁾.

Durante alguns anos pensou-se que o taurodontismo estivesse ausente nas populações mais modernas, pelo menos nas suas formas mais extremas, mas com o elevado número de relatos quer em dentição decídua quer permanente, ou ambas, parece que é mais prevalente do que o que se pensava ^(41, 42).

3.2 Etiologia

As teorias sobre a possível etiologia do taurodontismo têm sido variadas ao longo de vários anos ⁽¹⁾, continuando incerta ⁽⁴⁾.

Tem sido sugerido que esta anomalia represente a nível etiológico um carácter especializado ou retrógrado; um padrão primitivo; uma característica atávica; uma característica ligada ao cromossoma X familiar; um traço autossómico dominante ⁽⁴³⁾.

Contudo existem também várias teorias sobre a patogénese da formação radicular de um dente taurodontico, sendo relatadas como um padrão incomum de desenvolvimento; um atraso na calcificação da câmara pulpar; uma deficiência odontoblástica; e uma alteração na bainha epitelial de Hertwig ⁽⁴⁴⁾.

Actualmente, considera-se o taurodontismo uma alteração morfológica na fase do desenvolvimento dentário, que resulta de uma falha na invaginação da bainha epitelial de Hertwig's a nível horizontal ^(1, 2, 38). A formação de esmalte e dentina num dente normal, acontece ao nível da fractura da junção amelo-cementária, pois é nesta zona que as células epiteliais dentinárias proliferam e penetram no mesênquima subjacente, para formar a bainha epitelial de Hertwig's, esta determina o número, tamanho e morfologia das raízes. Por sua vez, num dente com taurodontismo, a invaginação horizontal da bainha epitelial de Hertwig's ocorre perto do ápice, mas como ocorre muito mais tarde que num dente normal, verifica-se a localização apical da furca radicular. Ao ocorrer esta anomalia, a função dos odontoblastos não é modificada e a dentinogénese segue o seu curso normal ^(38, 45).

No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares da morfogénese radicular ⁽²⁷⁾. A determinação genética do taurodontismo é provável que seja poligénica. Actualmente, as mutações no gene *distal-less homeobox* (DLX3), expresso durante a morfogénese da raiz, têm sido associadas com o taurodontismo na Síndrome Trico-Dento-Ósseo (TDO) e com amelogénese imperfeita autossómica dominante ⁽⁴⁾.

Existem numerosas hipóteses relacionadas com os possíveis factores etiológicos, desde hereditárias, genéticas e ambientais, como trauma físico, radioterapia e quimioterapia ⁽⁴⁶⁾, alterações por doenças sistémicas como febre ou a ingestão de fármacos durante as diferentes fases de desenvolvimento dentário ⁽³⁸⁾.

3.3 Epidemiologia

A prevalência expressa o número de vezes que determinada condição ocorre numa população específica, por um período de tempo determinado.

O Taurodontismo pode afectar a totalidade das peças dentárias ou apenas uma, ser unilateral ou bilateral, e em qualquer combinação de dentes e quadrantes. A prevalência é maior na dentição permanente (3-35%) do que na decídua (<1%) ⁽⁴⁷⁾. É mais comum ocorrer em molares, segundos e terceiros, mas ocasionalmente pode afectar pré-molares, caninos mandibulares e incisivos ^(2, 43, 48, 49).

A revisão da literatura revela uma grande discrepância na prevalência de taurodontismo em diferentes populações. A sua prevalência tem sido relatada a variar entre 0,2% e 22,8% ⁽⁴⁾.

A taxa de prevalência de taurodontismo na população em geral é baixa e é relatada a variar de acordo com a etnia. É comumente observado entre os esquimós e nativos da Austrália e América Central ⁽⁵⁰⁾.

Na tabela seguinte é feita uma síntese de alguns trabalhos de prevalência do Taurodontismo (tabela 3) ^(42, 44, 51-59).

Tabela 3: Análise da prevalência do Taurodontismo em algumas populações.

<i>Autor, Ano da publicação</i>	<i>País</i>	<i>Prevalência</i>
Shifman, 1978	Israel	5,60%
Ruprecht, 1987	Arábia Saudita	11,30%
Llamas & Planas, 1993	Espanha	0,79%
Darwazeh, 1998	Jordânia	4,40%
Pillai, 2007	Reino Unido	11,28%
Kuchler, 2007	USA	1,60%
Porto, 2009	Brasil	5,30%
Burklein, 2010	Alemanha	2,25%
Ghapanchi, 2011	Irão	1,03%
Gupta, 2011	Índia	2,49%
Topcuoglu, 2011	Turquia	22,8%

A incidência expressa o número de casos novos de uma determinada doença, durante um período definido, numa população sob o risco de desenvolver a doença.

A incidência de taurodontismo na população moderna tem sido relatada como bastante variada ⁽³⁵⁾, 2,5% para 5,6% na população adulta, e inferior a 1% no homem moderno e 3% no homem primitivo, em esquimós e índios americanos ⁽⁴²⁾.

3.4 Síndromes e patologias associadas

O taurodontismo aparece mais frequentemente como uma anomalia isolada, mas também tem sido associado com algumas doenças como Hipofosfatase (60), Hipofosfatemia de Rickets (16, 61), a várias síndromes conhecidas devido a alterações de cromossomos sexuais, como a síndrome de Klinefelter (62, 63), síndrome de Trissomia 21 ou Down (64), síndrome Trico dento-ósseo (65), Síndrome de Williams (66), Síndrome de McCune-Albright (67), Síndrome de Ellis-van Creveld (68), Síndrome de Mohrs (69) e Síndrome de Van der Woude (70), a anomalias de formação dentária como: amelogénese imperfeita (71, 72), dentes supranumerários (47, 72, 73), agenesias dentárias (74), Odontodisplasia regional (16) e a alguns defeitos ectodérmicos como: Displasia ectodérmica hereditária (75, 76) e Disqueratose Congénita (77). A figura 4 ilustra um exemplo de taurodontismo associado a dentes supranumerários.



Figura 4: Ortopantomografia onde se verifica hiperturodontismo bilateral nos dentes 3.4 e 4.4, e a presença bilateral de dentes supranumerários entre as raízes dos 1º e 2º pré-molares inferiores.

3.5 Diagnóstico

As características morfológicas externas, como a forma e o tamanho da coroa, foram usadas inicialmente no diagnóstico de taurodontismo, contudo foram consideradas insuficientes para a realização de um diagnóstico adequado ⁽²⁾.

Clinicamente, um dente taurodontico tem a mesma aparência de um dente normal, logo não é possível realizar o diagnóstico, unicamente por inspeção visual, sendo obrigatório recorrer a meios complementares de diagnóstico, como o exame radiográfico ^(69, 78).

A ortopantomografia, é o método mais indicado e usado para o fazer, pois é o único que permite visualizar as características particulares de um dente taurodontico, sendo elas: a forma rectangular da câmara pulpar, a sua extensão ao longo do corpo dentário, as raízes curtas, a localização da bifurcação ou trifurcação (geralmente perto dos ápices) e despistar o tamanho normal da coroa ^(1, 79). A Figura 5 ilustra um exemplo de diagnóstico radiográfico de taurodontismo.



Figura 5: Ortopantomografia que apresenta o diagnóstico de Hipertaurodontismo nos dentes 1.6, 2.6, 3.6 e 4.6.

3.6 Classificação

Durante décadas foram realizados vários estudos de investigação, de maneira a estabelecer uma classificação adequada do taurodontismo que ajude o profissional a catalogar facilmente esta anomalia dentária. Nestes existem diferenças tanto na metodologia utilizada como na classificação do taurodontismo, e também diferenças no tamanho das amostras, nas populações e na interpretação de dados ⁽⁸⁰⁻⁸³⁾.

Shaw em 1928, propôs uma classificação para o taurodontismo de 3 categorias, de acordo com as características morfológicas externas, baseadas no deslocamento apical do soalho da câmara pulpar, ou seja, na expressão do taurodontismo, em: hipotaurodontismo quando a raiz se divide na parte superior do 1/3 médio, mesotaurodontismo, quando a raiz se divide na parte inferior do 1/3 médio e hipertaurodontismo, quando a raiz se divide no 1/3 apical ^(1, 2, 36). Considera-se um dente cinodonte quando não apresenta qualquer alteração. (Figura 6)

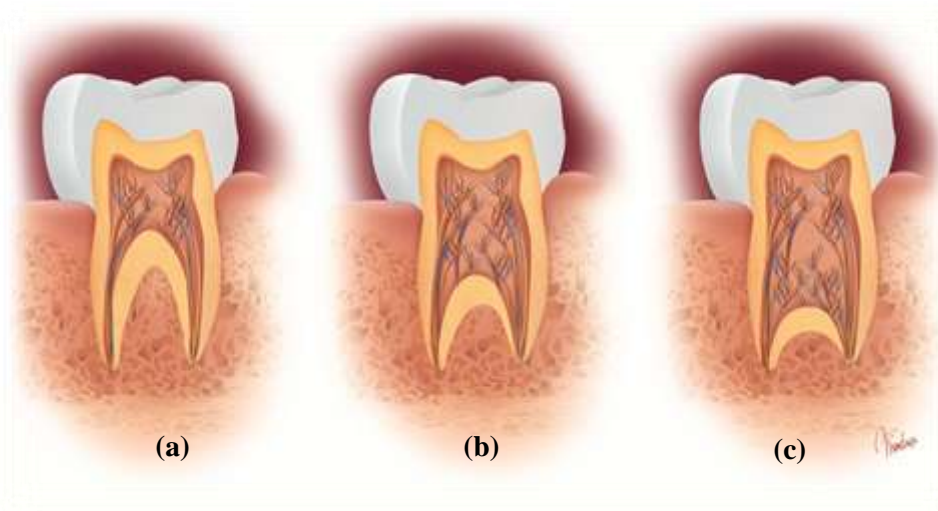


Figura 6: Método de classificação do taurodontismo segundo Shaw. (a) Hipotaurodontismo, (b) Mesotaurodontismo, (c) Hipertaurodontismo.

A classificação de Shaw tem sido a mais difundida, mas é subjectiva, de modo que sucessivas tentativas de classificação foram feitas *à posteriori* ⁽¹⁾.

Keene *et al.* ⁽²⁾ em 1966 criou um Índice onde analisou duas variáveis para classificar taurodontismo: a altura da câmara pulpar (A) e tamanho do dente (B), medido à maior raiz (Figura 7). De acordo com Keene *et al.*, divide-se A por B e depois multiplica-se por 100 e obtém-se um valor superior a 25%. (Figura 7-a)

Assim o grau de Taurodontismo segundo este autor é determinado como:

- < 24,9% - Cinodontia;
- 25 - 49,9% - Hipotaurodontismo;
- 50 - 74,9% - Mesotaurodontismo;
- 75 - 100% - Hipertaurodontismo.

Fiechtinger & Rossiwal ⁽¹⁾ em 1977, consideraram que para definir um dente com Taurodontismo, era apenas necessário medir a distância da furca à junção amelo-cementária (A), e a distância cervico-oclusal (B), sendo que esta última deveria ser menor em casos de taurodontismo. (Figura 7-b)

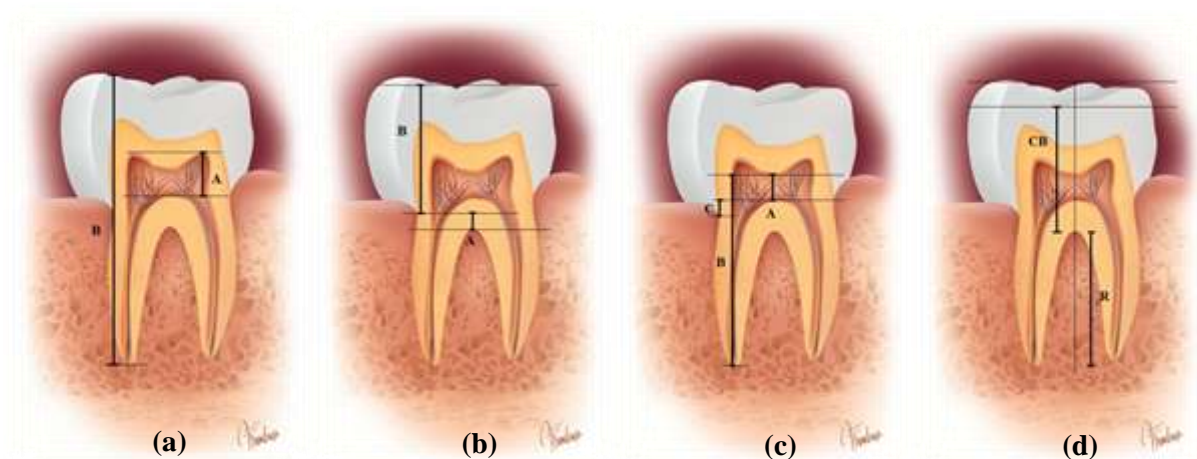


Figura 7: Métodos de classificação do taurodontismo segundo vários autores. (a) Keene *et al.*, (b) Fiechtinger & Rossiwal, (c) Shifman & Chanannel, (d) Seow & Lai.

Shifman & Chanannel ⁽⁸¹⁾ em 1978, propuseram novas categorias de classificação do taurodontismo proposto por Keene *et al.* em 1966, utilizando como referência 3 variáveis. Através de um índice taurodântico, utilizando duas variáveis, a altura da câmara pulpar (A), medida do ponto mais baixo do tecto da câmara pulpar ao ponto mais alto do soalho câmara pulpar, e a distância do tecto da câmara pulpar ao ápice da raiz mais longa (B), concluíram que um dente é Taurodântico quando a razão de A e B é igual ou maior que 20%. Assim o grau de Taurodontismo determinado pelos autores, segundo a fórmula é:

- 20-29 % Hipotaurodontismo
- 30-39 % Mesotaurodontismo
- 40-75 % Hipertaurodontismo

A terceira variável é a distância do ponto mais alto do soalho da câmara pulpar à junção amelo-cementária (C), que deve ser maior que 2,5mm para um dente ser considerado taurodontico. (Figura 7-c)

Seow & Lai ⁽⁸⁰⁾ em 1989, analisaram duas variáveis que relacionam o comprimento da coroa com o comprimento da raiz, sendo elas: (CB) comprimento da coroa e do corpo do dente e (R) comprimento da raiz. Estas variáveis são determinadas através da (Figura 7-d):

- 1) linha que passa por oclusal, através do sulco mais profundo, paralela a uma linha que une as cúspides mais altas;
- 2) linha vertical traçada perpendicularmente à linha de oclusão.
- 3) distância entre a maior profundidade do sulco e da bifurcação das raízes, medido ao longo da linha vertical (altura CB).
- 4) distância entre a bifurcação das raízes ao ápice da maior raiz medido ao longo da linha vertical (altura R).

Uma vez encontrado o valor de CB e os valores de R, através da fórmula CB/R , o grau de taurodontismo é obtido. Se o resultado for superior a 1,10 estamos presentes um dente taurodôntico. Os graus de classificação são então:

- < 1,10 Cinodontia;
- 1,10 - 1,29 Hipotaurodontismo;
- 1,30 - 2,00 Mesotaurodontismo;
- > 2,00 Hipertaurodontismo.

Laatikainen e Ranta ⁽⁸²⁾ em 1996, realizaram um estudo, no qual modificaram os índices de classificação de Shifman & Chanannel, referentes à distância da JAC ao ápice radicular - variável C. Os novos valores propostos para classificação, foram:

- < 3,5 mm - Cinodontia;
- 3,5 a 4,5 mm - Hipotaurodontismo;
- 5,0 a 6,5 mm - Mesotaurodontismo;
- 7,0 a 10,0 mm - Hipertaurodontismo.

3.7 Considerações Clínicas

A presença de um dente com taurodontismo influencia o correcto e adequado diagnóstico, plano de tratamento e por sua vez prognóstico, sendo importante salientar as diversas considerações a ter presente nos procedimentos clínicos nas diversas áreas da Medicina Dentária.

3.7.1 Considerações Endodônticas

A facilidade do tratamento endodôntico depende da morfologia do dente taurodontico ⁽⁶⁹⁾, pois a forma alongada rectangular da câmara pulpar, pode dificultar o acesso aos orifícios dos canais dentários, criando dificuldades na instrumentação e na obturação ^(48, 84). Este tem sido considerado um tratamento difícil e complexo ⁽⁶⁹⁾. Durante a trepanação há tendência a um aumento de hemorragia, que pode ser confundida com uma perfuração ⁽⁵⁰⁾.

Devido à polpa de um dente taurodontico ser geralmente volumosa e porque a instrumentação adequada dos canais radiculares irregulares não pode ser prevista, foi sugerida a realização de uma irrigação canal ar exaustiva com hipoclorito de sódio a 2,5% para dissolver o máximo de material necrótico, e uma irrigação ultra-sónica final para garantir que nenhum tecido pulpar permaneça ⁽⁸⁵⁾.

Devido à complexidade da anatomia canal ar, a obturação canal ar de um dente taurodontico é um desafio ^(2, 86). Uma técnica de obturação modificada, que consiste na compactação lateral na região apical combinada com compactação vertical na câmara pulpar alongada, é proposta por Barthei *et al.* ⁽⁴³⁾.

Em casos de Hipertaurodontismo em dentes decíduos, uma pulpotomia vital, pode ter de ser considerado como um tratamento de escolha ideal, em vez da pulpectomia, uma vez que nesta técnica o acesso correcto aos canais radiculares é difícil devido à sua complexidade ^(78, 81). O uso de um material de obturação não reabsorvível, como o Óxido de Zinco eugenol deve ser evitado, pois pode atrasar a exfoliação natural do dente decíduo. O Hidróxido de Cálcio devido à sua taxa de reabsorção elevada é considerado o material ideal nestes casos ⁽⁶⁹⁾.

O uso de dispositivos de ampliação, como lupas de aumento e microscópios cirúrgicos são aconselhados para a correcta identificação dos orifícios canulares e do soalho da câmara pulpar ⁽⁵⁶⁾.

3.7.2 Considerações em Dentisteria Operatória

A restauração de um dente cariado taurodontico pode ser realizada de maneira igual a de um dente cinodonte, com recurso a amálgama de prata, materiais adesivos e coroas pré-formadas. No entanto, muitos autores argumentam que um selamento completo só é conseguido através de coroas pré-formadas ^(38, 78, 80). A coroa de aço é uma restauração extremamente durável e que não requer grande técnica na sua colocação, oferecendo um recobrimento total do dente ⁽⁸⁷⁾.

3.7.3 Considerações Cirúrgicas

A exodontia de um dente taurodontico, é geralmente complicada por causa da deslocação da furca para o nível apical. Em contraste, o corpo alongado e a área superficial pouco volumosa inserida no alvéolo de um dente taurodontico, sugere uma exodontia menos complicada, desde que as raízes não sejam divergentes. A adaptação correcta dos boticões ao dente taurodontico é uma dificuldade acrescida, sendo o problema resolvido com o uso adequado de alavancas durante o procedimento cirúrgico ⁽¹⁾.

3.7.4 Considerações Periodontais

Do ponto de vista periodontal, dentes taurodonticos podem, em casos específicos oferecer um prognóstico mais favorável, onde a recessão gengival ou bolsa periodontal pode ocorrer, e a probabilidade de envolvimento de furca é consideravelmente menor do que em dentes normais ⁽⁸¹⁾.

Por outro lado, é considerado um grande desafio, quando existe doença periodontal com envolvimento de furca, sendo o prognóstico reservado. A resolução geralmente passa por recorrer à extracção. As principais razões para esse resultado, são a diminuição da eficácia na terapia periodontal, pois há restrição no acesso à furca para um correcto desbridamento manual e mecânico da raiz, que por sua vez reduz a presença de células e sangue do ligamento periodontal e do defeito ósseo, havendo um aumento da microflora bacteriana ⁽⁸⁸⁾.

3.7.5 Considerações Protéticas

O uso de um dente taurodontico como pilar de uma prótese não é aconselhado, devido ao facto de a furca se encontrar ao nível do 1/3 apical, e por isso ser menos resistente a forças laterais em comparação com dentes normais ⁽³⁸⁾.

3.7.6 Considerações Ortodônticas

Os dentes não são corpos livres, estando unidos a estruturas periodontais que restringem os seus movimentos. Nestas circunstâncias, a força a ser aplicada terá que passar pelo centro de resistência do dente de forma a produzir movimento em massa ⁽⁸⁹⁾.

Entre os factores que influenciam o movimento dentário durante a aplicação de forças ortodônticas, encontra-se a forma e morfologia do dente. A intensidade total da força aplicada ao dente irá ser distribuída por toda a superfície radicular afectada, logo a força a ser aplicada tem de ser calculada em relação com o tamanho e morfologia da raiz dentária ⁽³⁸⁾.

Nos dentes uniradiculares, o centro de resistência está localizado no eixo longitudinal do dente, entre 1/3 e a metade da longitude da raiz a partir da crista alveolar. Nos dentes multiradiculares, está localizado 1-2mm apical à bifurcação ou trifurcação radicular ⁽⁸⁹⁾.

Para haver movimento dentário, as forças terão que ser aplicadas na coroa dentária directamente ou indirectamente, e a relação entre a linha de acção da força e o centro de resistência do dente é o mais importante ⁽⁸⁹⁾.

A aplicação de forças em dentes taurodonticos, devido às raízes serem mais pequenas e mais curtas têm maior susceptibilidade para provocar reabsorção, para além de a ancoragem ser menor ⁽⁹⁰⁾. Esta susceptibilidade deve-se ao facto de a furca se encontrar mais apical do que nos dentes normais, e ao aplicar pressão (força/superfície) na área radicular, podemos proporcionar uma compressão vascular e hialinização periodontal que permanece durante várias semanas, anulando o movimento dentário e exigindo uma reabsorção óssea indirecta. Desta forma, são necessárias forças muito ligeiras para mover os dentes com taurodontismo ⁽³⁸⁾.

3.8 Determinantes genéticas do taurodontismo

A pesquisa no PUBMED, na base de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* “OMIM” usando o termo “Taurodontism” identifica os genes DLX3 e GJA1 como estando associados a esta patologia.

3.8.1 DLX3

O grupo *distal-less homeobox* (DLX) recebeu a sua denominação a partir da homologia observada com o genoma de *Drosófilas* e é conhecido por estar amplamente envolvido na padronização do embrião. No genoma humano é organizado em 3 pares invertidos de genes transcritos, denominados: Dlx1 e Dlx2, Dlx3 e Dlx4 e o Dlx5 e Dlx6^(24, 91).

O gene *distal-less homeobox 3* (Dlx3) codifica uma proteína homeodomínio (HD), e está localizado no cromossoma 17q21. Esta proteína é expressa precocemente na placenta durante o desenvolvimento embrionário⁽⁹²⁾, ao mesmo tempo é também encontrada mais tarde na pele, e em estruturas que envolvem interações epitélio-mesenquima, como os dentes e os folículos capilares⁽⁹³⁾. A proteína Dlx3 tem 287 aminoácidos com o HD localizado entre os resíduos 130-189.

Esta proteína funciona como activadora de transcrição de outros genes, e tem o seu local de ligação do DNA composto por uma sequência de TAAT⁽⁹⁴⁾.

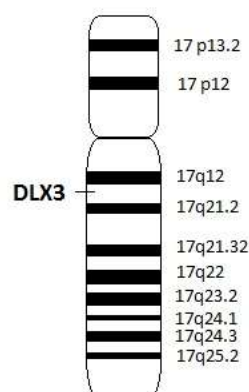


Figura 8: Localização molecular do gene DLX3 no cromossoma 17 na posição 21.2.

A actividade da DLX3 depende de dois domínios de transactivação, um no domínio N-terminal e outro localizado imediatamente a jusante da região do homeodomínio ^(94, 95). Mutações no gene DLX3 são descritas como estando relacionadas com o Síndrome Trico-dento-ósseo (TDO) (OMIM190320), uma doença genética autossómica dominante que se manifesta por taurodontismo, hipoplasia de esmalte, alterações no cabelo e unhas e aumento da densidade óssea no crânio ^(96, 97). Há duas mutações no gene DLX3 associadas a TDO. A primeira mutação identificada foi uma remoção de um tetra nucleótido de GGGG (c.51_574delGGGG) (98) e posteriormente foi sugerido que outra supressão de um di nucleótido (CT) numa zona diferente do gene seria também responsável por TDO ⁽⁹⁹⁾.

3.8.1.1 Mutação por remoção do nucleótido GGGG

Num estudo realizado por Price *et al.* ⁽⁹⁸⁾, foi identificada uma supressão de 4-pares de bases (GGGG) no gene DLX3. A supressão c.51_574delGGGG, resulta de uma mutação do quadro de leitura (“*frameshift*”) depois do primeiro codão localizado 3-pb abaixo do homeodomínio. A proteína mutante exibe uma sequência de aminoácidos que tem alterações ao nível do terminal C, quando comparada com a proteína DLX3, na sua estrutura normal. Esta mutação resulta numa alteração do comprimento do péptido produzido, tendo 255 aminoácidos em vez dos habituais 287, havendo assim 32 aminoácidos não traduzidos. A mutação não altera a estrutura do domínio *homeobox* (que se encontra a montante da supressão dos nucleótidos), a região que contem a sequência de endereçamento nuclear nem a localização nuclear da proteína propriamente dita. No entanto, um dos domínios de transactivação é afectado e visto que os dois domínios de transactivação estabelecidos são necessários para a actividade de transcrição do gene DLX3, a falta do segundo domínio significa que pelo menos teoricamente a DLX3 não é funcional, apesar de poder ligar ao DNA de forma eficaz ⁽⁹¹⁾.

3.8.1.2 Mutação por remoção do nucleótido CT

A mutação c.561_562delCT do gene DLX3 foi associada à Amelogénese Imperfeita de tipo hipoplásica e hipomaturada ⁽¹⁰⁰⁾. Este facto levou à sugestão de que a mesma mutação poderia estar associada a taurodontismo, no entanto Lee *et al.* ⁽⁹⁹⁾, não encontraram evidência para este facto, uma vez que famílias com a mutação referida não apresentavam sinais clínicos de taurodontismo.

3.8.2 GJA1

O GJA1 é o gene responsável por uma displasia congênita autossômica dominante de nome Displasia Oculo-Dento-Digital (DODD), que afecta o desenvolvimento da face, olhos, sistema esquelético e dentição. Estas alterações têm sido associadas a mutações heterozigóticas no gene que codifica a proteína *Gap Junction Alpha 1* (GJA1) localizado no cromossoma 6q21-q23.2 com dois exões separados por um intrão de 11 kb. O gene codifica proteínas transmembranares, como conexina 43, e exerce um efeito negativo dominante interferindo com a ligação normal das células através de junções ^(6, 101). Embora na pesquisa da base de dados OMIM este gene esteja associado ao taurodontismo, não foram encontrados nenhuns estudos de associação entre mutações neste gene e taurodontismo, apenas foram encontradas referências, associando o gene com Displasia Oculo-Dento-Digital (DODD) ^(6, 101).

III. Objetivos

O objectivo principal desta Dissertação de Mestrado Integrado é identificar a presença de mutações ou polimorfismos do gene DLX3 em pacientes diagnosticados com Taurodontismo e familiares na Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa (CDU-UCP), mais especificamente fazer a detecção da mutação c.571_574delGGGG.

Os objectivos secundários são identificar a população da CDU-UCP com diagnóstico de taurodontismo, através do ficheiro radiográfico informatizado, determinar a sua prevalência, classificar consoante o grau de afectação em hipo-, meso- ou hipertaurodontismo, e caracterizar a amostra segundo os seguintes parâmetros:

- ✓ Género (Masculino / Feminino);
- ✓ Idade (faixa etária dos: 10-14; 15-19; 20-24; 25-30);
- ✓ Número de dentes afectados por paciente;
- ✓ Tipo de dentição afectada;
- ✓ Arcada(s)/Quadrante(s).
- ✓ Dente(s) afectado(s) (caninos, pré-molares, molares).

IV. Materiais e Métodos

1. Desenho do estudo e caracterização da amostra

O estudo efectuado é um estudo observacional transversal, que consistiu em realizar uma pesquisa no ficheiro radiológico da CDU-UCP, através das ortopantomografias, posteriormente seleccionadas de forma aleatória, dos indivíduos com idades compreendidas entre os 10 e os 30 anos de idade (nascidos entre 01/01/1981 e 31/12/2001), sendo a amostra caracterizada como não probabilística por julgamento.

2. Avaliação dos registos clínicos

No processo de selecção das ortopantomografias a incluir na amostra foram eliminadas todas aquelas que não possuíam boa qualidade técnica, em que não se visualizava claramente as estruturas anatómicas radiotransparentes e radiopacas importantes, como por exemplo, seios nasais e estruturas calcificadas (peças dentárias e estruturas ósseas) respectivamente.

As ortopantomografias foram realizadas com o aparelho digital modelo “Proline Panoramic X-ray PM 2002 CC” e o tratamento digital de imagem foi efectuado com o programa “Planmeca Dimaxis Pro – UCP Viseu”. As imagens foram visualizadas em monitor TFT, marca Hewlett-Packard.

Todas as ortopantomografias foram cuidadosamente observadas sempre pelo mesmo operador, no que diz respeito à identificação de dentes com taurodontismo. Para isso, teve-se especial atenção à forma rectangular da câmara pulpar, deslocamento da furca para apical e encurtamento das raízes, factores que nos permitem suspeitar do diagnóstico.

Foram excluídos todos os dentes com tratamentos endodônticos, com restaurações insatisfatórias, fracturados, com reabsorção radicular e rizogénese incompleta. Excluíram-se também os terceiros molares.

Os dados de cada paciente foram registados em ficha previamente elaborada em Excel, com o número de ficha clínica, nome, idade, sexo e quais os dentes afectados (Anexo 3).

Com o objectivo de eliminar e garantir a fiabilidade dos resultados as ortopantomografias foram observadas com um intervalo de 1 minutos entre cada uma, por períodos de duração, não superiores a uma hora e meia. Num intervalo de 3 semanas após a colheita de dados, as

ortopantomografias foram novamente visualizadas e elaborados novos registos de observação, em que somente se teve acesso ao número do processo. Os resultados desta reavaliação foram comparados com os dados da colheita inicial, visando a mensuração de possíveis erros metodológicos. Não foram detectadas diferenças de resultados entre a primeira e a segunda observação de ortopantomografias.

3. Diagnóstico de taurodontismo

Os dentes com suspeita de diagnóstico de taurodontismo, foram avaliados quanto ao grau de severidade, segundo o método de classificação de Shifman & Chanannel ⁽⁸¹⁾, através do software Corel Draw® X5 e registados numa ficha previamente elaborada em Excel com o número da ficha clínica, dente(s) afectado(s), valor das medições, nomeadamente A (altura da câmara pulpar), B (distância do tecto da câmara pulpar ao ápice da raiz mais longa), C (distância do soalho da câmara pulpar à JAC), o resultado A/B e C, e o diagnóstico (Anexo 4).

Após a avaliação foram seleccionados 24 pacientes, que foram contactados via telefone por parte do operador. Os pacientes foram informados da natureza do estudo e foi averiguada a disponibilidade de cada um em participar. Foi ainda solicitado que os familiares pudessem também ser incluídos no estudo caso desejassem. Do total dos pacientes seleccionados, apenas 19 possuíam o contacto actualizado na ficha clínica, desses apenas 12 demonstraram interesse em participar neste estudo.

4. Recolha de amostras de saliva

Foi possível a recolha de saliva numa população que representa 12 pacientes diagnosticados com Taurodontismo e seus familiares, perfazendo no total 44 indivíduos, que se dirigiram à Clínica Dentária Universitária voluntariamente no período entre Fevereiro e Março de 2012.

Antes de se proceder à recolha das amostras de saliva, efectuou-se uma breve explicação do objectivo do estudo e do diagnóstico de Taurodontismo e assinatura do Consentimento Informado (Anexo 5) pelos próprios, pais ou responsáveis, autorizando a recolha de amostras

salivares, bem como a utilização dos dados para a realização do estudo em questão, assegurando os autores a confidencialidade das informações recolhidas.

A recolha das amostras de saliva foi realizada através do método de “*drooling*”. Os pacientes e familiares foram instruídos a estimular o reflexo salivar, sendo a saliva recolhida num tubo estéril sem adição de nenhum soluto. Cada tubo foi identificado com o número atribuído previamente aquando da aceitação de participação no estudo, e congelado a - 20°C (Anexo 6).

5. Pesquisa do polimorfismo no gene DLX3

5.1 Extração de ADN

O protocolo de extração de ADN utilizado foi de uma extração fenol clorofórmio apresentado no anexo 7 (protocolo 1). Uma vez que das primeiras análises não foi obtido DNA em quantidade e qualidade suficientes foi repetido o processo de isolamento com um novo protocolo (protocolo 2) ligeiramente alterado em relação ao protocolo 1. Dado que os resultados não permitiram novamente a obtenção de DNA de qualidade, foi tentada uma nova extração de DNA com o kit DNA Genotek®, mas apenas em uma amostra (protocolo 3).

5.2 Verificação espectrofotométrica da quantidade e qualidade de ADN isolado

Para assegurar que havia ADN em quantidade e qualidade suficiente nas extrações efectuadas procedeu-se à leitura das absorvâncias das soluções obtidas a 260 e 280 nm, num espectrofotómetro Cary 50 Conc.

5.3 Amplificação de ADN em reacção de PCR

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador, de modelo PTC-150, Minicycler™, da MJ Research, sendo as condições de amplificação definidas em função da sequência dos *primers* utilizados e dos fragmentos que se pretendiam amplificar. A mutação escolhida para análise do taurodontismo é a c.571_574delGGGG, que corresponde à remoção de 4 guaninas entre os nucleótidos 571 e 574 que leva a uma mutação do quadro de leituras. Os *primers* utilizados para a amplificação da sequência do gene DLX3 de interesse são

descritos por Price *et al.* ⁽⁹⁸⁾. Como controlo positivo da reacção de PCR e presença de ADN nas amostras foram ainda usados *primers* para a globulina Beta (Hb) ⁽¹⁰²⁾. As condições de amplificação para cada *primer* constam do anexo 7 (protocolo 4).

5.4 Separação dos amplificados por electroforese

Aliquotas do resultado das extracções bem como os resultados das reacções de amplificação por PCR foram visualizados num transluminador com fonte de ultravioletas em géis de agarose previamente elaborados, segundo as instruções do fabricante, com o protocolo 5 (anexo 7).

6. Análise estatística

Os dados recolhidos foram introduzidos numa folha de cálculo em EXCEL 2010. No processamento e análise de dados foi utilizado o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 19.0). Calcularam-se prevalências, expressas em percentagens.

O Teste do Qui-Quadrado, foi utilizado para comparar a frequência de taurodontismo entre os géneros Masculino e Feminino, onde se considerou o nível de significância estatístico 5%, isto é, para um valor de p igual ou inferior a 0,05, as distribuições diferem significativamente.

V. Resultados

1. Caracterização da amostra

Amostra, Género e Faixa etária

Do total de 4509 ficheiros clínicos de pacientes da CDU-UCP na faixa etária dos 10-30 anos, apenas 1369 apresentavam Ortopantomografia no ficheiro informatizado da clínica, o que corresponde a uma percentagem de 30,36% (tabela 4).

Tabela 4: Distribuição do número e percentagem da população da CDU-UCP na faixa etária dos 10-30 anos de idade com Ortopantomografia.

	<i>n^o</i>	%
Com Orto	1369	30,36
Sem Orto	3140	69,64
Total	4509	100

Dos 1369 ficheiros que possuíam ortopantomografias, foram seleccionados 34, que apresentam características compatíveis com o diagnóstico de taurodontismo. Após a confirmação do diagnóstico através da classificação de Shifman & Chanannel, obteve-se uma amostra de 24 pacientes com taurodontismo, correspondendo a 1,75% da população (tabela 5).

Tabela 5: Distribuição do número e percentagem da população da CDU-UCP na faixa etária dos 10-30 anos de idade com Taurodontismo.

	<i>n^o</i>	%
Com Tauro	24	1,75
Sem Tauro	1345	98,25
Total	1369	100

Relativamente ao género, o sexo Feminino registou uma prevalência (58,3%) mais elevada de Taurodontismo, quando comparado com o sexo Masculino (41,7%) (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição do número e percentagem dos pacientes com taurodontismo, de acordo com o género.

	<i>n</i> ^o	%
Feminino	14	58,3
Masculino	10	41,7
Total	24	100

Quanto ao intervalo de idades, os intervalos [20-24] e [25-30] foram aqueles que apresentaram maior incidência de taurodontismo (33,3%, cada um) (Tabela 7), sendo a média da idades igual a 21,7.

Tabela 7: Distribuição do número e percentagem dos pacientes com taurodontismo, de acordo com a faixa etária.

	<i>n</i> ^o	%
[10-14]	4	16,7
[15-19]	4	16,7
[20-24]	8	33,3
[25-30]	8	33,3
Total	24	100

Número de dentes afectados com taurodontismo por indivíduo

A distribuição do número de peças dentárias afectadas com taurodontismo por cada paciente, revelou que é mais prevalente a presença isolada (50%) de um dente taurodôntico, sendo a presença de três dentes com taurodontismo (4,2%) a menos prevalente. Constatou-se também, que a presença de dentes taurodônticos múltiplos em números pares, são sempre simétricos (tabela 8).

Tabela 8: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, por cada paciente.

	<i>n^o</i>	%
1	12	50
2	9	37,5
3	1	4,2
4	2	8,3
Total	24	100

Número de peças dentárias classificadas com Taurodontismo

Do total de 627 peças dentárias analisadas, apenas 41 foram classificadas com taurodontismo, apresentando assim uma prevalência de 6,54%. (Tabela 9)

Tabela 9: Distribuição do número e percentagem de dentes diagnosticados com taurodontismo.

	<i>n^o</i>	%
Cinodontia	586	93,46
Taurodontismo	41	6,54
Total	627	100

2. Classificação de dentes com taurodontismo

Classificação Taurodontismo

Das 41 peças dentárias afectadas, após a classificação de Shifman & Chanannel, há maior frequência de casos de Hipertaurodontismo (24), seguido por casos de Mesotaurodontismo (11) e Hipotaurodontismo (6) (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com o grau de classificação.

	<i>n^o</i>	%
Hipotaurodontismo	6	14,6
Mesotaurodontismo	11	26,8
Hipertaurodontismo	24	58,5
Total	41	100

Tipo de dentição e localização

Dos 41 dentes classificados com taurodontismo, todos pertencem à dentição permanente (tabela 11).

Tabela 11: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com o tipo de dentição.

	<i>n^o</i>	%
Decídua	0	0
Permanente	41	100
Total	41	100

Quanto à localização, o maxilar inferior foi o mais afectado (68,3%), não havendo diferença na distribuição pelos quadrantes (34,1% ambos) (tabela 12 e 13).

Tabela 12: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com a arcada.

	<i>n</i> ^o	%
Maxilar Superior	13	31,7
Maxilar Inferior	28	68,3
Total	41	100

Tabela 13: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com o quadrante.

	<i>n</i> ^o	%
1º Quadrante	5	12,2
2º Quadrante	8	19,5
3º Quadrante	14	34,1
4º Quadrante	14	34,1
Total	41	100

Tipo de dentes

Quanto ao tipo de dente, os pré-molares foram os mais afectados com taurodontismo (51,2%), seguido dos molares (43,9%) e depois dos caninos (4,9%) (tabela 14). O 1º Pré-Molar e 2º Pré-Molar direito foram os mais prevalentes (14,9%) (tabela 15).

Tabela 14: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, segundo o tipo de dente.

	<i>n</i> ^o	%
Caninos	2	4,9
Pré-molares	21	51,2
Molares	18	43,9
Total	41	100

Tabela 15: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com o dente afectado.

	<i>n</i> ^o	%
1º Molar Superior direito	3	7,3
2º Molar superior direito	3	7,3
1º Molar superior esquerdo	4	9,8
2º Molar superior esquerdo	3	7,3
Canino inferior esquerdo	2	4,9
1º Pré-Molar inferior esquerdo	5	12,2
2º Pré-Molar inferior esquerdo	4	9,8
1º Molar inferior esquerdo	1	2,4
2º Molar inferior esquerdo	2	4,9
1º Pré-Molar inferior direito	6	14,6
2º Pré-Molar inferior direito	6	14,6
1º Molar inferior direito	2	4,9
Total	41	100,0

3. Análise Genética

Para a análise genética da presença da mutação c.571_574delGGGG foi necessário obter DNA da saliva dos pacientes como foi descrito no material e métodos. Numa primeira abordagem foi utilizado o método de extração de DNA normalmente usado nos laboratórios do CRB. Esse método de extração conduziu à recolha de DNA com os parâmetros espectrofotométricos apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Resultados das leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm dos isolamentos de ADN de cada amostra e respectivo cálculo do ratio 260/280 e concentração de ADN em ng/ml de amostra.

mostra nº	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	Ratio 260/280	[ng ADN/ml]
1	0,1341	0,1701	0,7881	53,64
2	0,1427	0,1865	0,7655	57,08
3	0,2137	0,2582	0,8277	85,48
4	0,0689	0,0846	0,8143	27,56
5	0,0609	0,0769	0,7917	24,36
6	0,3231	0,3799	0,8505	129,24
7	0,0976	0,1276	0,7649	39,04
8	0,0827	0,0903	0,9152	33,08
9	0,0797	0,1068	0,7462	31,88
10	0,1124	0,144	0,7806	44,96
11	0,1364	0,1781	0,7656	54,56
12	0,1302	0,1768	0,7365	52,08
13	0,0907	0,1174	0,7723	36,28
14	0,2	0,265	0,7546	80
15	0,1408	0,173	0,8141	56,32
16	0,1277	0,1635	0,7809	51,08
17	0,1463	0,1813	0,8068	103,8
18	0,2595	0,3405	0,762	120,4
19	0,301	0,3736	0,8058	47,88
20	0,1197	0,1728	0,6927	37,76
21	0,0944	0,1252	0,7538	93,32
22	0,2175	0,2622	0,8297	87
23	0,2761	0,31	0,8906	110,44
24	0,227	0,2733	0,8307	90,8
25	0,1832	0,2155	0,85	73,28
26	0,1232	0,1404	0,8773	49,28
27	0,1255	0,169	0,7427	50,2
28	0,1719	0,2215	0,7764	68,76
29	0,1469	0,2089	0,7032	58,76
30	0,2368	0,3793	0,6244	94,72
31	0,198	0,2777	0,713	79,2
32	0,1035	0,167	0,6198	41,4
33	0,1761	0,2285	0,7708	70,44
34	0,2451	0,3018	0,8121	98,04

35	0,2137	0,2539	0,8416	85,48
36	0,2028	0,2839	0,7144	81,12
37	0,1461	0,2122	0,6885	58,44
38	0,2808	0,4009	0,7006	112,32
39	0,203	0,2604	0,7796	81,2
40	0,2268	0,2752	0,8243	90,72
41	0,3246	0,4703	0,6904	129,84
42	0,1509	0,1847	0,817	60,36
43	0,2608	0,4014	0,6497	104,32
44	0,1805	0,2435	0,7415	72,2

Nesta tabela pode verificar-se que para a generalidade das amostras apesar do ADN presente não cumprir os parâmetros de pureza desejados, (ratios 260/280 nm entre 1.8 e 2.0), o cálculo das concentrações permite verificar que a maioria das amostras tem uma quantidade de ADN suficiente para a realização das reacções de PCR.

Desta forma prosseguiu-se para a amplificação do fragmento do gene DLX3 com os *primers* seleccionados. O resultado da electroforese onde foram aplicados os fragmentos obtidos pelo PCR encontra-se na Figura 9.

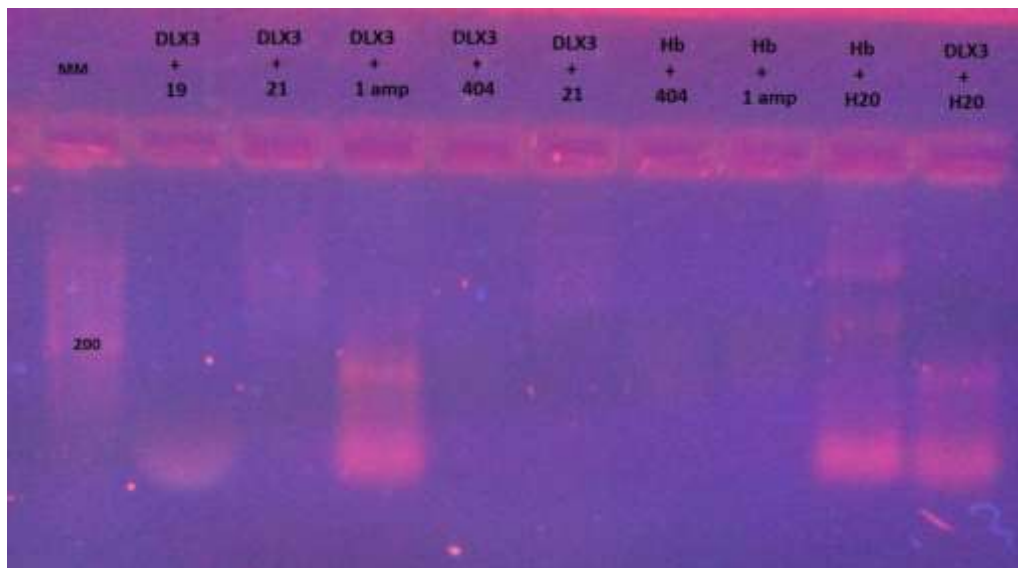


Figura 9: Gel de agarose a 4% apresentando os resultados da amplificação de amostras de 2 indivíduos (19 e 21) usando *primers* para DLX3 e para o gene da Globulina beta (HB). Neste gel são ainda apresentados os controlos negativos para os dois *primers* (H20 + *primer*). O número 404 refere-se a uma amostra de saliva da qual já tinha sido feita uma amplificação de ADN no nosso laboratório com outro conjunto de *primers*.

Da análise da Figura 9 verifica-se que não houve amplificação em nenhuma das amostras e que as bandas observadas correspondem aos negativos e às amostras previamente amplificadas.

Os resultados anteriores levaram-nos a questionar se de facto haveria ADN nas amostras e se os *primers* utilizados para o gene DLX3 estariam bem desenhados. Assim, usámos uma amostra em que já tinha sido conseguida amplificação (embora não de pacientes com taurodontismo nem de seus familiares) para poder testar a acção dos *primers* DLX3. Os resultados obtidos estão na Figura 10.

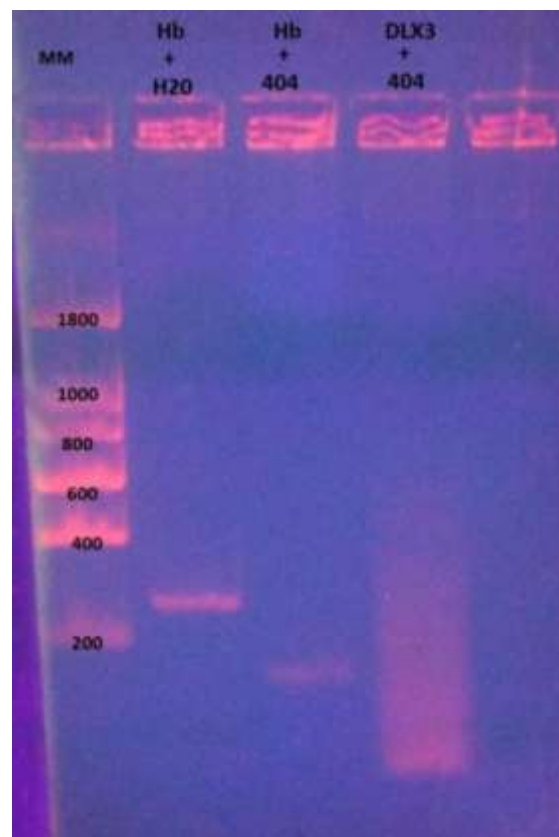


Figura 10: Gel de teste em que são apresentados os resultados da amplificação de uma amostra independente (não taurodontismo) com os *primers* genéricos da globulina beta (Hb) e com os *primers* DLX3. O controlo negativo corresponde a água em vez de amostra.

Nesta imagem verifica-se que embora não seja bem visível parece haver alguma amplificação com os *primers* DLX3, pois no fim do arrastamento verificado parece visualizar-se uma banda.

Com os resultados anteriores tentámos então fazer novos isolamentos das salivas armazenadas. Depois de feitos os novos isolamentos foram tentadas novas amplificações com o gene DLX3 e foram obtidos os resultados apresentados na Figura 11.

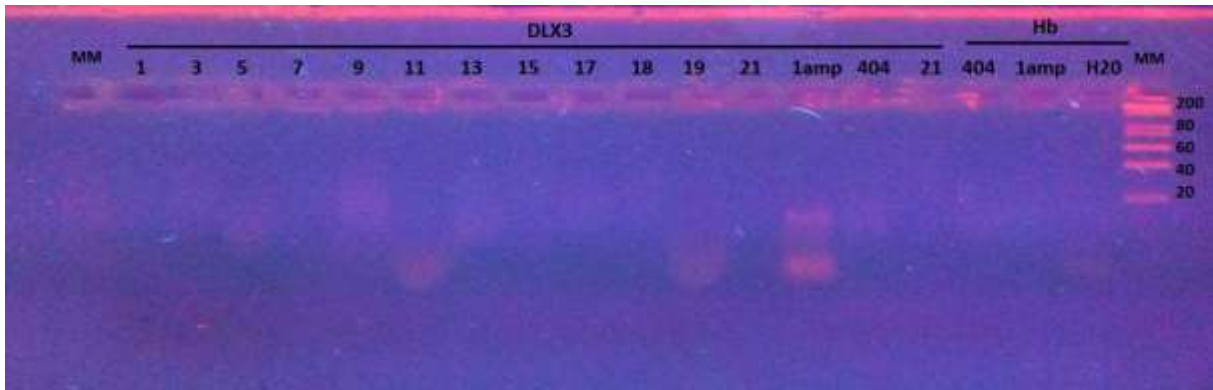


Figura 11: Resultado das amplificações com os *primers* DLX3. Como controlo para a reacção de PCR foram usados os *primers* Hb e como controlo negativo foi usada água.

Da figura 11 verifica-se que embora em algumas amostras pareça ser visível amplificação esta não corresponde a bandas definidas nos tamanhos esperados.

VI. Discussão

A faixa-etária seleccionada aquando do delineamento deste estudo foi definida tendo em conta dois parâmetros, sendo para tal necessário determinar uma idade mínima e uma idade máxima de inclusão. Em primeiro lugar, foi estabelecido como idade mínima os 10 anos de idade, altura em que ocorre quer a exfoliação dos molares decíduos quer a apexogénese do 1º molar permanente ⁽¹⁴⁾. Após observação da amostra de pacientes da CDU-UCP, optou-se por se estender a faixa etária apenas até aos 30 anos de idade, visto que nos permite um maior número de indivíduos ainda com a dentição permanente completa e número de dentes perdidos reduzido. Este facto tem em consideração o elevado número de doentes que procuram os serviços da CDU-UCP, que numa faixa etária reduzida já apresentam perdas dentárias em número considerável.

A ortopantomografia foi o exame radiográfico eleito para a realização deste estudo, pois permite visualizar de uma forma global o complexo maxilo-mandibular, permitindo a avaliação das estruturas dentárias em apenas uma imagem ⁽¹⁰³⁾. Este método é vantajoso e é o mais descrito na literatura ^(54, 55, 58), havendo excepções, como por exemplo, nos estudos de Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾ e Burklein *et al.* ⁽⁵⁶⁾, em que estes utilizaram radiografias periapicais para o diagnóstico do taurodontismo. No nosso entender, é mais simples a utilização da ortopantomografia, uma vez que as incidências retroalveolares têm uma probabilidade aumentada de serem de mais difícil comparação, por exemplo, por utilização de diferentes distâncias entre a ampola e o sensor.

A amostra total observada da CDU-UCP foi de 4509 indivíduos. Destes, apenas 30,36% da população, na faixa etária dos 10 aos 30 anos de idade, apresentavam ortopantomografia no programa informatizado. Esta reduzida percentagem deve-se essencialmente à mudança de ficheiros radiográficos no servidor da CDU-UCP, para um arquivo denominado “arquivo morto”, resultando numa considerável perda de informação, que se torna inacessível, e também devido a ficheiros clínicos que não existem mesmo tendo um número associado.

Os critérios de exclusão deste estudo foram estabelecidos de modo a proporcionarem um diagnóstico correcto e fiável, com o intuito de não classificar dentes normais com taurodontismo ⁽⁵⁵⁾.

Para a classificação de taurodontismo optámos pela utilização do método de Shifman & Chanannel ⁽⁸¹⁾. Segundo alguns autores ⁽³⁸⁾ este índice poderá não ser o mais fiável, nomeadamente em situações em que ocorre incompleta formação radicular, presença de reabsorção radicular ou quando há distorção radiográfica das raízes. No presente estudo, estes

parâmetros foram considerados como critérios de exclusão, considerando-se então este método de classificação como adequado para a análise a efectuar.

Após o tratamento de dados, 1369 (1,75%) ortopantomografias analisadas revelam a presença de taurodontismo. Estes dados estão de acordo com os estudos publicados, por Burklein *et al.* ⁽⁵⁶⁾ (2,25%) e Kuchler *et al.* ⁽⁵⁴⁾ (1,60%), que obtiveram valores na mesma ordem de grandeza dos nossos. Contudo nos estudos realizados por Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾ (22,8%) e Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾ (11,28%), a prevalência encontrada foi bastante superior. Esta discrepância de valores pode estar associada a diferentes factores. Em primeiro lugar podemos falar da faixa etária utilizada em cada um dos estudos. No estudo de Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾ apesar de a amostra estudada ser significativamente menor, foram incluídos apenas pacientes adultos na faixa etária dos 18 aos 65 anos, enquanto que no estudo de Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾ essa faixa estendia-se dos 18 até aos 82 anos. Isto permitiu não só a observação de todos os pré-molares e segundos molares formados, como a determinação da prevalência de pré-molares maxilares e segundos molares taurodonticos. No estudo de Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾, verificou-se uma média de 4,8% de pré-molares taurodonticos, já no estudo de Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾ os segundos molares maxilares foram os segundos dentes com maior prevalência de taurodontismo em homens com 12,7% de prevalência e o dente taurodôntico mais prevalente em mulheres com uma prevalência de 13,6%. No presente estudo, esta determinação não foi possível de se efectuar para a totalidade da amostra, uma vez que existe uma percentagem considerável de pacientes até aos 11 e 12 anos (16,7%), respectivamente, onde a maturação e erupção de segundos pré-molares e segundos molares ainda não se completou. Outro factor importante é que no estudo de Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾ foram incluídos todos os terceiros molares erupcionados, sendo o dente com maior prevalência de taurodontismo, o que influencia e justifica de certa forma este valor superior em termos de prevalência total de taurodontismo, visto que no nosso estudo, os terceiros molares acabaram por ser um dos factores de exclusão, devido a variabilidade anatómica e a elevada prevalência de agenesia que apresenta ^(104, 105).

Quanto ao género, o feminino é mais prevalente (58,3%) que o masculino (41,7%), não sendo uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), o que está de acordo com o estudo de Kuchler *et al.* ⁽⁵⁴⁾ e Burkelin *et al.* ⁽⁵⁶⁾, cujos resultados também foram superiores no género feminino, tendo a diferença no último estudo sido estatisticamente significativa ($p=0,097$). Já no estudo de Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾ e Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾, a prevalência de taurodontismo foi mais elevada no género masculino, não havendo diferença estatisticamente significativa. Tendo em conta que o taurodontismo é uma alteração cuja etiologia continua

desconhecida, não é possível fazer a associação clara entre a anomalia e um determinado género ⁽³⁸⁾.

Em pacientes com taurodontismo verificou-se que a presença isolada de um dente taurodontico é a condição mais prevalente (50%). São poucos os estudos que se referem à prevalência de taurodontismo determinando o número de peças dentárias afectadas por indivíduo. No entanto, há autores que relatam casos clínicos isolados de indivíduos com múltipla presença de dentes com taurodontismo. Por exemplo, Sert *et al.* ⁽³⁴⁾ relata o caso de um paciente de 18 anos com 6 molares hipertaurodonticos (2 mandibulares e 4 maxilares); Joshy *et al.* ⁽³⁵⁾ fala de um paciente com 15 anos, em que todos os molares com excepção dos terceiros apresentam hipertaurodontismo; Tiku *et al.* ⁽¹⁰⁶⁾ relata dois casos, em que no primeiro um paciente de 10 anos de idade apresenta hipertaurodontismo em todos os primeiros molares permanentes, e no segundo um paciente da mesma idade possui os primeiros pré-molares inferiores hipertaurodonticos, e por fim González *et al.* ⁽¹⁰⁷⁾ identifica um paciente com 13 anos, no qual todos os segundos molares eram hipertaurodonticos com excepção do molar do 4º quadrante que era mesotaurodontico.

A percentagem de peças dentárias (n=627) classificadas com taurodontismo (6,54%) é superior à relatada por Burklein *et al.* ⁽⁵⁶⁾ (0,61%), Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾ (4,2%) e Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾ (4,79%). Esta diferença de resultados pode ser explicada pela amostra de peças dentárias avaliadas. No presente estudo foram avaliados todos os dentes, à excepção dos terceiros molares, o que acaba por ser uma amostra maior em relação ao estudo de Burklein *et al.* ⁽⁵⁶⁾ que apenas inclui molares no seu estudo, e ao estudo de Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾ que apenas inclui pré-molares. No entanto, no estudo de Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾ também são avaliados todos os dentes incluindo terceiros molares. A interpretação individual de cada operador no momento de selecção de registos radiográficos a avaliar quanto ao possível diagnóstico de taurodontismo, também é um factor importante, pois podemos excluir inadvertidamente dentes com taurodontismo que parecem cinodontes, ou por outro lado, incluir dentes cinodontes como taurodonticos. Este factor foi eliminado no presente estudo em que a classificação foi realizada sempre pelo mesmo operador.

Quanto ao grau de severidade, o Hipertaurodontismo foi o mais prevalente, tendo apresentado uma prevalência de 58,5%. Este resultado é o oposto ao apresentado por Porto *et al.* ⁽⁵⁵⁾, em que o Hipotaurodontismo apresentou um maior número de casos, com 81,5%, e por Moraes *et al.* ⁽¹⁰⁸⁾ em que o Mesotaurodontismo foi o mais prevalente com 59,1%. A variabilidade de resultados quanto ao grau de severidade é um resultado expectável, pois cada

avaliador, para além de poder utilizar métodos de classificação e ter critérios de exclusão/inclusão diferentes, também avalia de modo diferente. A forma de avaliação é um factor importante, pois um erro em termos de classificação, ou mesmo na forma de avaliação, pode induzir o diagnóstico em erro, classificar um grau de taurodontismo menos/mais severo ou mesmo classificar um dente normal com taurodontismo.

No presente estudo foi apenas diagnosticado taurodontismo na dentição definitiva, o que está de acordo com os autores que referem o predomínio na dentição definitiva. Contudo, Tyagi *et al.* ⁽⁶⁹⁾, reporta um caso isolado de uma criança com 5 anos que apresentava o segundo molar mandibular esquerdo decíduo, com diagnóstico de mesotaurodontismo, e Bhat *et al.* ⁽⁶⁰⁾ que reporta outro caso no qual uma criança também com 5 anos de idade, apresentava todos os molares decíduos taurodonticos. No entanto, a ausência de taurodontismo na dentição decídua já era expectável, devido à idade que escolhemos como critério de inclusão atempadamente definido, idade na qual é normal a exfoliação dos molares temporários e a erupção dos pré-molares ⁽¹⁴⁾ correspondentes e aos critérios de exclusão, nomeadamente dentes com reabsorção radicular.

A distribuição de dentes com taurodontismo, revelou diferenças entre as arcadas, com uma prevalência duas vezes superior na mandíbula (68,3%), sem preferência no quadrante (34,1% em ambos). No estudo de Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾, o resultado final em termos de incidência de taurodontismo por maxilar, revelou uma maior prevalência da anomalia no maxilar superior com 6,5% em contraste com os 2% de taurodontismo no maxilar inferior. Em concordância com os nossos resultados, temos o estudo de Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾, onde apenas foram observados pré-molares, e foi relatado uma maior prevalência de pré-molares inferiores taurodonticos (9,07%), quando comparados com pré-molares superiores taurodonticos (0,56%). No entanto, no estudo de Burklein *et al.* ⁽⁵⁶⁾, não existe qualquer diferença significativa em termos de localização de dentes taurodonticos, quer seja por quadrante ou por maxila, apesar de só terem sido incluídos os dentes molares.

A distribuição do taurodontismo por dentes revelou que a incidência é maior em pré-molares, apresentando uma prevalência de 51,2%, seguidos dos molares com 43,9% e por fim de caninos 4,9%. Este resultado é diferente do expectável, pois na literatura actual os dentes relatados com maior incidência de taurodontismo são os molares ^(55, 57, 86), sendo os pré-molares considerados raros ^(35, 65, 72). Em relação aos caninos, o resultado obtido é considerado ainda mais raro, visto que na literatura actual não existe referência a nenhum diagnóstico de taurodontismo em caninos, apesar de existir referências bibliográficas sobre estes ^(2, 43, 49).

Os primeiros e os segundos pré-molares mandibulares direitos foram os dentes que apresentaram uma maior prevalência de taurodontismo (14,6% cada), seguidos do primeiro pré-molar mandibular esquerdo com 12,2% dos casos e do segundo pré-molar mandibular esquerdo com 9,8%. De realçar que não foi diagnosticado nenhum pré-molar maxilar com taurodontismo. Apesar de existirem poucos estudos sobre prevalências de taurodontismo em pré-molares, o nosso resultado vem de encontro aos resultados obtidos por Pillai *et al.* ⁽⁴²⁾, em que o primeiro pré-molar inferior foi o mais afectado com 10,46% de dentes afectados. Este resultado era previsível, visto que os autores apenas avaliaram pré-molares. No entanto, Llamas *et al.* ⁽⁵⁹⁾ e Topcuoglu *et al.* ⁽⁵⁸⁾ avaliaram molares e pré-molares, e relatam um resultado oposto ao do nosso estudo: no primeiro trabalho, os primeiros pré-molares maxilares foram os mais prevalentes com 0,79% e no segundo estudo, os segundos pré-molares maxilares foram os mais prevalentes com 2,2%.

A dificuldade em amplificar o gene DLX3 de amostras de saliva foi para nós surpreendente uma vez que o protocolo de amplificação e *primers* utilizados tinham já sido publicados por outro grupo ⁽⁹⁸⁾. No entanto, este grupo não usou saliva mas sim sangue, uma fonte de ADN de colheita muito mais complexa e desconfortável para o paciente e que os nossos laboratórios não estão autorizados a processar. Além disso os *primers* DLX3 parecem ter funcionado (ainda que em condições não muito boas) com outras amostras (Figura 10) o que leva a supor que estamos perante uma questão de quantidade e qualidade do ADN.

Em estudos futuros pensamos que a dificuldade em obter ADN em quantidade e qualidade suficiente para o estudo do gene DLX3 poderá ser suplantada pelo uso de kits comerciais de extracção que permitam o uso de grandes volumes de saliva. Com estes kits a eficácia de extracção de ADN de amostras biológicas não só é maior como o ADN resultante dos procedimentos é muito menos fragmentado.

Embora os nossos resultados sugiram que o problema na amplificação era a quantidade/qualidade de ADN, uma vez que com as mesmas amostras quando analisadas usando *primers* para um gene diferente também não conseguiram ser amplificadas. No entanto não é de excluir que o problema da falta de amplificação esteja relacionado com os *primers* usados para o DLX3. Assim, em estudos futuros, será útil verificar o desenho dos *primers* a nível bioinformático e pesquisar na bibliografia estudos que tenham testado outros pares de *primers* para esta mutação.

VII. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

- ✓ A prevalência de taurodontismo encontrada na população da CDU-UCP está dentro dos valores relatados em outros estudos;
- ✓ O grau mais prevalente de severidade do taurodontismo (hipertaurodontismo) é idêntico ao encontrado noutros estudos;
- ✓ O género mais afectado é o feminino, contudo sem diferença estatisticamente significativa relativamente ao sexo masculino ($p < 0,05$);
- ✓ A presença isolada de uma peça dentária com taurodontismo é a mais prevalente e a prevalência do total de peças dentárias examinadas com taurodontismo é superior à relatada na literatura;
- ✓ O taurodontismo teve apenas presença em dentição permanente, com maior incidência na mandíbula;
- ✓ Os dentes mais afectados foram os pré-molares, nomeadamente o 1º e 2º pré-molar inferior direito;
- ✓ Devem ser alterados os procedimentos de colheita de saliva (aumento do volume processado na extracção) para poder obter maior quantidade de ADN para amplificação do gene DLX3 pela técnica de PCR;
- ✓ No sentido de melhorar a qualidade do ADN obtido a partir de saliva é desejável o uso de kits comerciais de extracção;
- ✓ O desenho dos *primers* utilizados deve ser optimizado.

VIII. Referências Bibliográficas

1. Manjunatha BS, Kovvuru SK. Taurodontism –A Review on its etiology, prevalence and clinical considerations. *J Clin Exp Dent*. 2010;2(4):187-90.
2. Jafarzadeh H, Azarpazhooh A, Mayhall JT. Taurodontism: a review of the condition and endodontic treatment challenges. *Int Endod J*. 2008;41(5):375-88.
3. Silva BMS, Filho FB, Abuabara A, Moura P, Losso EM, Moro A. Multiple taurodontism: the challenge of endodontic treatment. *J Oral Sci*. 2010;52(4):653-8.
4. Gomes RR, Habckost CD, Junqueira LG, Leite AF, Figueiredo PT, Paula LM, et al. Taurodontism in Brazilian patients with tooth agenesis and first and second-degree relatives: A case–control study. *Arch Oral Biol*. 2012.
5. Choi SJ, Song IS, Feng JQ, Gao T, Haruyama N, Gautam P, et al. Mutant DLX 3 disrupts odontoblast polarization and dentin formation. *Dev Biol*. 2010;344(2):682-92.
6. Paznekas WA, Karczeski B, Vermeer S, Lowry RB, Delatycki M, Laurence F, et al. GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Hum Mutat*. 2009;30(5):724-33.
7. Bailleul-Forestier I, Molla M, Verloes A, Berdal A. The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 1: clinical and molecular aspects of non-syndromic dental disorders. *Eur J Med Genet*. 2008;51(4):273-91.
8. Figueiredo MH, Gonçalves C. Cavidade Oral. In: Gonçalves C, Bairos V, editors. *Histologia*. 1ª ed: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2006. p. 206-10.
9. McDonald RE, Avery DR. Development and Morphology of the Primary Teeth. *Dentistry for the child and adolescent* 9ª ed: Mosby, ELSEVIER; 2011. p. 41-2;.
10. Berkovitz BKB, Holand GR, Moxhan BJ. Early tooth development. *Oral Anatomy, Histology and Embryology*. 3ª ed: Mosby; 2005. p. 290-303.
11. Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci*. 2009;5(3):226-43.
12. O'Rahilly R, Muller F. The digestive system. *Human embryology & teratology*. 2 ed: Wiley-Liss; 1996. p. 214-8.
13. Riviere HL. Tooth development. *Normal oral histology: Quintessence Publishing CO*; 2000. p. 1-12.
14. Mendonza A. Desarrollo y erupción dentaria. In: Boj JR, Catalá M, Garcia-Ballesta, Mendoza A, editors. *Odontopediatría*. 1ª edição ed: Elsevier Masson; 2004. p. 55-77.
15. Cate ART, Sharpe PT, Roy S, Nanci A. Development of thw tooth and its supporting tissues. In: Nanci A, editor. *Oral Histology - Development, Structure and Function*. 6ª ed: Mosby; 2003. p. 79-109.
16. Cameron AC, Widmer R, King N, Aldred M, Hall K, Seow K. Dental anomalies. In: Cameron A, Widmer R, editors. *Handbook of pediatric dentistry*. 3rd ed: Mosby; 2008. p. 179-219.
17. Galluccio G, Castellano M, La Monaca C. Genetic basis of non-syndromic anomalies of human tooth number. *Arch Oral Biol*. 2012.
18. Michaud JL, Pourquoié O. Genetic basis for tooth malformations: from mice to men and back again. *Cli Gen J*. 2011.

19. Bailleul-Forestier I, Berdal A, Vinckier F, Ravel T, Fryns JP, Verloes A. The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 2: syndromes with significant dental involvement. *Eur J Med Genet.* 2008;51(5):383-408.
20. Galluccio G, Castellano M, La Monaca C. Genetic basis of non-syndromic anomalies of human tooth number. *Arch Oral Biol.* 2012;57(7):918-30.
21. Brook AH. Multilevel complex interactions between genetic, epigenetic and environmental factors in the aetiology of anomalies of dental development. *Arch Oral Biol.* 2009(54):3-17.
22. Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Rev Mens Suisse Odont Stomato.* 2011;121(7-8):636-46.
23. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of development.* 1997;67(2):111-23.
24. Silva ER, Alves JB. A Genética da Odontogenese. *J Bioscie* 2008;24(2):113-24.
25. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Scie.* 2003;116(9):1647-8.
26. Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Cur Opin in Cell Biol.* 1996(8):844-50.
27. Hu J-C, Simmer JP. Developmental biology and genetics of dental malformations. *Ortho Craniofac Res.* 2007;10:45-52.
28. Garib DG, Alencar BM, Ferreira FV, Ozawa TO. Anomalias dentárias associadas: o ortodontista decodificando a genética que rege os distúrbios de desenvolvimento dentário. *Dental Press J Orthod.* 2010;15(2):138-57.
29. World Health Organization WHO. International statistical classification of diseases and related health problems. 2007; Available from: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>.
30. Seabra M, Macho V, Pinto A, Soares D, Andrade C. A Importância das Anomalias Dentárias de Desenvolvimento. *Acta Pedia Port.* 2008:195-200.
31. Sperber GH. The Genetics of Odontogenesis: Implications in Dental Anthropology and Palaeo-Odontology. *Dent Anthropol J.* 2004;17(1):1-6.
32. McDonald RE, Avery ED, Hartsfield JK. Acquired and Developmental Disturbances of the teeth and Associated Oral Structures. In: McDonald R, Avery's, editors. *Dentistry for the Child and Adolescent.* 9ª ed: Mosby ELSEVIER; 2011. p. 101-2.
33. García-Ballesta C, Nicolás ML. Alteraciones del desarrollo dentario. In: Boj JR, Catalá M, Garcia-Ballesta, Mendoza A, editors. *Odontopediatria.* 1ª ed: Elsevier Masson; 2004. p. 96-7.
34. Sert S, Bayr IG. Taurodontism in six molars: a case report. *J Endod.* 2004;30(8):601-2.
35. Joshy VR, Jose M, Mohammed R. Taurodontism of multiple teeth - a case report. *Or Max Path J* 2011;2(1):132-6.
36. Constant DA, Grine FE. A review of taurodontism with new data on indigenous southern African populations. *Arch Oral Biol.* 2001;46(11):1021-9.

37. Rao A, Arathi R. Taurodontism of deciduous and permanent molars: report of two cases. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2006;24(1):42-4.
38. Peinado NR, Marbán GS, Leache EB. Taurodontismo, una anomalía dentaria frecuentemente olvidada. *JADA.* 2010;5(2):180-4.
39. Paganini GA, Junior MGT, Oliveira P, Valdrighi HC. Taurodontic teeth. *RGO Porto Alegre.* 2005;53(2):117-20.
40. Mena CA. Taurodontism. *Oral Surg Oral Med Oral Path.* 1971;32(5):812-23.
41. Harvati K, Panagopoulou E, Karkanias P. First Neanderthal remains from Greece: the evidence from Lakonis. *Hum Evol J.* 2003;45(6):465-73.
42. Pillai KG, Scipio JE, Naya rK, Louis N. Prevalence of taurodontism in premolars among patients at a tertiary care institution in Trinidad. *West Indian Med J.* 2007;56(4):368-71.
43. Bharti R, Chandra A, Tikku AP, Wadhvani KK. "Taurodontism" an endodontic challenge: a case report. *J Oral Sci.* 2009;51(3):471-4.
44. Gupta SK, Saxena P, Jain S, Jain D. Prevalence and distribution of selected developmental dental anomalies in an Indian population. *J Oral Sci.* 2011;53(2):231-8.
45. Molano P, Molano R. Taurodontismo, Amelogenesis imperfecta, anodoncia parcial, disfuncion de la formacion radicular, y tendencia al enamismo esqueletico: una asociacion poco usual. Reporte de un caso. *Rev Estomato.* 2001;9(2):48-60.
46. Kaste SC, Hopkins KP, Jenkins JJ. Abnormal Odontogenesis in children treated with radiation and chemotherapy: imaging findings. *Americ RoentRay Soc.* 1994;162:1407-11.
47. Kan WY, Seow WK, Holcombe T. Taurodontism in children with hypodontia and supernumerary teeth: a case control study. *Pediat Dentist.* 2010;32(2):134-40.
48. Prakash R, Vishnu C, Suma B, Velmurugan N, Kandaswamy D. Endodontic management of taurodontic teeth. *Indian J Dent Res.* 2005;16(4):177-81.
49. Parolia A, Khosla M, Kundabala M. Endodontic management of hypo-, meso- and hypertaurodontism: case reports. *Aust Endod J.* 2012;38(1):36-41.
50. Reddy NV, Rao VAP, Kumar K, Mohan G, Sarasakavitha D. Endodontic treatment in primary molars with taurodontism - a case report. *An Essenc of Dent.* 2010;2(1):52-5.
51. Shifman A, Chanannel I. Prevalence of taurodontism found in radiographic dental examination of 1,200 young adult Israeli patients. *Commu Dentis Oral Epidem.* 1978;6(4):200-3.
52. Ruprech tA, Batniji S, Neweihi E. The incidence of taurodontism in dental patients. *Oral Surg Oral Med Oral Path.* 1987;63(6):743-7.
53. Darwazeh AM, Hamasha AA, Pillai K. Prevalence of taurodontism in Jordanian dental patients. *Dento Maxillo Facial Radiol.* 1998;27(3):163-5.
54. Kuchler EC, Risso PA, Costa MC, Modesto A, Vieira AR. Assessing the proposed association between tooth agenesis and taurodontism in 975 paediatric subjects. *Int J Paediatr Dent.* 2007;18(3):231-4.
55. Porto MT, Souza EC, Brucker MR. Prevalência de taurodontismo em pacientes da Faculdade de Odontologia da PUCRS. *Rev Cienc Med Biol.* 2009;8(1):39-45.
56. Burklein S, Breuer D, Schafer E. Prevalence of taurodont and pyramidal molars in a German population. *J Endod.* 2011;37(2):158-62.

57. Ghapanchi J, Haghnegahdar A, Khodadadzadeh S, Pourshahidi S, Ebrahimi H. Prevalence of taurodontism ,missing & impacted teeth In South of Iranian Population. *Austr J Basi Appl Scien.* 2011;5(9):430-4.
58. Topcuoglu HS, Karataş E, Arslan H, Koseoglu M, Evcil S. The Frequency of Taurodontism in the Turkish Population. *J Clin Exp Dent.* 2011;3(4):284-8.
59. Llamas R, Jimenez-Planas A. Taurodontism in premolars. *Oral Surg Oral Med Oral Path.* 1993;75(4):501-5.
60. Bhat SS, Sargon S, Mohammed SV. Taurodontism in deciduous molars - case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2004;22(4):193-6.
61. Seow WK, Needleman HL, Holm IA. Effect of familial hypophosphatemic rickets on dental development: a controlled, longitudinal study. *Pediatr Dentist.* 1995;17(5):346-50.
62. Joseph M. Endodontic treatment in three taurodontic teeth associated with 48,XXXXY Klinefelter syndrome: a review and case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(5):670-7.
63. Komatz Y, Tomoyoshi T, Yoshida O, Fujimoto A, Yoshitake K. Taurodontism and Klinefelter's syndrome. *J Med Genet.* 1978;15(6):452-4.
64. Moraes LC, Filho EM, Castilho JCM, Moraes MEL, Dotto PP, Dotto GN. Taurodontism occurrence in Down's syndrome patients. *Rev Inst Cien Sau.* 2004;22(4):317-22.
65. Demiryürek EO, Gönüloğlu N, Bulucu B. Endodontic treatment of a taurodontic premolar with five canals. *Australian Endod J.* 2010:1-4.
66. Jaspers MT, Witkop CJ. Taurodontism, an isolated trait associated with syndromes and X-chromosomal aneuploidy. *Am J Hum Genet.* 1980;32(3):396-413.
67. Akintoye SO, Lee JS, Feimster T, Booher S, Brahim J, Kingman A, et al. Dental characteristics of fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(3):275-82.
68. Aminabadi NA, Ebrahimi A, Oskouei SG. Chondroectodermal dysplasia (Ellis-van Creveld syndrome): a case report. *J Oral Sci.* 2010;52(2):333-6.
69. Tyagi P, Gupta S. Bilateral Taurodontism in Deciduous Molars: A case Report. *People's J Sci Res.* 2010;3(2):21-3.
70. Nawa H, Oberoi S, Vargervik K. Taurodontism and Van der Woude syndrome. Is there an association? *Angle Orthod.* 2008;78(5):832-7.
71. Collins MA, Mauriello SM, Tyndall DA, Wright JT. Dental anomalies associated with amelogenesis imperfecta: a radiographic assessment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(3):358-64.
72. Veiga L, Figueiredo A, Seabra M, Braga P. Taurodontism in premolars and supernumerary teeth – report of an unusual association. *Rev Dentíst Online.* 2012;10(22):26-31.
73. Genc A, Namdar F, Goker K, Atasu M. Taurodontism in association with supernumerary teeth. *J Clin Pedia Dentist.* 1999;23(2):151-4.
74. Brook AH GR, Smith RN, Townsend GC, Kaur G, Davis GR, Fearn J. Tooth size patterns in patients with hypodontia and supernumerary teeth. *Arch Oral Biol.* 2009;54(1):63-70.

75. Gros CI, Clauss F, Obry F, Maniere MC, Schmittbuhl M. Quantification of taurodontism: interests in the early diagnosis of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Oral Dis.* 2010;16(3):292-8.
76. Crawford PJ, Aldred MJ, Clarke A. Clinical and radiographic dental findings in X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Med Genet.* 1991;28(3):181-5.
77. Atkinson JC, Harvey KE, Domingo DL, Trujillo MI, Guadagnini JP, Gollins S, et al. Oral and dental phenotype of dyskeratosis congenita. *Oral Dis.* 2008;14(5):419-27.
78. Durr DP, Campos CA, Ayers CS. Clinical significance of taurodontism. *J Am Dent Assoc.* 1980;100(3):378-81.
79. Lygidakis NA, Laskaris MG. Anomalias Dentárias. In: Laskaris G, editor. Atlas colorido de doenças bucais da infância e da adolescência 1ª ed: Artmed; 2000. p. 2-35.
80. Seow WK, Lai PY. Association of taurodontism with hypodontia: a controlled study. *Pediat Dentist.* 1989;11(3):214-9.
81. Shifman A, Buchner A. Taurodontism. Report of sixteen cases in Israel. *Oral Surg Oral Med Oral Path.* 1976;41(3):400-5.
82. Laatikainen T, Ranta R. Taurodontism in twins with cleft lip and/or palate. *Europ journal Oral Sci.* 1996;104(2):82-6.
83. Blumberg JE, Hylander WL, Goepf RA. Taurodontism: a biometric study. *Amer J Physic Anthropol.* 1971;34(2):243-55.
84. Amorim ESA, Bernardo RV, Kora RC, Magre AF, Meneses GPS, Scelza MFZ. Algumas alterações morfológicas que dificultam o tratamento endodôntico. *Odonto Clin Cientif Recife.* 2007;6(3):203-6.
85. Metgud S, Metgud R, Rani K. Management of a patient with a taurodont, single-rooted molars associated with multiple dental anomalies: a spiral computerized tomography evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(2):81-6.
86. Guttal KS, Naikmasur VG, Bhargava P, Bathi RJ. Frequency of developmental dental anomalies in the Indian population. *Eur J Dent.* 2010;4(3):263-9.
87. Seale NS. The use of stainless steel crowns. *Pediat Dentist.* 2002;24(5):501-5.
88. Kadkhodazadeh M, Robati M, Yoosefimanesh H. Taurodontism and periodontal management. *Rev J Biol Res.* 2010;5(4):330-3.
89. Alcina EP. Biomecánica. In: Canut Brusola JA, editor. *Ortodoncia clínica y terapéutica.* 2 ed: Elsevier Masson; 2000. p. 275-8.
90. Yordanova M, Yordanova S, Tomov G. Orthodontic problems in patients with hypodontia and taurodontism of permanent molars. *J IMAB.* 2011;7(2):109-13.
91. Duverger O, Lee D, Hassan MQ, Chen SX, Jaisser F, Lian JB, et al. Molecular consequences of a frameshifted DLX3 mutant leading to Tricho-Dento-Osseous syndrome. *J Biol Chem.* 2008;283(29):20198-208.
92. Hyun HK, Kim JW. Thickness and microhardness of deciduous tooth enamel with known DLX3 mutation. *Arch Oral Biol.* 2009;54(9):830-4.
93. Duverger O, Chen SX, Lee D, Li T, Chock PB, Morasso MI. SUMOylation of DLX3 by SUMO1 promotes its transcriptional activity. *J Cell Biochem.* 2011;112(2):445-52.

94. Feledy JA, Morasso MI, Jang SI, Sargent TD. Transcriptional activation by the homeodomain protein distal-less 3. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(3):764-70.
95. Bryan JT, Morasso MI. The Dlx3 protein harbors basic residues required for nuclear localization, transcriptional activity and binding to Msx1. *J Cell Sci.* 2000;113(22):4013-23.
96. Ji Hun Cha JH, H-M. R, Woo KM, G-S. K, Baek J-H. Dlx3 Plays a Role as a Positive Regulator of Osteoclast Differentiation. *Int J Oral Biol.* 2007;32(3):85-91.
97. Choi SJ, Roodman GD, Feng JQ, Song IS, Amin K, Hart PS, et al. In vivo impact of a 4 bp deletion mutation in the DLX3 gene on bone development. *Dev Biol.* 2009;325(1):129-37.
98. Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC. Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet.* 1998;7(3):563-9.
99. Lee SK, Lee ZH, Lee SJ, Ahn BD, Kim YJ, Lee SH, et al. DLX3 mutation in a new family and its phenotypic variations. *J Dent Res.* 2008;87(4):354-7.
100. Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu T, Escamilla M, MacDougall M. DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Ame J Med Genet.* 2005;133(2):138-41.
101. Kelly SC, Ratajczak P, Keller M, Purcell SM, Griffin T, Richard G. A novel GJA 1 mutation in oculo-dento-digital dysplasia with curly hair and hyperkeratosis. *EJD.* 2006;16(3):241-5.
102. An HJ, Kim KR, Kim IS, Kim DW, Park MH, Park IA, et al. Prevalence of human papillomavirus DNA in various histological subtypes of cervical adenocarcinoma: a population-based study. *J USC Acad Pathol.* 2005;18(4):528-34.
103. Gartner CF, Goldenberg FC. Importance of panoramic radiography in the diagnosis and orthodontic treatment planning of mixed dentition phase. *Rev odonto.* 2009;17(77):102-9.
104. Pérez R, Rubén A, Navarrete E. Agenesis in permanent dentition. *Rev salud públ.* 2009;11(6):961-9.
105. Sidow JS, West LA, Liewehr FR, Loushine RJ. Root canal morphology of human maxillary and mandibular third molars. *J Endod.* 2000;26(11):675-8.
106. Tiku A, Damle SG, Nadkarni UM, Kalaskar RR. Hypertaurodontism in molars and premolars: management of two rare cases. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2003;21(4):131-4.
107. Gonzalez NTC, Bermudez JSL, Molina EMG, Olmedillo JRP. Multiple bilateral taurodontism. A case report. *J Endod.* 2010;36(11):1905-7.
108. Moraes ME, Moraes LC, Dotto GN, Dotto PP, Santos LR. Dental anomalies in patients with Down syndrome. *Braz Dent J.* 2007;18(4):346-50.

IX. Anexos

Anexo 1 – Índice de Figuras

- Figura 1:** Estádios do desenvolvimento dentário. Adaptado de Riviere ⁽¹³⁾. (a) Lâmina Dentária: E (epitélio) M (mesênquima) (b) Botão (c) Capuz: OE (órgão de esmalte), PD (papila dentária), SD (saco dentário); (d) Campânula: RE (retículo estrelado), EI (epitélio interno), EE (epitélio externo); (e) Campânula tardia: a vermelho encontra-se o epitélio oral e os seus derivados (esmalte), e a azul o mesênquima e os seus derivados (dentina)..... 8
- Figura 2:** Regulação molecular do desenvolvimento dentário. Adaptado de Bailleul-Forestier *et al.* ⁽⁷⁾ e Thesleff *et al.* ⁽²⁵⁾. Interações entre o epitélio (vermelho) e mesênquima (azul) são mediadas por sinais moleculares (BMP, FGF, SHH, TNF, WNT). Estes sinais actuam durante o desenvolvimento dentário e regulam a expressão de genes (itálico) nos diferentes tecidos (caixas). A amarelo estão representados os centros de sinalização. 11
- Figura 3:** Radiografias periapicais que evidenciam casos de taurodontismo. (a) dente 2.6 Hipertaurodontico (b) dente 4.4 hipertaurodontico..... 15
- Figura 4:** Ortopantomografia onde se verifica hipertaurodontismo bilateral nos dentes 3.4 e 4.4, e a presença bilateral de dentes supranumerários entre as raízes dos 1º e 2º pré-molares inferiores..... 19
- Figura 5:** Ortopantomografia que apresenta o diagnóstico de Hipertaurodontismo nos dentes 1.6, 2.6, 3.6 e 4.6. 20
- Figura 6:** Método de classificação do taurodontismo segundo Shaw. (a) Hipotaurodontismo, (b) Mesotaurodontismo, (c) Hipertaurodontismo. 21
- Figura 7:** Métodos de classificação do taurodontismo segundo vários autores. (a) Keene *et al.*, (b) Fiechtinger & Rossiwal, (c) Shifman & Chanannel, (d) Seow & Lai. 22
- Figura 8:** Localização molecular do gene DLX3 no cromossoma 17 na posição 21.2. 27
- Figura 9:** Gel de agarose a 4% apresentando os resultados da amplificação de amostras de 2 indivíduos (19 e 21) usando *primers* para DLX3 e para o gene da Globulina beta (HB). Neste gel são ainda apresentados os controlos negativos para os dois *primers* (H2O + *primer*). O número 404 refere-se a uma amostra de saliva da qual já tinha sido feita uma amplificação de ADN no nosso laboratório com outro conjunto de *primers*. 50
- Figura 10:** Gel de teste em que são apresentados os resultados da amplificação de uma amostra independente (não taurodontismo) com os *primers* genéricos da globulina beta (Hb) e com os *primers* DLX3. O controlo negativo corresponde a água em vez de amostra. 51
- Figura 11:** Resultado das amplificações com os *primers* DLX3. Como controlo para a reacção de PCR foram usados os *primers* Hb e como controlo negativo foi usada água. 52

Anexo 2 – Índice de Tabelas

Tabela 1: Diferentes fases da odontogénese e anomalias dentárias associadas. (Adaptado de Cameron) (16)	10
Tabela 2: Classificação das anomalias dentárias de desenvolvimento segundo a OMS. (adaptado da <i>World Health Organization</i>) ⁽²⁹⁾	14
Tabela 3: Análise da prevalência do Taurodontismo em algumas populações.	18
Tabela 4: Distribuição do número e percentagem da população da CDU-UCP na faixa etária dos 10- 30 anos de idade com Ortopantomografia.....	43
Tabela 5: Distribuição do número e percentagem da população da CDU-UCP na faixa etária dos 10- 30 anos de idade com Taurodontismo.	43
Tabela 6: Distribuição do número e percentagem dos pacientes com taurodontismo, de acordo com o género.....	44
Tabela 7: Distribuição do número e percentagem dos pacientes com taurodontismo, de acordo com a faixa etária.....	44
Tabela 8: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, por cada paciente.....	45
Tabela 9: Distribuição do número e percentagem de dentes diagnosticados com taurodontismo.....	45
Tabela 10: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com o grau de classificação.....	46
Tabela 11: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com o tipo de dentição.....	46
Tabela 12: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com a arcada.....	47
Tabela 13: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com o quadrante.	47
Tabela 14: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, segundo o tipo de dente.....	48
Tabela 15: Distribuição do número e percentagem de dentes classificados com taurodontismo, de acordo com o dente afectado.....	48
Tabela 16: Resultados das leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm dos isolamentos de ADN de cada amostra e respectivo cálculo do ratio 260/280 e concentração de ADN em ng/ml de amostra. ...	49

Anexo 3 – Dados

<i>Processo</i>	<i>Género</i>	<i>Idade</i>	<i>Dentes</i>
9075	M	14	16, 26
14186	F	24	16,17,26, 27
15306	F	25	33
15761	F	23	35, 45
15867	F	22	33, 45
16183	M	24	35
18026	F	16	17
18113	F	21	44
20207	M	26	34
20247	M	18	34, 44
20447	M	29	44, 45
20745	M	29	16, 26, 36, 46
20845	M	15	27
21093	M	28	45
21449	M	22	37
21618	F	28	37
21740	M	23	26
22507	F	13	35, 45
22624	F	30	46
22811	F	10	34, 44
22890	F	17	17, 27, 44
22902	F	26	34, 44
22956	F	20	35
22970	F	11	34, 45

Anexo 4 – Diagnóstico Taurodontismo

<i>Processo</i>	<i>Dente</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>A/B</i>	<i>C</i>	<i>Diagnóstico</i>
9075	16	5,36	24,7	5,34	21,7	Maior	Hipotaurodontismo
	26	5,47	22,01	3,97	24,85	Maior	Hipotaurodontismo
14186	17	5,91	16,83	4,07	35,12	Maior	Mesotaurodontismo
	16	5,37	18,33	4,28	29,3	Maior	Hipotaurodontismo
	26	5,75	19,73	4,58	29,14	Maior	Hipotaurodontismo
	27	4,63	16,66	4,53	27,79	Maior	Hipotaurodontismo
15306	33	7,93	16,92	7,13	46,87	Maior	Hipertaurodontismo
15761	35	6,18	17,57	6,57	35,17	Maior	Mesotaurodontismo
	45	6,73	19,88	6,54	33,85	Maior	Mesotaurodontismo
15867	33	10,43	22,3	7,93	46,77	Maior	Hipertaurodontismo
	45	8,76	22,87	6,67	38,3	Maior	Mesotaurodontismo
16183	35	10,2	24,28	9,74	42,01	Maior	Hipertaurodontismo
18026	17	4,65	15,01	3,32	30,98	Maior	Mesotaurodontismo
18113	44	8,89	19,64	6,41	45,26	Maior	Hipertaurodontismo
20207	34	12,43	21,88	11,22	56,81	Maior	Hipertaurodontismo
20247	34	10,98	21,66	8,19	50,69	Maior	Hipertaurodontismo
	44	9,69	20,99	8,08	46,16	Maior	Hipertaurodontismo
20447	44	12,54	23,54	9,66	53,27	Maior	Hipertaurodontismo
	45	8,58	23,69	6,63	36,22	Maior	Mesotaurodontismo
20745	16	10,33	21,87	12,16	47,23	Maior	Hipertaurodontismo
	26	12,16	23,07	14,09	52,71	Maior	Hipertaurodontismo
	36	7,69	21,23	7,08	36,22	Maior	Mesotaurodontismo
	46	6,03	18,92	9,62	31,87	Maior	Mesotaurodontismo
20845	27	5,73	14,85	6,18	38,59	Maior	Mesotaurodontismo
21093	45	8,72	21,16	6,63	41,21	Maior	Hipertaurodontismo
21449	37	8,52	16,76	9,59	50,84	Maior	Hipertaurodontismo
21618	37	7,39	17,58	6,36	42,04	Maior	Hipertaurodontismo
21740	26	5,74	19,21	4,76	29,88	Maior	Hipotaurodontismo
22507	35	9,17	18,88	9,17	48,57	Maior	Hipertaurodontismo
	45	9,76	18,48	9,57	52,81	Maior	Hipertaurodontismo
22624	46	12,3	18,93	13,99	64,98	Maior	Hipertaurodontismo
22811	34	9,38	18,85	7,54	49,76	Maior	Hipertaurodontismo
	44	9,5	19,99	7,25	47,52	Maior	Hipertaurodontismo
22890	17	6,58	20,43	5,74	32,21	Maior	Mesotaurodontismo
	27	6,73	20,79	7,86	32,37	Maior	Mesotaurodontismo
	44	10,58	21,32	8,19	49,62	Maior	Hipertaurodontismo
22902	34	10,19	23,25	8,43	43,83	Maior	Hipertaurodontismo
	44	8,45	19,25	7,65	43,9	Maior	Hipertaurodontismo
22956	35	13,82	23,39	11,77	59,09	Maior	Hipertaurodontismo
22970	34	7,49	17,26	15,21	43,4	Maior	Hipertaurodontismo
	45	8,53	17,72	7,14	48,13	Maior	Hipertaurodontismo

Anexo 5 – Consentimento informado



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

Estrada da Circunvalação 3504-505 Viseu tel. 232 421 104/ 232 419656

Termo de Consentimento Informado

“ Prevalência dos polimorfismos do gene DLX3 em pacientes diagnosticados com Taurodontismo na Clínica Dentária Universitária de Viseu.”

Venho por este meio comunicar que farei um estudo nos pacientes seleccionados da consulta da Clínica Universitária da Universidade Católica Portuguesa, onde será realizado um exame clínico e recolha de uma amostra de saliva, com o objectivo de obter dados relevantes ao desenvolvimento de um estudo de carácter científico, na área de Odontopediatria. Comunico também que não será efectuado nenhum tratamento no paciente.

Os dados que constam na ficha clínica serão apenas utilizados pelos investigadores.

A informação recolhida será tratada com a máxima confidencialidade, o seu nome será codificado e apenas os investigadores terão acesso a essa mesma informação.

A participação neste estudo não implicará qualquer custo de atendimento.

(Nome do Pai, Mãe, Responsável) _____, tendo sido devidamente informado(a) sobre o conteúdo deste estudo, conduzido pela aluna _____, com o apoio de docentes da Disciplina de Odontopediatria do curso de “Mestrado Integrado de Medicina Dentária”, desejo que, (Nome do/a filho/a ou Participante no estudo)

por quem sou legítimo/a Responsável, seja/ser incluído(a) neste estudo, respondendo a todas as questões propostas e realizando os exames que me forem indicados.

Compreendi a explicação que me foi fornecida acerca do estudo, tendo-me sido dada as oportunidades de fazer as perguntas que julguei necessárias.

Viseu, ____ de _____ 201__

Participante/Pai/Mãe/Responsável Legal: _____

O Orientador: _____

O Co-Orientador: _____

A Aluna: _____

Anexo 6 – Dados da recolha de amostras de saliva

<i>Amostras</i>	<i>Idade</i>	<i>Parentesco</i>	<i>Família</i>
1	16	irmã	1
2	46	mãe	
3	10	TAURO	
4	47	pai	
5	24	irmão	
6	59	mãe	2
7	24	irmão	
8	60	pai	
9	29	TAURO	3
10	23	TAURO	
11	45	mãe	
12	47	pai	
13	11	TAURO	4
14	42	mãe	
15	43	pai	
16	18	irmã	
17	14	TAURO	5
18	44	pai	
19	8	irmão	
20	40	mãe	
21	15	TAURO	
22	8	irmã	6
23	32	mãe	
24	37	pai	
25	14	TAURO	7
26	12	irmão	
27	36	mãe	
28	24	TAURO	8
29	46	mãe	
30	47	pai	
31	28	TAURO	9
32	52	mãe	
33	14	irmã	
34	56	pai	
35	30	TAURO	10
36	60	pai	
37	26	TAURO	11
38	51	mãe	
39	54	pai	
40	30	irmão	
41	23	irmã	
42	23	TAURO	12
43	50	mãe	
44	16	irmã	

Anexo 7 – Protocolos

Protocolo 1: Extração de DNA

1. Transferir 2ml de saliva para tubo de *ependorf* (2 ml).
2. Centrifugar a 2700rpm (15min).
3. Descartar sobrenadante.
4. Lavar *pellet* com 35µl de tampão TE [(10mM) Tris (ph 8,0) e 10mM EDTA (PH 8,0)]
5. Centrifugar a 2700rpm (15min).
6. Descartar sobrenadante.
7. Ressuspender (lavar) *pellet* em 700µl de tampão de lise [10mM Tris (ph 8,0), 10mM EDTA (pH 8,0), 0,1M NaCl e 2%SDS].
8. Transferir para um tubo de microcentrifuga de 2ml contendo 35µl de 20mg/ml de proteinase K.
9. Misturar a amostra e colocar a 58°C por 2horas.
10. Adicionar igual volume de clorofórmio (+/- 700µl).
11. Levar ao *vortex* durante 10segundos.
12. Centrifugar a 14000rpm (2min).
13. Ficar apenas com o sobrenadante (retirar o sobrenadante: verificação de 3 fases no qual se utiliza o sobrenadante).
14. Adicionar 3M NaOAc (ph 6,0; 1/10 volume de sobrenadante) e 2 vezes o volume de etanol a 70% (para extrair DNA do sobrenadante).
15. Fazer o “pulso” na centrifugadora.
16. Aspirar o líquido.
17. Deixar secar durante 1 hora (nota: tapar com papel de filtro).
18. Ressuspender o *pellet* em 500µl de TE.

Protocolo 2: Extração de DNA

1. Transferir 2ml de saliva para tubo de *ependorf* (2 ml).
2. Centrifugar a 2700rpm (15min).
3. Descartar sobrenadante.
4. Lavar *pellet* com 35µl de tampão TE [(10mM) Tris (ph 8,0) e 10mM EDTA (PH 8,0)]
5. Centrifugar a 2700rpm (15min).
6. Descartar sobrenadante.
7. Ressuspender (lavar) *pellet* em 700µl de tampão de lise [10mM Tris (ph 8,0), 10mM EDTA (pH 8,0), 0,1M NaCl e 2%SDS].
8. Transferir para um tubo de microcentrifuga de 2ml contendo 35µl de 20mg/ml de proteinase K.
9. Misturar a amostra e colocar a 58°C por 2horas.
10. Adicionar igual volume de clorofórmio (+/- 700µl).
11. Levar ao *vortex* durante 10segundos.
12. Centrifugar a 14000rpm (2min).
13. Ficar apenas com o sobrenadante (retirar o sobrenadante: verificação de 3 fases no qual se utiliza o sobrenadante).
14. Adicionar 3M NaOAc (ph 6,0; 1/10 volume de sobrenadante) e 2 vezes o volume de etanol a 70% frio (“*overnight*” 18 horas no frigorífico).
15. Fazer o “pulso” na centrifugadora.
16. Aspirar o líquido.
17. Deixar em estufa até secar totalmente (nota: tapar com papel de filtro).
18. Ressuspender o *pellet* em 200µl de H₂O.

Protocolo 3: Extração com kit DNA Genotek

1. Misturar a amostra no kit Genotek DNA por inversão e agitar suavemente durante alguns segundos.
2. Incubar a amostra em H₂O a 50° C no tempo mínimo de 1 hora ou na incubadora de ar num tempo mínimo de 2 horas.
3. Transferir o total da amostra para um tubo eppendorf (1,5 µL).
4. Incubar um volume de 1/25th de PT-L2P e misturar durante alguns segundos no *vortex*.
5. Incubar em gelo durante 10 minutos.
6. Centrifugar à temperatura ambiente durante 10 minutos à velocidade máxima.
7. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para novo *eppendorf*. Descartar o *pellet*.
8. Adicionar ao sobrenadante etanol a 95 ou 100%, e misturar gentilmente por inversão dez vezes.
9. Deixar a amostra repousar à temperatura ambiente durante dez minutos (precipitação do DNA).
10. Centrifugar à temperatura ambiente, à velocidade máxima durante 10 minutos.
11. Remover o sobrenadante. Conservar *pellet*.
12. Lavar *pellet* com etanol: adicionar 1 ml de etanol 70%, e deixar repousar durante 1 minuto. Remover o etanol.
13. Reidratar o DNA com 0.2- 1mL de solução de TE e levar ao *vortex* durante 30 segundos.
14. Incubar à temperatura ambiente durante 12 horas, e depois levar ao *vortex* a 50°C durante uma hora.
15. Transferir o DNA reidratado para um tubo *eppendorf* de 1.5 µL e armazenar.
16. Opções para armazenar o DNA totalmente reidratado.
17. Colocar em TE, em aliquotas a -20° C para armazenamento a longo prazo ou em TE a 4° C para um tempo máximo de 2 meses.

Protocolo 4: Reacção de PCR

1. 5 µl de amostra adicionar 20 µl de master mix contendo 1 µl de *primer* F e 1 µl de *primer* R.
2. Colocar as amostras no termociclador com o seguinte programa:
 - Desnaturação do DNA inicial a 95°C durante 5 min
 - 30 ciclos de:
 - Desnaturação a 94°C durante 40 seg
 - Hibridação a 58°C durante 40 seg
 - Extensão a 72°C durante 40 seg.
 - Extensão final 10 minutos a 72

Protocolo 5: Gel agarose NuSieve a 4%

1. Adicionar TAE 1x gelado 60ml e um magnete num copo.
2. Ir colocando muito lentamente a agarose 2.4 g com a agitação no máximo.
3. Remover o magnete.
4. Deixar repousar durante 15 minutos.
5. Pesquisar o copo e a solução e registrar o peso.
6. Tapar o copo com parafilme e fazer furinhos.
7. Aquecer no microondas durante 2 minutos, em potência média.
8. Remover do microondas.
9. Agitar lentamente o copo para ressuspender as partículas de agarose.
10. Voltar a por no microondas em potência máxima até começar a ferver.
11. Manter em ebulição durante 1min ou até que todas as partículas sejam dissolvidas.
12. Agitar lentamente o copo.
13. Adicionar água destilada quente para obter o peso inicial.
14. Misturar bem.
15. Deixar arrefecer até os 50°-60°C.

