ANOMALIAS DENTÁRIAS COMO EXTENSÃO FENOTÍPICA DAS FISSURAS ORAIS: ESTUDOS MOLECULARES DE GENES E REGIÕES CANDIDATAS

ARIADNE MACHADO GONÇALVES LETRA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Biologia Oral.

**BAURU
2007**

**ANOMALIAS DENTÁRIAS COMO EXTENSÃO FENOTÍPICA DAS
FISSURAS ORAIS: ESTUDOS MOLECULARES DE GENES E
REGIÕES CANDIDATAS**

ARIADNE MACHADO GONÇALVES LETRA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Biologia Oral.

Orientador: **Prof. Dr. José Mauro Granjeiro**
Orientador no exterior: **Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira**

**BAURU
2007**

L586a Letra, Ariadne Machado Gonçalves
Anomalias dentárias como extensão fenotípica das
fissuras orais : Estudos moleculares de genes e regiões
candidatas / Ariadne Machado Gonçalves. -- Bauru,
2007.
261 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadores: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processo
fotocopiadores oe/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética do HRAC/USP

Protocolo n.º: 265/2004
Data: 25/08/2004

Dados Curriculares

Ariadne Machado Gonçalves Letra

<i>Nascimento</i>	07 de fevereiro de 1974 São Paulo, SP
<i>Filiação</i>	Jose Álvaro Letra e Carmen Lúcia Machado Gonçalves Letra
<i>1991 – 1995</i>	Graduação em Odontologia Universidade Federal Fluminense Niterói, RJ
<i>1996</i>	Atualização em Dentística Restauradora Associação Brasileira de Odontologia. Seção Niterói Niterói, RJ
<i>1998 - 1999</i>	Especialização em Endodontia Odontoclínica Central do Exército – OCEX Rio de Janeiro, RJ
<i>1999</i>	Extensão em Cirurgia Paraendodôntica Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP Bauru, SP
<i>2002 – 2003</i>	Pós-Graduação em Endodontia, Nível Mestrado Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Rio de Janeiro, RJ Agência Financiadora, Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2004 - 2007

Pós-Graduação em Biologia Oral, Nível Doutorado
Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP
Bauru, SP.

Agência Financiadora, Centro de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2006 - 2007

Bolsista do Estágio de Doutorando no Exterior
University of Pittsburgh School of Dental Medicine
Department of Oral Biology
Pittsburgh, PA, EUA

Agência Financiadora, Centro de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Associações

ABO/RJ. Associação Brasileira de Odontologia, Seção
Rio de Janeiro.

APCD/SP. Associação Paulista de Cirurgiões
Dentistas.

SBPqO. Sociedade Brasileira de Pesquisa
Odontológica.

IADR. International Association of Dental Research.

ASHG. American Society of Human Genetics.

*A todos os pacientes e seus familiares, pela
generosa participação e contribuição de material biológico para que
este estudo pudesse ser realizado...*

... DEDICO ESPECIALMENTE ESTE TRABALHO.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS, por me manter forte e saudável e por orientar os meus passos todos os dias.

*Aos meus pais, **Álvaro** e **Carmen Lúcia**, pelos ensinamentos de amor e caráter e pela confiança que sempre tiveram em mim, pelo apoio e incentivo para que eu sempre perseguisse os meus sonhos, por mais que significassem estarmos longe.*

*À minha querida avó, **Maria Donzília**, pelo carinho especial e por nos acompanhar para Bauru e cuidar de nós, especialmente o Lucas.*

*Aos meus queridos **Renato** e **Lucas**, por terem tornado o meu sonho seus sonhos, e por oferecerem o seu amor todos os dias de nossas vidas. Lembrando uma música que recentemente se tornou uma das favoritas do Lucas e expressa todo o meu sentimento...*

*“You’re the meaning in my life, you’re the inspiration,
You bring feeling to my life, you’re the inspiration...”*

*Aos meus sogros, **Renato** e **Heloísa**, pelo carinho e apoio de sempre.*

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

*Ao meu orientador, **Professor Dr. José Mauro Granjeiro**, por ter se revelado um verdadeiro Mestre, com sua postura sempre otimista orientando e estimulando o exercício do pensamento científico e moral, e por ter se tornado um verdadeiro amigo, com suas palavras sábias e gentis. Pelos incentivos profissionais e pessoais que me possibilitaram estar aqui hoje e por acreditar no meu potencial.*

*Ao meu orientador no exterior, **Professor Dr. Alexandre Vieira**, pela carinhosa acolhida em seu laboratório, pelos preciosos ensinamentos, pela confiança e imensa generosidade. Serei sempre grata pelo seu suporte e compreensão, imprescindíveis para a nossa adaptação nos Estados Unidos, pela amizade sincera que surgiu e pelos bons momentos no trabalho e no lazer com as famílias.*

*À **Professora Dra. Ana Paula de Souza Pardo**, por ter contribuído significativamente para minha introdução na área de Biologia Molecular, e ter guiado o meu aprendizado nas técnicas laboratoriais de algumas etapas deste projeto. Obrigada pela amizade e pelo carinho de sempre.*

*À Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do atual Diretor **Prof. Dr. Fernando Pegoraro**, pelo apoio durante as atividades exercidas durante o curso de Doutorado.*

*Ao Hospital de Reabilitação e Anomalias Craniofaciais, na pessoa do atual diretor **Prof. Dr. José Alberto de Souza Marques**, por ter permitido acesso aos pacientes e suas famílias para a realização deste trabalho.*

*À Universidade do Sagrado Coração, na atual pessoa do Coordenador de Pós-Graduação e Pesquisa, **Prof. Dr. Sérgio Catanzaro Guimarães**, por ter permitido a utilização das instalações do Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.*

*Ao Departamento de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de Pittsburgh, na pessoa da atual Chefe de Departamento, **Profa. Dra. Mary Louise Marazita**, pelo apoio e pela gratificante oportunidade de aprender com um grande nome.*

*Aos amigos do Departamento de Bioquímica, Professores, **Dra. Marília Rabelo Buzalaf** e **Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, Técnicos, **Thelma, Ovídio e Flávia Iano**, e Alunos, cujos nomes completariam algumas paginas desta tese... pelo apoio, amizade e por terem tornado a Bioquímica a minha segunda casa em Bauru.*

*Aos queridos amigos da turma de Doutorado em Biologia Oral, **Esther, Flavia, Heloisa, Rejane, Tania, Anna Elisa, Silvia, Renato e Claudia**, pela amizade e pela convivência maravilhosa nestes anos em Bauru.*

*Aos colegas do Setor de Saúde Coletiva do HRAC, por terem me recebido de forma tão amigável, pela paciência e ajuda durante os procedimentos com os pacientes. Em especial, à **Gisele da Silva Dalben**, cujo apoio foi fundamental durante muitos meses de trabalho intenso.*

Ao amigo **Rodrigo Augusto da Silva**, pela amizade sincera e incansável ajuda durante os procedimentos laboratoriais, principalmente no período que antecedeu a minha viagem ao exterior.

Ao amigo **Wilson Aparecido Orcini**, pelo inestimável apoio técnico e amizade.

Aos colegas do Vieira Lab, **Monica, Jill, Kathleen, e Joe**, pelo suporte técnico, pela amizade e pelo excelente ambiente de trabalho, e a **Asli**, pelo ombro amigo durante a fase final de preparo desta tese.

À **Vera Rufino Rosa**, pela ajuda imprescindível com as tarefas burocráticas...matrículas, qualificação, defesa de tese...

À equipe da Comissão de Pós-Graduação da FOB/USP, **Giane, Margareth, e Letícia**, pela simpatia e pela ajuda inestimável durante estes anos.

À **Professora Dra. Mari Cleide Sogayar**, do Departamento de Bioquímica da USP/SP, pela contribuição de materiais permanentes e reagentes para execução de parte deste projeto.

À **Pró Reitoria de Pós-Graduação da USP**, pela concessão de auxílio financeiro para participação em eventos científicos.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no exterior.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE QUADROS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
 1 INTRODUÇÃO.....	 1
 2 REVISÃO DA LITERATURA.....	 7
2.1 Desenvolvimento Normal da Face.....	9
2.1.1 Desenvolvimento do Palato Primário.....	9
2.1.2 Desenvolvimento do Palato Secundário.....	10
2.2 As Fissuras Labiais com ou sem Fissuras Palatinas.....	11
2.3 Definição do Fenótipo.....	12
2.3.1 Fissuras Labiais com ou sem Fissuras Palatinas e Anomalias Dentárias..	12
2.4 Genes Candidatos e Polimorfismos Genéticos.....	14
2.5 Estudos Genéticos das Fissuras Labiais com ou sem Fissuras Palatinas.....	14
2.6 As Metaloproteinases da Matriz Extracelular.....	15
2.6.1 MMP1.....	17
2.6.2 MMP3.....	18
2.6.3 MMP9.....	18
2.7 Fator Transformador de Crescimento Alfa (TGFA).....	19
2.8 Fator Regulador de Interferon-6 (IRF6).....	20
2.9 Cromossomo 6q.....	21
 3 PROPOSIÇÃO.....	 24
 4 MATERIAL E MÉTODOS.....	 27
4.1 MATERIAL.....	29
4.1.1 População Estudada.....	29
4.2 MÉTODO.....	29
4.2.1 Definição do Fenótipo.....	29
4.2.2 Coleta de Material Biológico.....	30
4.2.3 Extração do DNA.....	30

4.2.4 Seleção dos Genes Candidatos e Polimorfismos de um Único Nucleotídeo....	31
4.2.5 Genotipagem.....	31
4.2.5.1 MMP1.....	32
4.2.5.2 MMP3.....	34
4.2.5.3 MMP9.....	36
4.2.5.4 TGFA.....	38
4.2.5.5 IRF6.....	42
4.2.5.6 Cromossomo 6q.....	43
4.2.6 Análise dos Dados.....	44
4.2.6.1 Definição do Fenótipo.....	44
4.2.6.2 Associação de Polimorfismos Genéticos e Subfenótipos de FL/P....	45
4.2.6.3 Análise de Desequilíbrio de Ligação entre os Polimorfismos estudados.....	45
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Definição do Fenótipo.....	49
5.1.1 Caracterização da Amostra.....	49
5.1.2 Tipos de Fissura.....	49
5.1.3. Presença de Anomalias Dentárias.....	50
5.1.4 Anomalias Dentárias como Subfenótipos Adicionais para FL/P.....	51
5.2 Novos Subfenótipos Propostos.....	54
5.3 Estudos Genéticos de Associação com a FL/P.....	55
5.3.1 MMP1.....	55
5.3.2 MMP3.....	57
5.3.3 MMP9.....	59
5.3.4 TGFA.....	62
5.3.5 IRF6.....	66
5.3.6 Cromossomo 6q.....	70
5.4 Estudos Genéticos utilizando Anomalias Dentárias como Subfenótipos Adicionais para FL/P.....	77
5.5 Análise de Desequilíbrio de Ligação entre os Polimorfismos Testados.....	83
5.6 Sumário dos Resultados.....	89

6 DISCUSSÃO.....	91
6.1 Metodologia.....	93
6.1.1 Tipo de Estudo.....	93
6.1.2 Seleção dos Genes Candidatos e Polimorfismos Estudados.....	94
6.1.3 Genotipagem.....	96
6.1.4 Análise dos Resultados.....	97
6.2 Resultados.....	97
6.2.1 Caracterização da Amostra.....	97
6.2.2 Definição do Fenótipo.....	99
6.3 Estudos Genéticos de Associação com a FL/P.....	101
6.3.1 MMPs.....	101
6.3.2 TGFA.....	104
6.3.3 IRF6.....	106
6.3.4 Cromossomo 6q.....	109
6.4 Estudos Genéticos utilizando Anomalias Dentárias como Subfenótipos Adicionais para FL/P.....	111
6.5 Análise de Desequilíbrio de Ligação entre os Polimorfismos Testados.....	112
7 CONCLUSÕES.....	115
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	119
ANEXOS.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	231
ABSTRACT.....	259
APÊNDICES	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do gene MMP1 (11q22.2).....	32
Figura 2.	Polimorfismo -1607 1G/2G na região promotora do gene MMP1....	34
Figura 3.	Estrutura do gene MMP3 (11q22.3).....	34
Figura 4.	Polimorfismo -1171 5A/6A na região promotora do gene MMP3....	36
Figura 5.	Estrutura do gene MMP9 (20q13.12).....	36
Figura 6.	Polimorfismo -1562C/T na região promotora do gene MMP9.....	38
Figura 7.	Esquema da estrutura do gene TGFA.....	38
Figura 8.	Resultados obtidos pelo método Taqman no gene TGFA.....	39
Figura 9.	Exemplo de indivíduo homozigoto analisado pelo método de PCR cinético.....	41
Figura 10.	Exemplo de indivíduo heterozigoto analisado pelo método de PCR cinético.....	41
Figura 11.	Esquema da estrutura do gene IRF6.....	42
Figura 12.	Gráfico de desequilíbrio de ligação ilustrando a região estudada no cromossomo 6q.....	43
Figura 13.	Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene TGFA em casos e controles (população total).....	83
Figura 14.	Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene TGFA em casos e controles (caucasianos) e controles japoneses.....	84
Figura 15.	Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene IRF6 em casos e controles (população total).....	85
Figura 16.	Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene IRF6 em casos e controles (caucasianos) e controles japoneses.....	86
Figura 17.	Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no cromossomo 6q em casos e controles (população total).....	87
Figura 18.	Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no cromossomo 6q em casos e controles (caucasianos) e controles japoneses.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características observadas para a população estudada.....	49
Tabela 2.	Diferenças observadas para as frequências de anomalias dentárias em casos e controles.....	50
Tabela 3.	Distribuição das anomalias dentárias nos indivíduos fissurados (divididos de acordo com os subfenótipos apresentados) e controles.....	52
Tabela 4.	Número de anomalias dentárias observadas nos indivíduos fissurados, de acordo com o lado da anomalia e lado da fissura.....	53
Tabela 5.	Características da população estudada para o gene MMP1.....	56
Tabela 6.	Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1607 1G/2G no gene MMP1 em casos e controles, na população total e em caucasianos.....	56
Tabela 7.	Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1607 1G/2G no gene MMP1 em indivíduos com FL/P e FP, na população total e em caucasianos.....	57
Tabela 8.	Características da população estudada para o gene MMP3.....	58
Tabela 9.	Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1171 5A/6A no gene MMP3 em casos e controles, na população total e em caucasianos.....	58
Tabela 10.	Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1171 5A/6A no gene MMP3 em indivíduos com FL/P e FP, na população total e em caucasianos.....	59
Tabela 11.	Características da população estudada para o gene MMP9.....	60
Tabela 12.	Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1562 C/T no gene MMP9 em casos e controles, na população total e em caucasianos.....	60
Tabela 13.	Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1562 C/T no gene MMP9 em indivíduos com FL/P e FP, na população total e em caucasianos.....	61
Tabela 14.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e dos alelos obtidas para casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no gene TGFA.....	62

Tabela 15.	Análise comparativa das frequências dos genótipos obtidos para casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no gene TGFA.....	63
Tabela 16.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos para casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no gene TGFA.....	64
Tabela 17.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos para casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no gene TGFA.....	65
Tabela 18.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e dos alelos obtidas para casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no gene IRF6.....	66
Tabela 19.	Análise comparativa das frequências dos genótipos obtidos para casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no gene IRF6.....	67
Tabela 20.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos para casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no gene IRF6.....	68
Tabela 21.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos para casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no gene IRF6.....	69
Tabela 22.	Análise comparativa das frequências dos genótipos obtidos em casos e controles para cada polimorfismo estudado no cromossomo 6q.....	71
Tabela 23.	Diferenças observadas para as frequências dos genótipos e dos alelos de cada polimorfismo estudado entre casos e controles (caucasianos).....	72
Tabela 24.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos para os subfenótipos de casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no cromossomo 6q.....	73
Tabela 25.	Análise comparativa das frequências dos genótipos obtidos para os subfenótipos de casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no cromossomo 6q.....	75
Tabela 26.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos em casos e controles (população total) para cada polimorfismo no gene TGFA, de acordo com os subfenótipos propostos.....	77

Tabela 27.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos em casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo no gene TGFA, de acordo com os subfenótipos propostos.....	78
Tabela 28.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos em casos e controles (população total) para cada polimorfismo no gene IRF6 de acordo com os subfenótipos propostos.....	78
Tabela 29.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos em casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo no gene IRF6 de acordo com os subfenótipos propostos.....	79
Tabela 30.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos em casos e controles (população total) para cada polimorfismo no cromossomo 6q de acordo com os subfenótipos propostos.....	79
Tabela 31.	Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos em casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo no cromossomo 6q de acordo com os subfenótipos propostos.....	81
Tabela 32.	Sumário das associações encontradas de acordo com o polimorfismo estudado.....	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Condições experimentais para o polimorfismo -1607 1G/2G no gene MMP1.....	33
Quadro 2.	Condições experimentais para o polimorfismo -1171 5A/6A no gene MMP3.....	35
Quadro 3.	Condições experimentais para o polimorfismo -1562C/T no gene MMP9.....	37
Quadro 4.	SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de base dos polimorfismos estudados no gene TGFA.....	39
Quadro 5.	Condições experimentais para o polimorfismo C3296T no gene TGFA.....	40
Quadro 6.	Condições experimentais para o polimorfismo C3827T no gene TGFA.....	40
Quadro 7.	SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de base dos polimorfismos estudados no gene IRF6.....	42
Quadro 8.	SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de base dos polimorfismos estudados na região do cromossomo 6q.....	44
Quadro 9.	Lista de subfenótipos utilizados em estudos genéticos e os subfenótipos adicionais propostos baseados no desenvolvimento dental.....	54

RESUMO

A fissura labial com ou sem fissura palatina (FL/P) é uma anomalia craniofacial muito comum em humanos, e pode ocorrer como característica de um quadro sindrômico ou isolada, quando os indivíduos afetados não apresentam qualquer anomalia estrutural associada. A etiologia da FL/P isolada é complexa, com a contribuição de componentes genéticos e ambientais. Diversos genes/loci candidatos a FL/P foram sugeridos nos últimos anos, apesar de discrepâncias entre resultados. Alguns autores consideram a FL/P como parte de um fenótipo mais amplo, e sugerem que características clínicas adicionais, como a presença de anomalias dentárias, poderiam ser utilizadas para uma melhor descrição do fenótipo individual em investigações genéticas da FL/P. Quinhentos indivíduos com FL/P e quinhentos indivíduos sem FL/P e não relacionados entre si foram examinados com relação ao tipo de fissura e anomalias dentárias apresentadas e amostras de saliva foram coletadas de cada indivíduo para estudos moleculares. A frequência das anomalias dentárias foi significativamente maior nos indivíduos com FL/P e as associações preferenciais observadas para algumas anomalias e determinados subfenótipos de FL/P foram consideradas novos subfenótipos de FL/P e incluídos nas análises moleculares. Um total de 30 polimorfismos distribuídos nos genes MMP1, MMP3, MMP9, TGFA, IRF6 e no cromossomo 6q foram estudados com relação à associação com a FL/P e seus subfenótipos através de restrição enzimática, PCR cinético e método Taqman. As diferenças observadas para as frequências dos genótipos e alelos de cada polimorfismo estudado em casos e controles foram avaliadas estatisticamente através do teste Qui-quadrado e correção de Bonferroni para múltiplos testes. O padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados também foi avaliado. Os genes MMP3, TGFA, IRF6, e outros e três genes (PRSS35, SNAP91 e CYB5R4) e dois polimorfismos localizados no cromossomo 6q mostraram-se associados a FL/P e seus subfenótipos na população estudada.

Palavras-chave: fissura labial/palatina, subfenótipo, anomalias dentárias, polimorfismos genéticos.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A fissura labial com ou sem fissura palatina (FL/P) é uma das anomalias craniofaciais mais comuns em humanos, cuja incidência varia entre 1/500 a 1/2500 nascimentos (**MOSSEY; LITTLE, 2002**). Em geral, aproximadamente 70% das FL/P são consideradas não sindrômicas, ou isoladas, cujos indivíduos afetados não apresentam qualquer outra anomalia estrutural associada, enquanto as 30% restantes são atribuídas a síndromes ou aberrações cromossômicas e agentes teratogênicos (**SCHUTTE; MURRAY, 1999, MURRAY, 2002, MARAZITA; MOONEY, 2004**).

A natureza multifatorial complexa da FL/P isolada justifica os inúmeros estudos genéticos demonstrando uma diversidade de genes e fatores ambientais envolvidos na sua etiologia (**WYSZYNSKI et al., 1997, LITTLE et al., 2004, JUGESSUR; MURRAY, 2005**). Conseqüentemente, diversos genes e loci candidatos foram associados à FL/P isolada em diferentes estudos: fator regulador de interferon-6 (IRF6, 1p36), fator de crescimento transformante alfa (TGFA, 2p13), *muscle segment homeobox 1* (MSX1, 4p16), fator de crescimento transformante beta-3 (TGFB3, 14q24), receptor alfa do ácido retinóico (RARA, 17q21), *B-cell lymphoma 3* (BCL3, 19q13), apesar das discrepâncias entre resultados (**VIEIRA; ORIOLLI, 2001, VIEIRA et al., 2003, LIDRAL; MURRAY, 2004, MARAZITA et al., 2004, LIDRAL; MORENO, 2005**).

Alguns autores acreditam que parte da dificuldade encontrada nos estudos genéticos da FL/P pode ser atribuída à falta de uma definição mais detalhada do fenótipo. A classificação precisa dos indivíduos afetados torna-se crucial quando se tratando de um traço genético complexo como a FL/P, em que o fenótipo pode ser altamente variável. Inúmeras evidências sugerem que o fenótipo da FL/P pode ser muito mais complexo do que se presume, podendo apresentar diversas combinações de fissura (com relação ao lado afetado e extensão da fissura), ou ainda ser caracterizado por uma variedade de marcadores subclínicos associados. Por exemplo, dados epidemiológicos sugerem que indivíduos com FL/P apresentam uma maior incidência de anomalias dentárias do que indivíduos não-fissurados e ainda, que a severidade das anomalias dentárias parece estar relacionada à severidade da FL/P, sugerindo que a presença de anomalias dentárias em indivíduos com FL/P isolada poderia representar um marcador clínico adicional para a ocorrência de FL/P, implicando uma etiologia genética comum

entre as duas condições (**ADAMS; NISWANDER**, 1967, **SCHROEDER; GREEN**, 1975, **LARSON et al.**, 1998, **VAN DEN BOOGARD et al.**, 2000, **EERENS et al.**, 2001, **SLAYTON et al.**, 2003, **VIEIRA**, 2003, **AIZENBUD et al.**, 2005, **STAHL et al.**, 2006).

Outra dificuldade relatada pelos autores está relacionada à interpretação dos resultados relatados na literatura, os quais muitas vezes são contraditórios possivelmente devido a viés de estudo, falta de poder estatístico, e diferenças entre populações estudadas, impondo outras dificuldades para o desenvolvimento de novos estudos. Dessa forma, os estudos genéticos recentes visam não só a identificação de novos genes/loci candidatos através de tecnologias avançadas, mas também testar genes/loci sugeridos como potencialmente envolvidos quanto a sua associação com a FL/P isolada (**JUGESSUR; MURRAY**, 2005, **PARK et al.**, 2006).

Os genes de metaloproteinases da matriz (MMPs) têm sido sugeridos como possíveis candidatos à fissura labial e/ou palatina devido à importante função destas enzimas durante o desenvolvimento craniofacial (**IAMAROON et al.**, 1996). Diversas evidências biológicas (**IAMAROON et al.**, 1996, **MORRIS-WIMAN**, 1999; 2000, **KERRIGAN et al.**, 2000, **BLAVIER et al.**, 2001, **BROWN et al.**, 2002) sugerem que os genes de diferentes MMPs e suas variações podem estar implicados nas anomalias de desenvolvimento do lábio e palato. Entretanto, até o presente momento, somente um estudo sugeriu uma possível associação entre uma determinada região cromossômica contendo o gene MMP25 e FL/P (**BLANTON et al.**, 2004), revelando uma área relativamente inexplorada nas investigações sobre a etiologia genética da FL/P.

O gene TGFA (Fator de Crescimento Transformante Alfa) foi o primeiro gene associado à FL/P em humanos (**ARDINGER et al.**, 1989). Esse gene foi escolhido juntamente com outros genes relacionados baseado em estudos com modelos animais demonstrando a sua importância na formação do palato (**FERGUSON**, 1988, **DIXON et al.**, 1991; 1992, **IAMAROON et al.**, 1996). Desde então, diversos estudos com diferentes populações demonstraram associação do TGFA com a FL/P enquanto outros não observaram tal associação. Alguns autores ainda consideram o TGFA como um importante coadjuvante na etiologia da FL/P, pois existem evidências que sugerem que o TGFA interage com fatores ambientais, como o tabagismo materno, ou atua como modificador do fenótipo individual (**VIEIRA**, 2006).

Variações no gene IRF6 foram sugeridas como responsáveis pela contribuição genética de 12% de todos os casos de FL/P (ZUCCHERO et al., 2004), após mutações neste gene terem sido identificadas como causadoras da síndrome de Van der Woude, caracterizada pela presença de FL/P e depressões no lábio inferior dos indivíduos afetados (KONDO et al., 2002). Desde então, estudos subsequentes em diversas populações diferentes têm replicado estes resultados (BLANTON et al., 2005; GHASSIBÉ et al., 2005; SCAPOLI et al., 2005; SCHRIMTHONG et al., 2005). Estudos biológicos suportam um papel para o IRF6 na etiologia da FL/P, pois a expressão do IRF6 pode ser detectada em camundongos em desenvolvimento, na bainha epitelial dos processos palatinos, além de no germe dentário, folículo capilar, pele, e em diversos tecidos adultos de camundongos (KONDO et al., 2002).

Além dos genes supracitados, a utilização de abordagens estatísticas sofisticadas (VIELAND, 1998) desenvolvidas para avaliar a chance de determinado evento ocorrer em uma dada população, possibilitou a detecção de uma região no cromossomo 6q que apresenta uma probabilidade de 90% de conter um gene envolvido na etiologia da FL/P (GOVIL et al., 2006). Interessantemente, o gene DDO (*D-aspartate oxidase*), localizado no cromossomo 6q se mostrou associado à FL/P (MARAZITA et al., 2006).

Em resumo, a complexidade e a diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos na embriogênese, com ambos fatores genéticos e ambientais exercendo papéis fundamentais, proporcionam inúmeras oportunidades para investigar a etiologia da FL/P visando uma melhor compreensão do desenvolvimento embriológico humano e suas alterações. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar os fenótipos e subfenótipos encontrados para a FL/P com base no desenvolvimento dental e suas alterações, e verificar a existência de associação entre polimorfismos nos genes MMP1, MMP3, MMP9, TGFA, IRF6, e genes contidos no cromossomo 6q, com a FL/P e seus subfenótipos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento Normal da Face

O desenvolvimento normal da face humana compreende uma cascata de eventos complexos e rigidamente controlados durante o desenvolvimento embrionário, regulados através de genes cujos fatores de transcrição podem ser traduzidos em proteínas estruturais, regulatórias ou enzimáticas (**SPERBER**, 2002a).

Aproximadamente na quarta semana de vida intra-uterina, células originárias da crista neural cranial migram sob a forma de células mesenquimais para os processos embrionários craniofaciais durante o fechamento do tubo neural. Os segmentos da crista neural por sua vez migram para os arcos branquiais em desenvolvimento para se tornarem precursores de cartilagem, osso, músculo e tecido conjuntivo do complexo craniofacial. Uma série de eventos então se iniciam para induzir a formação das cinco proeminências faciais (frontonasal, maxilares e mandibulares bilateralmente) (**GARCIA-CASTRO; BROMER-FRASER**, 1999, **SPERBER**, 2002a, **COBOURNE**, 2004). A diferenciação, crescimento, e eventual fusão destas proeminências darão origem à face humana.

2.1.1 Desenvolvimento do Palato Primário

O palato primário consiste na porção da face que separa as cavidades oral e nasal, e compreende parte dos processos nasais mediais e laterais do processo frontonasal e parte dos processos maxilares que contribuem para a separação das cavidades nasal e oral (**DIEWERT; LOSANOFF**, 2002, **JOHNSTON; BRINSKY**, 2002; **SPERBER**, 2002b). A palatogênese do palato primário envolve uma série de eventos celulares e moleculares rigidamente controlados, onde determinadas alterações físicas e biomecânicas associadas ao crescimento craniofacial devem ocorrer especificamente durante a quinta a sétima semana de vida intra-uterina em humanos. O palato primário inicialmente se forma ao redor das narinas através da rápida proliferação do epitélio lateral e do mesênquima subjacente (**CARSTENS**, 2002). **DIEWERT; LOSANOFF**, 1993, demonstraram em embriões de camundongos e humanos, que conforme as proeminências faciais crescem ao redor das narinas para formar a região pré-maxilar, o crescimento do cérebro e dos componentes craniofaciais alteram a

morfologia facial podendo afetar o período, a localização e a extensão do contato entre as proeminências faciais. Ao mesmo tempo, o cérebro se eleva à medida que o ângulo da base do crânio diminui, a região nasal medial se estreita, e a maxila cresce sagitalmente para encontrar as proeminências nasais medial e lateral. A partir daí, o lábio superior se forma através da fusão das proeminências nasais mediais projetadas a partir da proeminência frontonasal. Esta fusão requer a ocorrência coordenada entre crescimento das proeminências faciais, exata localização, e apoptose e/ou diferenciação do epitélio que forma a ponte nasal transitória entre os processos maxilares e frontonasal. A degradação da ponte nasal subjacente permite o fluxo de células mesenquimais entre os componentes medial e lateral do lábio superior, aproximadamente na sétima semana de vida intra-uterina. O desenvolvimento anormal deste epitélio pode estar implicado nas fissuras labiais e do palato primário (**DIEWERT; LOSANOFF, 2002, JOHNSTON; BRONSKY, 2002, SPERBER, 2002b**).

2.1.2 Desenvolvimento do Palato Secundário

O palato secundário compreende as partes do primórdio facial posterior ao palato primário e inclui os dois processos palatinos que se projetam medialmente a partir dos processos maxilares (**DIEWERT; LOSANOFF, 2002, JOHNSTON; BRONSKY, 2002, SPERBER, 2002c**).

Assim como na palatogênese do palato primário, o fechamento e a fusão do palato secundário requerem a completa interação dos movimentos dos processos palatinos. Durante a oitava semana de vida intra-uterina, os processos palatinos mudam de uma posição vertical a cada lado da língua e se elevam para assumirem uma posição horizontal, para então se encontrarem na linha média através de inúmeros desmossomos formando uma “bainha epitelial”, conhecida como bainha epitelial medial, a qual desaparece gradativamente permitindo a confluência do mesênquima de ambos os processos palatinos. O desaparecimento da bainha epitelial medial é um fator essencial para a fusão e eventual ossificação dos processos palatinos, que prossegue da parte posterior do palato secundário em direção a pré-maxila durante a oitava semana de vida intra-uterina (**DIEWERT; LOSANOFF, 2002, JOHNSTON; BRONSKY, 2002, SPERBER, 2002c**). Diversas evidências têm sugerido que tanto processos de morte celular programada, migração celular para os epitélios nasal e oral, e transformação

epitélio-mesenquimal podem estar envolvidos no desaparecimento da bainha epitelial medial (**FITCHETT; HAY**, 1989, **CARETTE; FERGUSON**, 1992). Tais processos envolvem a modulação de filamentos intermediários do citoesqueleto (por exemplo, citoqueratina e vimentina), moléculas de adesão celular (caderina-e), e da matriz extracelular (**TUDELA et al.**, 2002).

Distúrbios em qualquer um dos estágios durante a palatogênese: crescimento inadequado dos processos palatinos, elevação atrasada ou falha na elevação dos processos, falhas durante a fusão, falhas levando ao não desaparecimento ou desaparecimento incompleto da bainha epitelial medial, ou ruptura pós-fusão, têm sido sugeridos como possíveis causas de fissuras no palato (**FERGUSON**, 1988).

2.2 As Fissuras Labiais com ou sem Fissura Palatina (FL/P)

As FL/P são defeitos congênitos comuns em humanos, devido a distúrbios no desenvolvimento embrionário normal, e podem ocorrer como característica de uma síndrome, como parte de um fenótipo resultante de aberrações cromossômicas, ou ainda como resultado da exposição materna a determinados teratógenos durante a gestação. Existem aproximadamente 400 síndromes em que a FL/P é considerada parte do fenótipo. Entretanto, a maioria das fissuras é considerada não síndrômica ou isolada, sem qualquer outra anomalia estrutural associada, e somam aproximadamente 70% dos casos de FL/P (**MURRAY**, 2002).

Tipicamente, as FL/P são divididas em três grupos principais: fissura labial isolada (FL), fissura labial com ou sem fissura palatina (também denominada fissura lábio-palatina, FLP), e fissura palatina isolada (FP). A incidência relatada para FL/P varia de 1:500 a 1:1000 nascimentos dependendo da população. Para FP, a incidência relatada é menor, de 1:2500 nascimentos aproximadamente. Em geral, os indivíduos de descendência Asiática ou de Índios americanos apresentam maior incidência enquanto indivíduos de descendência Africana apresentam incidências menores, quando comparados a indivíduos caucasianos (**NATSUME et al.**, 1987).

A etiologia da fissura isolada é considerada multifatorial, com componentes genéticos e ambientais. O fato de que os genes atuam de modo determinante no desenvolvimento das estruturas craniofaciais normais é evidente em estudos com gêmeos monozigóticos. Entretanto, tal programação genética individual é

extremamente sensível a distúrbios pós-concepção, o que pode ser constatado pela longa lista de teratógenos que acarretam FL/P. Fatores ambientais como déficit nutricional, uso de inseticidas, consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo durante a gestação, assim como a interação entre estes e os fatores genéticos individualmente têm sido sugeridos como possíveis fatores causais da FL/P (MURRAY, 2002).

2.3 Definição do Fenótipo

A busca pela origem genética de qualquer condição através de técnicas de mapeamento genético começa com a definição do fenótipo e a classificação inapropriada ou insuficiente dos indivíduos afetados pode enfraquecer a habilidade de se detectar loci relevantes (HAINES; PERICAK-VANCE, 1998, RICE et al., 2001).

A maioria dos estudos genéticos se refere ao fenótipo das fissuras labiais com ou sem fissuras palatinas como fissura labial isolada (FL), fissura lábio-palatina (FLP), e fissura palatina (FP). FOGH-ANDERSEN, 1942, demonstrou que FP é uma entidade distinta de FL/P do ponto de vista embriológico. Entretanto, diferenças na etiologia ou epidemiologia de tais condições podem permanecer não reveladas devido à alta variabilidade no fenótipo.

Evidências recentes sugerem que o fenótipo da FL/P pode ser muito mais complexo do que se presume, podendo apresentar diversas combinações com relação ao lado afetado e extensão da fissura, ou ainda ser caracterizado por uma variedade de marcadores clínicos associados, os quais poderiam auxiliar na busca da etiologia genética da condição (VIEIRA, 2003). Esforços têm sido dispensados na tentativa de correlacionar características craniofaciais e FL/P utilizando abordagens imagenológicas, tais como ultra-som, radiografias cefalométricas e/ou fotografias (WEINBERG et al., 2006).

2.3.1 Fissuras Labiais com ou sem Fissuras Palatinas e Anomalias Dentárias

Os eventos mais críticos durante a formação dos dentes, lábios e palato apresentam períodos de desenvolvimento e localização similares. Muitos dos genes envolvidos no desenvolvimento dos dentes, lábios e palato são os mesmos. O epitélio odontogênico sobre os processos maxilares e mandibulares pode ser detectado no início

da quinta semana de vida intra-uterina; a FL/P parece ocorrer durante a quarta até a sétima semana (TONGE, 1967). Proliferação e diferenciação celular, bem como apoptose, definem estas estruturas, enquanto que distúrbios nestes processos, por anormalidades ambientais e/ou genéticas, podem predispor a anomalias dentárias e fissuras.

As anomalias dentárias são sinais clínicos comuns em indivíduos com FL/P quando comparados com indivíduos sem fissura em diversas populações (RANTA, 1982; 1983; 1986, RANTA; TULENSALO, 1988, WERNER; HARRIS, 1989, HARRIS; HULLINGS, 1990, TSAI et al., 1998, SHAPIRA et al., 1999; 2000, SLAYTON et al., 2003, STAHL et al., 2006). A anomalia mais frequentemente observada é a agenesia dentária (RANTA, 1983, JIROUTOVA, 1991, LAATIKAINEN; RANTA, 1994, SHAPIRA et al., 1999; 2000, EERENS et al., 2001, SLAYTON et al., 2003). Outras anomalias relatadas incluem atrasos no desenvolvimento da dentição (RANTA, 1982; 1983, NYSTROM; RANTA, 1988; HARRIS; HULLINGS, 1990), presença de dentes supranumerários (NAGAI et al., 1965; HANSEN; MEHDINIA, 2002), assimetria dental acentuada (SOFAER, 1979; NYSTROM; RANTA, 1988; WERNER; HARRIS, 1989), defeitos na formação do esmalte (DIXON, 1968; VICHÍ; FRANCHI, 1995; MALANCZUK et al., 1999), e microdontia (FOSTER; LAVELLE, 1971; PETERKA; MULLEROVA, 1983, WERNER; HARRIS, 1989; JAKSIC et al., 2002).

Existem evidências que suportam a idéia de uma possível origem genética comum entre FL/P e agenesia dentária isoladas. A mutação mais intrigante relacionando as duas condições foi descrita por VAN DEN BOOGARD et al., 2000, no gene MSX1. A família afetada apresentava uma combinação de agenesia dentária, FL/P e FP. Esta família apresenta a evidência mais convincente de que alguns mecanismos são os mesmos para o desenvolvimento dos dentes, lábios e palato. Além do fato de que indivíduos com FL/P apresentam consideravelmente mais anomalias dentárias do que indivíduos não fissurados, existem evidências de que a severidade das anomalias parece estar relacionada à severidade da FL/P (ADAMS; NISWANDER, 1967, SCHROEDER; GREEN, 1975, RANTA, 1984; 1988, LARSON et al., 1998, VAN DEN BOOGARD et al., 2000, EERENS et al., 2001, DEWINTER et al., 2003, SLAYTON et al., 2003, VIEIRA, 2003, AIZENBUD et al., 2005, STAHL et al., 2006).

A ocorrência simultânea de FL/P e agenesia dentária sugere que estes dois fenótipos possam estar geneticamente associados. Para se poder testar essa hipótese, uma descrição mais detalhada do fenótipo dental é necessária, com uma completa descrição das anomalias dentárias incluindo dentes ausentes e outros sinais, tais como microdontia e presença de dentes supranumerários. A análise seria realizada testando-se diferentes combinações de manifestações fenotípicas e dados moleculares.

2.4 Genes Candidatos e Polimorfismos Genéticos

Genes que potencialmente representam um papel na etiologia de uma alteração em particular são denominados candidatos àquela alteração. A maioria dos genes candidatos à FL/P foram originalmente sugeridos através de observações durante o processo de embriogênese em modelos animais (YOUNG et al., 2000). Outras indicações também surgiram de estudos com aberrações cromossômicas, e estudos de ligação com famílias de indivíduos afetados, apontando determinadas regiões cromossômicas como contendo possíveis genes candidatos (MURRAY, 2002).

Polimorfismos de um único nucleotídeo, também conhecidos como SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), são formas variantes da sequência de DNA que podem estar presentes nos indivíduos de uma população dentro de um espectro considerado biologicamente normal (KORNMAN et al., 1997). A hipótese de que a forma variante possa estar associada à função alterada de um gene em particular e conseqüentemente possa exercer algum papel na etiologia da FL/P pode ser analisada através da análise das frequências desses polimorfismos em indivíduos afetados (PRESCOTT et al., 2000).

2.5 Estudos Genéticos das Fissuras Labiais com ou sem Fissuras Palatinas

Um componente hereditário para a FL/P foi descrito pela primeira vez por FOGH-ANDERSEN em 1942. Atualmente, é aceito que 2 a 14 genes possam estar envolvidos na etiologia da FL/P (SCHLIEKELMAN; SLATKIN, 2002).

Diversos estudos têm sugerido uma correlação entre a presença de FL/P e variações genéticas em ou próximos a determinados genes, tais como TGFA

(ARDINGER et al., 1989), RARA (SHAW et al., 1993); TGFB3 (MAESTRI et al., 1997, LIDRAL et al., 1998, ROMITTI et al., 1999, VIEIRA et al., 2003), BCL3 (*B-cell lymphoma 3*) e PVR (*poliovirus receptor*) (STEIN et al., 1995, MAESTRI et al., 1997, WYSZYNSKI et al., 1997b, WARRINGTON et al., 2006), MSX1 (*muscle segment homeobox 1*) (LIDRAL et al., 1998, JEZEWSKI et al., 2003, VIEIRA et al., 2003, SUZUKI et al., 2004), IRF6 (ZUCCHERO et al., 2004, BLANTON et al., 2005, GHASSIBE et al., 2005, SCAPOLI et al., 2005, SCHRIMTHONG et al., 2006), PVRL1 (*poliovirus receptor-related 1*) (SOZEN et al., 2001, AVILA et al., 2006), FGFs (*fibroblast growth receptors*) (RILEY et al., 2007), entre outros (VIEIRA et al., 2005). Ainda, uma meta-análise sugeriu um possível envolvimento de genes contidos nos cromossomos 1p, 2q, 6p, 6q, 9q, 14q, 15q, 17q e 19q (MARAZITA et al., 2004). Todavia, a natureza e a função dos genes envolvidos na etiologia da FL/P variam amplamente, sugerindo a alta vulnerabilidade dos processos de desenvolvimento craniofacial, e a complexidade envolvida nos estudos genéticos da FL/P.

2.6 As Metaloproteinases da Matriz Extracelular

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) constituem uma família de enzimas extracelulares que apresentam domínios estruturais funcionais e mecanismos de ativação similares. As MMPs são endopeptidases cálcio- e zinco-dependentes, sintetizadas como pró-enzimas secretadas ou de membrana, e cuja ativação requer a remoção de um peptídeo amino-terminal. A maioria destas enzimas não é constitutivamente expressa, e o processo de transcrição só se inicia mediante ativação celular (STERNLICHT; WERB 2001, HANNAS et al., 2007).

Existem 23 MMPs humanas descritas, distribuídas em classes diferentes de acordo com a homologia na sequência de amino ácidos, presença de domínios peptídicos estruturais específicos, e especificidade do substrato *in vivo*. As três principais classes de MMPs são: (1) collagenases, ativas contra colágenos fibrilares, (2) gelatinases, altamente ativas contra colágenos desnaturados (gelatina), e (3) estromelisinases, que degradam os componentes não-colágenos da matriz extracelular. Outras classes incluem as MMPs de membrana, matrilisinases, elastase, entre outras (NAGASE, 2006).

As MMPs são responsáveis pela degradação e remodelação da matriz extracelular e por isso exercem papéis fundamentais durante o desenvolvimento embrionário, não somente removendo moléculas indesejadas, mas também influenciando diversas funções celulares tais como migração e proliferação celular, e modulação de moléculas biologicamente ativas (**NAGASE**, 2006).

Uma série de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais controlam a expressão e a atividade das MMPs individualmente. Acredita-se que para a maioria das MMPs, o principal mecanismo seja a regulação da transcrição, já que as MMPs são expressas somente em períodos de remodelação tecidual ativa (**STERNLICHT; WERB** 2001). Alguns polimorfismos nos genes de MMPs apresentam efeitos alelo-específicos sobre as atividades transcricionais das regiões promotoras dos genes, possivelmente contribuindo para diferenças interindividuais na susceptibilidade a doenças complexas, provavelmente através de alterações no equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas da matriz extracelular (**YE**, 2000).

Apesar da formação do palato incluir a síntese e degradação da matriz extracelular do palato, o exato papel das MMPs durante a palatogênese ainda não está bem estabelecido. No entanto, os genes de MMPs podem ser considerados possíveis candidatos devido à importante atuação destas enzimas na remodelação da matriz extracelular durante o desenvolvimento craniofacial (**IAMAROON et al.**, 1996; **KERRIGAN et al.**, 2000). Diversas evidências biológicas sugerem que os genes de diferentes MMPs e suas variações podem estar implicados nas anomalias de desenvolvimento do lábio e palato. A expressão de MMPs, em particular MMPs 2, 3, 7, 9, e 13, foi observada em padrões temporais e espaciais específicos no desenvolvimento do palato em camundongos (**MORRIS-WIMAN et al.**, 1999; 2000, **MANSELL et al.**, 2000, **BLAVIER et al.**, 2001). Outros estudos ainda demonstraram que a degradação proteolítica da matriz extracelular que precede a fusão do palato só ocorre na presença de MMPs, sugerindo que alterações na expressão destas enzimas poderiam conseqüentemente acarretar em distúrbios nas etapas finais da palatogênese (**BLAVIER et al.**, 2001, **BROWN et al.**, 2002).

O processo de transformação epitélio-mesenquimal no palato requer diversas etapas para que as duas superfícies epiteliais se fundam e as células migrem para os epitélios nasal ou oral. As células apresentam um aumento na expressão de moléculas sinalizadoras, incluindo MMPs, para que a degradação da matriz extracelular ocorra devidamente (**KANG; SVOBODA**, 2005). Uma redução nos níveis de MMPs

poderia hipoteticamente acarretar em falhas durante a fusão do palato levando ao aparecimento de fissura palatina.

Entretanto, apesar das evidências implicando as MMPs como moléculas essenciais durante a formação do lábio e do palato, nenhum estudo até hoje investigou o envolvimento das MMPs na etiologia da FL/P. O único relato sugerindo o envolvimento de uma MMP com a FL/P é resultado de um estudo utilizando regiões cromossômicas candidatas a FL/P sugeridas por buscas por todo o genoma, que encontrou um locus contendo o gene MMP25, como potencialmente envolvido na etiologia da FL/P (BLANTON et al., 2004).

2.6.1 MMP1

A MMP-1 pertence à família das collagenases e é a MMP mais abundantemente expressa em humanos. Apresenta atividade proteolítica contra colágenos fibrilares (colágenos tipo I, II e III), componentes mais abundantes do tecido conjuntivo intersticial (DUNLEAVEY et al., 2000). A MMP-1 é expressa durante o desenvolvimento craniofacial, e embora nenhum relato aborde a sua expressão durante a palatogênese especificamente, a MMP-1 tem sido implicada como um gene importante durante o desenvolvimento da dentição (RANDALL; HALL, 2002).

O gene MMP1 está localizado no cromossomo 11q22.3 próximo ao gene MMP3. Ambos estão em desequilíbrio de ligação e portanto existe a chance de estarem atuando em conjunto (HINODA et al., 2002). Polimorfismos no gene MMP1 têm sido associados principalmente a condições inflamatórias e patológicas caracterizadas por destruição de tecidos colágenos (YE, 2000, DE SOUZA et al., 2003, ASTOLFI et al., 2006, LIEVRE et al., 2007). Um dos polimorfismos mais comumente descritos encontra-se na posição -1607 da região promotora do gene MMP1, devido à inserção/deleção de uma guanosina (G) (polimorfismo 1G/2G). A presença do alelo 2G em conjunto com uma adenosina cria um sítio de ligação (5'-GGA-3') para a família de fatores de transcrição Ets, resultando em um aumento de 37 vezes na atividade transcricional da enzima (RUTTER et al., 1998). Entretanto, não existem relatos na literatura sobre polimorfismos neste gene e anomalias de desenvolvimento craniofacial.

2.6.2 MMP3

A MMP-3 pertence à classe das estromelisinases, e o seu gene está situado no cromossomo 11q22.3. A MMP-3 apresenta ampla especificidade de substratos, incluindo colágenos tipo III, IV e V, e componentes não colágenos, como proteoglicanas, fibronectina e laminina. Estudos *in vivo* demonstraram a imunolocalização destas enzimas subjacente ao epitélio medial, logo após o contato dos processos palatinos na linha média (**BROWN et al.**, 2002). A MMP-3 exerce um papel importante no processo de transformação epitélio-mesenquimal, e a indução de sua expressão resulta na ativação de caderina, perda do fenótipo epitelial e subsequente conversão de epitélio a mesênquima (**LOCHTER et al.**, 1997). Níveis elevados e constantes de MMP-3 foram observados nos estágios finais da palatogênese, sugerindo que a presença de MMP-3 neste determinado período pode significar o estímulo necessário para o início do processo de transformação epitélio-mesenquimal (**MANSELL et al.**, 2000).

Alterações patológicas na expressão de MMP-3 têm sido associadas a diversas condições sistêmicas, tais como aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (**YAMADA**, 2006), provavelmente devido à ampla variedade de substratos degradada pela enzima. Um polimorfismo funcional no gene MMP3 é resultado de uma variação do comprimento de uma série de adenosinas (A) localizadas na posição -1171 da região promotora, onde podem existir 5 ou 6 adenosinas em sequência. A presença de 5 adenosinas (alelo 5A) está associada à expressão elevada da MMP-3 *in vitro* (**YE et al.**, 1995; 1996). Assim como com o gene MMP1, todavia, não existem relatos de polimorfismos no gene MMP3 e anomalias de desenvolvimento craniofacial.

2.6.3 MMP9

O gene MMP9 está localizado no cromossomo 20q12.2. Também denominada gelatinase B, a MMP-9 é conhecida por sua habilidade em degradar colágenos tipo IV, V e XI, proteoglicanas e elastina (**VU et al.**, 1998), e em facilitar o processo de migração celular (**ZHANG et al.**, 1999).

Estudos anteriores demonstraram a expressão seletiva e elevada da enzima MMP-9 nos centros de ossificação da maxila em desenvolvimento, logo após a

reorientação horizontal dos processos palatinos e durante a fusão do palato, e a redução da expressão tão logo a fusão estar completa (**MORRIS-WIMAN et al.**, 2000, **BLAVIER et al.**, 2001), sugerindo uma possível atuação durante os eventos finais da palatogênese. Conseqüentemente, alterações na expressão da MMP-9 devido a variações na estrutura do gene poderiam acarretar falhas durante o processo final de fusão do palato. Um polimorfismo na região promotora do gene MMP9 (-1562 C/T) acarreta em um efeito sobre a transcrição do gene MMP9, onde a troca de uma citosina (C) por uma timina (T) resulta na perda de ligação de uma proteína nuclear nesta região e conseqüentemente resulta em um aumento na atividade transcricional (**ZHANG et al.** 1999).

2.7 Fator Transformador de Crescimento Alfa (TGFA)

O gene TGFA está localizado no cromossomo 2p13 (**BRISSENDEN et al.**, 1985, **TRICOLI et al.**, 1986) e sua expressão ocorre em diversos tecidos desde a embriogênese até a fase adulta (**RAPOLEE et al.**, 1988). Durante o desenvolvimento craniofacial, o gene TGFA é expresso no epitélio medial no momento da fusão dos processos palatinos (**DIXON et al.**, 1991, **IAMAROON et al.**, 1996, **MIETTINEN et al.**, 1999). No tecido de palato cultivado, o gene TGFA promove a síntese de matriz extracelular e migração de células mesenquimais, e subseqüentemente a resistência do palato fusionado (**DIXON; FERGUSON**, 1992). Apesar do gene TGFA ser expresso durante a palatogênese em camundongos, camundongos que não expressam o gene possuem pele, pelos e olhos anormais mas não possuem fissura palatina (**LUETTEKE et al.**, 1993, **MANN et al.**, 1993). Entretanto, camundongos “*knockout*” para o gene do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) apresentam uma alta incidência de fissura de palato, e isto sugere uma explicação para a correlação genética da FL/P com polimorfismos no gene TGFA (**MIETTINEN et al.**, 1999), uma vez que TGFA é um provável ligante do EGFR.

ARDINGER et al., 1989, descreveu pela primeira vez um possível envolvimento do gene TGFA com a etiologia da FL/P. Desde então, alguns estudos confirmaram tal resultado (**CHENEVIX-TRENCH et al.**, 1991; 1992, **HOLDER et al.**, 1992, **SASSANI et al.**, 1993, **STOLL et al.**, 1993, **FENG et al.**, 1994, **FIELD et al.**, 1994, **HWANG et al.**, 1995, **JARA et al.**, 1995a; 1995b, **SHAW et al.**, 1996,

PRESCOTT et al., 2000, **TANABE et al.**, 2000, **BEATY et al.**, 2002; 2006, **MARAZITA et al.**, 2002, **YUAN et al.**, 2006, **MORKŪNIENĖ et al.**, 2007), enquanto outros não observaram correlação alguma (**HECHT et al.**, 1991, **VINTINER et al.**, 1992; **BEATY et al.**, 1997; 2001, **LIDRAL et al.**, 1997, **WYSZYNSKI et al.**, 1997a, **SCAPOLI et al.**, 1998, **CHRISTENSEN et al.**, 1999, **ROMITTI et al.**, 1999; **MARAZITA et al.**, 2002; **PASSOS-BUENO et al.**, 2004). Outros estudos ainda sugeriram um papel para o TGFA como fator modificador na etiologia da FL/P, interagindo com outros genes e/ou fatores ambientais (**FIELD et al.**, 1994).

Atualmente, mais de 370 polimorfismos foram descritos para o gene TGFA. Entretanto, os relatos atuais corroboram a hipótese de um efeito reduzido do gene TGFA sobre o risco de ocorrência de FL/P em humanos, onde o TGFA modifica a expressão (severidade) da FL/P. Mesmo que pequeno, o papel do TGFA na etiologia da FL/P não deixa de ser significativa, e variações neste gene podem representar uma causa rara de FL/P em humanos (**VIEIRA**, 2006).

2.8 Fator Regulador de Interferon-6 (IRF6)

O gene IRF6 (1q32) faz parte de uma família de genes (IRF) que codifica fatores de transcrição e regula a expressão de interferons α e β após infecções virais. A função exata do IRF6 permanece desconhecida; entretanto, mutações no gene IRF6 foram identificadas em famílias de indivíduos afetados pelas síndromes de Van der Woude (OMIM 119300) e do Pterígio Poplíteo OMIM 119500), ambas caracterizadas pela presença de FL/P (**KONDO et al.**, 2002). Adicionalmente, polimorfismos na estrutura do IRF6 foram relatadas como responsáveis por aproximadamente 12% de toda a contribuição genética em casos de FL/P isolada (**ZUCCHERO et al.**, 2004), tornando este gene um dos mais significativos até hoje identificados. Em seu estudo cobrindo 36 polimorfismos na região do IRF6, com mais de 8000 indivíduos pertencentes a populações da Ásia, Europa e América do Sul, os autores demonstraram a associação de um destes polimorfismos em todas as populações estudadas e relataram ainda que variações na estrutura do IRF6 podem somar 12% do risco de ocorrência da FL/P isolada. Ainda, os autores encontraram transmissão preferencial do alelo ancestral da variante V274I em indivíduos com descendência asiática com FL/P isolada, mas não em descendentes europeus.

Estudos subsequentes confirmaram a associação de polimorfismos no gene IRF6 e FL/P em diversas populações (**SCAPOLI et al.**, 2005, **BLANTON et al.**, 2005, **GHAASSIBÉ et al.**, 2005, **SCHRIMTHONG et al.**, 2005, **VIEIRA et al.**, 2007), o que praticamente confirma o IRF6 como fator etiológico para FL/P. O IRF6 é expresso no epitélio medial dos processos palatinos durante o processo de fusão do palato secundário, nos germens dentários, folículos capilares, e pele de camundongos (**KONDO et al.**, 2002). **INGRAHAM et al.**, 2006, relataram que camundongos que não expressam o gene IRF6 apresentam defeitos no desenvolvimento craniofacial, pele e membros, e são caracterizados também pela presença de fissura palatina, a qual parece ser causada primariamente por defeitos na elevação dos processos palatinos, ou por distúrbios durante o desenvolvimento craniofacial devido à ação constritora da pele ou tecidos orais.

2.9 Cromossomo 6q

Estudos sobre a organização do genoma humano (**SABETI et al.**, 2002) têm demonstrado que este contém longos segmentos apresentando alto desequilíbrio de ligação e diversidade de haplótipos limitada, sugerindo que o uso de informações sobre haplótipos é potencialmente útil para os estudos de associação. O termo “desequilíbrio de ligação” significa associação de alelos. Quando dois alelos em loci distintos são transmitidos aos gametas mais freqüentemente do que o esperado, e uma vez que as freqüências dos alelos e a fração de recombinação entre os dois loci são conhecidas, os alelos são considerados em desequilíbrio de ligação um com o outro. Evidências de desequilíbrio de ligação podem ser úteis no mapeamento de genes responsáveis por doenças complexas uma vez que sugerem que os dois loci em desequilíbrio de ligação podem estar localizados próximos uns dos outros.

VIELAND, 1998, descreveu um método para medir a probabilidade de se ter encontrado um resultado de ligação verdadeiro, através da interpretação das evidências a favor ou contra estes resultados independente da quantidade de evidências disponíveis. **GOVIL et al.**, 2006, utilizaram este método na avaliação de estudos de ligação de FL/P e apontaram uma região de 14cM no cromossomo 6q como apresentando aproximadamente 90% de chance de conter um gene associado a FL/P. Adicionalmente, análises recentes sugeriram resultados intrigantes para regiões nos

cromossomos 6q e 9q em associação com tipos específicos de fissura, e um gene (DDO) no cromossomo 6q se mostrou associado à FL/P (**MARAZITA et al.**, 2006).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Com base nos fatos expostos nas seções anteriores, o objetivo deste estudo foi:

1. Analisar os tipos de FL/P e das anomalias dentárias encontradas na população estudada;
2. Verificar a existência de associação entre polimorfismos nos genes *MMP1*, *MMP3*, *MMP9*, *IRF6* e *TGFA*, com a FL/P e seus subfenótipos;
3. Verificar a existência de associação entre polimorfismos situados no cromossomo 6q com a FL/P e seus subfenótipos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 População estudada

Quinhentos (500) pacientes portadores de FL/P isolada em tratamento no Setor Odontológico do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC/USP) e quinhentos (500) indivíduos sem FL/P e sem história positiva familiar foram utilizados neste estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Reabilitação e Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde do Brasil (CONEP) (Anexo 1). Os indivíduos foram incluídos no estudo após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

4.2 MÉTODO

4.2.1 Definição do fenótipo

Todos os indivíduos foram analisados clinicamente e/ou através de fichas clínicas e exames radiográficos para os seguintes parâmetros: presença de fissura (FL, FLP ou FP), extensão (completa ou incompleta) e lado da fissura (direito, esquerdo, bilateral, e central), presença de anomalias dentárias (agenesia, microdontia, dente supranumerário, lateroversão ou giroversão, retenção, anomalias de forma e transposição). A presença de múltiplas anomalias dentárias foi registrada na ocasião de um mesmo indivíduo apresentar duas ou mais anomalias distintas. Para cada anomalia, o critério de inclusão foi a presença de pelo menos um dente permanente afetado. As anomalias presentes nas áreas de fissura não foram consideradas por serem conseqüências de alterações de desenvolvimento naquela região. Indivíduos cujo tipo e/ou lado da fissura não puderam ser determinados através de exame clínico ou através

das fichas clínicas foram considerados como apresentando “tipo/lado de fissura desconhecido”.

Adicionalmente, para cada indivíduo, as seguintes informações demográficas foram registradas: história familiar positiva para FL/P, idade, profissão e residência (localização geográfica) dos pais na época da gestação, história de tabagismo materno, uso de substâncias alcoólicas e/ou teratogênicas durante a gestação.

Todos os dados foram registrados em uma ficha individual para cada paciente e então transferidos para uma base de dados.

4.2.2 Coleta de material biológico

Amostras de saliva foram coletadas de todos os indivíduos como fonte de DNA genômico seguindo protocolos previamente publicados (**TREVILLATO; LINE, 2000**). Em resumo, os indivíduos realizaram um bochecho com 5mL de solução de dextrose a 5% durante 1 minuto, após o qual todo o volume do bochecho foi acondicionado em tubos para centrífuga de 15 mL (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Cada tubo contendo saliva foi então centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos para sedimentação do *pellet* de células. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* transferido para um tubo *ependorf* de 1,5mL (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) contendo 1mL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM, pH 7.8; EDTA 5mM; SDS 0.5%) e congelado a -20° C até o momento da extração do DNA.

4.2.3 Extração do DNA

Previamente à extração do DNA, as amostras foram descongeladas e incubadas com 100ng/mL Proteinase K (Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) em banho-maria a 56° C *overnight* e então submetidas a processos de precipitação utilizando-se solução de acetato de amônio a 10M e purificação com etanol/isopropanol (Anexo 4). A concentração do DNA foi estimada através de medições de OD 260 (**MANIATIS, 1989**).

4.2.4 Seleção dos genes candidatos e polimorfismos genéticos de um único nucleotídeo (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*)

Para este estudo foram selecionados os SNPs que se classificassem, de preferência, como: 1) potencialmente funcionais por alterarem a seqüência de aminoácidos da proteína final, por ocorrerem próximo à região promotora do gene e potencialmente influenciarem a expressão gênica, ou ainda os que demonstraram alterar a função ou expressão do gene, e 2) SNPs em desequilíbrio de ligação com outros SNPs em regiões de um gene candidato. **CARLSON et al.**, 2004, descreveram uma abordagem para seleção do mínimo de SNPs representando ao máximo a estrutura de desequilíbrio de ligação de determinada região. Os dados do International HapMap Project (**THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM**, 2003) foram utilizados para auxiliar na seleção dos SNPs. A distribuição dos haplótipos e a estrutura dos genes foram identificadas para otimizar a cobertura da região a ser estudada e para se selecionar os SNPs mais informativos.

Devido aos dados do HapMap Project serem derivados de populações de não-brasileiros, os genótipos gerados no nosso estudo servirão para uma primeira análise dos haplótipos na nossa população, o que, certamente, poderá beneficiar futuros estudos.

4.2.5 Genotipagem

As amostras de DNA genômico foram inicialmente amplificadas através da reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (**SAIKI et al.**, 1985) utilizada em três tecnologias distintas. As reações de PCR convencional (MMP1, MMP3 e MMP9) foram realizadas em volume total de 25µL, contendo 50ng de DNA genômico/reação, 10mM de tampão de reação (Tris-HCl pH 8.3), 1µM de cada *primer*, 200mM dNTPs, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) em um aparelho GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA). As reações de PCR cinético (TGFA C3827T e C3296T) foram realizadas em um seqüenciador automático (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em volume total de 3µL contendo 2ng DNA/reação, 1,8µL de SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster

City, CA, EUA) e 0,1µL de cada *primer* (IDT Technologies, Coralville, IA, EUA). As reações de PCR pelo método Taqman (**RANADE et al.**, 2001) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foram realizadas em um seqüenciador automático (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em volume total de 3µL contendo 2ng DNA/reação, 1,5µL de Taqman PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,425µL de água deionizada estéril.

Informações adicionais com relação a genotipagem dos indivíduos para cada polimorfismo estudado seguem em detalhes.

4.2.5.1 MMP1 (-1607 1G/2G)

A região incluindo a posição -1607 no promotor do gene MMP1 (Figura 1) foi amplificada através da técnica de PCR conforme o item 4.2.5. A sequência dos *primers* e as condições de PCR utilizadas para MMP1 estão listadas no Quadro 1.

Figura 1. Estrutura do gene MMP1 (11q22.2). Caixas verdes representam regiões codificadoras, barras pretas representam íntrons, caixas amarelas representam regiões não-traduzidas. A seta azul indica a localização do polimorfismo estudado (-1607 1G/2G).

Quadro 1. Condições experimentais para o polimorfismo -1607 1G/2G no gene MMP1.

	MMP1 (-1607 1G/2G)
Primer <i>forward</i>	5' TCGTGAGAATGTCTTCCCAT 3'
Primer <i>reverse</i>	5' TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC 3'
Condições de PCR	95°C por 1 min (1 ciclo), 35 ciclos: 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, extensão final a 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação inicial, os genótipos foram obtidos através de digestão enzimática (RFLP - *Restriction-Fragment Length Polymorphism*) realizada em volume total de 10µL/reação, contendo 5µL do produto de PCR e 5µL de uma solução contendo 2µL de tampão NE 10X (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl₂, 1mM ditiotretol pH 7.9), 0,2µL *Xmn*I (20 unidades/mL) (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EUA), 0,3µL de albumina e 2,5µL de água deionizada estéril, sob incubação a 37° C *overnight*. Dois erros foram introduzidos no *primer reverse* anelado na proximidade do polimorfismo (DUNLEAVEY et al., 2000) criando uma sequência de reconhecimento (5'-GAANNNTTC-3') para a enzima de restrição *Xmn*I quando a amostra contém o alelo 1G (mas não o 2G) no local do polimorfismo. Assim, a enzima digere o alelo 1G, criando dois fragmentos de 89 pb e 29 pb. O conteúdo digerido foi adicionado a 1µL de tampão de corrida (Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) e analisado em gel de eletroforese não-denaturante a 10% (Anexo 6), corado pela técnica de impregnação pela prata (SANGUINETTI et al., 1994) (Anexo 7). Um padrão de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado como referência em todos os géis para identificação apropriada dos produtos (Figura 2).

Figura 2. Polimorfismo -1607 1G/2G na região promotora do gene MMP1.

4.2.5.2 MMP3 (-1171 5A/6A)

A região incluindo a posição -1171 no promotor do gene MMP3 (Figura 3) foi amplificada através da técnica de PCR conforme o item 4.2.5, utilizando dois primers *forward* alelo-específicos e um único primer *reverse*. Dois primers *forward* alelo-específicos e um único primer *reverse* foram utilizados. Um dos primers *forward* amplifica um fragmento de 95 pb relativo ao alelo 5A e o outro amplifica um fragmento de 92 pb relativo ao alelo 6A (Figura 4). A sequência dos primers e as condições de PCR utilizadas para MMP3 estão listadas no Quadro 2.

Figura 3. Estrutura do gene MMP3 (11q22.3). Caixas verdes representam regiões codificadoras, barras pretas representam íntrons. A seta azul indica a localização do polimorfismo estudado (-1171 5A/6A).

Quadro 2. Condições experimentais para o polimorfismo -1171 5A/6A no gene MMP3.

	MMP3 (-1171 5A/6A)
Primer <i>forward</i> (alelo 5A)	5' GACAAGACATGGTTTTTC 3'
Primer <i>forward</i> (alelo 6A)	5' AAGACATGGTTTTTT 3'
Primer <i>reverse</i>	5' AGACATGGGTCACGG 3'
Condições de PCR	95°C por 3 minutos (1 ciclo), 35 ciclos: 95°C por 1 minuto, 41°C (alelo 6A) por 1 minuto ou 44°C (alelo 5A) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados em cada reação foram adicionados a 1µL de tampão de corrida (Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) e analisados em gel de eletroforese não-denaturante a 10%, corado pela técnica de impregnação pela prata (SANGUINETTI et al., 1994). Para um mesmo paciente, os produtos amplificados foram aplicados no gel, com a primeira fileira destinada à reação contendo o primer específico para o alelo 5A e a segunda contendo a reação para o alelo 6A. Assim, indivíduos apresentando genótipo 5A/5A apresentavam uma banda para o alelo 5A somente e nenhuma banda na fileira seguinte, contendo a reação para o alelo 6A. Indivíduos com genótipo 6A/6A apresentam banda somente na fileira contendo a reação para o alelo 6A. Indivíduos heterozigotos apresentam ambas as bandas. Um padrão de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado como referência em todos os géis para identificação apropriada dos produtos (Figura 4).

Figura 4. Polimorfismo -1171 5A/6A na região promotora do gene MMP3.

4.2.5.3 MMP9 (-1562 C/T)

A região incluindo a posição -1562 no promotor do gene MMP9 (Figura 5) foi amplificada através da técnica de PCR conforme o item 4.2.5. Os indivíduos foram genotipados através da técnica de RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A sequência dos *primers* e as condições de PCR utilizadas para MMP9 estão listadas no Quadro 3.

Figura 5. Estrutura do gene MMP9 (20q13.12). Caixas verdes representam regiões codificadoras, barras pretas representam íntrons. A seta azul indica a localização do polimorfismo estudado (-1562 C/T).

Após a amplificação inicial, os genótipos foram obtidos através de digestão enzimática (RFLP - *Restriction-Fragment Length Polymorphism*) realizada em volume total de 10µL/reação, contendo 2µL do produto de PCR e 8µL de uma solução contendo 1µL 10X tampão NE, 0,3µL *Sph I* (20 unidades/ml) (New England Biolabs, MA) e 6,7µL de água deionizada estéril a 37° C *overnight*. A enzima de restrição *SphI* reconhece e cliva a sequência 5'-GCATGC-3'. Como o alelo C não possui sítio de ligação para a *SphI*, ele não é digerido e pode ser identificado pela visualização de um fragmento de 435 pb. Já o alelo T é clivado pela enzima, criando dois fragmentos, de 247 pb e 188 pb. O conteúdo digerido foi adicionado a 1µL de tampão de corrida (Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) e analisado em gel de eletroforese não-denaturante a 10%, corado pela técnica de impregnação pela prata (SANGUINETTI et al., 1994). Um padrão de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado como referência em todos os géis para identificação apropriada dos produtos (Figura 6).

Quadro 3. Condições experimentais para o polimorfismo -1562C/T no gene MMP9.

	MMP9 (-1562 C/T)
Primer <i>forward</i>	5'GCCTGGCACATAGTAGGCCC 3'
Primer <i>reverse</i>	5'CTTCCTAGCCAGCCGGCATC 3'
Condições de PCR	95° C por 3 minutos (1 ciclo), 35 ciclos: 95° C por 1 minuto, 65° C por 45 segundos, 72° C por 45 segundos, extensão final a 72° C por 7 minutos.

Figura 6. Polimorfismo -1562C/T na região promotora do gene MMP9.

4.2.5.4 TGFA (*Transforming Growth Factor Alpha*)

Seis polimorfismos no gene TGFA foram estudados (Quadro 4) (Figura 7). Os polimorfismos foram selecionados a partir de resultados de estudos prévios (**SHI et al.**, 2004, **VIEIRA et al.**, 2004, **CALLAHAN et al.**, 2007), e os genótipos obtidos pelo método Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Quadro 4) (Figura 8) e através de PCR cinético (Figuras 9 e 10), previamente descritos no item 4.2.5. A sequência dos *primers* e as condições de PCR cinético utilizadas estão listadas nos Quadros 5-7.

Figura 7. Esquema da estrutura do gene TGFA. Caixas verdes representam regiões codificadoras, barras pretas representam íntrons, caixas amarelas representam regiões não-traduzidas. As setas azuis indicam a localização dos polimorfismos estudados (da esquerda para a direita): rs377122, rs2902345, rs1523305, rs930655, C3296T (rs2166975) e C3827T (rs1058213).

Quadro 4. SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de base dos polimorfismos estudados no gene TGFA.

SNP	Posição*	Gene	Região	Troca de base
rs1058213	70,589,118	TGFA	3'UTR	CT
rs2166975	70,589,649	TGFA	Exon 6	CT
rs930655	70,596,106	TGFA	Intron	AG
rs1523305	70,610,511	TGFA	Intron	CT
rs2902345	70,628,254	TGFA	Intron	CT
rs377122	70,678,680	TGFA	Intron	CT

* de acordo com o website <http://genome.ucsc.edu>, dados de 2004.

Figura 8. Resultados obtidos pelo método Taqman (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para o marcador rs377122 no gene TGFA. Indivíduos homozigotos para cada alelo são representados pelas cores vermelha e azul, e indivíduos heterozigotos são representados pela cor verde.

Quadro 5. Condições experimentais para o polimorfismo C3296T no gene TGFA.

	TGFA C3296T
<i>Primer forward</i>	5'CTTATTTTCCCAACGTGGCC 3'
<i>Primer C reverse</i> (alelo comum)	5'CTCCTCTGGGCTCTTCTG 3'
<i>Primer T reverse</i> (alelo raro)	5'TCCTCCTCTGGGCTCTTCTA 3'
Condições de PCR	95° C por 10 min (1 ciclo) 95° C por 15 seg, 56° C por 40 seg (55 ciclos)

Quadro 6. Condições experimentais para o polimorfismo C3827T no gene TGFA.

	TGFA C3827T
<i>Primer C forward</i> (alelo comum)	5'AGAAGGTGTATCCTCTAACCACGAGAAC 3'
<i>Primer T forward</i> (alelo raro)	5'GAGAAGCTGTATCCTCTAACCACGAGAAT 3'
<i>Primer reverse</i>	5'GGATGGTCTTCAATGTCATG 3'
Condições de PCR	95° C por 10 min (1 ciclo) 95° C por 15 seg, 56° C por 40 seg (55 ciclos)

Figura 9. Exemplo de indivíduo homozigoto analisado pelo método de PCR cinético (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Figura 10. Exemplo de indivíduo heterozigoto analisado pelo método de PCR cinético (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

4.2.5.5 IRF6

Seis polimorfismos previamente descritos no gene IRF6 foram estudados (Quadro 8). Os indivíduos foram genotipados utilizando-se o método Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme descrito no item 4.2.5. A escolha dos polimorfismos foi baseada em resultados de estudos anteriores (ZUCCHERO et al., 2004; VIEIRA et al., 2007) (Figura 11).

Figura 11. Esquema da estrutura do gene IRF6. Caixas verdes representam regiões codificadoras, barras pretas representam íntrons, caixas amarelas representam regiões não-traduzidas. As setas azuis indicam a localização dos polimorfismos estudados (da esquerda para a direita): rs658860, rs2073487, rs861019, rs2013162, rs2235371 (V274I), e rs4844880.

Quadro 7. SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de base dos polimorfismos estudados no gene IRF6.

SNP	Posição*	Gene	Região	Troca de base
rs4844880	207,937,289	HSD11B1**	intron	AT
rs2235371	208,030,453	IRF6	exon	CT
rs2013162	208,035,057	IRF6	exon	AC
rs861019	208,041,759	IRF6	exon	AG
rs2073487	208,043,019	IRF6	intron	CT
rs658860	208,056,922	----	----	CT

* de acordo com o website <http://genome.ucsc.edu>, dados de 2004.

** HSD11B1, hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1

4.2.5.6 Cromossomo 6q

Tomando como base a região de 14cM apontada como apresentando 90% de chance de conter um gene associado a FL/P isolada (GOVIL et al., 2006), quinze polimorfismos foram selecionados a partir de dados do International HapMap Project (THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2003) e visualizados através do software Haploview, levando em consideração a distribuição dos haplótipos e a estrutura dos genes visando uma ótima cobertura da região a ser estudada e poder selecionar os SNPs mais informativos (Figura 12) (Quadro 9).

Figura 12. Gráfico de desequilíbrio de ligação ilustrando a região estudada no cromossomo 6q. Os polimorfismos estudados estão situados na posição específica do segmento do cromossomo que ocupam (setas pretas), e estão distribuídos por 4 genes localizados na região estudada (chaves). A relação entre dois polimorfismos é representada pela intersecção entre dois quadrados e pode apresentar cores (ou intensidade de cor) variadas baseada no valor obtido para a relação. Vermelho indica $D' = 1$ e $\text{LOD} \geq 2$. Azul indica $D' = 1$ e $\text{LOD} < 2$. Tons de vermelho/rosa indicam $D' < 1$ e $\text{LOD} \geq 2$. Branco indica $D' < 1$ e $\text{LOD} < 2$.

Quadro 8. SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de base dos polimorfismos estudados no cromossomo 6q.

SNP	Posição	Gene	Região	Troca de base
rs10943944	84,268,655	PRSS35§	intron	CT
rs7753918	84,273,887	PRSS35	intron	AG
rs1171114	84,284,365	PRSS35	intron	CT
rs512140	84,287,372	PRSS35	intron	AG
rs1171105	84,297,584	PRSS35	5' UTR	TC
rs2023238	84,339,480	SNAP91†	intron	AG
rs3798867	84,388,560	SNAP91	intron	CG
rs217325	84,407,373	SNAP91	exon	CG
rs217290	84,455,284	SNAP91	intron	CT
rs217308	84,426,588	SNAP91	intron	CT
rs624076	84,476,512	401268	exon	AG
rs614565	84,498,645	----	----	CT
rs1325474	84,596,144	----	----	AG
rs6940766	84,672,046	CYB5R4‡	intron	AG
rs1325469	84,705,856	CYB5R4	limite intron/exon	AG

* de acordo com o website <http://genome.ucsc.edu>, dados de 2004.

§PRSS35, serine-protease 35.

†SNAP91, synaptosomal associated protein

‡CYB5R4, cytochrome b5 reductase-4

4.2.6 Análise dos Dados

4.2.6.1 Definição do Fenótipo

Diferenças nas frequências observadas para cada tipo de anomalia dentária nos casos e controles foram acessadas através do teste Qui-quadrado, com nível de significância de 95% ($p \leq 0.05$). O risco estimado (*odds ratio*) também foi calculado, com intervalo de confiança de 95%. Além disso, as diferenças entre as frequências de anomalias observadas para cada subfenótipo de FL/P e controles foram acessadas através dos testes Qui-quadrado e correção de Bonferroni. Nesse caso, foram considerados o número de testes (23) e o número de variáveis (8) (0,05/176 análises, $p \leq 0.0002$ indica diferença estatística significativa).

4.2.6.2 Associação de polimorfismos genéticos e subfenótipos de FL/P

As frequências dos genótipos e alelos obtidos para cada SNP foram testadas com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg através da equação: $(p^2 + 2pq + q^2 = 1)$, onde p e q representam a frequência observada para cada alelo.

Para os estudos com os genes MMP1, MMP3 e MMP9, devido ao menor número de amostras disponíveis no período em que estes estudos foram realizados, as diferenças observadas para a frequência dos genótipos e alelos de cada SNP entre casos e controles foi analisada estatisticamente através do teste Qui-quadrado com nível de significância de 95% ($p \leq 0.05$). O risco estimado (*odds ratio*) também foi calculado, com intervalo de confiança de 95%.

Para os demais estudos (TGFA, IRF6, cromossomo 6q), as diferenças nas frequências dos genótipos e alelos de cada SNP entre cada subfenótipo de FL/P e controles (com e sem anomalias dentárias) foram analisadas estatisticamente através do teste Qui-quadrado com Correção de Bonferroni. Nesse caso, foram considerados o número de testes (27) e o número de variáveis (35) (0,05/945 análises, $p \leq 0.00005$ indica diferença estatística significante).

4.2.6.3 Análise de desequilíbrio de ligação dos polimorfismos estudados

O padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos testados foi calculado utilizando-se o programa GOLD (Graphical Overview of Linkage Disequilibrium) (ABECASIS; COOKSON, 2000).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Definição do Fenótipo

5.1.1 Caracterização da amostra

As características demográficas observadas para a população estudada encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Características observadas para a população estudada.

Características	Casos (n=500)	Controles (n=500)	P value
Idade*	17,1 ± 8,8	36,4 ± 19,7	0,000001‡
Mulheres	198	337	0,00001***
Homens	302	163	
Caucasianos**	406	291	0,00001***
Negros	80	38	
Japoneses	9	167	
Etnia desconhecida	5	4	

* Idade média ± desvio padrão, em anos.

‡ Teste t de Student; $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

*** Qui-quadrado com 1 grau de liberdade; $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa.

5.1.2 Tipos de Fissura

Dos 500 indivíduos com FL/P, 400 apresentavam fissura labial e palatina (168 com fissura labial esquerda, 76 com fissura labial direita, e 54 com fissura bilateral), 6 indivíduos apresentavam fissura labial somente (2 no lado direito e 4 no lado esquerdo), 66 indivíduos apresentavam fissura palatina, e 28 apresentavam fissuras cujo tipo ou lado não puderam ser determinados. Devido ao fato de somente 6 indivíduos apresentarem FL, estes foram incluídos no grupo FL/P para posterior análise.

5.1.3 Presença de Anomalias Dentárias

Os indivíduos fissurados apresentaram um número consideravelmente maior de anomalias dentárias fora da área de fissura quando comparados aos indivíduos controles ($p=0,00001$). As frequências observadas para cada tipo de anomalia entre casos e controles estão listadas na Tabela 2. A presença de agenesia dentária, microdontia, dentes supranumerários, anomalias de forma, transposição, e ainda de múltiplas anomalias foi consistentemente mais frequente nos indivíduos fissurados. A retenção de dentes permanentes também mostrou uma tendência a ser mais frequente nestes indivíduos (Tabela 2).

A agenesia dentária foi à anomalia mais frequente em ambos os grupos. Excluindo-se os terceiros molares que apresentaram a maior frequência de agenesia em ambos indivíduos fissurados (179/352; $p=0,00001$) e controles (34/62; $p=0,00001$), os pré-molares foram os dentes mais comumente ausentes em indivíduos fissurados (108/352; $p=0,002$) sem diferenças significativas com relação ao tipo de fissura apresentada, enquanto indivíduos controles apresentaram maior incidência de agenesia dos incisivos laterais superiores (13/62; $p=0,0491$).

Tabela 2. Diferenças observadas para as frequências de anomalias dentárias em casos e controles.

Tipo de Anomalia	Casos (n=500)	Controles (n=500)	P*	Odds ratio (95% IC)**
Agenesia	131	36	0,00001	4,5757 (3,08-6,78)
Microdontia	9	1	0,006	9,14 (1,15-72,47)
Supranumerário	22	1	0,00001	22,96 (3,08-171,05)
Giroversão/Lateroversão	47	2	0,00001	25,83 (6,23-106,96)
Retenção	6	1	0,06	6,06 (0,72-50,52)
Anomalia de forma	2	0	0,08	---
Transposição	7	0	0,001	---
Múltiplas anomalias	23	1	0,00001	24,06 (3,23-178,87)
Total	247	42	0,00001	10,64 (7,41-15,28)

* Qui-quadrado com 1 grau de liberdade; $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa.

** IC, intervalo de confiança.

5.1.4 Anomalias Dentárias como Subfenótipos Adicionais para FL/P

Os indivíduos fissurados apresentaram 18 subfenótipos diferentes de fissura, baseados nas observações sobre lado e extensão da fissura, e estão listados na Tabela 3 juntamente com a frequência das anomalias dentárias observadas nos indivíduos compondo cada subfenótipo e nos indivíduos controles. As diferenças entre as frequências das anomalias dentárias apresentadas por indivíduos compondo cada subfenótipo de FL/P e controles encontram-se no Anexo 6.

A Tabela 4 mostra a distribuição das quatro anomalias dentárias mais frequentes (agenesia, microdontia, presença de dente supranumerário e giroversão/lateroversão), de acordo com o lado da fissura em indivíduos com FL/P. Foi possível observar que as anomalias são mais frequentes no lado oposto da fissura: agenesia do lado esquerdo em indivíduos com fissura unilateral direita, agenesia do lado direito em indivíduos com fissura unilateral esquerda, e presença de dentes supranumerários do lado direito em indivíduos com fissura unilateral esquerda. A presença de microdontia do lado direito também mostrou uma tendência a ser mais frequente em indivíduos com fissura unilateral esquerda (Tabela 4).

A agenesia do incisivo lateral superior esquerdo mostrou-se associada à fissura unilateral direita (12/78; $p=0,007$) e, ao contrário, a agenesia do incisivo lateral superior direito mostrou-se associada à fissura unilateral esquerda (15/172; $p=0,00001$).

Alterações na orientação normal dos dentes, como giroversão e lateroversão, foram características comuns nos indivíduos fissurados e mostraram-se associados a diversos subfenótipos de FL/P (Tabela 3). Os caninos inferiores foram os dentes mais afetados (39/47; $p=0,00001$) e frequentemente associados a FL/P bilateral (Tabela 3).

A retenção de dentes permanentes mostrou associação preferencial com FP completa; a transposição dentária mostrou associação com FL/P bilateral completa e FL/P unilateral incompleta esquerda (Tabela 3).

A presença de múltiplas anomalias foi mais frequente em indivíduos apresentando FL/P unilateral esquerda completa e incompleta. Dos 23 casos apresentando múltiplas anomalias, 20 apresentaram agenesia dentária junto a outras anomalias. As combinações mais frequentes foram agenesia e giroversão/lateroversão (11/20) e agenesia e dentes supranumerários (8/20). A combinação de agenesia e

microdontia foi observada em um indivíduo apenas, com FL/P unilateral direita completa.

Tabela 3. Distribuição das anomalias dentárias nos indivíduos fissurados (divididos de acordo com os subfenótipos apresentados) e controles.

Subfenótipos	Nº de indivíduos	Agnesia	Microdontia	Supranumerário	Giro/lateroversão	Retenção	Anomalia de forma	Transposição	Múltiplas anomalias	Total de anomalias
Fissura Palatina										
Completa	21	4	0	0	0	2	0	0	2	8
Incompleta + submucosa	45	10	0	1	4	0	1	0	0	16
Total	66	14	0	1	4	2	1	0	2	24
Fissura Labio-Palatina										
Completa	300	90	7	16	30	3	0	5	17	168
Incompleta	104	23	1	4	12	1	0	2	3	46
Unilateral	250	71	6	16	27	3	0	3	16	142
Completa	175	57	5	14	19	2	0	1	13	111
Incompleta	75	14	1	2	8	1	0	2	3	31
Direita	78	28	2	3	9	1	0	0	2	45
Completa	54	23	2	3	6	0	0	0	2	36
Incompleta	16	3	0	0	3	0	0	0	0	6
Incompleta + FP	8	1	0	0	1	0	0	0	0	2
Esquerda	172	43	4	13	18	2	0	3	14	97
Completa	121	34	3	11	13	2	0	1	11	75
Incompleta	46	9	1	2	5	0	0	2	3	22
Incompleta + FP	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilateral	154	42	2	4	15	1	0	4	4	72
Completa	125	33	2	2	11	1	0	4	4	57
Incompleta	8	1	0	1	1	0	0	0	0	3
Incompleta + FP	17	7	0	1	3	0	0	0	0	11
Incompleta mista	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1
FL direita + FLP	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Esquerda										
FL esquerda + FP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bilateral										
Fissura mediana	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	406	113	8	20	42	4	0	7	20	214
Fissura com tipo/lado desconhecido	28	4	1	1	1	0	1	0	1	9
Total Fissurados	500	131	9	22	47	6	2	7	23	247
Controles	500	36	1	1	2	1	0	0	1	42

* Análise comparativa entre casos e controles. Indivíduos apresentando fissuras na linha média (mediana) e cujo tipo e/ou lado não puderam ser diagnosticados não foram incluídos na análise.

** Os números em negrito indicam diferença estatística significativa entre casos e controles ($p \leq 0,0002$).

Tabela 4. Número de anomalias dentárias observadas em indivíduos fissurados, de acordo com o lado da anomalia e lado da fissura.

Anomalia	Lado da anomalia	Lado da fissura				P*
		Direito (n=78)	Esquerdo (n=172)	Bilateral (n=154)	Central (n=66)	
Agenesia	Direito	5	16	2	2	0,01
	Esquerdo	8	6	5	0	0,01
	Bilateral	13	18	34	12	0,04
	Desconhecido	2	3	1	0	0,31
Microdontia	Direito	0	3	0	0	0,06
	Esquerdo	2	1	1	0	0,29
	Bilateral	0	0	1	0	0,43
	Desconhecido	0	0	0	0	---
Supranumerário	Direito	0	4	0	0	0,02
	Esquerdo	2	3	0	1	0,15
	Bilateral	0	0	0	0	---
	Desconhecido	1	6	4	0	0,20
Giroversão/ Lateroversão	Direito	3	11	6	1	0,38
	Esquerdo	4	3	2	2	0,28
	Bilateral	2	2	6	0	0,10
	Desconhecido	0	2	1	1	0,58

* Qui-quadrado com 3 graus de liberdade; $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa (em negrito).

5.2 Novos Subfenótipos Propostos

Os resultados expostos na Tabela 3 demonstram a associação preferencial de determinados subfenótipos de FL/P com certos tipos de anomalias dentárias, e a partir destes, 12 novos subfenótipos de FL/P foram propostos com base nas anomalias apresentadas, (Quadro 1) e incluídos nas análises moleculares.

Quadro 9. Lista de subfenótipos utilizados em estudos genéticos e os subfenótipos adicionais propostos baseados no desenvolvimento dental.

Subfenótipos utilizados em estudos genéticos recentes *	Subfenótipos propostos baseados no desenvolvimento dental
<ul style="list-style-type: none"> - Todas as fissuras - Fissura Labial e/ou Palatina (FL/P) (todos lábios) - Fissura Labial somente (FL) - Fissura Labial e Palatina (FLP) (lábio e palato) - Fissura Labial e/ou Palatina (FL/P) (todos palatos) - Fissura Palatina somente (FP) 	<ul style="list-style-type: none"> - Fissura Labial e/ou Palatina (FL/P) <ul style="list-style-type: none"> - unilateral direita com/sem agenesia fora da região de fissura - unilateral esquerda <ul style="list-style-type: none"> - com/sem agenesia fora da região de fissura - com/sem microdontia ou supranumerário no lado oposto da fissura - com/sem múltiplas anomalias - bilateral <ul style="list-style-type: none"> - com/sem agenesia fora da região de fissura - com/sem dente supranumerário no lado oposto da fissura - com/sem múltiplas anomalias - bilateral frustro (FL/P unilateral com agenesia do incisivo lateral superior oposto) <ul style="list-style-type: none"> - com/sem múltiplas anomalias - Fissura Palatina somente (FP) <ul style="list-style-type: none"> - com/sem agenesia fora da região de fissura - completa <ul style="list-style-type: none"> - com/sem retenção de dentes permanentes - com/sem múltiplas anomalias - incompleta com/sem giroversão/lateroversão

* VIEIRA et al. 2003; VIEIRA et al. 2005; AVILA et al. 2006; WARRINGTON et al. 2006.

5.3 Estudos genéticos de associação com a FL/P

Diferentes análises comparativas foram realizadas neste estudo. Os estudos de associação de polimorfismos nos genes MMP1, MMP3, e MMP9, e FL/P foram analisados comparando-se as frequências obtidas para casos e controles somente, devido ao menor número de indivíduos compondo a amostra no período em que os experimentos foram realizados. As características da amostra referentes a cada estudo estão listadas nas respectivas tabelas.

Para os demais polimorfismos (TGFA, IRF6 e cromossomo 6q), foram realizadas análises comparativas entre casos e controles, e entre subfenótipos de casos e controles, com e sem anomalias dentárias, utilizando-se a amostra total. O número de indivíduos compondo cada grupo da amostra encontra-se detalhado nas respectivas tabelas. As frequências obtidas para genótipos e alelos referentes a cada polimorfismo estudado encontram-se no Apêndice 7.

A distribuição dos alelos para todos os polimorfismos estudados em casos e controles estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.3.1 MMP1 (-1607 1G/2G)

As características da população estudada para o gene MMP1 estão listadas na Tabela 5.

Não houve diferença estatística significativa comparando-se as frequências dos genótipos e dos alelos entre casos e controles e entre subfenótipos de casos e controles, utilizando todos os indivíduos ou somente indivíduos caucasianos para as análises (Tabelas 6 e 7).

Tabela 5. Características da população estudada para o gene MMP1.

Características	MMP1		
	FL/P (n=170)	Controles (n=225)	P ***
Idade*	17,1 ± 9,1	38,1 ± 13	0,000001‡
Homens	89	86	0,005
Mulheres	81	139	
Caucasianos**	131	193	0,1919
Japoneses	32	60	
Negros	3	2	
Etnia desconhecida	4	0	

* Idade média ± desvio padrão, em anos.

‡ Teste t de Student; p ≤ 0,05 indica diferença estatística significativa.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

*** Qui-quadrado com 1 grau de liberdade; p ≤ 0,05 indica diferença estatística significativa.

Tabela 6. Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1607 1G/2G no gene MMP1 em casos e controles, na população total e em caucasianos.

	Todos os indivíduos				Caucasianos			
	FL/P (n=170)	Controle (n=255)	P*	OR (IC)**	FL/P (n=131)	Controle (n=193)	P*	OR (IC)**
Alelo								
1G	133	196	0,21	1,2 (0,9-1,6)	106	171	0,33	0,85 (0,62-1,2)
2G	207	254			156	215		
Genótipo								
1G/1G	29	46	0,47	0,92 (0,6-1,4)	28	42	0,36	0,88 (0,6-1,3)
1G/2G	75	104			50	87		
2G/2G	66	75			53	64		

* Qui-quadrado com 1 e 2 graus de liberdade (para alelo e genótipo, respectivamente); p ≤ 0,05 indica diferença estatística significativa.

** OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança, 95%.

Tabela 7. Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1607 1G/2G no gene MMP1 em indivíduos com FL/P e FP, na população total e em caucasianos.

	Todos os indivíduos (n=170)		Caucasianos somente (n=131)	
	FL/P (n=139)	FP (n=24)	FL/P (n=110)	FP (n=19)
<i>Alelo</i>				
1G	107	21	79	18
2G	171	27	133	20
P**	0,18	0,98	0,09	0,72
<i>Genótipo</i>				
1G/1G	25	4	21	4
1G/2G	57	13	37	10
2G/2G	57	7	48	5
P**	0,33	0,75	0,10	0,79

*Tipo/lado desconhecido, para todos os indivíduos, n=7; caucasianos somente, n=4.

** Comparados com indivíduos controles. Qui-quadrado com 1 e 2 graus de liberdade (para alelo e genótipo, respectivamente); $p \leq 0,05$ indica diferença estatística.

5.3.2 MMP3

As características da população estudada para o gene MMP3 estão listadas na Tabela 8.

Diferenças estatísticas significativas foram observadas comparando-se as frequências dos genótipos e dos alelos entre casos e controles e entre subfenótipos de casos e controles, utilizando todos os indivíduos ou somente indivíduos caucasianos para as análises (Tabelas 9 e 10).

Tabela 8. Características da população estudada para o gene MMP3.

Características	MMP3		
	FL/P (n=78)	Controles (n=255)	P
Idade*	17,7 ± 10,2	36,2 ± 13	0,000001‡
Homens	40	96	0,03***
Mulheres	38	159	
Caucasianos**	64	219	0,6694***
Japoneses	11	29	
Negros	2	4	
Etnia desconhecida	1	3	

* Idade média ± desvio padrão, em anos.

‡ Teste t de Student; $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

*** Qui-quadrado com 1 grau de liberdade; $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa.

Tabela 9. Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1171 5A/6A no gene MMP3 em casos e controles na população total e em caucasianos.

	Todos os indivíduos				Caucasianos			
	FL/P (n=78)	Controle (n=255)	P*	OR (IC)**	FL/P (n=64)	Controle (n=219)	P*	OR (IC)**
<i>Alelo</i>								
5A	110	251	0,00001	2,5 (1,7-3,6)	92	225	0,00001	2,4 (1,6-3,7)
6A	46	259			36	213		
<i>Genótipo</i>								
5A/5A	35	65	0,00001	2,37 (1,4-4)	31	60	0,0002	2,5 (1,4-4,4)
5A/6A	40	121			30	105		
6A/6A	3	69			3	54		

* Qui-quadrado com 1 e 2 graus de liberdade (para alelo e genótipo, respectivamente); $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa.

Tabela 10. Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1171 5A/6A no gene MMP3 em indivíduos com FL/P e FP, na população total e em caucasianos.

	Todos os indivíduos (n=78)		Caucasianos somente (n=64)	
	FL/P (n=62)	FP (n=11)	FL/P (n=50)	FP (n=10)
<i>Alelo</i>				
5A	87	17	72	16
6A	37	5	28	4
P**	0,00001	0,002	0,0001	0,012
<i>Genótipo</i>				
5A/5A	27	6	24	6
5A/6A	33	5	24	4
6A/6A	2	0	2	0
P**	0,00001	0,04	0,00001	0,011

*Tipo/lado desconhecido, para todos os indivíduos, n=5; caucasianos somente, n=4.

** Comparados com indivíduos controles. Qui-quadrado com 1 e 2 graus de liberdade (para alelo e genótipo, respectivamente); $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa.

5.3.3 MMP-9

As características da população estudada para o gene MMP9 estão listadas na Tabela 11.

Não houve diferença estatística significativa comparando-se as frequências dos genótipos e dos alelos entre casos e controles e entre subfenótipos de casos e controles, utilizando todos os indivíduos ou somente indivíduos caucasianos para as análises (Tabelas 12 e 13).

Tabela 11. Características da população estudada para o gene MMP9.

Características	MMP9		
	FL/P (n=125)	Controles (n=173)	P
Idade*	19,42 ± 9,6	26,61 ± 10,24	0,000001‡
Homens	67	59	0,0007***
Mulheres	58	114	
Caucasianos**	106	134	
Japoneses	1	27	0,00001***
Negros	18	12	

* Idade média ± desvio padrão, em anos.

‡ Teste T de Student; p ≤ 0,05 indica diferença estatística significativa.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

*** Qui-quadrado com 1 grau de liberdade; p ≤ 0,05 indica diferença estatística significativa

Tabela 12. Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1562 C/T no gene MMP9 em casos e controles, na população total e em caucasianos.

	Todos os indivíduos				Caucasianos**			
	FL/P (n=125)	Controle (n=173)	P*	OR (IC)***	FL/P (n=90)	Controle (n=132)	P*	OR (IC)***
<i>Alelo</i>								
C	226	305	0,38	1.3	181	237	0,79	1.2
T	24	41		(0,7-2.3)	19	27		(0,7-2.2)
<i>Genótipo</i>								
CC	101	132	0,35	1.3	81	105	0,78	1.1
CT	24	41		(0,7-2.1)	19	27		(0,6-2.1)
TT	0	0			0	0		

* Qui-quadrado com 1 e 2 graus de liberdade (para alelo e genótipo, respectivamente); p ≤ 0,05 indica diferença estatística significativa.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

*** OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança (95%).

Tabela 13. Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo -1562 C/T no gene MMP9 em indivíduos com FL/P e FP, na população total e em caucasianos.

		Todos os indivíduos (n=125)*		Caucasianos** (n=94)*	
		FL/P (n=103)	FP (n=22)	FL/P (n=83)	FP (n=14)
<i>Alelo</i>					
C		186	40	149	24
T		36	4	17	2
	P***	0,14	0,59	0,99	0,68
<i>Genótipo</i>					
CC		84	18	66	11
CT		18	4	17	2
TT		0	0	0	0
	P***	0,24	0,56	0,99	0,66

*Tipo/lado desconhecido, para caucasianos, n=4.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

*** Comparados com indivíduos controles. Qui-quadrado com 1 e 2 graus de liberdade (para alelo e genótipo, respectivamente); $p \leq 0,05$ indica diferença estatística significativa.

5.3.4 TGFA

A distribuição dos genótipos e alelos para os polimorfismos estudados no gene TGFA em casos e controles utilizando a população total e caucasianos somente encontra-se nas Tabelas 14 e 15.

A análise comparativa entre casos e controles, utilizando a população total, mostrou diferenças significativas para as frequências dos genótipos no marcador rs930655 (Tabela 14). Entretanto, a análise utilizando somente os indivíduos caucasianos da amostra não revelou diferenças entre os grupos (Tabela 15).

Tabela 14. Análise comparativa das frequências dos genótipos e dos alelos obtidas para casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no gene TGFA.

Marcadores	n	Genótipos			P*	Alelos		P*
		AA	AB	BB		A	B	
rs1058213								
casos	465	441	3	21	<i>0,04</i>	885	45	<i>0,02</i>
controles	467	427	11	29		865	69	
rs2166975								
casos	464	330	98	36	0,11	758	170	<i>0,01</i>
controles	475	365	84	26		814	136	
rs930655								
casos	474	91	212	271	<i>0,00001</i>	394	754	<i>0,0001</i>
controles	480	85	237	158		407	553	
rs1523305								
casos	463	104	231	128	0,99	439	487	0,98
controles	474	107	235	132		449	499	
rs2902345								
casos	457	144	225	88	0,80	513	401	0,69
controles	476	159	225	92		543	409	
rs377122								
casos	470	89	239	142	0,14	417	523	0,06
controles	478	105	255	118		465	491	

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

Tabela 15. Análise comparativa das frequências dos genótipos obtidos para casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no gene TGFA.

Marcadores	n	Genótipos (Caucasianos)**			P*	Alelos (Caucasianos)**		P*
		AA	AB	BB		A	B	
rs1058213 casos controles	379 276	358 259	3 1	18 16	0,66	719 519	39 33	0,51
rs2166975 casos controles	373 282	266 215	76 51	31 16	0,28	608 481	138 83	0,07
rs930655 casos controles	386 285	79 54	181 140	126 91	0,82	339 248	433 322	0,88
rs1523305 casos controles	375 282	80 64	194 148	101 70	0,81	354 276	396 288	0,53
rs2902345 casos controles	358 282	120 84	170 144	68 54	0,64	410 306	306 252	0,39
rs377122 casos controles	382 284	75 62	195 160	112 62	0,09	345 284	419 284	0,08

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

As Tabelas 16 (todos os indivíduos) e 17 (caucasianos) demonstram as diferenças entre as frequências dos genótipos e alelos obtidos nos indivíduos de cada subfenótipo de FL/P e controles para cada polimorfismo estudado no gene TGFA, e estão representados pelo valor de P obtido para os genótipos seguido do valor obtido para os alelos ($P_{\text{genótipo}}/P_{\text{alelo}}$). Diferenças significantes foram observadas para a frequência dos genótipos entre os grupos, utilizando a amostra total, para o marcador rs930655 (Tabela 16). Analisando somente os indivíduos caucasianos da amostra, diferenças significativas foram observadas para a frequência dos alelos do marcador rs1058213 (C3827T) nos grupos FP incompleta + submucosa e FP total, quando comparados com controles. Diferenças significativas também foram observadas entre as frequências dos genótipos obtidos para o marcador rs2902345 entre os grupos FL/P total e controles (Tabela 17).

Tabela 16. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos para casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no gene TGFA.

Subfenótipo	n	rs1058213	rs2166975	rs930655	rs1523305	rs2902345	rs377122
Fissura Palatina							
Completa	21	0,39/ 0,01	0,96/0,90	0,62/0,34	0,74/0,52	0,46/0,23	0,74/0,65
Incompleta + submucosa	45	0,58/0,84	0,48/0,24	0,16/0,14	0,13/0,45	0,05/0,86	0,35/0,87
Total FP	66	0,39/0,27	0,54/0,30	0,54/0,49	0,43/0,78	0,18/0,61	0,30/0,71
Fissura Labio-Palatina							
Completa	300	0,26/0,08	0,07/ 0,009	0,09/0,25	0,88/0,75	0,92/0,68	0,11/0,11
Incompleta	104	0,30/0,56	0,94/0,70	0,13/0,13	0,61/0,35	0,97/0,81	0,02/0,006
Unilateral	250	0,46/0,19	0,09/ 0,01	0,01/0,53	0,52/0,48	0,75/0,97	0,01/0,005
Completa	175	0,81/0,44	0,01/0,0009	0,02/0,12	0,56/0,74	0,56/0,94	0,04/0,05
Incompleta	75	0,31/0,16	0,86/0,55	0,09/0,25	0,65/0,36	0,97/0,85	0,01/0,008
Direita	78	0,05/0,008	0,83/0,49	0,05/0,17	0,31/0,12	0,61/0,96	0,23/0,12
Completa	54	0,01/0,0001	0,76/0,46	0,33/0,23	0,17/0,06	0,81/0,84	0,25/0,21
Incompleta	16	0,70/0,90	0,64/0,38	0,08†	0,95/0,94	0,46/0,29	0,34/0,19
Incompleta + FP	8	0,54/0,15	0,57/0,35	0,03/0,26	0,51/0,84	0,46/0,28	0,97/0,91
Esquerda	172	0,94/0,98	0,05/0,009	0,11/0,87	0,47/0,93	0,28/0,99	0,02/0,009
Completa	121	0,88/0,45	0,003/0,0001	0,03/0,24	0,45/0,43	0,21/0,82	0,10/0,11
Incompleta	46	0,30†	0,90/0,64	0,47/0,22	0,48/0,49	0,97/0,80	0,03/0,01
Incompleta + FP	5	0,79/0,38	0,26/0,07	0,42/0,26	0,34/0,15	0,38/0,65	0,45/0,24
Bilateral	154	0,04/0,18	0,25/0,28	0,90/0,67	0,74/0,50	0,86/0,90	0,47/0,40
Completa	125	0,04†	0,25/0,65	0,90/0,91	0,55/0,35	0,69/0,82	0,84/0,65
Incompleta	8	0,64/0,42	0,56/0,22	0,17/0,16	0,37/0,20	0,60/0,34	0,05/0,06
Incompleta + FP	17	0,71/0,98	0,23/0,48	0,02/0,008	0,38/0,16	0,68/0,45	0,65/0,61
Incompleta mista	4	0,29/ 0,05	0,05/0,22	0,51/0,78	0,99/0,88	0,92/0,68	0,38/0,18
Fissura Mediana	2	----	----	----	----	----	----
Total FL/P	406	0,14/0,07	0,06/ 0,007	0,09/0,75	0,88†	0,92/0,70	0,03/0,01
Tipo/lado desconhecido	28	----	----	----	----	----	----
Total Fissurados	500	0,05/0,02	0,11/ 0,01	0,00001/0,0001	0,99/0,98	0,80/0,69	0,14/0,06
Controles (sem fissura)	500	----	----	----	----	----	----

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

Tabela 17. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos (genótipos/alelos) para casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no gene TGFA.

Subfenótipo	n	rs1058213	rs2166975	rs930655	rs1523305	rs2902345	rs377122
Fissura Palatina							
Completa	15	0,39/ 0,05	0,68/0,42	0,74/0,48	0,90†	0,77/0,56	0,68/0,72
Incompleta + submucosa	38	0,77/ 0,00001	0,57/0,25	0,10/0,18	0,11/0,17	0,11†	0,17/0,51
Total FP	53	0,84/ 0,00001	0,44/0,18	0,37/0,45	0,32/0,28	0,31/0,43	0,17/0,72
Fissura Labio-Palatina							
Completa	237	0,39/0,51	0,10/ 0,01	0,41/0,68	0,64/0,43	0,60/0,44	0,04/0,12
Incompleta	86	0,76/0,95	0,78/0,47	0,30/0,13	0,77/0,60	0,96/0,95	0,007/0,004
Unilateral	200	0,37/0,95	0,21/0,06	0,16/0,85	0,59/0,99	0,52/0,55	0,005/0,006
Completa	136	0,19/0,81	0,01/0,001	0,10/0,33	0,48/0,82	0,37/0,54	0,01/0,08
Incompleta	64	0,78/0,62	0,31/0,09	0,35/0,24	0,90/0,70	0,97/0,80	0,007/0,003
Direita	60	0,37/0,06	0,92/0,64	0,15/0,46	0,75/0,47	0,62/0,41	0,23/0,18
Completa	43	0,08/0,001	0,50/0,19	0,40/0,36	0,54/0,32	0,73/0,46	0,46/0,42
Incompleta	11	0,83/0,46	0,56/0,55	0,42/0,45	0,63/0,43	0,20/0,08	0,34/0,18
Incompleta + FP	6	0,73/0,26	0,19/ 0,05	0,12/0,30	0,37/0,48	0,26/0,12	0,79/0,56
Esquerda	140	0,19/0,37	0,13/ 0,04	0,39/0,83	0,35/0,67	0,30/0,79	0,006/0,007
Completa	93	0,05/0,11	0,008/0,001	0,17/0,51	0,31/0,35	0,18/0,75	0,01/0,09
Incompleta	44	0,81/0,59	0,64/0,32	0,52/0,25	0,54/0,69	0,98/0,91	0,03/0,01
Incompleta + FP	3	0,83/0,39	0,44/0,16	0,48/0,25	0,60/0,38	0,77/0,79	0,16/0,10
Bilateral	123	0,59/0,36	0,40/0,34	0,69/0,41	0,67/0,40	0,90/0,67	0,18/0,38
Completa	101	0,44/0,13	0,46/0,64	0,89/0,64	0,44/0,26	0,76/0,53	0,54/0,53
Incompleta	6	0,53/0,12	0,29/0,07	0,42/0,20	0,37/0,28	0,55/0,43	0,03/0,08
Incompleta + FP	13	0,50/0,10	0,13/0,55	0,02/0,008	0,37/0,17	0,65/0,36	0,32/0,44
Incompleta mista	3	0,13/ 0,005	0,0004/0,01	0,68/0,61	0,80/0,95	0,77/0,79	0,16/0,10
Fissura Mediana	1	----	----	----	----	----	----
Total FL/P	324	0,68/0,86	0,34/0,09	0,45/0,81	0,71/0,63	0,00001/0,02	0,007/0,01
Tipo/lado desconhecido	16	----	----	----	----	----	----
Total Fissurados	393	0,66/0,51	0,28/0,07	0,82/0,88	0,80/0,53	0,64/0,48	0,09/0,07
Controles (sem fissura)	285	----	----	----	----	----	----

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

5.3.5 IRF6

A distribuição dos genótipos e alelos para os polimorfismos estudados no gene IRF6 em casos e controles utilizando a população total e caucasianos somente encontra-se nas Tabelas 18 e 19.

A análise comparativa inicial entre casos e controles utilizando a população total revelou diferenças significativas para as frequências dos genótipos e alelos obtidos para o marcador rs2235371 (V274I) (Tabela 18). Entretanto, a análise utilizando somente os indivíduos caucasianos da amostra não revelou diferenças entre os grupos (Tabela 19).

Tabela 18. Análise comparativa das frequências dos genótipos e dos alelos obtidas para casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no gene IRF6.

Marcadores	n	Genótipos			P*	Alelos		P*
		AA	AB	BB		A	B	
rs4844880								
casos	492	33	183	276	<i>0,002</i>	249	735	<i>0,001</i>
controles	480	62	183	235		307	653	
rs2235371								
casos	463	413	43	7	<i>0,00001</i>	869	57	<i>0,00001</i>
controles	475	344	114	17		802	148	
rs2013162								
casos	465	59	211	195	<i>0,002</i>	329	601	<i>0,0003</i>
controles	476	95	223	158		413	539	
rs861019								
casos	490	161	224	105	0,49	546	434	0,28
controles	478	166	224	88		556	400	
rs2073487								
casos	464	58	209	197	<i>0,001</i>	325	603	<i>0,003</i>
controles	477	95	224	158		414	540	
rs658860								
casos	470	17	130	323	0,33	164	776	0,13
controles	476	12	118	346		142	810	

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

Tabela 19. Análise comparativa das frequências dos genótipos obtidos para casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no gene IRF6.

Marcadores	n	Genótipos (Caucasianos)			P*	Alelos (Caucasianos)		P*
		AA	AB	BB		A	B	
rs4844880								
casos	393	20	146	227	0,69	186	600	0,99
controles	285	18	99	168		135	435	
rs2235371								
casos	377	340	32	5	0,24	712	42	0,37
controles	281	245	34	2		524	38	
rs2013162								
casos	377	44	173	160	0,31	261	493	0,17
controles	282	44	128	110		216	348	
rs861019								
casos	383	106	188	89	0,77	400	366	0,46
controles	283	84	139	60		307	259	
rs2073487								
casos	391	43	186	162	0,17	272	510	0,14
controles	282	45	128	109		218	346	
rs658860								
casos	383	10	115	258	0,51	135	631	0,26
controles	281	6	74	201		86	476	

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

As Tabelas 20 e 21 demonstram as diferenças entre as frequências dos genótipos e alelos obtidos nos indivíduos de cada subfenótipo de FL/P e controles para cada polimorfismo estudado no gene IRF6, e estão representados pelo valor de P obtido para os genótipos seguido do valor obtido para os alelos ($P_{\text{genótipo}}/P_{\text{alelo}}$).

Analisando a população total, foram observadas diferenças significantes entre as frequências de ambos genótipos e alelos para determinados subfenótipos de FL/P e controles para os marcadores rs4844880 (FL/P incompleta), rs2235371 (V274I) (FL/P completa, FL/P incompleta, FL/P unilateral, FL/P esquerda, e FL/P total), rs2013162 (FL/P total) e rs2073487 (FL/P total) (Tabela 20). Diferenças significativas ainda foram observadas para as frequências dos alelos somente entre FL/P unilateral completa e incompleta, e FL/P bilateral e controles para o marcador rs2235371 (V274I) (Tabela 20). Entretanto, a análise utilizando somente os indivíduos caucasianos da amostra não revelou diferenças entre os grupos (Tabela 21).

Tabela 20, Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos para casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no gene IRF6 .

Subfenótipo	n	rs4844880	rs2235371	rs2013162	rs861019	rs2073487	rs658860
Fissura Palatina							
Completa	21	0,25/0,35	0,34/0,33	0,46/0,60	0,37/0,24	0,46/0,60	0,51/0,67
Incompleta + submucosa	45	0,47/0,41	0,08/0,10	0,93/0,83	0,86/0,70	0,96/0,80	0,70/0,46
Total FP	66	0,54/0,24	0,03/0,06	0,93/0,92	0,49/0,34	0,88/0,93	0,61/0,71
Fissura Labio-Palatina							
Completa	300	0,04/0,09	0,00001†	0,002/0,0006	0,07/0,01	0,001/0,0002	0,15/0,04
Incompleta	104	0,00005/0,00001	0,00001†	0,001/0,0002	0,18/0,14	0,001/0,0001	0,60/0,32
Unilateral	250	0,01/0,01	0,00001†	0,0005/0,0001	0,03/0,02	0,0004/0,0001	0,42/0,35
Completa	175	0,16/0,17	0,0001/0,00001	0,005/0,002	0,09/0,03	0,005/0,001	0,48/0,30
Incompleta	75	0,008/0,0009	0,0003/0,00001	0,03/0,005	0,13/0,16	0,02/0,005	0,66/0,79
Direita	78	0,21/0,07	0,001/0,0004	0,02/0,004	0,25/0,15	0,02/0,004	0,37/0,24
Completa	54	0,34/0,25	0,02/0,008	0,04/0,01	0,14/0,11	0,05/0,01	0,68/0,39
Incompleta	16	0,29/0,11	0,19/0,06	0,84/0,71	0,72/0,89	0,84/0,71	0,67/0,38
Incompleta + FP	8	0,72/0,55	0,22/0,08	0,15/0,04	0,31/0,51	0,15/0,04	0,07/0,78
Esquerda	172	0,04/0,01	0,00001†	0,006/0,003	0,07/0,03	0,005/0,002	0,04/0,06
Completa	121	0,35/0,32	0,003/0,0008	0,05/0,03	0,28/0,10	0,04/0,02	0,12/0,07
Incompleta	46	0,01/0,001	0,004/0,0008	0,01/0,003	0,08/0,28	0,01/0,002	0,09/0,27
Incompleta + FP	5	0,68/0,41	0,88/0,62	0,52/0,29	0,20/0,07	0,52/0,29	0,90/0,66
Bilateral	154	0,07/0,13	0,0002/0,00001	0,009/0,001	0,10†	0,005/0,0009	0,03/0,01
Completa	125	0,14/0,21	0,002/0,0002	0,08/0,02	0,09/0,12	0,05/0,01	0,06/0,02
Incompleta	8	0,29/0,25	0,22/0,08	0,59/0,33	0,31/0,51	0,59/0,33	0,90/0,78
Incompleta + FP	17	0,27/0,40	0,50/0,22	0,07/0,02	0,92/0,78	0,07/0,02	0,02/0,01
Incompleta mista	4	0,72/0,67	0,47/0,09	0,19/0,07	0,34/0,23	0,19/0,07	0,95/0,84
Fissura Mediana	2	----	----	----	----	----	----
Total FL/P	406	0,002/0,001	0,00001†	0,00001†	0,30/0,12	0,00001†	0,15/0,04
Tipo/lado desconhecido	28	----	----	----	----	----	----
Total Fissurados	500	0,002/0,001	0,00001†	0,002/0,0003	0,49/0,27	0,001/0,0001	0,33/0,13
Controles (sem fissura)	500	----	----	----	----	----	----

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

Tabela 21. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos para casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no gene IRF6.

Subfenótipo	n	rs4844880	rs2235371	rs2013162	rs861019	rs2073487	rs658860
Fissura Palatina							
Completa	15	0,22/0,19	0,07/0,49	0,18/0,10	0,35/0,32	0,20/0,10	0,48/0,84
Incompleta + submucosa	38	0,31†	0,05/0,20	0,43/0,19	0,12/ 0,05	0,49/0,22	0,98/0,91
Total FP	53	0,91/0,85	0,02/0,17	0,17/ 0,05	0,06/ 0,03	0,20/0,07	0,75/0,84
Fissura Labio-Palatina							
Completa	237	0,39/0,44	0,65/0,46	0,13/0,08	0,49/0,24	0,06/0,04	0,50/0,30
Incompleta	86	0,09/ 0,02	0,14/ 0,003	0,02/0,005	0,42/0,40	0,03†	0,25/0,09
Unilateral	200	0,58/0,32	0,22/0,18	0,03/0,04	0,26/0,22	0,01/0,06	0,46/0,43
Completa	136	0,51/0,59	0,49/0,66	0,06/0,15	0,51/0,34	0,05/0,10	0,66/0,64
Incompleta	64	0,03/0,008	0,38/0,15	0,19/0,06	0,29/0,30	0,10/0,23	0,48/0,37
Direita	60	0,13/ 0,04	0,39/0,50	0,36/0,28	0,43/0,39	0,04/0,62	0,26/0,30
Completa	43	0,16/0,74	0,37/0,74	0,29/0,41	0,28/0,34	0,27/0,38	0,36/0,23
Incompleta	11	0,004/0,002	0,94/0,75	0,63/0,76	0,94/0,97	0,04/0,45	0,88/0,83
Incompleta + FP	6	0,45/0,91	0,64/0,19	0,56/0,34	0,69/0,77	0,55/0,33	0,03/0,89
Esquerda	140	0,93†	0,62/0,37	0,06/ 0,05	0,44/0,38	0,05/0,03	0,01/0,17
Completa	93	0,67/0,37	0,80/0,73	0,16/0,19	0,82/0,53	0,14/0,13	0,07/0,30
Incompleta	44	0,38/0,16	0,33/0,12	0,13/ 0,05	0,10/0,74	0,11/ 0,03	0,12/0,24
Incompleta + FP	3	0,50/0,58	0,53/0,33	0,70/0,55	0,14/0,06	0,71/0,57	0,94/ 0,002
Bilateral	123	0,59/0,55	0,39/0,18	0,15/ 0,04	0,35/0,44	0,06/ 0,01	0,17/0,06
Completa	101	0,57/0,46	0,64/0,44	0,40/0,19	0,25/0,36	0,28/0,10	0,43/0,19
Incompleta	6	0,45/0,91	0,64/0,19	0,32/0,12	0,17/0,38	0,31/0,12	0,88/0,89
Incompleta + FP	13	0,29/0,70	0,45/0,08	0,17/ 0,05	0,61/0,38	0,16/ 0,05	0,003/0,008
Incompleta mista	3	0,89/0,68	0,80/0,36	0,56/0,27	0,21/0,83	0,55/0,27	0,94/0,92
Fissura Mediana	1	----	----	----	----	----	----
Total FL/P	377	0,73/0,70	0,32/0,15	0,02/0,01	0,45/0,21	0,008/0,01	0,24/0,09
Tipo/lado desconhecido	16	----	----	----	----	----	----
Total Fissurados	393	0,69/0,57	0,24/0,37	0,31/0,16	0,77/0,46	0,17/0,14	0,51/0,26
Controles (sem fissura)	285	----	----	----	----	----	----

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significante (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

5.3.6 Cromossomo 6q

A distribuição dos genótipos e alelos para os polimorfismos estudados no cromossomo 6q em casos e controles utilizando a população total e caucasianos somente encontra-se nas Tabelas 22 e 23.

A análise comparativa inicial, entre casos e controles, utilizando a população total, mostrou diferenças significativas para as frequências dos genótipos e alelos em quatro marcadores, rs7753918, rs 1171114, rs217325 e rs6940766 (Tabela 22). Considerando somente os indivíduos caucasianos da amostra, foram observadas diferenças somente para o marcador rs7753918 (Tabela 23).

As Tabelas 24 (todos os indivíduos) e 25 (caucasianos) demonstram as diferenças entre as frequências dos genótipos e alelos obtidos nos indivíduos de cada subfenótipo de FL/P e controles para cada polimorfismo estudado no cromossomo 6q, e estão representados pela diferença observada para os genótipos seguido da diferença observada para os alelos ($P_{\text{genótipo}}/P_{\text{alelo}}$).

Analizando a população total, foram observadas diferenças significantes nas frequências dos genótipos para determinados subfenótipos de FL/P e controles para o marcador rs7753918 (FL/P total, FL/P completa, FL/P unilateral, FL/P unilateral completa, FL/P esquerda, FL/P bilateral, e FL/P bilateral completa); nas frequências dos alelos para os marcadores rs217325 (FL/P unilateral), rs1325474 (FL/P esquerda incompleta + FP), e rs6940766 (FL/P bilateral completa); e nas frequências de ambos genótipos e alelos para os marcadores rs1171114 (FL/P total, FL/P completa, FL/P bilateral e FL/P bilateral completa), rs217325 (FL/P total e FL/P completa) e rs6940766 (FL/P total, FL/P completa e FL/P bilateral) (Tabela 24).

Quando analisando somente os indivíduos caucasianos da amostra, as diferenças para o marcador rs1325474 permaneceram significantes para os mesmos subfenótipos; as diferenças para o marcador rs7753918 também permaneceram significantes, exceto para FL/P unilateral, FL/P unilateral completa e FL/P esquerda. Diferenças significantes também foram observadas para a frequência dos alelos do marcador rs614565 entre os grupos FP incompleta e controle (Tabela 25).

Tabela 22. Análise comparativa das frequências dos genótipos obtidos em casos e controles (população total) para cada polimorfismo estudado no cromossomo 6q.

Marcadores	n	Genótipos			P*	Alelos		P*
		AA	AB	BB		A	B	
rs10943944								
casos	479	293	151	35	<i>0,01</i>	737	221	<i>0,001</i>
controles	478	320	142	16		782	174	
rs7753918								
casos	479	13	131	335	0,00001	157	801	0,52
controles	480	43	82	355		168	792	
rs1171114								
casos	474	158	230	86	0,00001	546	402	0,00001
controles	479	213	220	46		646	312	
rs512140								
casos	478	37	202	239	0,06	276	680	0,13
controles	479	40	167	272		247	711	
rs1171105								
casos	477	206	203	68	0,53	615	339	0,83
controles	479	196	221	62		613	345	
rs2023238								
casos	464	65	195	203	0,17	325	601	0,12
controles	480	64	177	239		305	655	
rs3798867								
casos	461	183	220	57	0,17	586	336	0,08
controles	476	163	242	71		568	384	
rs217325								
casos	481	51	190	240	0,00001	292	670	0,00001
controles	480	29	140	311		198	762	
rs217308								
casos	464	56	230	170	0,61	342	570	0,34
controles	478	66	247	165		379	577	
rs217290								
casos	471	181	234	56	0,33	596	346	0,17
controles	478	169	238	71		576	380	
rs624076								
casos	440	31	181	228	0,27	243	637	0,64
controles	474	46	179	249		271	677	
rs614565								
casos	457	29	170	258	0,53	228	686	0,37
controles	475	39	176	260		254	696	
rs1325474								
casos	441	24	140	277	0,22	188	694	0,08
controles	464	21	126	317		168	760	
rs6940766								
casos	481	22	150	309	0,00001	194	768	0,00001
controles	480	57	176	245		290	666	
rs1325469								
casos	467	290	152	25	0,22	732	202	0,09
controles	479	323	134	22		780	178	

* $p \leq 0,0005$ indica diferença significativa (negrito, em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

Tabela 23. Diferenças observadas para as frequências dos genótipos e dos alelos em casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismo estudado no cromossomo 6q.

Marcadores	n	Genótipos (Cauc)**			P*	Alelos (Cauc)**		P*
		AA	AB	BB		A	B	
rs10943944								
casos	391	242	119	30	0,01	603	179	0,07
controles	284	184	93	7		461	107	
rs7753918								
casos	389	11	105	273	0,00001	127	651	0,31
controles	285	28	49	208		105	465	
rs1171114								
casos	386	126	192	68	0,12	444	328	0,06
controles	285	107	143	35		357	213	
rs512140								
casos	390	29	171	190	0,14	229	551	0,08
controles	285	33	127	125		193	377	
rs1171105								
casos	396	176	166	54	0,09	518	274	0,13
controles	284	104	141	39		349	219	
rs2023238								
casos	376	55	161	160	0,37	271	481	0,31
controles	285	41	108	136		190	380	
rs3798867								
casos	375	148	179	48	0,33	475	275	0,50
controles	282	98	151	33		347	217	
rs217325								
casos	393	41	163	189	0,05	245	541	0,01
controles	285	20	103	162		143	427	
rs217308								
casos	377	46	188	143	0,73	280	474	0,94
controles	284	31	150	103		212	356	
rs217290								
casos	370	145	182	43	0,59	472	354	0,09
controles	283	100	149	34		349	217	
rs624076								
casos	370	25	148	197	0,33	198	542	0,33
controles	281	28	108	145		164	398	
rs614565								
casos	372	20	137	215	0,24	177	567	0,17
controles	281	24	105	152		153	409	
rs1325474								
casos	357	16	106	235	0,20	138	576	0,17
controles	278	13	65	200		91	465	
rs6940766								
casos	393	18	114	252	0,002	150	618	0,0003
controles	283	29	100	154		158	408	
rs1325469								
casos	379	248	117	14	0,19	613	145	0,29
controles	284	201	70	13		472	96	

* p ≤ 0,0005 indica diferença estatística significante (em negrito, realçado em cinza); p ≤ 0,05 indica tendência à significância (em itálico). ** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

Tabela 24. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos para os subfenótipos de casos e controles (população total) para cada polimorfismos estudado no cromossomo 6q.

Subfenótipo	n	rs10943944	rs7753918	rs1171114	rs512140	rs1171105	rs2023238	rs3798867	rs217325
Fissura Palatina									
Completa	21	0,44/0,35	0,28/0,41	0,92/0,83	0,81/0,91	0,61/0,64	0,74/0,92	0,80/0,55	0,13/0,15
Incompleta + submucosa	45	0,006/0,05	0,60/0,26	0,19/0,27	0,75/0,52	0,75/0,47	0,36/0,50	0,94/0,75	0,18/0,17
Total FP	66	0,07/0,25	0,83/0,62	0,30/0,31	0,71/0,64	0,57/0,40	0,30/0,55	0,84/0,57	0,14/0,06
Fissura Labio-Palatina									
Completa	300	0,007/0,005	0,00001/0,80	0,00001†	0,27/0,21	0,57/0,63	0,72/0,44	0,09/0,05	0,00001†
Incompleta	104	0,16/0,06	0,02/0,73	0,03/0,02	0,05/0,25	0,58/0,42	0,16/0,06	0,11/0,13	0,005/0,0006
Unilateral	250	0,0003/0,04	0,00001/0,42	0,007/0,002	0,09/0,24	0,92/0,86	0,25/0,08	0,16/0,07	0,0003/0,00001
Completa	175	0,02/0,01	0,00001/0,79	0,01†	0,48/0,33	0,77/0,88	0,71/0,38	0,28/0,21	0,001/0,0003
Incompleta	75	0,69/0,31	0,03/0,22	0,03/0,01	0,03/0,39	0,76/0,58	0,10/0,03	0,22/0,09	0,05/0,01
Direita	78	0,15/0,26	0,01/0,51	0,09/0,07	0,20/0,62	0,63†	0,41/0,15	0,14/0,05	0,09/0,02
Completa	54	0,27/0,28	0,06/0,64	0,19/0,21	0,49/0,42	0,56/0,30	0,42/0,18	0,55/0,29	0,11/0,10
Incompleta	16	0,77/0,93	0,45/0,23	0,47/0,45	0,90/0,91	0,62/0,84	0,43/0,18	0,06/0,02	0,07/0,02
Incompleta + FP	8	0,37/0,48	0,04/0,43	0,27/0,14	0,69/0,52	0,32/0,36	0,36/0,40	0,88/0,72	0,49/0,85
Esquerda	172	0,09/0,04	0,00001/0,54	0,005/0,004	0,13/0,23	0,71/0,93	0,40/0,19	0,40/0,28	0,0006/0,0002
Completa	121	0,04/0,02	0,0003/0,97	0,004/0,02	0,73/0,01	0,39/0,40	0,88/0,81	0,27/0,37	0,002/0,0003
Incompleta	46	0,92/0,74	0,23/0,31	0,02/0,01	0,005/0,10	0,27/0,11	0,04/0,008	0,55/0,34	0,01/0,01
Incompleta + FP	5	0,76/0,88	0,78/0,53	0,67/0,39	0,54/0,25	0,56/0,36	0,48/0,42	0,79/0,53	0,10/0,03
Bilateral	154	0,01/0,003	0,00001/0,84	0,00001†	0,32/0,21	0,27/0,75	0,77/0,75	0,22/0,09	0,0003/0,00001
Completa	125	0,08/0,04	0,00001/0,0008	0,00001†	0,40/0,32	0,55/0,51	0,85/0,77	0,16/0,07	0,004/0,0004
Incompleta	8	0,11/0,18	0,25/0,89	0,88/0,91	0,55/0,28	0,62/0,52	0,30†	0,48/0,46	0,02/0,004
Incompleta + FP	17	0,002/0,0005	0,26/0,12	0,47/0,33	0,79/0,60	0,01/0,65	0,99/0,96	0,71/0,62	0,01/0,06
Incompleta mista	4	0,84/0,67	0,49/0,19	0,50/0,91	0,73/0,95	0,63/0,93	0,42/0,24	0,35/0,20	0,61/0,76
Fissura Mediana	2	----	----	----	----	----	----	----	----
Total FL/P	406	0,0008/0,04	0,00001/0,62	0,00001†	0,07/0,13	0,58/0,96	0,32/0,15	0,06/0,02	0,00001

Subfenótipo	n	rs217308	rs217290	rs624076	rs614565	rs1325474	rs6940766	rs1325469
Fissura Palatina								
Completa	21	0,72/0,49	0,78/0,50	0,73/0,59	0,80†	0,37/0,06	0,03/0,005	0,36/0,33
Incompleta + submucosa	45	0,78/0,51	0,56/0,96	0,13/ 0,04	0,03/0,01	0,72/0,25	0,30/0,34	0,76/0,49
Total FP	66	0,64/0,37	0,69†	0,18/ 0,05	0,16/ 0,05	0,95/0,80	0,07/ 0,02	0,99/0,96
Fissura Labio-Palatina								
Completa	300	0,19/0,10	0,44/0,21	0,25/0,38	0,38/0,09	0,37/0,41	0,00001†	0,39/0,17
Incompleta	104	0,30/0,24	0,09/0,08	0,03/0,27	0,05/0,56	0,12/0,20	0,20/0,06	0,37/0,21
Unilateral	250	0,35/0,17	0,33/0,14	0,25/0,81	0,10/0,25	0,10/0,38	0,04/0,005	0,10/0,07
Completa	175	0,50/0,36	0,76/0,50	0,86/0,20	0,55/0,31	0,19/0,52	0,003†	0,08/ 0,03
Incompleta	75	0,36/0,19	0,15/0,06	0,01/0,29	0,02/0,48	0,34/0,43	0,69/0,36	0,46/0,87
Direita	78	0,08/ 0,03	0,15/0,06	0,67/0,51	0,69/0,42	0,43/0,49	0,10/ 0,02	0,33/0,09
Completa	54	0,32/0,15	0,59/0,38	0,54/0,29	0,59/0,41	0,59/0,42	0,09/ 0,02	0,26/0,09
Incompleta	16	0,07/ 0,02	0,08/ 0,02	0,41/0,52	0,45/0,67	0,78/0,54	0,99/0,91	0,26/0,51
Incompleta + FP	8	0,98/0,86	0,68/0,49	0,30/0,81	0,47/0,87	0,50/0,43	0,34/0,12	0,60/0,98
Esquerda	172	0,83/0,72	0,76/0,50	0,23/0,35	0,08/0,34	0,16/0,49	0,21/ 0,03	0,12/0,18
Completa	121	0,59/0,83	0,75/0,79	0,70/0,81	0,45/0,46	0,24/0,77	0,10/ 0,02	0,22/0,10
Incompleta	46	0,67/0,54	0,51/0,35	0,09/0,24	0,11/0,41	0,48/0,37	0,97/0,84	0,08/0,85
Incompleta + FP	5	0,77/0,50	0,89/0,98	0,52/0,92	0,52/0,81	0,0001/0,00001	0,41/0,16	0,24/0,35
Bilateral	154	0,26/0,11	0,24/0,17	0,02/0,05	0,36/0,15	0,48/0,30	0,00001†	0,81/0,52
Completa	125	0,19/0,09	0,38/0,17	0,01/0,04	0,25/0,10	0,82/0,53	0,0001/0,00001	0,97/0,82
Incompleta	8	0,30/0,49	0,48/0,49	0,14/ 0,04	0,17/0,06	0,27/0,25	0,56/0,31	0,29/0,51
Incompleta + FP	17	0,76/0,67	0,21/0,47	0,62/0,33	0,34/0,14	0,17/ 0,009	0,17/0,07	0,01/0,02
Incompleta mista	4	0,17/0,18	0,33/0,19	0,75/0,82	0,76/0,91	0,52/0,42	0,58/0,27	0,54/0,64
Fissura Mediana	2	----	----	----	----	----	----	----
Total FL/P	406	0,17/0,07	0,17/0,08	0,03/0,22	0,25/0,10	0,15/0,24	0,00001†	0,23/0,11
Tipo/lado desconhecido	28	----	----	----	----	----	----	----
Total Fissurados	500	0,61/0,21	0,33/0,17	0,27/0,64	0,53/0,37	0,22/0,30	0,00001†	0,22/0,10
Controles (sem fissura)	500	----	----	----	----	----	----	----

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

Tabela 25. Análise comparativa das frequências dos genótipos obtidos para os subfenótipos de casos e controles (caucasianos) para cada polimorfismos estudado no cromossomo 6q.

[illegible]

Subfenótipo	n	rs217308	rs217290	rs624076	rs614565	rs1325474	rs6940766	rs1325469
Fissura Palatina								
Completa	15	0,74/0,50	0,78/0,58	0,79/0,49	0,63/0,38	0,20/0,08	0,04/0,01	0,37/0,13
Incompleta + submucosa	38	0,70/0,44	0,61/0,69	0,26/0,17	0,09/ 0,00001	0,90/0,96	0,52/0,76	0,97/0,88
Total FP	53	0,56/0,33	0,88/0,99	0,57/0,44	0,42/0,38	0,61/0,37	0,28/0,12	0,82/0,53
Fissura Labio-Palatina								
Completa	237	0,46/0,76	0,58/0,76	0,48/0,27	0,16/ 0,05	0,08†	0,003/0,001	0,22/0,25
Incompleta	86	0,77/0,52	0,39/0,23	0,09/0,23	0,14/0,47	0,53/0,29	0,48/0,19	0,18/0,43
Unilateral	200	0,64/0,69	0,46/0,44	0,09/0,38	0,10/0,13	0,09/ 0,04	0,10/ 0,02	0,03/0,08
Completa	136	0,59/0,94	0,53/0,89	0,53/0,69	0,37/0,16	0,07/0,06	0,04/0,01	0,05†
Incompleta	64	0,59/0,34	0,33/0,16	0,03/0,23	0,04/0,38	0,53/0,22	0,88/0,62	0,21/0,65
Direita	60	0,23/0,11	0,29/0,15	0,40/0,81	0,35/0,17	0,50/0,44	0,17/ 0,04	0,68/0,37
Completa	43	0,77/0,51	0,86/0,68	0,84/0,83	0,29/0,11	0,56/0,25	0,14/ 0,04	0,53/0,23
Incompleta	11	0,08/ 0,04	0,06/ 0,03	0,30/0,93	0,28/0,78	0,49/0,87	0,66/0,68	0,71†
Incompleta + FP	6	0,61/0,38	0,58/0,34	0,66/0,75	0,79/0,61	0,26/0,09	0,26/0,13	0,75/0,43
Esquerda	140	0,62/0,66	0,63/0,89	0,15/0,33	0,19/0,27	0,02†	0,62/0,31	0,007/0,09
Completa	93	0,45/0,60	0,43/0,91	0,58/0,71	0,64/0,46	0,04/0,09	0,56/0,25	0,03/0,07
Incompleta	44	0,95/0,94	0,81/0,57	0,11/0,14	0,13/0,26	0,17/0,32	0,90/0,92	0,10/0,69
Incompleta + FP	3	0,45/0,52	0,51/0,55	0,57/0,82	0,55/0,73	0,00001†	0,15/ 0,04	0,24/0,28
Bilateral	123	0,74/0,65	0,93/0,73	0,28/0,11	0,25/0,12	0,43/0,47	0,002/0,0005	0,81/0,97
Completa	101	0,53/0,52	0,84/0,71	0,35/0,14	0,18/0,07	0,48/0,37	0,008/0,001	0,82/0,68
Incompleta	6	0,64/0,77	0,62/0,72	0,29/0,11	0,34/0,14	0,66/0,97	0,45/0,82	0,34/0,46
Incompleta + FP	13	0,98/0,92	0,39/0,62	0,68/0,38	0,38/0,15	0,54/0,97	0,12/0,06	0,75/0,47
Incompleta mista	3	0,28/0,13	0,32/0,15	0,79/0,50	0,83/0,56	0,81/0,98	0,54/0,33	0,88/0,98
Fissura Mediana	1	----	----	----	----	----	----	----
Total FL/P	2	0,60/0,62	0,65/0,48	0,18/0,16	0,13/ 0,05	0,09/0,07	0,005/0,001	0,12/0,23
Tipo/lado desconhecido	16	----	----	----	----	----	----	----
Total Fissurados	324	0,73/0,94	0,59/0,43	0,33†	0,25/0,15	0,20/0,17	0,002/0,0008	0,19/0,29
Controles (sem fissura)	285	----	----	----	----	----	----	----

* $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

** Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

5.4 Estudos genéticos utilizando anomalias dentárias como subfenótipos adicionais para FL/P

As tabelas 26-31 mostram a análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos obtidos para casos e controles em cada polimorfismo estudado, de acordo com os novos subfenótipos propostos no Quadro 1. As frequências obtidas para genótipos e alelos referentes a cada polimorfismo estudado encontram-se no Anexo 8.

Diferenças significativas foram encontradas entre as frequências dos genótipos e alelos obtidos para casos e controles (caucasianos) para o marcador rs2235371 (VAL274I) no gene IRF6, sugerindo a associação da presença de FP completa com retenção de dentes permanentes (Tabela 29).

Tabela 26. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos em casos e controles (população total) para cada polimorfismo no gene TGFA, de acordo com os subfenótipos propostos.

Subfenótipos adicionais	n	rs1058213	rs2166975	rs930655	rs1523305	rs2902345	rs377122
FP total com agenesia	14	0,66/0,80	0,21/0,22	0,42/0,29	0,42/0,35	0,56/0,37	0,32/0,21
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---
FP completa com múltiplas anomalias	2	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	---/---	0,76/0,87	0,41/0,32	0,46/0,49	0,49/0,63	0,98/0,94
FL/P direita com agenesia	27	---/---	0,93/0,69	0,91/0,96	0,63/0,55	0,30/0,33	0,71/0,51
FL/P esquerda com agenesia	40	0,66/0,49	0,06/ 0,05	0,40/0,24	0,30/0,55	0,12/0,11	0,53/0,37
FL/P esquerda com supranumerário	12	0,73/0,88	0,32/0,15	0,41/0,19	0,43/0,30	0,30/0,29	0,37/0,89
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	17	0,66/0,71	0,99/0,95	0,04 /0,11	0,15/0,33	0,08/0,13	0,24/0,39
FL/P bilateral com agenesia	39	0,38/0,48	0,44/0,30	0,68/0,99	0,83/0,70	0,16/0,07	0,87/0,61
FL/P bilateral com supranumerário	2	---/---	0,46/0,54	0,64/0,48	---/---	---/---	---/---
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	8	---/---	0,64/0,44	0,91/0,69	0,37/0,19	0,22/0,14	0,02/0,03
FL/P bilateral frustro*	31	0,82/0,65	0,91/0,82	0,52/0,96	0,25/0,55	0,002 /0,14	0,003/0,05
FL/P bilateral frustro* com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---

* FL/P unilateral com agenesia ou microdontia do incisivo lateral superior do lado oposto da fissura.

** $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significante (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

Tabela 27. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos em casos e controles (caucasianos‡) para cada polimorfismo no gene TGFA, de acordo com os subfenótipos propostos.

Subfenótipos adicionais	n	rs1058213	rs2166975	rs930655	rs1523305	rs2902345	rs377122
FP total com agenesia	12	0,90/0,67	0,06/ 0,04	0,15/0,07	0,04 /0,08	0,06/0,09	0,41/0,21
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	---/---	---/---	---/ 0,006	---/ 0,01	---/ 0,008	---/ 0,01
FP completa com múltiplas anomalias	0	---/---	---/---	0,61/0,72	0,43/0,40	0,50/0,56	0,32/0,60
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	---/---	0,74/0,91	0,38/0,28	0,44/0,41	0,50/0,57	0,96/0,98
FL/P direita com agenesia	24	0,24/ 0,02	0,94/0,69	0,78/0,57	0,97/0,83	0,32/0,16	0,95/0,60
FL/P esquerda com agenesia	36	0,01 /0,48	0,06/ 0,03	0,38/0,20	0,51/0,72	0,21/0,16	0,38/0,29
FL/P esquerda com supranumerário	9	---/---	0,10/ 0,02	0,67/0,37	0,58/0,60	0,35/0,55	0,37/0,94
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	14	---/---	0,94/0,92	0,02 / 0,03	0,07/0,15	0,02 / 0,04	0,16/0,29
FL/P bilateral com agenesia	34	0,88/0,97	0,29/0,17	0,73/0,96	0,81/0,88	0,09/ 0,03	0,71/0,50
FL/P bilateral com supranumerário	2	---/---	0,42/0,51	0,61/0,45	0,01 †	---/ 0,02	---/ 0,01
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	6	---/---	0,73/0,73	0,98/0,88	0,81/0,55	0,57/0,42	0,02 /0,08
FL/P bilateral frustro*	26	0,02 /0,31	0,93/0,96	0,62/0,94	0,20/0,60	0,87/0,97	0,33/0,26
FL/P bilateral frustro * com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/ 0,05	---/---	---/0,06	---/0,98

* FL/P unilateral com agenesia ou microdontia do incisivo lateral superior do lado oposto da fissura.

** p ≤ 0,0005 indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); p ≤ 0,05 indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo. ‡ Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

Tabela 28. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos em casos e para cada polimorfismo no gene IRF6 (população total) de acordo com os subfenótipos propostos.

Subfenótipos adicionais	n	rs4844880	rs2235371	rs2013162	rs861019	rs2073487	rs658860
FP total com agenesia	14	0,16/0,24	0,63/0,56	0,73/0,42	0,58/0,66	0,89/0,62	0,03 /0,13
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	0,74/0,77	---/---	0,009 / 0,006	---/---	---/---	---/---
FP completa com múltiplas anomalias	2	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	0,23/0,72	0,02 / 0,007	0,37/0,29	0,69/0,81	0,48/0,61	0,90/0,84
FL/P direita com agenesia	27	0,03 /0,14	0,14/0,11	0,33/0,13	0,39/0,40	0,33/0,13	0,49/0,46
FL/P esquerda com agenesia	40	0,48/0,20	0,01 / 0,004	0,30/0,13	0,15/ 0,04	0,30/0,13	0,29/0,17
FL/P esquerda com supranumerário	12	0,67/0,87	0,34/0,68	0,02 / 0,01	0,02 /0,96	0,02 / 0,01	0,24/0,10
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	17	0,61/0,30	---/---	0,06/ 0,02	0,33/0,19	0,06/ 0,02	0,38/0,16
FL/P bilateral com agenesia	39	0,29/0,78	0,06/ 0,03	0,23/0,15	0,97/0,88	0,16/0,11	0,99/0,90
FL/P bilateral com supranumerário	2	0,74/0,77	---/---	0,19/0,79	---/---	---/---	0,68/0,57
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	8	0,31/0,55	---/---	0,87/0,60	0,05 /0,06	0,28/0,14	0,57/0,33
FL/P bilateral frustro*	31	0,23/0,07	0,12/0,09	0,65/0,92	0,87/0,76	0,66/0,92	0,51/0,71
FL/P bilateral frustro * com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---

* FL/P unilateral com agenesia ou microdontia do incisivo lateral superior do lado oposto da fissura. ** p ≤ 0,0005 indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); p ≤ 0,05 indica tendência à significância (em itálico).

Tabela 29. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos em casos e controles (caucasianos‡) para cada polimorfismo no gene IRF6 de acordo com os subfenótipos propostos.

Subfenótipos adicionais	n	rs4844880	rs2235371	rs2013162	rs861019	rs2073487	rs658860
FP total com agenesia	12	0,47/0,87	0,16/0,12	0,93/0,75	0,24/0,90	0,76/0,53	0,001/0,01
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	0,79/0,88	0,00001†	0,002/0,003	---/---	---/---	---/---
FP completa com múltiplas anomalias	0	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	0,18/0,28	0,39/0,24	0,49/0,42	0,58/0,63	0,54/0,77	0,92/0,84
FL/P direita com agenesia	24	0,27/0,58	0,20/0,81	0,94/0,83	0,67/0,69	0,93/0,79	0,30/0,41
FL/P esquerda com agenesia	36	0,75/0,78	0,56/0,32	0,54/0,36	0,10/0,25	0,50/0,33	0,19/0,39
FL/P esquerda com supranumerário	9	0,53/0,25	0,91†	0,04/0,03	0,04/0,86	0,43/0,75	0,69/0,67
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	14	0,93/0,94	0,22/0,07	0,14/0,06	0,46/0,24	0,13/0,06	0,59/0,67
FL/P bilateral com agenesia	34	0,57/0,28	0,78/0,74	0,57/0,34	0,29/0,35	0,44/0,23	0,80/0,52
FL/P bilateral com supranumerário	2	0,79/0,88	---/---	0,19/0,64	---/---	0,19/0,65	0,73/0,57
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	6	0,51/0,80	0,51/0,24	0,97/0,83	0,12/0,15	0,97/0,85	0,76/0,52
FL/P bilateral frustro*	26	0,54/0,33	0,03/0,75	0,46/0,53	0,86/0,70	0,47/0,57	0,62/0,54
FL/P bilateral frustro * com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---	---/---	0,32/0,15	---/---

* FL/P unilateral com agenesia ou microdontia do incisivo lateral superior do lado oposto da fissura.

** p ≤ 0,0005 indica diferença estatística significante (em negrito, realçado em cinza); p ≤ 0,05 indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

‡ Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

Tabela 30. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos em casos e controles (população total) para cada polimorfismo no cromossomo 6q de acordo com os subfenótipos propostos.

Subfenótipos adicionais	n	rs10943944	rs7753918	rs1171114	rs512140	rs1171105	rs2023238
FP total com agenesia	14	0,07/ 0,04	0,89/0,91	0,90†	0,29/0,62	0,71/0,41	0,70/0,95
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	---/---	---/---	---/0,46	0,78/0,97	---/---	---/0,43
FP completa com múltiplas anomalias	2	---/---	---/---	---/---	---/---	0,70/0,41	---/---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	0,06/0,15	0,65/0,71	0,62/0,97	0,20/0,45	0,10/0,12	---/0,34
FL/P direita com agenesia	27	0,12/0,22	0,35/0,93	0,47/0,98	0,99/0,93	0,23/0,34	0,64/0,61
FL/P esquerda com agenesia	40	0,23/0,10	0,12/0,85	0,83/0,77	0,20/0,10	0,58/0,35	0,05/0,01
FL/P esquerda com supranumerário	12	0,55/0,37	0,14/0,90	0,21/0,36	0,11/0,07	0,42/0,56	0,66/0,35
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	17	0,52/0,94	0,20/0,18	0,14/0,08	0,08/0,04	0,39/0,19	0,25/0,12
FL/P bilateral com agenesia	39	0,05/0,03	0,60/0,62	0,15/0,07	0,61/0,87	0,40/0,39	0,91/0,90
FL/P bilateral com supranumerário	2	0,78/0,71	0,41/0,69	0,81/0,73	---/0,26	---/0,55	---/0,42
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	8	0,25/0,87	0,42/0,23	0,11/0,89	0,88/0,62	0,97/0,90	0,73/0,62
FL/P bilateral frustro*	31	0,17/ 0,05	0,54/0,66	0,02/0,16	0,30/0,11	0,86/0,90	0,59/0,27
FL/P bilateral frustro* com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---

Subfenótipos adicionais	n	rs3798867	rs217325	rs217308	rs217290	rs624076	rs614565
FP total com agenesia	14	0,12/0,31	0,82/0,54	0,15/0,34	0,10/0,40	0,19/0,86	0,31/0,71
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	---/0,69	---/0,15	---/0,67	---/0,67	0,79/0,87	0,80/0,93
FP completa com múltiplas anomalias	2	---/---	0,30/0,24	---/---	---/---	---/---	---/---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	0,59/0,73	0,15/ 0,04	0,61/0,75	0,49/0,39	0,69/0,51	---/---
FL/P direita com agenesia	27	0,63/0,96	0,82/0,99	0,34/0,43	0,72/0,78	0,69/0,93	0,75/0,60
FL/P esquerda com agenesia	40	0,92/0,70	0,03/0,02	0,95/0,78	0,89/0,65	0,70/0,52	0,40/0,70
FL/P esquerda com supranumerário	12	0,45/0,63	0,57/0,31	0,38/0,58	0,85/0,82	0,46/0,20	0,33/0,13
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	17	0,42/0,20	0,05/0,42	0,46/0,23	0,46/0,22	0,56/0,65	0,86/0,73
FL/P bilateral com agenesia	39	0,80†	0,05/0,03	0,94/0,85	0,84/0,89	0,77/0,63	0,82/0,52
FL/P bilateral com supranumerário	2	0,69/0,53	---/0,15	0,70/0,54	---/0,67	0,08/0,34	---/---
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	8	0,23/0,21	0,76/0,68	0,24/0,23	0,69/0,49	0,75/0,74	0,32/0,19
FL/P bilateral frustro*	31	0,35/0,81	0,82/0,99	0,16/0,95	0,38/0,74	0,20/0,24	0,09/0,10
FL/P bilateral frustro* com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---

Subfenótipos adicionais	n	rs1325474	rs6940766	rs1325469
FP total com agenesia	14	0,34/0,18	0,10/0,07	0,32/0,17
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	---/---	---/---	---/---
FP completa com múltiplas anomalias	2	---/---	---/---	---/---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	---/---	0,21/0,65	---/---
FL/P direita com agenesia	27	0,93/0,77	0,78/0,53	0,60/0,35
FL/P esquerda com agenesia	40	0,22/0,42	0,72/0,48	0,18/0,76
FL/P esquerda com supranumerário	12	0,08/ 0,02	0,22/0,32	0,09/ 0,03
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	17	0,38/0,94	0,73/0,64	0,25/0,77
FL/P bilateral com agenesia	39	0,63/0,35	0,009/0,04	0,14/0,11
FL/P bilateral com supranumerário	2	---/0,09	---/---	---/0,10
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	8	0,62/0,87	0,07/ 0,03	0,60/0,98
FL/P bilateral frustro*	31	0,20/0,13	0,68/0,35	0,34/0,40
FL/P bilateral frustro* com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---

* FL/P unilateral com agenesia ou microdontia do incisivo lateral superior do lado oposto da fissura.

** p ≤ 0,0005 indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); p ≤ 0,05 indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

Tabela 31. Análise comparativa das frequências dos genótipos e alelos (genótipos/alelos) obtidos em casos e controles (caucasianos†) para cada polimorfismo no cromossomo 6q de acordo com os subfenótipos propostos.

Subfenótipos adicionais	n	rs10943944	rs7753918	rs1171114	rs512140	rs1171105	rs2023238
FP total com agenesia	12	0,03/0,20	0,66/0,53	0,22/0,30	0,16/0,15	0,58/0,32	0,85/0,78
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	0,40/---	---/---	---/---	0,76/0,66	---/---	---/---
FP completa com múltiplas anomalias	0	---/---	0,44/0,14	---/---	---/---	0,80/0,53	0,44/0,97
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	0,04/0,01	0,67/0,70	0,61/0,86	0,37/0,90	0,16/0,18	---/---
FL/P direita com agenesia	24	0,03/0,48	0,74/0,38	0,47/0,72	0,40/0,22	0,12/0,28	0,42/0,68
FL/P esquerda com agenesia	36	0,17/0,12	0,26/0,88	0,83/0,58	0,78†	0,81/0,68	0,06/0,02
FL/P esquerda com supranumerário	9	0,29/0,33	0,27/0,90	0,22†	0,59/0,74	0,57/0,98	0,77/0,66
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	14	0,68/0,91	0,25/0,14	0,54/0,30	0,55/0,68	0,71/0,45	0,29/0,26
FL/P bilateral com agenesia	34	0,09/0,05	0,52/0,72	0,68/0,48	0,45/0,21	0,10/0,22	0,97/0,94
FL/P bilateral com supranumerário	2	0,83/0,74	0,46/0,70	0,75†	---/---	---/---	---/---
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	6	0,57/0,34	0,57/0,39	0,75/0,62	0,82/0,87	0,98/0,65	0,75/0,50
FL/P bilateral frustro*	22	0,22/0,17	0,67/0,30	0,14/0,33	0,89/0,90	0,21/0,11	0,73/0,40
FL/P bilateral frustro* com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---

Subfenótipos adicionais	n	rs3798867	rs217325	rs217308	rs217290	rs624076	rs614565
FP total com agenesia	12	0,26/0,54	0,98/0,99	0,31/0,59	0,19/0,63	0,29/0,93	0,42/0,75
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	---/---	---/---	---/---	---/---	0,81/0,88	0,82/0,95
FP completa com múltiplas anomalias	0	0,67/0,81	0,47/0,46	0,69/0,85	---/---	---/---	---/---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	0,66/0,81	0,47/0,12	0,69/0,85	---/---	0,71/0,51	---/---
FL/P direita com agenesia	24	0,54/0,90	0,79/0,51	0,58/0,72	0,67/0,71	0,76/0,51	0,83/0,55
FL/P esquerda com agenesia	36	0,87/0,78	0,70/0,13	0,95/0,89	0,94/0,90	0,73/0,43	0,63/0,60
FL/P esquerda com supranumerário	9	0,10/0,14	0,77/0,48	0,05/0,11	0,66/0,57	0,23/0,41	0,16/0,31
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	14	0,79/0,53	0,11/0,76	0,85/0,60	0,80/0,54	0,06/0,30	0,37/0,86
FL/P bilateral com agenesia	34	0,68/0,90	0,12†	0,87/0,84	0,81/0,66	0,71/0,44	0,42/0,32
FL/P bilateral com supranumerário	2	0,74/0,58	---/---	0,76/0,61	---/---	0,09/0,33	---/---
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	6	0,18/0,13	0,75/0,57	0,20/0,14	0,41/0,62	0,04/0,37	---/---
FL/P bilateral frustro*	22	0,17/0,55	0,88/0,72	0,11/0,48	0,24/0,54	0,39/0,54	0,03/0,10
FL/P bilateral frustro* com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---	---/---

Subfenótipos adicionais	n	rs1325474	rs6940766	rs1325469
FP total com agenesia	12	0,33/0,16	0,31/0,28	0,32/0,15
FP completa com retenção de dentes permanentes	2	---/---	---/---	---/---
FP completa com múltiplas anomalias	0	---/---	0,60/0,90	---/---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	4	---/---	0,20/0,50	---/---
FL/P direita com agenesia	24	0,89/0,69	0,97/0,83	0,89/0,73
FL/P esquerda com agenesia	36	0,37/0,83	0,89/0,79	0,24/0,72
FL/P esquerda com supranumerário	9	0,007/0,001	0,39/0,66	0,009/0,002
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	14	0,43/0,67	0,83/0,84	0,25/0,40
FL/P bilateral com agenesia	34	0,97/0,95	0,05/0,19	0,43/0,52
FL/P bilateral com supranumerário	2	---/---	---/---	---/---
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	6	0,30/0,33	0,28/0,14	0,14/0,18
FL/P bilateral frustro*	22	0,53/0,70	0,95/0,84	0,55/0,53
FL/P bilateral frustro* com múltiplas anomalias	1	---/---	---/---	---/---

* FL/P unilateral com agenesia ou microdontia do incisivo lateral superior do lado oposto da fissura.

** $p \leq 0,0005$ indica diferença estatística significativa (em negrito, realçado em cinza); $p \leq 0,05$ indica tendência à significância (em itálico).

† para ambos genótipo e alelo.

‡ Brasileiros sem ascendência Africana ou Japonesa.

5.5 Análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos testados

As Figuras 13 a 18 representam o padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados em casos e controles. Os eixos horizontais e verticais dos gráficos representam os polimorfismos estudados de acordo com as suas distâncias físicas, e a relação entre cada par de polimorfismos é representada por cores que podem variar de vermelho e azul escuro, de acordo com o grau de desequilíbrio de ligação (vermelho= alto desequilíbrio; azul escuro=baixo desequilíbrio). Para motivos de comparação, as análises foram realizadas utilizando a amostra total e somente os indivíduos caucasianos da amostra, pois havia uma forte suspeita de que os resultados estariam sob influência de uma possível estratificação populacional. Os resultados para o grupo controle contendo somente os indivíduos descendentes de Japoneses foram incluídos para comparação com os controles caucasianos. Os valores individuais das relações ilustradas nos gráficos abaixo se encontram no Anexo 9.

De um modo geral, para os estudos com TGFA e cromossomo 6, tanto na população total como em caucasianos somente, foi possível notar um maior número de polimorfismos em desequilíbrio de ligação nos indivíduos fissurados do que em controles.

Figura 13. Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene TGFA em casos (esquerda) e controles (direita) na população total. Os eixos horizontais e verticais estão representados em escala (Kb) de acordo com a distância entre os polimorfismos. Para cada par de polimorfismos, a análise estatística segue uma escala de cores de acordo com o grau de desequilíbrio de ligação, de vermelho (1,00) a azul escuro (0,10).

Figura 14. Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene TGFA em casos (esquerda) e controles (direita) caucasianos e controles japoneses (abaixo). Os eixos horizontais e verticais estão representados em escala (Kb) de acordo com a distância entre os polimorfismos. Para cada par de polimorfismos, a análise estatística segue uma escala de cores de acordo com o grau de desequilíbrio de ligação, de vermelho (1,00) a azul escuro (0,10).

A única exceção foi o gene IRF6, o qual apresentou um maior número de polimorfismos em desequilíbrio de ligação nos controles, na população total e em caucasianos.

Figura 15. Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene IRF6 em casos (esquerda) e controles (direita) na população total. Os eixos horizontais e verticais estão representados em escala (Kb) de acordo com a distância entre os polimorfismos. Para cada par de polimorfismos, a análise estatística segue uma escala de cores de acordo com o grau de desequilíbrio de ligação, de vermelho (1,00) a azul escuro (0,10).

Figura 16. Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no gene IRF6 em casos (esquerda) e controles (direita) caucasianos, e controles japoneses (abaixo). Os eixos horizontais e verticais estão representados em escala (Kb) de acordo com a distância entre os polimorfismos. Para cada par de polimorfismos, a análise estatística segue uma escala de cores de acordo com o grau de desequilíbrio de ligação, de vermelho (1,00) a azul escuro (0,10).

Figura 17. Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no cromossomo 6q em casos (esquerda) e controles (direita) na população total. Os eixos horizontais e verticais estão representados em escala (kb) de acordo com a distância entre os polimorfismos. Para cada par de polimorfismos, a análise estatística segue uma escala de cores de acordo com o grau de desequilíbrio de ligação, de vermelho (1,00) a azul escuro (0,10).

Figura 18. Representação gráfica do padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados no cromossomo 6q em casos (esquerda) e controles (direita) caucasianos, e controles japoneses (abaixo). Os eixos horizontais e verticais estão representados em escala (Kb) de acordo com a distância entre os polimorfismos. Para cada par de polimorfismos, a análise estatística segue uma escala de cores de acordo com o grau de desequilíbrio de ligação, de vermelho (1,00) a azul escuro (0,10).

5.6 Sumário dos resultados

A Tabela 32 apresenta um resumo dos resultados obtidos, de acordo com o polimorfismo estudado e o subfenótipo de FL/P ao qual se mostraram associados. Dos 30 polimorfismos estudados, 11 mostraram-se associados à pelo menos 1 subfenótipo de FL/P.

Tabela 32. Sumário das associações encontradas de acordo com o polimorfismo (SNP) estudado.

Subfenótipo	Gene	SNP	Amostra completa		Caucasianos somente	
			P _{genótipo}	P _{alelo}	P _{genótipo}	P _{alelo}
<i>Fissura Palatina</i>						
Completa	---	---	---	---	---	---
Incompleta + submucosa	TGFA	rs1058213	---	---	---	0,00001
	---	rs614565	---	---	---	0,00001
FP total (completa + incompleta)	TGFA	rs1058213	---	---	---	0,00001
	MMP3	-1171 5A/6A	0,04	0,002	0,01	0,01
<i>Fissura Lábio-Palatina</i>						
Completa	IRF6	rs2235371	0,00001	0,00001	---	---
	PRSS35	rs7753918	0,00001	---	0,00001	---
	PRSS35	rs1171114	0,00001	0,00001	---	---
	SNAP91	rs217325	0,00001	0,00001	---	---
	CYB5R4	rs6940766	0,00001	0,00001	---	---
Incompleta	IRF6	rs2235371	0,00001	0,00001	---	---
	IRF6	rs4844880	0,00005	0,00001	---	---
FL/P total (completa + incompleta)	IRF6	rs2235371	0,00001	0,00001	---	---
	IRF6	rs2013162	0,00001	0,00001	---	---
	IRF6	rs2073487	0,00001	0,00001	---	---
	PRSS35	rs7753918	0,00001	---	0,00001	---
	PRSS35	rs1171114	0,00001	0,00001	---	---
	SNAP91	rs217325	0,00001	0,00001	---	---
	CYB5R4	rs6940766	0,00001	0,00001	---	---
<i>Unilateral</i>	IRF6	rs2235371	0,00001	0,00001	---	---
	PRSS35	rs7753918	0,00001	---	---	---
	SNAP91	rs217325	---	0,00001	---	---
Completa	IRF6	rs2235371	---	0,00001	---	---
	PRSS35	rs7753918	0,00001	---	---	---
Incompleta	IRF6	rs2235371	---	0,00001	---	---
<i>Direita</i>						
Completa	---	---	---	---	---	---
Incompleta	---	---	---	---	---	---
Incompleta + FP	---	---	---	---	---	---

<i>Esquerda</i>	IRF6	rs2235371	0,00001	0,00001	---	---
	PRSS35	rs7753918	0,00001	---	---	---
Completa	---	---	---	---	---	---
Incompleta	---	---	---	---	---	---
Incompleta + FP	---	rs1325474	---	---	---	0,00001
<i>Bilateral</i>	IRF6	rs2235371	---	0,00001	---	---
	PRSS35	rs7753918	0,00001	---	0,00001	---
	PRSS35	rs1171114	0,00001	0,00001	---	---
	SNAP91	rs217325	---	0,00001	---	---
	CYB5R4	rs6940766	0,00001	0,00001	---	---
Completa	CYB5R4	rs6940766	---	0,00001	---	---
	PRSS35	rs7753918	0,00001	---	0,00001	---
Incompleta	---	---	---	---	---	---
Incompleta + FP	---	---	---	---	---	---
Incompleta mista	---	---	---	---	---	---
Total Fissurados (FL/P +FP)	TGFA	rs930655	0,00001	---	---	---
	TGFA	rs2902345	---	---	0,00001	---
	IRF6	rs2235371	0,00001	0,00001	---	---
	PRSS35	rs7753918	0,00001	---	0,00001	---
	PRSS35	rs1171114	0,00001	0,00001	---	---
	SNAP91	rs217325	0,00001	0,00001	---	---
	CYB5R4	rs6940766	---	0,00001	---	---
	MMP3	-1171 5A/6A	0,00001	0,00001	0,0002	0,00001
FP total com agenesia	---	---	---	---	---	---
FP completa com retenção de dentes permanentes	IRF6	rs2235371	---	---	0,00001	0,00001
FP completa com múltiplas anomalias	---	---	---	---	---	---
FP incompleta com giroversão/lateroversão	---	---	---	---	---	---
FL/P direita com agenesia	---	---	---	---	---	---
FL/P esquerda com agenesia	---	---	---	---	---	---
FL/P esquerda com supranumerário	---	---	---	---	---	---
FL/P esquerda com múltiplas anomalias	---	---	---	---	---	---
FL/P bilateral com agenesia	---	---	---	---	---	---
FL/P bilateral com supranumerário	---	---	---	---	---	---
FL/P bilateral com múltiplas anomalias	---	---	---	---	---	---
FL/P bilateral frustro	---	---	---	---	---	---
FL/P bilateral frustro com múltiplas anomalias	---	---	---	---	---	---

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Metodologia

6.1.1 Tipo de Estudo

Os estudos de associação são uma importante ferramenta para a identificação de variantes genéticas que predisõem a doenças complexas (**LI et al.**, 2006), e podem ser realizados testando famílias de indivíduos afetados ou testando indivíduos não relacionados entre si, compondo um desenho caso-controle, tal qual o utilizado neste estudo. O objetivo é verificar se um determinado alelo do gene candidato está associado à doença e permitir a identificação de genes que possam estar contribuindo para o fenótipo. Uma importante vantagem dos estudos de associação é a possibilidade de identificação de genes refratários a estudos de ligação devido à heterogeneidade genética e/ou penetrância reduzida (**FARRAL; HOLDER**, 1992).

Os estudos caso-controle são os mais frequentemente utilizados por permitirem o recrutamento de um número maior de indivíduos afetados isoladamente, sem a necessidade de incluir seus familiares (afetados ou não) na amostra (**RISCH**, 2000). Outra vantagem é a redução de aproximadamente um terço no custo do estudo, em comparação a um desenho utilizando tríades de famílias de indivíduos afetados. Uma desvantagem é que os resultados podem ser influenciados pela estratificação da população por serem baseados na diferenciação da frequência dos alelos entre casos e controles e portanto, sujeitos às questões de heterogeneidade populacional (**WANG et al.**, 2005).

A população brasileira pode ser considerada uma das mais heterogêneas do mundo, devido à ocorrência de cruzamentos étnicos entre pessoas de diferentes origens, tais como colonizadores europeus, escravos africanos e índios americanos (**ALVES-SILVA et al.**, 2000) e torna a seleção de um grupo controle adequado extremamente difícil. Entretanto, a utilização de uma amostra robusta minimiza a probabilidade de ocorrência de erros do tipo I por aumentar o poder estatístico do estudo (**IOANNIDIS**, 2003).

Uma iniciativa primordial durante o planejamento de qualquer estudo científico é determinar o número de amostras que devem ser utilizadas para que o efeito esperado seja detectado. Em estudos genéticos, este procedimento é fundamental,

levando em conta os altos custos envolvidos na genotipagem dos indivíduos, e ainda porque os resultados podem ser interpretados erroneamente caso o tamanho da amostra utilizada não seja suficiente para se detectar alguma associação (**PURCELL et al., 2003**). A amostra utilizada neste estudo pode ser considerada robusta, sendo composta por 1000 indivíduos, 500 casos portadores de FL/P isolada, e 500 indivíduos controles não relacionados, sem FL/P e sem história familiar positiva de FL/P. Cálculos de poder estatístico sugerem que este tamanho amostral apresenta 80% ($\alpha = 0.05$) de chance de detecção de associação de um polimorfismo em um gene candidato que esteja em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,8$) com o fator causal em questão (**PURCELL et al., 2003**).

6.1.2 Seleção dos genes candidatos e polimorfismos estudados

Os genes candidatos a FL/P têm sido sugeridos através de resultados de estudos biológicos em modelos animais demonstrando a sua importância durante o desenvolvimento embrionário, resultados de estudos de ligação e de desequilíbrio de ligação, resultados de buscas por todo o genoma, aberrações cromossômicas e formas síndrômicas de FL/P (**MURRAY, 2002**). A nossa abordagem com relação à seleção dos genes estudados seguiu os modelos acima; os genes da MMP1, MMP3 e MMP9 foram escolhidos baseados em resultados de estudos biológicos em modelos animais demonstrando a sua importância durante o desenvolvimento craniofacial (**IAMAROON et al., 1996**) e na formação do palato (**MORRIS-WIMAN et al., 1999; 2000; KERRIGAN et al., 2000; BLAVIER et al., 2001; BROWN et al., 2002**). Além disso, até a presente data, não existem relatos de estudos com estes genes na ocorrência de FL/P, conferindo ineditismo ao presente estudo.

Além da tentativa de detectar novos genes/loci potencialmente envolvidos na etiologia da FL/P, a replicação de estudos anteriores é uma prática comum na genética humana, para verificar se as associações sugeridas se repetem em outras populações. Nesse contexto, os genes TGFA e IRF6, por já terem sido associados com a FL/P em outros estudos (TGFA: **ARDINGER et al., 1989, CHENEVIX-TRENCH et al., 1991; 1992, HOLDER et al., 1992, SASSANI et al., 1993, STOLL et al., 1993, FENG et al., 1994, FIELD et al., 1994, HWANG et al., 1995, JARA et al., 1995a, 1995b, SHAW et al., 1996, PRESCOTT et al., 2000, TANABE et al., 2000, BEATY et al., 2002; 2006, MARAZITA et al., 2002, YUAN et al., 2006,**

MORKŪNIENĖ et al., 2007; IRF6: **ZUCCHERO et al.**, 2004, **SCAPOLI et al.**, 2005, **BLANTON et al.**, 2005, **GHASSIBÉ et al.**, 2005, **SCHRIMTHONG et al.**, 2005), foram escolhidos no intuito de verificarmos a existência de associação na nossa população. Finalmente, a escolha do cromossomo 6q como região candidata foi baseada no ineditismo do assunto, em uma região identificada por métodos estatísticos sofisticados como apresentando uma probabilidade elevada de apresentar um gene associado a FL/P.

A seleção de polimorfismos a serem testados também pode ser realizada a partir de resultados de estudos anteriores, através de observações sobre os efeitos biológicos dos polimorfismos, ou através de informações sobre desequilíbrio de ligação dos marcadores. Para este estudo, os polimorfismos nos genes MMP1, MMP3 e MMP9 foram selecionados por se classificarem como funcionais, ocorrendo no promotor dos genes e potencialmente influenciarem a expressão gênica, enquanto os polimorfismos nos genes TGFA e IRF6 foram escolhidos a partir de estudos anteriores (TGFA: **CALLAHAN et al.**, 2007, **MORKŪNIENĖ et al.**, 2007; IRF6: **ZUCCHERO et al.**, 2004, **VIEIRA et al.**, 2007). Com relação ao cromossomo 6q, devido à ausência de estudos prévios, os polimorfismos testados foram selecionados utilizando-se o Projeto Internacional HapMap (**THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM**, 2003), com o objetivo de visualizar a região específica no cromossomo 6q e selecionar os SNPs mais informativos, a partir das observações sobre desequilíbrio de ligação entre os SNPs, nos blocos de haplótipos e na estrutura dos genes da região. **CARLSON et al.**, 2004, desenvolveu uma abordagem para auxiliar a seleção de um menor número de SNPs que representem ao máximo a estrutura de desequilíbrio de ligação de uma determinada região. Basicamente, esta abordagem considera os SNPs em desequilíbrio de ligação (LD) existentes para uma determinada região cromossômica e a seleção é realizada de modo que, dos diversos SNPs que possam existir em um mesmo bloco de LD, apenas alguns precisam ser testados, pois todos fornecem praticamente a mesma informação. Dessa forma, os 15 polimorfismos testados foram escolhidos a partir dos 6 blocos de desequilíbrio de ligação existentes na determinada região de 14cM no cromossomo 6q, ilustrada na Figura 12 do Material e Métodos.

6.1.3 Genotipagem

O presente estudo utilizou quatro técnicas diferentes para genotipagem dos indivíduos: RFLP (*Restriction-Fragment Length Polymorphism*) utilizando enzimas de restrição específicas, PCR convencional e cinético com primers alelo-específicos, e método Taqman. Todas as técnicas têm sido amplamente utilizadas em investigações de polimorfismos genéticos e são altamente sensíveis e específicas.

A técnica RFLP (*Restriction-Fragment Length Polymorphism*), utilizada para os estudos com os genes MMP1 e MMP9, é uma técnica altamente específica, onde as enzimas de restrição atuam como “tesouras de DNA”, clivando a sequência de DNA específica de reconhecimento em fragmentos de comprimentos pré-determinados que podem ser visualizados em gel de eletroforese, e correspondem aos alelos específicos do polimorfismo. Esta técnica tem sido amplamente utilizada em estudos de associação de polimorfismos em genes de MMPs com diversas doenças (DE SOUZA et al., 2003; 2005, PERES; LINE, 2005, ASTOLFI et al., 2006, PRZYBYLOWSKA et al., 2006) e também nos estudos de associação de outros genes com FL/P, especialmente TGFA (ARDINGER et al., 1989, SHIANG et al., 1993, JARA et al., 1995, SHAW et al., 1996) e outros (LU et al., 2005).

As técnicas de PCR alelo-específicas, independente de serem utilizadas em PCR convencional ou cinético em tempo real, são de fácil realização e interpretação, e também têm sido utilizadas em estudos prévios de associação com a FL/P (SHI et al., 2004, ZUCCHERO et al., 2004, VIEIRA et al., 2005b). Uma desvantagem do PCR cinético é a necessidade de utilização de um seqüenciador automático (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de custo elevado.

O método Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) proposto por RANADE et al., 2001, consiste na utilização de sondas fluorescentes alelo-específicas, que combinam as etapas de amplificação e detecção dos alelos em uma única etapa e elimina a necessidade de procedimentos adicionais para determinação dos genótipos. Para cada reação, a fluorescência é medida após a reação de PCR e os genótipos inferidos a partir destes valores. Sendo assim, o método Taqman elimina qualquer viés por erro de interpretação, pois os genótipos são gerados automaticamente, sem interferências da análise humana. Entretanto, é uma técnica cara, devido à necessidade de utilização de um seqüenciador automático (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e do alto custo das sondas fluorescentes.

Todavia, devido à simplicidade da técnica, alta especificidade e confiabilidade dos resultados, o método Taqman se tornou uma importante ferramenta para os estudos de associação de diversos genes com a FL/P (BLANTON et al. 2004; 2005, ZUCCHERO et al., 2004, GHASSIBE et al., 2005, SCAPOLI et al., 2005, SRICHOMTHONG et al., 2005, VIEIRA et al., 2005a, AVILA et al., 2006, BEATY et al., 2006, NEISWANGER et al., 2006, WARRINGTON et al., 2006, MORKŪNIENĖ et al., 2007, RILEY et al. 2007).

6.1.4 Análise dos resultados

Um dos maiores problemas nos estudos genéticos de traços complexos é saber se um resultado é estatisticamente significativo (LANDER; SCHORK, 1994). Os resultados do presente estudo foram analisados estatisticamente através do teste Qui-quadrado com Correção de Bonferroni considerando o número de variáveis e análises realizadas, e o valor indicando significância foi estabelecido em $p \leq 0,00005$. Por ser um método extremamente conservador e, especialmente em se tratando do elevado número de testes como no presente estudo, a Correção de Bonferroni, apesar de corrigir para erros do tipo I (falso-positivos), pode aumentar a probabilidade de erro tipo II (falso-negativos) e evitar que resultados legitimamente significativos sejam detectados. Dessa forma, podemos garantir que as associações encontradas neste estudo apresentam legítima significância e, além disso, outras associações significativas ainda podem ter permanecido não detectadas devido aos valores extremamente rígidos impostos pela Correção de Bonferroni.

6.2 Resultados

6.2.1 Caracterização da amostra

A amostra utilizada no presente estudo pode ser considerada uma amostra de conveniência, composta por 500 indivíduos portadores de FL/P isolada e 500 indivíduos não relacionados, sem FL/P e sem história familiar positiva de FL/P. Casos e controles não foram pareados e foram observadas diferenças significativas com relação à idade, gênero e etnia entre os grupos de estudo. A diferença na idade não é relevante devido à natureza congênita da FL/P. Com relação ao gênero, a proporção

entre homens e mulheres nos grupos de estudo foi praticamente inversa, com o grupo de fissurados apresentando mais homens e o grupo de controles apresentando mais mulheres. Uma maior proporção de homens no grupo de fissurados era um resultado esperado uma vez que os homens são mais afetados pela FL/P do que as mulheres, e a proporção observada para homens e mulheres com relação aos tipos de FL/P apresentados coincidem com os dados relatados na literatura. No grupo controle, a maior proporção de mulheres provavelmente se deve ao fato de que o número de mulheres que procura atendimento odontológico nas clínicas da faculdade é notavelmente maior do que o número de homens. Idealmente, em estudos genéticos, o gênero dos indivíduos compondo a amostra também deve ser observado, no caso de que os genes estudados apresentem alguma predileção característica de acordo com o gênero (por exemplo, em estudos com genes no cromossomo X ou em situações epigenéticas ainda não conhecidas). Se este fosse o caso de algum dos genes estudados no presente estudo, não seria possível detectar estas diferenças.

A diferença na etnia entre os grupos é devida ao número significativamente maior de indivíduos com ascendência Japonesa no grupo controle do que no grupo de fissurados. Uma possível razão para esta diferença é que grande parte dos indivíduos do grupo controle residia em Bauru ou em cidades vizinhas. A região Sudeste do Brasil, especialmente o estado de São Paulo, é caracterizada por uma alta incidência de descendentes Japoneses, e isto parece ter se refletido na composição da amostra do grupo controle. Os indivíduos fissurados entretanto, eram residentes de diversos estados do país, que compareciam para tratamento odontológico no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC) de acordo com a necessidade específica de cada indivíduo, e eram na sua quase totalidade caucasianos.

O método de seleção do grupo controle pode levar a um viés de interpretação devido a fatores como mistura populacional, heterogeneidade genética e estratificação populacional, uma vez que a frequência aumentada de um alelo em uma determinada população ou grupo étnico tenderá a mostrar associação falso-positiva com o defeito (**LANDER; SCHORK**, 1994). Desse modo, para evitar qualquer interpretação errônea dos resultados, além das análises utilizando a população total, com todos os 500 indivíduos em cada grupo, foram realizadas análises utilizando somente os indivíduos caucasianos da amostra. Vale ressaltar que, devido aos cruzamentos étnicos na população brasileira, foram considerados caucasianos os indivíduos não descendentes de Japoneses ou Africanos. A estratificação da população é provavelmente

responsável pelos resultados observados com relação aos polimorfismos genéticos e as associações vistas nas análises com a amostra completa, a qual inclui descendentes de japoneses.

6.2.2 Definição do Fenótipo

A ocorrência simultânea de fissuras orais e agenesia dental (**RANTA**, 1982; 1983; 1986, **RANTA;TULENSALO**, 1988, **WERNER; HARRIS**, 1989, **HARRIS; HULLINGS**, 1990, **JIROUTOVA**, 1991, **LAATIKAINEN; RANTA**, 1994, **TSAI et al.**, 1998, **SHAPIRA et al.**, 1999; 2000, **EERENS et al.**, 2001, **SLAYTON et al.**, 2003, **STAHL et al.**, 2006) tem levado à hipótese de que estes dois fenótipos possam estar mais do que associados (**VIEIRA**, 2003). Em algumas situações, poderia haver uma variação fenotípica do mesmo componente genético. Apesar dos inúmeros relatos sobre a alta incidência de anomalias dentárias em indivíduos fissurados, até a presente data, nenhum estudo considerou a inclusão das anomalias dentárias como subfenótipos clínicos da FL/P.

O presente estudo é pioneiro em subclassificar os tipos de fissura encontrados para uma numerosa população de indivíduos com FL/P, e o primeiro relato mostrando a ocorrência preferencial de algumas anomalias dentárias com alguns tipos de FL/P, possibilitando a identificação de subfenótipos adicionais para serem incluídos nas investigações genéticas. A hipótese de expansão do fenótipo pode facilitar a identificação de indivíduos saudáveis que apresentem um risco de carregar genes potencialmente candidatos a FL/P, e assim aumentar o poder dos estudos visando o descobrimento da etiologia genética da condição (**WEINBERG et al.**, 2006). Além disso, nós acreditamos que a utilização de definições clínicas mais sofisticadas pode significar uma importante ferramenta na identificação de genes associados a FL/P.

Corroborando os resultados de estudos anteriores (**SHPRINTZEN et al.**, 1985, **RANTA**, 1986, **SHAPIRA et al.**, 1999, **EERENS et al.**, 2001), a presença de anomalias dentárias, em especial a agenesia de dentes permanentes foi significativamente mais freqüente no grupo FL/P, sugerindo uma etiologia comum entre as duas condições (**VIEIRA**, 2003). A presença de microdontia, dentes supranumerários, retenção e transposição dentária também foi mais freqüente em indivíduos com FL/P neste e em outros estudos (**NAGAI et al.**, 1965, **FOSTER; LAVELLE**, 1971, **SHPRINTZEN et al.**, 1985, **WERNER; HARRIS**, 1989,

HANSEN; MEHDINIA, 2002, JAKSIC et al., 2002). Adicionalmente, um maior número de anomalias dentárias é observado à medida que a severidade da FL/P aumenta (**ADAMS; NISWANDER, 1967, VAN DEN BOOGARD et al., 2000, EERENS et al., 2001, SLAYTON et al., 2003, AIZENBUD et al., 2005).** Isto também foi notado neste estudo, pois a maioria dos casos afetados por múltiplas anomalias dentárias apresentava fissura labial e palatina. Entretanto, a partir destas observações, seria esperado que indivíduos com FL/P bilateral apresentassem a maior incidência de múltiplas anomalias, e o observado foi que os indivíduos com FL/P unilateral esquerda foram os mais afetados, sugerindo que não existe uma relação direta entre número de anomalias presentes e severidade da FL/P. Não existem outros estudos para compararmos aos nossos resultados.

A agenesia dentária é considerada a anomalia de desenvolvimento mais comum em humanos apresentando uma incidência de 1,6% a 9,6% na população em geral (**VASTARDIS, 2000**), e nossos resultados para o grupo controle (7,2%) seguem essa proporção. Nos indivíduos fissurados, a agenesia dentária foi observada em 26,2% dos indivíduos, corroborando relatos anteriores (**EERENS et al., 2001**), embora a incidência relatada na literatura varia amplamente, podendo chegar a 67% (**SHAPIRA et al., 2000**) e 77% (**AIZENBUD et al., 2005**). Estes dois últimos estudos porém, consideraram a presença de agenesia dentária na região de fissura. No presente estudo, foram considerados somente os casos de anomalias fora da região de fissura, uma vez que qualquer anomalia na área da fissura é provavelmente decorrente de alterações do desenvolvimento normal na região.

Com relação aos dentes mais afetados pela agenesia dentária, excluindo-se os terceiros molares, que são os dentes mais comumente ausentes com uma incidência de 20% na população (**LAVELLE et al., 1970**), as opiniões variam com relação ao segundo dente mais afetado. Alguns autores (**MULLER et al., 1970, MALIK, 1972**) acreditam que os incisivos laterais superiores são os dentes mais afetados, enquanto outros (**GRAHNEN, 1956, HUNDSTADBRATEN, 1973, VIEIRA et al., 2004**) relatam que os segundos pré-molares inferiores são os dentes mais ausentes. Nossos resultados corroboram a primeira hipótese para os indivíduos controles, e a segunda hipótese para os indivíduos fissurados.

Foi interessante observar as associações entre alguns tipos de anomalia dentária e subfenótipos de FL/P. Por exemplo, notamos que a presença de múltiplas anomalias foi significativamente mais freqüente nos casos com fissuras completas, tanto

FP e FL/P. Dos casos de FL/P, os casos de FL/P unilateral esquerda apresentaram mais múltiplas anomalias. Além disso, uma outra observação intrigante foi a presença consideravelmente mais freqüente de agenesia, microdontia e dentes supranumerários (especialmente do incisivo lateral superior) no lado oposto de fissuras unilaterais.

Em resumo, nossos resultados demonstraram que a prevalência de anomalias dentárias como sinais de distúrbios do desenvolvimento dentário em indivíduos fissurados foi significativamente maior do que em indivíduos controles, e nos indica que as anomalias dentárias podem ser consideradas um fenótipo adicional para a FL/P e merecem ser incluídas nas análises genéticas. Além disso, a presença de anomalias dentárias no lado oposto da FL/P unilateral com alterações de desenvolvimento do incisivo lateral superior nos leva a acreditar que estas FL/P unilaterais podem ser consideradas FL/P bilaterais “frustradas”, e deveriam ser examinadas com cautela com relação à etiologia dos diferentes subfenótipos de FL/P.

6.3 Estudos genéticos de associação com a FL/P

6.3.1 MMPs

Estudos mostrando a importante atuação das MMPs na remodelação da matriz extracelular durante o desenvolvimento craniofacial e durante a formação e fusão do palato suportam a idéia de que estes genes possam ser considerados candidatos a FL/P (**IAMAROON et al.**, 1996b, **KERRIGAN et al.**, 2000, **BLAVIER et al.**, 2001). A maioria dos estudos porém, aborda a formação do palato secundário somente (**KERRIGAN et al.**, 2000, **BLAVIER et al.**, 2001, **BROWN et al.**, 2002). A presença das MMPs 2, 3, 7, 9 e 13 foi demonstrada durante fases específicas da palatogênese em camundongos (**MORRIS-WIMAN et al.**, 1999; 2000), e alguns autores sugerem que alterações no padrão de expressão das enzimas – possivelmente devido a alterações na estrutura dos genes – possam acarretar distúrbios no desenvolvimento normal do palato secundário (**IAMAROON et al.**, 1996b, **BLAVIER et al.**, 2001, **BROWN et al.**, 2002). Com relação ao palato primário, **IAMAROON et al.**, 1996a, demonstraram a expressão de MMP2 durante o desenvolvimento embrionário do complexo craniofacial de camundongos, com a expressão de MMP2 sendo intensamente localizada nas regiões em crescimento do palato primário concomitantemente com a localização de

fibronectina, indicando que alterações na expressão ou função desta enzima poderiam apresentar alguma relação com as anomalias craniofaciais.

A palatogênese é um mecanismo complexo e requer dois eventos principais: elevação e fusão dos processos palatinos. Existem algumas controvérsias com relação ao mecanismo de elevação dos processos palatinos, o qual poderia ocorrer devido a uma força intrínseca produzida pela pressão da hidratação da matriz extracelular rica em glicosaminoglicanas e ácido hialurônico, ou devido à proliferação, migração e/ou contração das células mesenquimais dos processos palatinos (MOXHAM, 2003). Com relação à fusão do palato, eventos de morte celular programada (MARTINEZ-ALVAREZ et al., 2000), transdiferenciação epitélio-mesenquimal (FITCHETT; HAY, 1989) e migração das células do epitélio medial para outras regiões no epitélio oral ou nasal (CARETTE; FERGUSON, 1992), são necessários para que o mesênquima do palato se torne confluyente e a fusão se complete. Acredita-se porém, que o desaparecimento do epitélio medial se dá principalmente através de transdiferenciação celular (KANG; SVOBODA, 2005). Tem sido demonstrado que explantes de tecidos do palato se fundem *in vitro* após a membrana basal ser estimulada e que as células do epitélio medial se diferenciam em células mesenquimais (FITCHETT; HAY, 1989, SHULER et al., 1992, KAARTINEN et al., 1997). Adicionalmente, a persistência de células do epitélio medial entre os processos palatinos corresponde à fissura palatina *in vivo* (KAARTINEN et al., 1997, TAYA et al., 1999). Confirmando a atuação das MMPs durante a palatogênese, possivelmente através do seu papel durante o desaparecimento do epitélio medial, BLAVIER et al., 2001, mostraram que a utilização de um inibidor sintético da atividade das MMPs previne a fusão do palato em camundongos. Surpreendentemente, apesar das evidências biológicas implicando genes de MMPs como apresentando algum envolvimento na etiologia da FL/P isolada, este é o primeiro estudo incluindo genes de MMPs como candidatos a FL/P. Até então, o único estudo genético mencionando um possível envolvimento dos genes de MMPs na etiologia da FL/P foi conduzido utilizando regiões candidatas sugeridas por estudos de varredura por todo o genoma, onde um locus contendo o gene MMP25 se mostrou associado a FL/P (BLANTON et al., 2004).

Nossos resultados revelaram uma forte associação entre o gene MMP3 e a FL/P. O gene MMP3 está localizado no cromossomo 11q22.3, próximo ao locus do gene PVRL1, o qual foi sugerido como um fator de risco associado a FL/P (SOZEN et al., 2001; AVILA et al., 2006). Níveis elevados e constantes de MMP3 foram

observados nos estágios finais da palatogênese, sugerindo que a presença da MMP3 neste determinado período poderia significar o estímulo necessário para o início do processo de transdiferenciação epitélio-mesenquimal no palato (**MANSELL et al.**, 2000). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a expressão de MMP3 na região subjacente ao epitélio medial após o contato dos processos palatinos na linha média (**BROWN et al.**, 2002), o que pode estar correlacionado à degradação da fibronectina presente no local. Uma outra observação importante surgiu do estudo de **LOCHTER et al.**, 1997, demonstrando que as MMPs podem induzir diretamente o processo de transdiferenciação epitélio-mesenquimal em células epiteliais da glândula mamária durante a progressão tumoral. A indução da MMP3 resultou na remoção das porções extracelulares de caderina-e, acarretando no desaparecimento desta proteína das junções aderentes e subsequente ausência de diferenciação fenotípica. Interessantemente, mutações no gene da caderina-e (CDH1) foram associadas a FL/P em indivíduos com câncer de estômago (**FREBOURG et al.**, 2006).

Os genes MMP1 e MMP9 não se mostraram associados a FL/P neste estudo. A enzima MMP1 é a collagenase mais abundante no organismo humano e seus principais substratos são os colágenos fibrilares (**DUNLEAVEY et al.**, 2000). O exato papel do colágeno nos processos palatinos ainda permanece desconhecido, todavia, **PRATT; KING**, 1972, demonstraram que a fissura palatina pode resultar da administração de substâncias que exercem efeitos específicos na formação da ligação cruzada do colágeno. Dessa forma, alterações na taxa de degradação do colágeno devido à expressão alterada de MMP1 poderiam estar relacionadas a FL/P. **HASSEL; ORKIN**, 1976, descreveram a existência de tufos colágenos de orientação definida próximos à membrana basal dos processos palatinos e relataram que a taxa de síntese de colágeno é mais elevada nos momentos que antecedem a elevação dos processos. De fato tem sido sugerido que estas fibras colágenas direcionam a força de elevação (**BULLIET; ZIMMERMAN**, 1985) e/ou contribuem para que os processos palatinos atinjam o volume necessário para sua reorientação (**BEN-KHAIAL; SHAM**, 1994). As fibras colágenas podem ser facilmente identificadas imunohistoquimicamente como volumosos tufos de colágenos localizados no centro de cada processo palatino (**FERGUSON**, 1988). Com relação a MMP9, pertencente à família das gelatinases e reconhecida pela sua habilidade em degradar colágenos desnaturados e em facilitar a migração celular (**ZHANG et al.**, 1999), não foi observada associação com a FL/P no presente estudo. Todavia, a expressão de MMP9 nos sítios de ossificação durante a

fusão do palato em camundongos (**BLAVIER et al.**, 2001) sugere algum envolvimento nas etapas finais da palatogênese.

6.3.2 TGFA

Foi sugerido que o cromossomo 2 pode apresentar um ou mais genes contribuindo para a ocorrência da FL/P (**MARAZITA et al.**, 2004). O gene TGFA está localizado no cromossomo 2p13 (**BRISSENDEN et al.**, 1985, **TRICOLI et al.**, 1986), e sua expressão foi detectada em diversos tecidos normais durante o período de desenvolvimento embrionário até a fase adulta em camundongos (**RAPOLEE et al.**, 1988). O TGFA é produzido por uma variedade de células, primariamente de origem ectodérmica, e pode interagir com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF) e induzir respostas durante o contato celular (**WILCOX; DERYNCK**, 1988). Durante o desenvolvimento craniofacial, o gene TGFA é expresso no epitélio medial no momento da fusão dos processos palatinos (**DIXON et al.**, 1991, **IAMAROON et al.**, 1996a, **MIETTINEN et al.**, 1999).

O TGFA foi o primeiro gene associado a FL/P isolada em um estudo caso-controle (**ARDINGER et al.**, 1989) e em estudos subseqüentes (**CHENEVIX-TRENCH et al.**, 1991; 1992, **HOLDER et al.**, 1992, **SASSANI et al.**, 1993, **STOLL et al.**, 1993, **FENG et al.**, 1994, **FIELD et al.**, 1994, **HWANG et al.** 1995, **JARA et al.**, 1995a; 1995b, **SHAW et al.**, 1996, **PRESCOTT et al.**, 2000, **TANABE et al.**, 2000, **BEATY et al.**, 2002; 2006, **MARAZITA et al.**, 2002, **YUAN et al.**, 2006, **MORKŪNIENĖ et al.**, 2007). Estes resultados foram replicados também em estudos com famílias de indivíduos afetados (**MAESTRI et al.**, 1997, **BEATY et al.**, 2001, **JUGESSUR et al.**, 2003, **SUAZO et al.**, 2005) e em duas meta-análises (**MITCHELL**, 1997, **IOANNIDIS et al.**, 2001). Todavia alguns estudos não detectaram qualquer correlação entre variações no gene TGFA e FL/P (**HECHT et al.**, 1991, **VINTINER et al.**, 1992, **BEATY et al.**, 1997; 2001, **LIDRAL et al.**, 1997, **WYSZYNSKI et al.**, 1997a, **SCAPOLI et al.**, 1998, **CHRISTENSEN et al.**, 1999, **ROMITTI et al.**, 1999, **MARAZITA et al.**, 2002, **PASSOS-BUENO et al.**, 2004). Os primeiros estudos sugeriram um efeito genético maior do que os estudos seguintes, e fatores como viés de interpretação e diversidade populacional podem explicar esta tendência dos primeiros estudos em superestimar a predisposição atribuída aos polimorfismos no TGFA.

Os resultados do presente estudo revelaram a associação do TGFA com ambas FP e FLP. Dos seis polimorfismos testados, foi possível observar a associação do marcador rs1058213 (C3827T) com FP incompleta e FP total (completa + incompleta) e do marcador rs2902345 com FL/P no subgrupo de indivíduos caucasianos, e do marcador rs930655 com FL/P na amostra completa. Ao desconsiderarmos os valores extremamente rígidos impostos pela correção de Bonferroni, cinco dos seis polimorfismos estudados mostraram tendências à associação com diversos subfenótipos de FL/P na análise da população total, e quatro na análise dos caucasianos, apresentando variações de acordo com o subfenótipo. É provável que estas variações se devam ao efeito da estratificação da população e reforçam a importância de se identificar qualquer mistura populacional nos estudos genéticos em geral. Entretanto, a análise de desequilíbrio entre os marcadores no TGFA revelou que o padrão de desequilíbrio se manteve o mesmo para a amostra completa e para os indivíduos caucasianos, e além disso, que os polimorfismos associados não estavam em desequilíbrio de ligação, indicando que não houve sobreposição do efeito dos polimorfismos associados.

Apesar de não termos observado nenhuma associação para o marcador rs2166975 (C3296T), este se mostrou associado à FP em uma população da Lituânia (**MORKŪNIENĖ et al.**, 2007). **SHIANG et al.**, 1993, e **FIELD et al.**, 1994, também encontraram evidências de associação entre TGFA e FP em caucasianos e em uma população da Índia respectivamente. Ambos os polimorfismos C3827T e C3296T foram originalmente descritos por **MACHIDA et al.**, 1999, e correspondem a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) nos nucleotídeos 3827 e 3296 do gene TGFA, respectivamente. Na posição 3296, o polimorfismo está localizado a 1 par de bases do códon terminal e acarreta uma mutação silenciosa (valina-valina). O polimorfismo C3827T está localizado na posição 3' UTR (*UTR – untranslated region*) do gene e não foi encontrado em nenhum indivíduo do grupo controle (**MACHIDA et al.**, 1999). Apesar do efeito biológico destas variações ainda não estar elucidado, estas UTRs, regiões altamente conservadas, podem exercer um papel importante na estabilidade da mensagem sinalizada pelo gene TGFA (**SIOMI; DREYFUSS**, 1997). A literatura atual apresenta inúmeras discrepâncias entre as frequências dos alelos obtidos para os polimorfismos C3296T e C3827T. Algumas populações (Melanésia e Papua) apresentam o alelo T como o mais comum para ambos os loci. Entretanto, o alelo C é o mais comum em ambos os loci nas demais populações que já foram estudadas,

incluindo a população utilizada neste estudo. Diversas populações ainda apresentam os alelos para ambos os loci em desequilíbrio de ligação (**VIEIRA**, 2006).

Com relação aos novos subfenótipos de FL/P baseados na presença de anomalias dentárias, as associações observadas para polimorfismos no TGFA não atingiram níveis significantes. Contudo, alguns resultados interessantes foram observados, com tendências a associação com subfenótipos de FL/P com agenesia dentária (incluindo FL/P bilateral “frustrada”), supranumerário e múltiplas anomalias, assim como FP com agenesia e com retenção de dentes permanentes.

A comparação de resultados entre estudos genéticos com TGFA tem se tornado difícil devido a variações no desenho de estudo e nos polimorfismos estudados, e na porcentagem de indivíduos com história familiar positiva; isto sugere ainda que muitas das variações observadas para as frequências dos alelos podem ser atribuídas ao acaso, devido ao número de amostras utilizadas nos estudos ser geralmente pequeno. Entretanto, apesar dos efeitos das variações genéticas estudadas, principalmente dos marcadores C3296T e C3827T, serem até então desconhecidas, as associações positivas de estudos anteriores e as observadas no presente estudo continuam a defender um papel para o TGFA na etiologia da FL/P.

6.3.3 IRF6

O gene IRF6 (1q32) foi identificado como fator etiológico da FL/P (**ZUCCHERO et al.**, 2004) após ter sido atribuído como responsável pela síndrome de Van der Woude (**KONDO et al.**, 2002), condição autossômica dominante e uma das formas sindrômicas mais comuns de FL/P, caracterizada pela presença de FL/P, depressões no lábio inferior e hipodontia (**LACOMBE et al.**, 1995). Variações no gene IRF6 foram consideradas responsáveis por 12% da contribuição genética para o risco de ocorrência da FL/P, e triplicam o risco de recorrência em famílias que já apresentam uma criança afetada (**ZUCCHERO et al.**, 2004).

Dos 36 polimorfismos testados por **ZUCCHERO et al.**, 2004, o polimorfismo V274I (rs2235371) revelou-se um dos mais significativos (senão o mais significativo) por ter demonstrado transmissão preferencial do alelo V em indivíduos de populações Asiáticas e Sul-Americanas, mas não em populações Européias. Este polimorfismo corresponde à substituição de uma isoleucina por um resíduo de valina no códon 274 em um domínio de ligação protéica denominado SMIR (*smad-interferon*

regulatory factor binding domain) (**EROSHKIN; MUSHEGIAN**, 1999), e é comum na população em geral (3% em populações Européias e 22% em populações Asiáticas) (**KONDO et al.**, 2002). O alelo I, o qual é considerado o “alelo protetor”, mostrou-se raro ou até mesmo ausente em indivíduos de origem Africana e Européia (**ZUCCHERO et al.**, 2004). Foi relatado que o alelo I é específico em humanos, o que sugere que ele foi selecionado para a evolução humana (**CHAKRAVARTI**, 2004). Recentemente, **SCHRIMTHONG et al.**, 2005, confirmaram a transmissão preferencial do alelo V em seu estudo em uma população Tailandesa. Além do V274I, a análise de outros polimorfismos mostrou um padrão de desequilíbrio de ligação entre o gene IRF6 e FL/P numa faixa se estendendo desde 40kbp na porção 5’ do IRF6 até 135kbp na porção 3’, e esta observação também incluiu as populações Americanas e Dinamarquesas estudadas (**ZUCCHERO et al.**, 2004).

O IRF6 também foi associado à FL/P em outros estudos. **SCAPOLI et al.**, 2005, e **BLANTON et al.**, 2005, testaram quatro dos 36 polimorfismos estudados por **ZUCCHERO et al.**, 2004, com exceção do V274I, e relataram resultados similares, incluindo a transmissão alterada dos alelos comuns nos indivíduos afetados, contribuindo para o fenótipo de FL/P observado nas populações da Itália e dos EUA, respectivamente. O motivo para não ter investigado o V274I foi que devido à ausência do alelo I nas suas populações, seria pouco provável que este polimorfismo pudesse estar diretamente implicado na etiologia da FL/P. **GHAASSIBÉ et al.**, 2005, também testaram dois polimorfismos associados previamente com FL/P nos estudos de **BLANTON et al.**, 2005, e **SCAPOLI et al.**, 2005, e confirmaram tais resultados.

Nós investigamos a associação de seis polimorfismos previamente estudados no gene IRF6 (**ZUCCHERO et al.**, 2004) incluindo alguns testados por outros autores (**BLANTON et al.**, 2005, **GHAASSIBÉ et al.**, 2005, **SCAPOLI et al.**, 2005). Nossos resultados revelaram associações interessantes com relação ao polimorfismo V274I na população total, o qual se mostrou significativamente associado a diversos subfenótipos de FL/P: FL/P total (FL/P + FP), FL/P completa e incompleta, FL/P unilateral completa e incompleta, FL/P unilateral esquerda e FL/P bilateral. Outros três polimorfismos (rs2013162, rs2073487 e rs4844880) também mostraram associação com a FL/P, e FL/P incompleta no caso do rs4844880, quando analisando a amostra total. Um destes polimorfismos (rs2013162), localizado na posição 5’UTR do gene, foi o único que também se mostrou associado a FL/P em populações de origem caucasiana (**BLANTON et al.**, 2005, **GHAASSIBÉ et al.**, 2005, **SCAPOLI et al.**, 2005).

Interessantemente, quando analisamos somente os indivíduos caucasianos da nossa amostra, os quais na sua maioria são descendentes de Europeus, atribuídos ao cruzamento étnico após a posse do Brasil por colonizadores Portugueses, a associação previamente encontrada para este polimorfismo na população total não atingiu níveis considerados significantes. Entretanto, se levarmos em conta os valores considerados significantes sem a correção de Bonferroni, cada um dos seis polimorfismos estudados no IRF6 mostraram associações com no mínimo dois subfenótipos de FL/P, com algumas das associações sendo as mesmas para a população total e caucasiana, e algumas associações sendo somente reveladas nos indivíduos caucasianos.

A frequência dos polimorfismos no IRF6 parece ser mais susceptível a mistura populacional. Assim como **ZUCCHERO et al.**, 2004, nós também observamos uma transmissão alterada dos alelos do V274I. Devido ao nosso grupo controle conter mais indivíduos de origem asiática do que o grupo teste, foi possível verificar a diferença na frequência dos alelos entre os dois grupos, com o alelo I sendo significativamente mais frequente no grupo controle composto por todos os 500 indivíduos. A análise dos indivíduos caucasianos da amostra não revelou associação alguma para este polimorfismo, o que sugere fortemente o efeito da estratificação populacional nesse resultado. Além disso, a diferença no padrão de desequilíbrio de ligação entre os marcadores observada quando comparando o grupo de fissurados na amostra total e no subgrupo de indivíduos caucasianos demonstra a influência da estratificação populacional nos resultados do IRF6.

A utilização de anomalias dentárias como subfenótipos adicionais de FL/P revelou uma forte associação entre o polimorfismo V274I e FP com retenção de dentes permanentes em indivíduos caucasianos. **VIEIRA et al.**, 2007, verificaram a associação deste polimorfismo em indivíduos com agenesia dentária em uma população brasileira, e a estimativa calculada para a contribuição deste polimorfismo para a agenesia dentária nesta população foi de 16.4%.

Considerando os resultados do presente estudo, o fato de que todos os estudos até a presente data têm reportado a presença de associação entre o IRF6 e a FL/P isolada nos indica que este é um gene importante com relação à etiologia de tal condição.

6.3.4 Cromossomo 6q

O cromossomo 6 tem sido alvo de inúmeras investigações com relação à etiologia da FL/P. Estudos anteriores relataram a associação de FL/P e aberrações cromossômicas envolvendo o cromossomo 6p (**KORMANN-BORTOLOTTI et al.**, 1990, **DONNAI et al.**, 1992) e o primeiro resultado positivo de estudos de ligação envolvendo a FL/P foi no locus 6p24-p25 (F13A) (**EIBERG et al.**, 1987). Entretanto, outros estudos independentes não observaram evidências de associação entre estes loci e FL/P (**HECHT et al.**, 1993, **VINTINER et al.**, 1993, **BLANTON et al.**, 1996).

Uma meta-análise dos resultados de treze estudos de varredura pelo genoma humano indicou quinze regiões cromossômicas que podem conter genes potencialmente envolvidos na etiologia da FL/P (**MARAZITA et al.**, 2004). Uma região específica no cromossomo 6q apresentou valores significantes, despertando a hipótese de que esta região, até então inexplorada nos estudos genéticos da FL/P, poderia de fato apresentar algum gene envolvido. Análises estatísticas aplicadas sobre os valores obtidos em estudos de ligação da FL/P com esta região cromossômica revelaram que a probabilidade de haver um gene associado à FL/P pode chegar a 90% (**GOVIL et al.**, 2006). Adicionalmente, outras investigações mostraram a associação do gene DDO (*D-aspartate oxidase*), localizado também no cromossomo 6q, com a FL/P (**MARAZITA et al.**, 2006).

Nossos resultados utilizando a população total demonstraram que, dos quatro genes encontrados na região investigada, três (PRSS35, SNAP91 e CYB5R4) mostraram associação com diversos subfenótipos de FL/P. Além disso, um outro polimorfismo (rs1325474) também mostrou associação com a FL/P. Nenhum gene mostrou associação com fissura palatina somente. Foi possível observar também um determinado padrão com relação aos subfenótipos de FL/P associados, além de FL/P total, FL/P completa, FL/P unilateral, FL/P esquerda, e FL/P bilateral mostraram associação com os genes PRSS35, SNAP91 e CYB5R4. A análise com os indivíduos caucasianos da amostra demonstrou que as associações encontradas para o gene PRSS35 e para o polimorfismo rs1325474 com a FL/P se mantiveram significantes e, adicionalmente um outro polimorfismo (rs614565) mostrou-se associado à FP. Considerando os resultados apresentando tendência à significância ($p \leq 0,05$), todos os 15 polimorfismos no cromossomo 6q mostraram-se associados a subfenótipos de FL/P na análise com a amostra completa, e um polimorfismo (rs624076) deixou de mostrar

associação na análise dos indivíduos caucasianos. Todavia, estas diferenças entre os resultados das análises com a amostra completa versus a amostra de caucasianos são possivelmente devidas à estratificação da população. Apesar destas diferenças nas análises, o padrão de desequilíbrio de ligação dos marcadores na amostra completa e nos indivíduos caucasianos se manteve praticamente idêntico e não parece ter sido afetado pela estratificação populacional.

Nenhum dos marcadores no gene PRSS35 ou os marcadores rs1325474 e rs614565, que se mostraram associados a FL/P, mostraram desequilíbrio de ligação entre si, o que sugere que cada um deles ou algum outro marcador que esteja em desequilíbrio de ligação com cada um deles possa estar contribuindo independentemente para a associação com a FL/P.

O gene PRSS35 (serino-protease 35, 6q14.2) codifica uma protease pertencente à família das serino-proteases, cuja sequência de amino ácidos é altamente conservada entre espécies relacionadas, como por exemplo, roedores e primatas. As serino-proteases (assim como as metaloproteinases da matriz) exercem funções de remodelação da matriz extracelular, modulam as atividades de fatores de crescimento e citocinas através da regulação da sua biodisponibilidade, e controlam os níveis de expressão de algumas proteínas. Dessa forma, as proteases são fundamentais para os processos de proliferação, diferenciação, migração e adesão celular, necessários para o desenvolvimento normal e homeostasia de diversos tecidos. Não existem informações sobre a expressão do PRSS35 durante o desenvolvimento craniofacial, mas a associação encontrada entre este gene e a FL/P pode sugerir que variações neste gene possam acarretar alterações que levem a ocorrência de FL/P.

As informações obtidas sobre os outros genes associados à FL/P neste estudo, porém, parecem pouco relevantes para tentar explicar o seu envolvimento com a etiologia da FL/P. A expressão do gene SNAP91 (*synaptosomal-associated protein*, 6q14.2) foi detectada no cérebro, testículos, coração e ovários (ISHIKAWA *et al.*, 1998) e a função da proteína codificada é facilitar a formação de vesículas sinápticas nos tecidos cerebrais. A redução desta proteína foi associada a doenças caracterizadas por disfunções no sistema nervoso central como a doença de Alzheimer (YAO *et al.*, 2003). Apesar da inexistência de relatos sobre a sua expressão durante o desenvolvimento da face, alguns relatos correlacionaram a FL/P com outras malformações, incluindo malformações do sistema nervoso central (GOLDSBERRY *et al.*, 2006) atribuídas a deformidades de redução do componente cerebral

(CALZOLARI et al., 2007). Com relação ao gene CYB5R4 (*cytochrome b5 reductase 4*, 6q14.2-14.3), este codifica para a enzima NADPH-reductase (ZHU et al., 1999), responsável pela redução dos níveis de stress oxidativo celular (XIE et al., 2003), o que poderia estar associado aos eventos pré-apoptose ou que antecedem o desaparecimento das células do epitélio medial previamente a fusão do palato.

6.4 Estudos genéticos utilizando anomalias dentárias como subfenótipos adicionais para FL/P

Os eventos mais críticos durante a formação dos dentes, lábios e palato ocorrem quase que concomitantemente. Proliferação e diferenciação celular, bem como apoptose, definem estas estruturas, enquanto que distúrbios nestes processos, por anormalidades ambientais e/ou genéticas, podem predispor a anomalias dentárias e FL/P. A ocorrência simultânea de FL/P e agenesia dentária sugere que estes dois fenótipos possam estar geneticamente associados. O objetivo de utilizar observações sobre o desenvolvimento dentário para subclassificar subfenótipos de FL/P visava identificar grupos que pudessem apresentar contribuições genéticas específicas e auxiliar na identificação de genes envolvidos na etiologia de ambas as condições.

A mutação mais intrigante relacionando a presença de fissuras e agenesia dentária foi previamente descrita por VAN DEN BOOGARD et al., 2000, no gene MSX1. A família afetada apresentava uma combinação de agenesia dentária, fissura labial e palatina e fissura palatina somente. Este relato apresenta a evidência mais convincente de que alguns mecanismos são os mesmos para o desenvolvimento dos dentes, lábios e palato.

A associação mais significativa desta análise foi a de um polimorfismo no gene IRF6 (rs2235371, VAL274I) e FP completa com retenção de dentes permanentes em indivíduos caucasianos. Entretanto, diversos polimorfismos apresentaram tendências à associação (consideradas sem a correção de Bonferroni) com os novos subfenótipos, em ambas as análises da população total e de caucasianos somente. Por exemplo, os subfenótipos incluindo agenesia dentária mostraram associação com os 6 polimorfismos no gene TGFA, 4 polimorfismos no gene IRF6 e 4 no cromossomo 6q; a presença de FL/P bilateral “frustrada” (FL/P unilateral com agenesia ou microdontia do incisivo lateral no lado oposto da fissura) mostrou associação com 3 polimorfismos no gene TGFA e 2 no cromossomo 6q, embora nenhuma associação foi encontrada para este

subfenótipo e o gene IRF6. O gene IRF6 foi recentemente associado à agenesia dentária (VIEIRA et al., 2007) onde ficou demonstrado que o alelo comum do polimorfismo V274I foi sempre transmitido aos indivíduos apresentando agenesia dentária, e a contribuição estimada deste polimorfismo à condição foi de 16,4%. Os autores relataram ainda ter observado uma associação preferencial do alelo comum do V274I em famílias caracterizadas pela agenesia de pré-molares.

Para os subfenótipos apresentando dentes supranumerários, também foram observadas tendências à associação com 4 polimorfismos no gene TGFA, 3 no gene IRF6 e 3 no cromossomo 6q. Para os subfenótipos com múltiplas anomalias dentárias, tendências à associação foram observadas para 3 polimorfismos em TGFA e IRF6, e 4 no cromossomo 6q. A presença de FP completa com retenção de dentes permanentes também mostrou tendência à associação com os genes TGFA e outro polimorfismo no IRF6, e finalmente, a presença de FP incompleta com giroversão/lateroversão mostrou alguma associação com polimorfismos no gene IRF6 e no cromossomo 6q.

Apesar da ausência de estudos similares para comparação, nossos resultados não são suficientes para sugerir que os mesmos genes associados a FL/P possam ser responsáveis pela ocorrência de anomalias dentárias. Entretanto, a associação de alguns destes polimorfismos com subfenótipos específicos de FL/P sugere que as anomalias dentárias podem representar uma extensão fenotípica da FL/P e merecem ser incluídas na descrição do fenótipo dos indivíduos com FL/P compondo a amostra de estudos genéticos.

6.5 Análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos testados

O padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados foi similar para os polimorfismos no gene TGFA e cromossomo 6q. Entretanto, para o gene IRF6, o inverso foi observado, com o grupo controle apresentando uma maior incidência de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados. Isto confirma o fato de que populações distintas apresentam frequências diferentes dos alelos de um determinado polimorfismo e justifica a nossa iniciativa em interpretar os dados moleculares deste estudo considerando a amostra completa e o subgrupo de indivíduos caucasianos. Com relação ao gene IRF6 especificamente, estudos prévios relataram uma diferença significativa entre as frequências observadas para determinados alelos, como,

por exemplo, no polimorfismo V274I, em indivíduos caucasianos e asiáticos (ZUCCHERO *et al.*, 2004), e isto também pode ser observado nos nossos resultados, subseqüentemente demonstrando a importância de se considerar a composição genética em estudos com populações diferentes.

Com relação à população brasileira, estudos relacionados às suas origens genéticas sugerem um padrão de acasalamento preferencial envolvendo homens imigrantes e mulheres nativas (ALVES-SILVA *et al.*, 2000). Adicionalmente, VIEIRA *et al.*, 2002, relataram diferenças significativas nas freqüências dos haplótipos ancestrais em indivíduos com FL/P e controles, onde os casos apresentaram uma maior freqüência de um alelo específico para populações nativas Americanas e uma menor freqüência de alelos específicos para populações Africanas. Estes resultados estão de acordo com os dados epidemiológicos existentes, indicando que indivíduos de origens indígenas e Asiáticas apresentam uma maior incidência de FL/P, indivíduos de origem caucasiana apresentam incidência intermediária e indivíduos de origem africana apresentam baixa incidência (VANDERAS, 1987). Mediante estas informações, é possível interpretarmos os nossos resultados e compará-los aos resultados de outros estudos, da mesma forma que acreditamos que o nosso estudo possa servir como base de comparação para outros estudos genéticos envolvendo indivíduos brasileiros ou de outras populações.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Baseado nos objetivos propostos e nos resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

1. As fissuras labiais com ou sem fissuras palatinas apresentam uma ampla variedade de subfenótipos de acordo com lado e extensão da fissura e de acordo com as anomalias dentárias apresentadas.
2. Os genes MMP3, TGFA e IRF6 mostraram-se associados a FL/P e seus subfenótipos na população estudada.
3. Polimorfismos em genes localizados no cromossomo 6q (PRSS35, SNAP91 e CYB5R4) mostraram-se associados a FL/P e seus subfenótipos na população estudada.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados do presente estudo reforçam a natureza complexa da FL/P e o papel de genes importantes como TGFA e IRF6 na sua etiologia, e ainda, demonstram pela primeira vez a associação de genes até então nunca testados com relação a FL/P.

As perspectivas futuras do nosso estudo incluem:

1. Verificar se a associação encontrada para o gene MMP3 permanece significativa utilizando uma amostra maior e incluir outros genes de MMPs nas análises genéticas.
2. Testar outros polimorfismos em genes do cromossomo 6q.
3. Testar genes associados em outras populações que não tenham sido estudados na população brasileira.
4. Realizar ensaios funcionais para verificar se as variantes genéticas associadas realmente exercem alguma função biológica que possam acarretar FL/P.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética

Ofício nº 265/2004-UEP-CEP

Bauru, 14 de outubro de 2004.

Prezado(a) Senhor(a)

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "Investigação de polimorfismos em genes de metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) na ocorrência de fissura labial e/ou palatina em indivíduos não síndrômicos", de autoria de ARIADNE MACHADO GONÇALVES LETRA desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de **25 de agosto de 2004** o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes para início da pesquisa. Solicitamos a V.Sª a gentileza de comunicar o parecer à pesquisadora.

A pesquisadora fica responsável pela entrega na Unidade de Ensino e Pesquisa dos relatórios semestrais.

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

Atenciosamente

A handwritten signature in black ink, which appears to read "R. Loureiro Maringoni", is positioned above the printed name of the signatory.

PROF. DR. ROBERTO LOUREIRO MARINGONI

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP

Ilmo(a) Sr(a)

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Departamento de Ciências Biológicas – FOB/USP

ANEXO 2 – Carta de Informação ao Sujeito da Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O objetivo do presente estudo: “Investigação de polimorfismo em genes de metaloproteinases (mmps) -2 e -9 na ocorrência de fissura labial/palatina em indivíduos não síndrômicos” de autoria de Ariadne Machado Gonçalves Letra, será investigar possíveis variações genéticas (polimorfismos) em alguns genes do organismo que possam ter envolvimento na formação da fissura labial/palatina em indivíduos não síndrômicos. Espera-se, no caso da associação entre possíveis polimorfismos encontrados ao desenvolvimento da fissura labial/palatina, poder prever procedimentos de diagnóstico avançados.

Não haverá desconfortos, riscos ou custos para os participantes da pesquisa. Os procedimentos para coleta das amostras de material genético (DNA) dos participantes constarão de:

- bochecho com solução de água + dextrose (água com açúcar) a 3% durante 1 minuto; e coleta do bochecho em um vidro previamente esterilizado.
- coleta de amostras de sangue colhido por técnicos do hospital.

Os participantes receberão respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Os participantes serão sempre atualizados, com informações obtidas durante o estudo, mesmo que possam afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. A participação é voluntária, podendo o participante a qualquer momento retirar este consentimento livre e esclarecido e deixar de participar desta pesquisa, ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica). O tratamento no HRAC não será comprometido pela decisão de desistência de participação na pesquisa. Em casos de danos ao indivíduo diretamente causados pela pesquisa, com nexo causal comprovado, o participante terá direito a tratamento médico e indenização por parte da Instituição.

Caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, o participante poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC/USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20, na Unidade de Ensino e Pesquisa ou pelo telefone (14) 3235-8421.

Os indivíduos (ou seus responsáveis) que, após a leitura desta carta, concordarem em participar do estudo, deverão assinar o termo de consentimento, e preencher uma ficha com os dados pessoais e história médica e familiar.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
portador de RG nº _____,
residente à Rua (Av.) _____, Nº
_____, na cidade de _____ Estado _____, (responsável
pelo (a) menor _____* matriculado no
HRAC com o Nº _____, concordo em participar na (autorizo sua
participação na) pesquisa de título: “INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES
DE METALOPROTEINASES 2 E 9 EM PACIENTES NÃO SINDRÔMICOS PORTADORES
DE FISSURA LABIAL/PALATINA”, realizada por Ariadne Machado Gonçalves Letra, CRO-
RJ 22102-7, sob orientação do Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, RG Nº 10593401.

Bauru, ____/____/____.

Assinatura do paciente (responsável)

* em caso de menor de idade

Nome do responsável: _____

Nome do pesquisador responsável: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Endereço institucional: Al. Dr. Octávio Pinheiro Brizolla, 9-75 - Departamento de Bioquímica,
FOB/USP.

Cidade: Bauru

Estado: SP

CEP: 18012-901

Telefone: 14 3235-8246

ANEXO 3 – Protocolo para Extração de DNA

- Descongelar amostras de saliva
- Adicionar 100ng/mL de Proteinase K e incubar em banho-maria a 56° *overnight*
- Colocar 500µL de solução de acetato de amônio a 10%
- Agitar manualmente durante 5 minutos
- Centrifugar por 15 minutos em velocidade alta (aproximadamente 15000 rpm)
- Dividir o sobrenadante em dois tubos eppendorfs
- Adicionar 540µL de álcool isopropílico gelado
- Agitar vigorosamente
- Verificar formação de “nuvem de DNA”
- Deixar descansar na geladeira por 2 horas
- Centrifugar durante 20 minutos
- Descartar sobrenadante com cuidado para não deslocar o pellet de células
- Adicionar 1mL de álcool 70° gelado
- Centrifugar por 5 minutos
- Descartar sobrenadante
- Deixar o tubo aberto para evaporar o excesso de álcool ($\pm$ 4 a 5 horas)
- Ressuspender o pellet de células em 50 µL de água deionizada autoclavada
- Congelar amostra de DNA

ANEXO 4 – Protocolo para confecção de gel de poliacrilamida não-denaturante a 10% para análise por eletroforese

6 mL de solução de acrilamida a 30%

3.6 mL de TBE 5X

7 mL de água deionizada autoclavada

117 μ L de APS

9 μ L de TEMED

ANEXO 5 – Protocolo de impregnação pela prata (SANGUINETTI et al. 1994)

- Após a eletroforese, remover o gel com cuidado e colocá-lo em recipiente contendo solução fixadora (10% etanol, 0.5% ácido acético)
- Agitar em mesa agitadora durante 10 minutos
- Descartar solução fixadora
- Adicionar solução de prata (10% etanol, 0.5% ácido acético, 0.5% nitrato de prata, 89.5% água deionizada autoclavada)
- Agitar durante 40 minutos
- Descartar solução e lavar com água para remover excesso de prata
- Adicionar solução reveladora (3% NaOH em água, 0.5% formaldeído)
- Agitar durante alguns minutos até visualização das bandas
- Descartar solução
- Adicionar solução de contração (50% metanol, 10% ácido acético, 40% água deionizada autoclavada)

ANEXO 6. Anomalias Dentárias como Subfenótipos Adicionais para FL/P (Seção 5.2.3)

Diferenças entre as frequências das anomalias dentárias apresentadas por indivíduos compondo cada subfenótipo de FL/P e controles ($p \leq 0.0002$ indica diferença estatística significativa).

1. FP completa x Controles

Anomalia dentária	FP completa (n=21)	Controle (n=500)	P
Agenesia	4	36	0.0457
Microdontia	0	1	0.8374
Supranumerário	0	1	0.8374
Giroversão/lateroversão	0	2	0.7715
Retenção	2	1	0.00001
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	0	0	----
Múltiplas anomalias	2	1	0.00001
Total	8	42	0.00001

2. FP incompleta x Controle

Anomalia dentária	FP incompleta (n=45)	Controle (n=500)	P
Agenesia	10	36	0.0005
Microdontia	0	1	0.7639
Supranumerário	1	1	0.0316
Giroversão/lateroversão	4	2	0.00001
Retenção	0	1	0.7639
Anomalia de forma	1	0	0.0008
Transposição	0	0	----
Múltiplas anomalias	0	1	0.7639
Total	16	42	0.00001

3. FP total (completa + incompleta) x Controle

Anomalia dentária	FP (n=66)	Controle (n=500)	P
Agenesia	14	36	0.0001
Microdontia	0	1	0.7161
Supranumerário	1	1	0.0905
Giroversão/lateroversão	4	2	0.00001
Retenção	2	1	0.0029
Anomalia de forma	1	0	0.0058
Transposição	0	0	----
Múltiplas anomalias	2	1	0.0029
Total	24	42	0.00001

4. FL/P completa (unil + bilat) x Controle

Anomalia dentária	FL/P completa (n=300)	Controle (n=500)	P
Agenesia	90	36	0.00001
Microdontia	7	1	0.0033
Supranumerário	16	1	0.00001
Giroversão/lateroversão	30	2	0.00001
Retenção	3	1	0.1204
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	5	0	0.0037
Múltiplas anomalias	17	1	0.00001
Total	168	42	0.00001

5. FL/P incompleta (unilateral + bilateral) x Controle

Anomalia dentária	FL/P Inc (n=104)	Controle (n=500)	P
Agenesia	23	36	0.00001
Microdontia	1	1	0.2187
Supranumerário	4	1	0.0001
Giro/lateroversão	12	2	0.00001
Retenção	1	1	0.2187
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	2	0	0.0018
Múltiplas anomalias	3	1	0.0021
Total	44	42	0.0000001

6. FL/P unilateral x Controle

Anomalia dentária	FL/P Uni (n=250)	Controle (n=500)	P
Agenesia	71	36	0.00001
Microdontia	6	1	0.0031
Supranumerário	16	1	0.00001
Giroversão/lateroversão	27	2	0.00001
Retenção	3	1	0.0763
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	3	0	0.0141
Múltiplas anomalias	16	1	0.00001
Total	139	42	0.00001

7. FL/P completa unilateral x Controle

Anomalia dentária	FL/P comp uni (n=175)	Controle (n=500)	P
Agenesia	57	36	0.00001
Microdontia	5	1	0.0012
Supranumerário	14	1	0.00001
Giroversão/lateroversão	19	2	0.00001
Retenção	2	1	0.1065
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	1	0	0.0907
Múltiplas anomalias	13	1	0.00001
Total	111	42	0.00001

8. FL/P incompleta unilateral x Controle

Anomalia dentária	FL/P inc uni (n=75)	Controle (n=500)	P
Agenesia	14	36	0.0010
Microdontia	1	1	0.1267
Supranumerário	2	1	0.0064
Giroversão/lateroversão	8	2	0.00001
Retenção	1	1	0.1267
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	2	0	0.0003
Múltiplas anomalias	3	1	0.0002
Total	31	42	0.00001

9. FL/P unilateral direita x Controle

Anomalia dentária	FL/P uni dir (n=78)	Controle (n=500)	P
Agenesia	28	36	0.00001
Microdontia	2	1	0.0068
Supranumerário	3	1	0.0003
Giroversão/lateroversão	9	2	0.00001
Retenção	1	1	0.1301
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	0	0	----
Múltiplas anomalias	2	1	0.0068
Total	45	42	0.00001

10. FL/P unilateral direita completa x Controle

Anomalia dentária	FL/P uni dir comp (n=54)	Controle (n=500)	P
Agenesia	23	36	0.00001
Microdontia	2	1	0.0008
Supranumerário	3	1	0.00001
Giroversão/lateroversão	6	2	0.00001
Retenção	0	1	0.7422
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	0	0	----
Múltiplas anomalias	2	1	0.0008
Total	36	42	0.00001

11. FL/P unilateral direita incompleta x Controle

Anomalia dentária	FL/P uni dir inc (n=16)	Controle (n=500)	P
Agenesia	3	36	0.0853
Microdontia	0	1	0.8578
Supranumerário	0	1	0.8578
Giroversão/lateroversão	3	2	0.00001
Retenção	0	1	0.8578
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	0	0	----
Múltiplas anomalias	0	1	0.8578
Total	6	42	0.00001

12. FL/P unil direita incomp + FP x Controle

Anomalia dentária	FL/P unil dir inc + FP (n=8)	Controle (n=500)	P
Agenesia	2	36	0.0576
Microdontia	0	1	0.8992
Supranumerário	0	1	0.8992
Giroversão/lateroversão	0	2	0.8577
Retenção	1	1	0.8578
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	0	0	----
Múltiplas anomalias	0	1	0.8992
Total	3	42	0.0040

13. FL/P unilateral esquerda x Controle

Anomalia dentária	FL/P unilateral esquerda (n=172)	Controle (n=500)	P
Agenesia	43	36	0.00001
Microdontia	4	1	0.0051
Supranumerário	13	1	0.00001
Giroversão/lateroversão	18	2	0.00001
Retenção	2	1	0.1023
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	3	0	0.0030
Múltiplas anomalias	14	1	0.00001
Total	97	42	0.00001

14. FL/P unilateral esquerda completa x Controle

Anomalia dentária	FL/P unilateral esquerda completa (n=121)	Controle (n=500)	P
Agenesia	34	36	0.00001
Microdontia	3	1	0.0051
Supranumerário	11	1	0.00001
Giroversão/lateroversão	13	2	0.00001
Retenção	2	1	0.0386
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	1	0	0.0419
Múltiplas anomalias	11	1	0.00001
Total	75	42	0.00001

15. FL/P unilateral esquerda incompleta x Controle

Anomalia dentária	FL/P uni esq inc (n=46)	Controles (n=500)	P
Agenesia	9	36	0.0035
Microdontia	1	1	0.0339
Supranumerário	2	1	0.0002
Giroversão/lateroversão	5	2	0.00001
Retenção	0	1	0.7614
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	2	0	0.00001
Múltiplas anomalias	3	1	0.00001
Total	22	42	0.00001

16. FL/P uni esq incom+ FP x Controle

Anomalia dentária	FL/P uni esq inc + FP (n=5)	Controles (n=500)	P
Agenesia	0	36	0.5335
Microdontia	0	1	0.9202
Supranumerário	0	1	0.9202
Giroversão/lateroversão	0	2	0.8873
Retenção	0	1	0.9202
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	0	0	----
Múltiplas anomalias	0	1	0.9202
Total	0	42	0.4985

17. FL/P bilateral x Controle

Anomalia dentária	FL/P bilateral (n=154)	Controle (n=500)	P
Agenesia	42	36	0.00001
Microdontia	2	1	0.0724
Supranumerário	4	1	0.0028
Giroversão/lateroversão	15	2	0.00001
Retenção	1	1	0.3772
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	4	0	0.0003
Múltiplas anomalias	4	1	0.0028
Total	72	42	0.00001

18. FL/P bilateral completa x Controle

Anomalia dentária	FL/P bil comp (n=125)	Controle (n=500)	P
Agenesia	33	36	0.00001
Microdontia	2	1	0.0460
Supranumerário	2	1	0.0460
Giroversão/lateroversão	11	2	0.00001
Retenção	1	1	0.2976
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	4	0	0.00001
Múltiplas anomalias	4	1	0.0008
Total	57	42	0.0000001

19. FL/P bilateral incompleta x Controle

Anomalia dentária	FL/P bil inc (n=8)	Controle (n=500)	P
Agenesia	1	36	0.5671
Microdontia	0	1	0.8992
Supranumerário	1	1	0.00001
Giroversão/lateroversão	1	2	0.00001
Retenção	0	1	0.8992
Anomalia de forma	0	0	---
Transposição	0	0	---
Múltiplas anomalias	0	1	0.8992
Total	3	42	0.0040

20. FL/P bilateral incompleta + FP x Controle

Anomalia dentária	FL/P bil inc + FP (n=17)	Controle (n=500)	P
Agenesia	7	36	0.00001
Microdontia	0	1	0.8535
Supranumerário	1	1	0.0002
Giroversão/lateroversão	3	2	0.00001
Retenção	0	1	0.8535
Anomalia de forma	0	0	---
Transposição	0	0	---
Múltiplas anomalias	0	1	0.8535
Total	11	42	0.00001

21. FL/P bilateral incompleta mista x Controle

Anomalia dentária	FL/P bil inc mista (n=4)	Controle (n=500)	P
Agenesia	1	36	0.1739
Microdontia	0	1	0.9286
Supranumerário	0	1	0.9286
Giroversão/lateroversão	0	2	0.8991
Retenção	0	1	0.9286
Anomalia de forma	0	0	---
Transposição	0	0	---
Múltiplas anomalias	0	1	0.8991
Total	1	42	0.2365

22. FL/P total x Controle

Anomalia dentária	FL/P total (n=406)	Controle (n=500)	P
Agenesia	113	36	0.00001
Microdontia	8	1	0.0075
Supranumerário	20	1	0.00001
Giroversão/lateroversão	42	2	0.00001
Retenção	4	1	0.1126
Anomalia de forma	0	0	----
Transposição	7	0	0.0032
Múltiplas anomalias	20	1	0.00001
Total	217	42	0.00001

ANEXO 7. Estudos genéticos de associação com a FL/P (Seção 5.3)

Frequências obtidas para genótipos e alelos referentes a cada polimorfismo estudado:

1. TGFA – amostra completa
2. TGFA – caucasianos
3. IRF6 – amostra completa
4. IRF6 - caucasianos
5. Cromossomo 6q – amostra completa
6. Cromossomo 6q – caucasianos

rs1058213 (C3827T)

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	20	0	0	20	40	0	40	0.39/0.01
Incompleta	45	42	0	3	45	84	6	90	0.58/0.84
Total FP	66	62	0	3	65	124	6	130	0.39/0.27
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	259	3	12	274	521	27	548	0.26/0.08
Incompleta	104	93	0	6	99	186	12	198	0.30/0.56
Unilateral	250	218	3	11	232	439	25	464	0.46/0.19
Completa	175	148	3	8	159	299	19	318	0.81/0.44
Incompleta	75	70	0	3	73	140	6	146	0.31/0.16
Unilateral Direita	78	71	0	1	72	142	2	144	0.05/0.008
Completa	54	50	0	0	50	100	0	100	0.01/0.0001
Incompleta	16	14	0	1	15	28	2	30	0.70/0.90
Incompleta + FP	8	7	0	0	7	14	0	14	0.54/0.15
Unilateral Esquerda	172	147	3	10	160	297	23	320	0.94/0.98
Completa	121	98	3	8	109	199	19	218	0.88/0.45
Incompleta	46	44	0	2	46	88	4	92	0.30/0.30
Incompleta + FP	5	5	0	0	5	10	0	10	0.79/0.38
Bilateral	154	134	0	7	141	268	14	282	0.04/0.18
Completa	125	111	0	4	115	222	8	230	0.04/0.04
Incompleta	8	7	0	1	8	14	2	16	0.64/0.42
Incompleta + FP	17	13	0	1	14	26	2	28	0.71/0.98
Incompleta Mista	4	3	0	1	4	6	2	8	0.29/0.05
FL direita + FL/P esquerda	3	3	0	0	3	6	0	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	2	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	406	353	3	18	374	709	39	748	0.14/0.07
Tipo/lado desconhecido	28	26	0	0	26	52	0	52	----
Total fissurados	500	441	3	21	465	885	45	930	0.05/0.02
Sem fissura (Controles)	500	427	11	29	467	865	69	934	----

rs2166975 (C3296T)

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	15	4	1	20	34	6	40	0.96/0.90
Incompleta	45	31	11	3	45	73	17	90	0.48/0.24
Total FP	66	46	15	4	65	107	23	130	0.54/0.30
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	188	59	23	270	435	105	540	0.07/0.009
Incompleta	104	76	19	6	101	171	31	202	0.94/0.70
Unilateral	250	163	44	22	229	370	88	458	0.09/0.01
Completa	175	106	32	19	157	244	70	314	0.01/0.0009
Incompleta	75	57	12	3	72	126	18	144	0.86/0.55
Unilateral Direita	78	54	14	5	73	122	24	146	0.83/0.49
Completa	54	37	9	4	50	83	17	100	0.76/0.46
Incompleta	16	10	4	1	15	24	6	30	0.64/0.38
Incompleta + FP	8	7	1	0	8	15	1	16	0.57/0.35
Unilateral Esquerda	172	109	30	17	156	248	64	312	0.05/0.009
Completa	121	69	23	15	107	161	53	214	0.003/0.0001
Incompleta	46	35	7	2	44	77	11	88	0.90/0.64
Incompleta + FP	5	5	0	0	5	10	0	10	0.26/0.07
Bilateral	154	101	34	7	142	236	48	284	0.25/0.28
Completa	125	82	27	4	113	191	35	226	0.25/0.65
Incompleta	8	5	2	1	8	12	4	16	0.56/0.22
Incompleta + FP	17	10	1	2	13	21	5	26	0.23/0.48
Incompleta Mista	4	4	4	0	8	12	4	16	0.05/0.22
FL direita + FL/P esquerda	3	0	3	0	3	3	3	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	4	1	0	5	9	1	10	----
Fissura Mediana	2	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	406	265	78	33	376	608	144	752	0.06/0.007
Tipo/lado desconhecido	28	19	5	3	27	43	11	54	----
Total fissurados	500	330	98	36	464	758	170	928	0.11/0.01
Sem fissura (Controles)	500	365	84	26	475	814	136	950	----

rs377122

	N	Genótipos			Alelos				
Subfenótipo		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	3	12	5	20	18	22	40	0.74/0.65
Incompleta	45	7	29	9	45	43	47	90	0.35/0.87
Total FP	66	10	41	14	65	61	69	130	0.30/0.71
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	57	133	88	278	247	309	556	0.11/0.11
Incompleta	104	12	53	36	101	77	125	202	0.02/0.006
Unilateral	250	38	115	81	234	191	277	468	0.01/0.005
Completa	175	32	73	56	161	137	185	322	0.04/0.05
Incompleta	75	6	42	25	73	54	92	146	0.01/0.008
Unilateral Direita	78	13	36	25	74	62	86	148	0.23/0.12
Completa	54	10	23	18	51	43	59	102	0.25/0.21
Incompleta	16	1	9	5	15	11	19	30	0.34/0.19
Incompleta + FP	8	2	4	2	8	8	8	16	0.97/0.91
Unilateral Esquerda	172	25	79	56	160	129	191	320	0.02/0.009
Completa	121	22	50	38	110	94	126	220	0.10/0.11
Incompleta	46	3	26	16	45	32	58	90	0.03/0.01
Incompleta + FP	5	0	3	2	5	3	7	10	0.45/0.24
Bilateral	154	31	71	43	145	133	157	290	0.47/0.40
Completa	125	25	60	32	117	110	124	234	0.84/0.65
Incompleta	8	1	2	5	8	4	12	16	0.05/0.06
Incompleta + FP	17	5	7	4	16	17	15	32	0.65/0.61
Incompleta Mista	4	0	2	2	4	2	6	8	0.38/0.18
FL direita + FL/P esquerda	3	0	1	2	3	1	5	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	69	186	124	379	324	434	758	0.03/0.01
Tipo/lado desconhecido	28	10	12	3	25	32	18	50	----
Total fissurados	500	89	239	142	470	417	523	940	0.14/0.06
Sem fissura (Controles)	500	105	255	118	478	465	491	956	----

rs2902345

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	5	9	6	20	19	21	40	0.46/0.23
Incompleta	45	11	29	4	44	51	37	88	0.05/0.86
Total FP	66	16	38	10	64	70	58	128	0.18/0.61
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	87	126	55	268	300	236	536	0.92/0.68
Incompleta	104	32	46	20	98	110	86	196	0.97/0.81
Unilateral	250	80	102	48	230	262	198	460	0.75/0.97
Completa	175	57	67	34	158	181	135	316	0.56/0.94
Incompleta	75	23	35	14	72	81	63	144	0.97/0.85
Unilateral Direita	78	22	39	12	73	83	63	146	0.61/0.96
Completa	54	15	26	9	50	56	44	100	0.81/0.84
Incompleta	16	6	8	1	15	20	10	30	0.46/0.29
Incompleta + FP	8	1	5	2	8	7	9	16	0.46/0.28
Unilateral Esquerda	172	58	63	36	157	179	135	314	0.28/0.99
Completa	121	42	41	25	108	125	91	216	0.21/0.82
Incompleta	46	14	21	9	44	49	39	88	0.97/0.80
Incompleta + FP	5	2	1	2	5	5	5	10	0.38/0.65
Bilateral	154	46	70	25	141	162	120	282	0.86/0.90
Completa	125	37	59	19	115	133	97	230	0.69/0.82
Incompleta	8	4	3	1	8	11	5	16	0.60/0.34
Incompleta + FP	17	4	6	4	14	14	14	28	0.68/0.45
Incompleta Mista	4	1	2	1	4	4	4	8	0.92/0.68
FL direita + FL/P esquerda	3	1	1	1	3	3	3	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	406	120	172	75	367	412	322	734	0.92/0.70
Tipo/lado desconhecido	28	8	15	3	26	31	21	52	----
Total fissurados	500	144	225	88	457	513	401	914	0.80/0.69
Sem fissura (Controles)	500	159	225	92	476	543	409	952	----

rs1523305

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	21	6	9	5	20	21	19	40	0.74/0.52
Incompleta	45	5	28	11	44	38	50	88	0.13/0.45
Total FP	66	11	37	16	64	59	69	128	0.43/0.78
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	62	132	81	275	256	294	550	0.88/0.75
Incompleta	104	26	46	24	96	98	94	192	0.61/0.35
Unilateral	250	60	105	63	228	225	231	456	0.52/0.48
Completa	175	41	71	46	158	153	163	316	0.56/0.74
Incompleta	75	19	34	17	70	72	68	140	0.65/0.36
Unilateral Direita	78	21	37	15	73	79	67	146	0.31/0.12
Completa	54	17	24	10	51	58	44	102	0.17/0.06
Incompleta	16	3	8	4	15	14	16	30	0.95/0.94
Incompleta + FP	8	1	5	1	7	7	7	14	0.51/0.84
Unilateral Esquerda	172	39	68	48	155	146	164	310	0.47/0.93
Completa	121	24	47	36	107	95	119	214	0.45/0.43
Incompleta	46	13	18	12	43	44	42	86	0.48/0.49
Incompleta + FP	5	2	3	0	5	7	3	10	0.34/0.15
Bilateral	154	28	73	42	143	129	157	286	0.74/0.50
Completa	125	21	61	35	117	103	131	234	0.55/0.35
Incompleta	8	1	3	4	8	5	11	16	0.37/0.20
Incompleta + FP	17	5	7	2	14	17	11	28	0.38/0.16
Incompleta Mista	4	1	2	1	4	4	4	8	0.99/0.88
FL direita + FL/P esquerda	3	1	1	1	3	3	3	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	88	178	105	371	354	388	742	0.88/0.88
Tipo/lado desconhecido	28	5	16	6	27	26	28	54	----
Total fissurados	500	104	231	128	463	439	487	926	0.99/0.98
Sem fissura (Controles)	500	107	235	132	474	449	499	948	----

rs930655

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G		
Fissura Palatina									
Completa	21	5	10	5	20	20	20	40	0.62/0.34
Incompleta	45	3	25	17	45	31	59	90	0.16/0.14
Total FP	66	8	35	22	65	51	79	130	0.54/0.49
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	52	116	111	279	220	338	558	0.09/0.25
Incompleta	104	27	45	31	103	99	107	206	0.13/0.13
Unilateral	250	51	90	95	236	192	280	472	0.01/0.53
Completa	175	30	60	70	160	120	200	320	0.02/0.12
Incompleta	75	21	30	25	76	72	80	152	0.09/0.25
Unilateral Direita	78	14	26	34	74	54	94	148	0.05/0.17
Completa	54	8	21	22	51	37	65	102	0.33/0.23
Incompleta	16	2	4	9	15	8	22	30	0.08/0.08
Incompleta + FP	8	4	1	3	8	9	7	16	0.03/0.26
Unilateral Esquerda	172	35	64	61	160	134	186	320	0.11/0.87
Completa	121	22	39	48	109	83	135	218	0.03/0.24
Incompleta	46	11	23	12	46	45	47	92	0.47/0.22
Incompleta + FP	5	2	2	1	5	6	4	10	0.42/0.26
Bilateral	154	28	71	46	145	127	163	290	0.90/0.67
Completa	125	22	56	41	119	100	138	238	0.90/0.91
Incompleta	8	0	4	4	8	4	12	16	0.17/0.16
Incompleta + FP	17	6	8	1	15	20	10	30	0.02/0.008
Incompleta Mista	4	0	3	1	4	3	5	8	0.51/0.78
FL direita + FL/P esquerda	3	0	2	1	3	2	4	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	79	161	143	383	319	447	766	0.09/0.75
Tipo/lado desconhecido	28	4	16	6	26	24	28	52	----
Total fissurados	500	91	212	271	574	394	754	1148	0.00001/0.0001
Sem fissura (Controles)	500	85	237	158	480	407	553	960	----

rs1058213 (C3827T) caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Alelos				
		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	15	15	0	0	15	30	0	30	0.39/0.05
Incompleta	38	0	0	3	3	0	6	6	0.77/0.00001
Total FP	53	0	0	3	3	0	6	6	0.84/0.00001
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	215	3	10	228	433	23	456	0.39/0.51
Incompleta	86	77	0	5	82	154	10	164	0.76/0.95
					0	0	0	0	
Unilateral	200	182	3	10	195	367	23	390	0.37/0.95
Completa	136	123	3	7	133	249	17	266	0.19/0.81
Incompleta	64	59	0	3	62	118	6	124	0.78/0.62
Unilateral Direita	60	56	0	1	57	112	2	114	0.37/0.06
Completa	43	42	0	0	42	84	0	84	0.08/0.001
Incompleta	11	9	0	1	10	18	2	20	0.83/0.46
Incompleta + FP	6	5	0	0	5	10	0	10	0.73/0.26
Unilateral Esquerda	140	126	3	9	138	255	21	276	0.19/0.37
Completa	93	81	3	7	91	165	17	182	0.05/0.11
Incompleta	44	42	0	2	44	84	4	88	0.81/0.59
Incompleta + FP	3	3	0	0	3	6	0	6	0.83/0.39
Bilateral	123	110	0	5	115	220	10	230	0.59/0.36
Completa	101	92	0	3	95	184	6	190	0.44/0.13
Incompleta	6	5	0	1	6	10	2	12	0.53/0.12
Incompleta + FP	13	11	0	0	11	22	0	22	0.50/0.10
Incompleta Mista	3	2	0	1	3	4	2	6	0.13/0.005
FL direita + FL/P esquerda	2	2	0	0	2	4	0	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	324	293	3	18	314	589	39	628	0.68/0.86
Tipo/lado desconhecido	16	15	0	0	15	30	0	30	----
Total fissurados	393	358	3	18	379	719	39	758	0.66/0.51
Sem fissura (Controles)	285	259	1	16	276	519	33	552	----

rs2166975 (C3296T) caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Alelos				
		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	15	10	4	1	15	24	6	30	0.68/0.42
Incompleta	38	26	9	3	38	61	15	76	0.57/0.25
Total FP	53	36	13	4	53	85	21	106	0.44/0.18
Fissura Labial e/ou Palatina					0	0	0	0	
Completa	237	154	48	22	224	356	92	448	0.10/0.01
Incompleta	86	63	14	3	80	140	20	160	0.78/0.47
Unilateral	200	138	37	19	194	313	75	388	0.21/0.06
Completa	136	87	26	18	131	200	62	262	0.01/0.001
Incompleta	64	51	9	1	61	111	11	122	0.31/0.09
Unilateral Direita	60	43	11	4	58	97	19	116	0.92/0.64
Completa	43	29	9	4	42	67	17	84	0.50/0.19
Incompleta	11	8	2	0	10	18	2	20	0.56/0.55
Incompleta + FP	6	6	0	0	6	12	0	12	0.19/0.05
Unilateral Esquerda	140	95	24	15	134	214	54	268	0.13/0.04
Completa	93	58	17	14	89	133	45	178	0.008/0.001
Incompleta	44	34	7	1	42	75	9	84	0.64/0.32
Incompleta + FP	3	3	0	0	3	6	0	6	0.44/0.16
Bilateral	123	79	27	6	112	185	39	224	0.40/0.34
Completa	101	67	22	4	93	156	30	186	0.46/0.64
Incompleta	6	3	2	1	6	8	4	12	0.29/0.07
Incompleta + FP	13	9	0	1	10	18	2	20	0.13/0.55
Incompleta Mista	3	0	3	0	3	3	3	6	0.0004/0.01
FL direita + FL/P esquerda	2	0	2	0	2	2	2	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	324	218	62	25	305	498	112	610	0.34/0.09
Tipo/lado desconhecido	16	13	1	2	16	27	5	32	----
Total fissurados	393	266	76	31	373	608	138	746	0.28/0.07
Sem fissura (Controles)	285	215	51	16	282	481	83	564	----

rs377122 caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	15	2	10	3	15	14	16	30	0.68/0.72
Incompleta	38	7	27	4	38	41	35	76	0.17/0.51
Total FP	53	9	37	7	53	55	51	106	0.17/0.72
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	50	108	72	230	208	252	460	0.04/0.12
Incompleta	86	11	41	32	84	63	105	168	0.007/0.004
Unilateral	200	34	93	69	196	161	231	392	0.005/0.006
Completa	136	29	59	46	134	117	151	268	0.01/0.08
Incompleta	64	5	34	23	62	44	80	124	0.007/0.003
Unilateral Direita	60	11	29	19	59	51	67	118	0.23/0.18
Completa	43	9	21	13	43	39	47	86	0.46/0.42
Incompleta	11	1	5	4	10	7	13	20	0.34/0.18
Incompleta + FP	6	1	3	2	6	5	7	12	0.79/0.56
Unilateral Esquerda	140	23	64	50	137	110	164	274	0.006/0.007
Completa	93	20	38	33	91	78	104	182	0.01/0.09
Incompleta	44	3	25	15	43	31	55	86	0.03/0.01
Incompleta + FP	3	0	1	2	3	1	5	6	0.16/0.10
Bilateral	123	27	56	35	118	110	126	236	0.18/0.38
Completa	101	21	49	26	96	91	101	192	0.54/0.53
Incompleta	6	1	1	4	6	3	9	12	0.03/0.08
Incompleta + FP	13	5	5	3	13	15	11	26	0.32/0.44
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.16/0.10
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	2	2	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	324	61	149	105	315	271	359	630	0.007/0.01
Tipo/lado desconhecido	16	5	9	0	14	19	9	28	----
Total fissurados	393	75	195	112	382	345	419	764	0.09/0.07
Sem fissura (Controles)	285	62	160	62	284	284	284	568	----

rs2902345 caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	15	4	7	4	15	15	15	30	0.77/0.56
Incompleta	38	10	6	3	19	26	12	38	0.11/0.11
Total FP	53	14	13	7	34	41	27	68	0.31/0.43
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	77	108	42	227	262	192	454	0.60/0.44
Incompleta	86	25	40	16	81	90	72	162	0.96/0.95
Unilateral	200	66	89	38	193	221	165	386	0.52/0.55
Completa	136	47	58	27	132	152	112	264	0.37/0.54
Incompleta	64	19	31	11	61	69	53	122	0.97/0.80
Unilateral Direita	60	19	31	8	58	69	47	116	0.62/0.41
Completa	43	14	22	6	42	50	34	84	0.73/0.46
Incompleta	11	5	5	0	10	15	5	20	0.20/0.08
Incompleta + FP	6	0	4	2	6	4	8	12	0.26/0.12
Unilateral Esquerda	140	47	58	30	135	152	118	270	0.30/0.79
Completa	93	33	36	21	90	102	78	180	0.18/0.75
Incompleta	44	13	21	8	42	47	37	84	0.98/0.91
Incompleta + FP	3	1	1	1	3	3	3	6	0.77/0.79
Bilateral	123	36	59	20	115	131	99	230	0.90/0.67
Completa	101	30	50	15	95	110	80	190	0.76/0.53
Incompleta	6	3	2	1	6	8	4	12	0.55/0.43
Incompleta + FP	13	2	6	3	11	10	12	22	0.65/0.36
Incompleta Mista	3	1	1	1	3	3	3	6	0.77/0.79
FL direita + FL/P esquerda	2	1	0	1	2	2	2	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	324	103	14	58	175	220	130	350	0.00001/0.02
Tipo/lado desconhecido	16	3	9	3	15	15	15	30	----
Total fissurados	393	120	170	68	358	410	306	716	0.64/0.48
Sem fissura (Controles)	285	84	144	54	282	312	252	564	----

rs1523305 caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Alelos				
		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	15	4	7	4	15	15	15	30	0.90/0.90
Incompleta	38	3	24	10	37	30	44	74	0.11/0.17
Total FP	53	7	31	14	52	45	59	104	0.32/0.28
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	49	114	65	228	212	244	456	0.64/0.43
Incompleta	86	21	39	19	79	81	77	158	0.77/0.60
Unilateral	200	48	91	52	191	187	195	382	0.59/0.99
Completa	136	33	61	38	132	127	137	264	0.48/0.82
Incompleta	64	15	30	14	59	60	58	118	0.90/0.70
Unilateral Direita	60	15	31	12	58	61	55	116	0.75/0.47
Completa	43	13	21	9	43	47	39	86	0.54/0.32
Incompleta	11	1	6	3	10	8	12	20	0.63/0.43
Incompleta + FP	6	1	4	0	5	6	4	10	0.37/0.48
Unilateral Esquerda	140	33	60	40	133	126	140	266	0.35/0.67
Completa	93	20	40	29	89	80	98	178	0.31/0.35
Incompleta	44	12	18	11	41	42	40	82	0.54/0.69
Incompleta + FP	3	1	2	0	3	4	2	6	0.60/0.38
Bilateral	123	22	62	32	116	106	126	232	0.67/0.40
Completa	101	16	53	27	96	85	107	192	0.44/0.26
Incompleta	6	1	2	3	6	4	8	12	0.37/0.28
Incompleta + FP	13	4	6	1	11	14	8	22	0.37/0.17
Incompleta Mista	3	1	1	1	3	3	3	6	0.80/0.95
FL direita + FL/P esquerda	2	1	0	1	2	2	2	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	324	70	153	85	308	293	323	616	0.71/0.63
Tipo/lado desconhecido	16	3	10	2	15	16	14	30	----
Total fissurados	393	80	194	101	375	354	396	750	0.80/0.53
Sem fissura (Controles)	285	64	148	70	282	276	288	564	----

rs930655 caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G		
Fissura Palatina									
Completa	15	4	7	4	15	15	15	30	0.74/0.48
Incompleta	38	2	23	13	38	27	49	76	0.10/0.18
Total FP	53	6	30	17	53	42	64	106	0.37/0.45
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	48	101	84	233	197	269	466	0.41/0.68
Incompleta	86	22	40	22	84	84	84	168	0.30/0.13
Unilateral	200	45	80	73	198	170	226	396	0.16/0.85
Completa	136	28	52	55	135	108	162	270	0.10/0.33
Incompleta	64	17	28	18	63	62	64	126	0.35/0.24
Unilateral Direita	60	13	21	25	59	47	71	118	0.15/0.46
Completa	43	8	17	18	43	33	53	86	0.40/0.36
Incompleta	11	2	3	5	10	7	13	20	0.42/0.45
Incompleta + FP	6	3	1	2	6	7	5	12	0.12/0.30
Unilateral Esquerda	140	32	59	48	139	123	155	278	0.39/0.83
Completa	93	20	35	37	92	75	109	184	0.17/0.51
Incompleta	44	11	22	11	44	44	44	88	0.52/0.25
Incompleta + FP	3	1	2	0	3	4	2	6	0.48/0.25
Bilateral	123	25	61	33	119	111	127	238	0.69/0.41
Completa	101	20	49	29	98	89	107	196	0.89/0.64
Incompleta	6	0	3	3	6	3	9	12	0.42/0.20
Incompleta + FP	13	5	7	0	12	17	7	24	0.02/0.008
Incompleta Mista	3	0	2	1	3	2	4	6	0.68/0.61
FL direita + FL/P esquerda	2	0	1	1	2	1	3	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	324	70	141	107	318	281	355	636	0.45/0.81
Tipo/lado desconhecido	16	3	10	2	15	16	14	30	----
Total fissurados	393	79	181	126	386	339	433	772	0.82/0.88
Sem fissura (Controles)	285	54	140	91	285	248	322	570	----

rs2235371 (VAL274I)

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	21	17	2	1	20	36	4	40	0.34/0.33
Incompleta	45	38	4	2	44	80	8	88	0.08/0.10
Total FP	66	55	6	3	64	116	12	128	0.03/0.06
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	245	28	3	276	518	34	552	0.00001†
Incompleta	104	91	6	0	97	188	6	194	0.00001†
Unilateral	250	209	19	3	231	437	25	462	0.00001†
Completa	175	142	15	3	160	299	21	320	0.0001/0.00001
Incompleta	75	67	4	0	71	138	4	142	0.0003/0.00001
Unilateral Direita	78	68	5	1	74	141	7	148	0.001/0.0004
Completa	54	46	4	1	51	96	6	102	0.02/0.0008
Incompleta	16	14	1	0	15	29	1	30	0.19/0.06
Incompleta + FP	8	8	0	0	8	16	0	16	0.22/0.08
Unilateral Esquerda	172	141	14	2	157	296	18	314	0.00001†
Completa	121	96	11	2	109	203	15	218	0.003/0.0008
Incompleta	46	41	2	0	43	84	2	86	0.004/0.0008
Incompleta + FP	5	4	1	0	5	9	1	10	0.88/0.62
Bilateral	154	127	15	1	143	269	17	286	0.0002/0.00001
Completa	125	103	13	1	117	219	15	234	0.002/0.0002
Incompleta	8	8	0	0	8	16	0	16	0.22/0.08
Incompleta + FP	17	12	2	0	14	26	2	28	0.50/0.22
Incompleta Mista	4	4	0	0	4	8	0	8	0.47/0.09
FL direita + FL/P esquerda	3	3	0	0	3	6	0	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Fissura Mediana	2	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	406	336	34	3	373	706	40	746	0.00001†
Tipo/lado desconhecido	28	21	3	1	25	45	5	50	----
Total fissurados	500	413	43	7	463	869	57	926	0.00001†
Sem fissura (Controles)	500	344	114	17	475	802	148	950	----

rs2013162

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	21	6	7	7	20	19	21	40	0.46/0.60
Incompleta	45	8	22	15	45	38	52	90	0.93/0.83
Total FP	66	14	29	22	65	57	73	130	0.93/0.92
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	31	128	117	276	190	362	552	0.002/0.0006
Incompleta	104	8	41	49	98	57	139	196	0.001/0.002
Unilateral	250	22	110	101	233	154	312	466	0.0005/0.0001
Completa	175	15	79	67	161	109	213	322	0.005/0.002
Incompleta	75	7	31	34	72	45	99	144	0.03/0.005
Unilateral Direita	78	7	32	35	74	46	102	148	0.02/0.004
Completa	54	4	23	24	51	31	71	102	0.04/0.01
Incompleta	16	3	6	6	15	12	18	30	0.84/0.71
Incompleta + FP	8	0	3	5	8	3	13	16	0.15/0.04
Unilateral Esquerda	172	15	78	66	159	108	210	318	0.006/0.003
Completa	121	11	56	43	110	78	142	220	0.05/0.03
Incompleta	46	2	20	22	44	24	64	88	0.01/0.003
Incompleta + FP	5	2	2	1	5	6	4	10	0.52/0.29
Bilateral	154	17	59	65	141	93	189	282	0.009/0.001
Completa	125	16	49	50	115	81	149	230	0.08/0.02
Incompleta	8	1	3	4	8	5	11	16	0.59/0.33
Incompleta + FP	17	0	6	8	14	6	22	28	0.07/0.02
Incompleta Mista	4	0	1	3	4	1	7	8	0.19/0.07
FL direita + FL/P esquerda	3	0	0	3	3	0	6	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	39	169	166	374	247	501	748	0.00001†
Tipo/lado desconhecido	28	6	13	6	25	25	25	50	----
Total fissurados	500	59	211	195	465	329	601	930	0.002/0.003
Sem fissura (Controles)	500	95	223	158	476	413	539	952	----

rs2073487

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	6	7	7	20	19	21	40	0.46/0.60
Incompleta	45	8	21	15	44	37	51	88	0.96/0.80
Total FP	66	14	28	22	64	56	72	128	0.88/0.93
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	30	128	119	277	188	366	554	0.001/0.0002
Incompleta	104	8	40	49	97	56	138	194	0.001/0.0001
Unilateral	250	22	108	102	232	152	312	464	0.0004/0.0001
Completa	175	15	78	68	161	108	214	322	0.005/0.001
Incompleta	75	7	30	34	71	44	98	142	0.02/0.005
Unilateral Direita	78	7	32	35	74	46	102	148	0.02/0.004
Completa	54	4	23	24	51	31	71	102	0.05/0.01
Incompleta	16	3	6	6	15	12	18	30	0.84/0.71
Incompleta + FP	8	0	3	5	8	3	13	16	0.15/0.04
Unilateral Esquerda	172	15	76	67	158	106	210	316	0.005/0.002
Completa	121	11	55	44	110	77	143	220	0.04/0.02
Incompleta	46	2	19	22	43	23	63	86	0.01/0.002
Incompleta + FP	5	2	2	1	5	6	4	10	0.52/0.29
Bilateral	154	16	60	66	142	92	192	284	0.005/0.0009
Completa	125	15	50	51	116	80	152	232	0.05/0.01
Incompleta	8	1	3	4	8	5	11	16	0.59/0.33
Incompleta + FP	17	0	6	8	14	6	22	28	0.07/0.02
Incompleta Mista	4	0	1	3	4	1	7	8	0.19/0.07
FL direita + FL/P esquerda	3	0	0	3	3	0	6	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	38	168	168	374	244	504	748	0.00001†
Tipo/lado desconhecido	28	6	13	6	25	25	25	50	----
Total fissurados	500	58	209	197	464	325	603	928	0.001/0.0001
Sem fissura (Controles)	500	95	224	158	477	414	540	954	----

rs4844880

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		AA	AT	TT	Total	A	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	3	4	13	20	10	30	40	0.25/0.35
Incompleta	45	3	19	23	45	25	65	90	0.47/0.41
Total FP	66	6	23	36	65	35	95	130	0.54/0.24
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	20	119	146	285	159	411	570	0.04/0.09
Incompleta	104	4	34	77	115	42	188	230	0.00005/0.00001
Unilateral	250	15	100	135	250	130	370	500	0.01/0.01
Completa	175	12	67	84	163	91	235	326	0.16/0.17
Incompleta	75	3	23	51	77	29	125	154	0.008/0.0009
Unilateral Direita	78	5	27	43	75	37	113	150	0.21/0.07
Completa	54	3	21	27	51	27	75	102	0.34/0.25
Incompleta	16	1	4	11	16	6	26	32	0.29/0.11
Incompleta + FP	8	1	2	5	8	4	12	16	0.72/0.55
Unilateral Esquerda	172	10	61	92	163	81	245	326	0.04/0.01
Completa	121	9	46	57	112	64	160	224	0.35/0.32
Incompleta	46	1	13	32	46	15	77	92	0.01/0.001
Incompleta + FP	5	0	2	3	5	2	8	10	0.68/0.41
Bilateral	154	9	63	76	148	81	215	296	0.07/0.13
Completa	125	8	52	62	122	68	176	244	0.14/0.21
Incompleta	8	1	1	6	8	3	13	16	0.29/0.25
Incompleta + FP	17	0	8	8	16	8	24	32	0.27/0.40
Incompleta Mista	4	0	2	2	4	2	6	8	0.72/0.67
FL direita + FL/P esquerda	3	0	2	1	3	2	4	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	24	153	224	401	201	601	802	0.002/0.001
Tipo/lado desconhecido	28	3	7	16	26	13	39	52	----
Total fissurados	500	33	183	276	492	249	735	984	0.002/0.001
Sem fissura (Controles)	500	62	183	235	480	307	653	960	----

rs658860

Subfenótipo	N	CC	Genótipos		Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
			CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	21	1	3	16	20	5	35	40	0.51/0.67
Incompleta	45	2	12	31	45	16	74	90	0.70/0.46
Total FP	66	3	15	47	65	21	109	130	0.61/0.71
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	11	83	185	279	105	453	558	0.15/0.04
Incompleta	104	3	29	67	99	35	163	198	0.60/0.32
Unilateral	250	5	69	161	235	79	391	470	0.42/0.35
Completa	175	4	48	110	162	56	268	324	0.48/0.30
Incompleta	75	1	21	51	73	23	123	146	0.66/0.79
Unilateral Direita	78	2	13	60	75	17	133	150	0.37/0.24
Completa	54	1	10	40	51	12	90	102	0.68/0.39
Incompleta	16	0	3	13	16	3	29	32	0.67/0.38
Incompleta + FP	8	1	0	7	8	2	14	16	0.07/0.78
Unilateral Esquerda	172	3	56	101	160	62	258	320	0.04/0.06
Completa	121	3	38	70	111	44	178	222	0.12/0.07
Incompleta	46	0	17	27	44	17	71	88	0.09/0.27
Incompleta + FP	5	0	1	4	5	1	9	10	0.90/0.66
Bilateral	154	9	43	91	143	61	225	286	0.03/0.01
Completa	125	7	35	75	117	49	185	234	0.06/0.02
Incompleta	8	0	2	6	8	2	14	16	0.90/0.78
Incompleta + FP	17	2	5	7	14	9	19	28	0.02/0.01
Incompleta Mista	4	0	1	3	4	1	7	8	0.95/0.84
FL direita + FL/P esquerda	3	0	1	2	3	1	5	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	14	112	253	379	140	618	758	0.15/0.04
Tipo/lado desconhecido	28	0	3	23	26	3	49	52	----
Total fissurados	500	17	130	323	470	164	776	940	0.33/0.13
Sem fissura (Controles)	500	12	118	346	476	142	810	952	----

rs861019

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		AA	AG	GG	Total	A	G	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	10	7	3	20	27	13	40	0.37/0.24
Incompleta	45	17	19	8	44	53	35	88	0.86/0.70
Total FP	66	27	26	11	64	80	48	128	0.49/0.34
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	80	132	69	281	292	270	562	0.07/0.01
Incompleta	104	25	54	20	99	104	94	198	0.18/0.14
Unilateral	250	59	127	51	237	245	229	474	0.03/0.02
Completa	175	42	85	37	164	169	159	328	0.09/0.03
Incompleta	75	17	42	14	73	76	70	146	0.13/0.16
Unilateral Direita	78	19	41	16	76	79	73	152	0.25/0.15
Completa	54	11	30	11	52	52	52	104	0.14/0.11
Incompleta	16	5	9	2	16	19	13	32	0.72/0.89
Incompleta + FP	8	3	2	3	8	8	8	16	0.31/0.51
Unilateral Esquerda	172	40	86	35	161	166	156	322	0.07/0.03
Completa	121	31	55	26	112	117	107	224	0.28/0.10
Incompleta	46	9	28	7	44	46	42	88	0.08/0.28
Incompleta + FP	5	0	3	2	5	3	7	10	0.20/0.07
Bilateral	154	46	59	38	143	151	135	286	0.10/0.10
Completa	125	38	47	32	117	123	111	234	0.09/0.12
Incompleta	8	3	2	3	8	8	8	16	0.31/0.51
Incompleta + FP	17	5	7	2	14	17	11	28	0.92/0.78
Incompleta Mista	4	0	3	1	4	3	5	8	0.34/0.23
FL direita + FL/P esquerda	3	0	2	1	3	2	4	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	125	187	89	401	437	365	802	0.30/0.12
Tipo/lado desconhecido	28	9	11	5	25	29	21	50	----
Total fissurados	500	161	224	105	490	546	434	980	0.49/0.27
Sem fissura (Controles)	500	166	224	88	478	556	400	956	----

rs2235371 (VAL274I) Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Alelos				
		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	15	13	1	1	15	27	3	30	0.07/0.49
Incompleta	38	31	4	2	37	66	8	74	0.05/0.20
Total FP	53	44	5	3	52	93	11	104	0.02/0.17
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	206	22	2	230	434	26	460	0.65/0.46
Incompleta	86	76	1	0	77	153	1	154	0.14/0.003
Unilateral	200	176	14	2	192	366	18	384	0.22/0.18
Completa	136	120	12	2	134	252	16	268	0.49/0.66
Incompleta	64	56	4	0	60	116	4	120	0.38/0.15
Unilateral Direita	60	54	4	1	59	112	6	118	0.39/0.50
Completa	43	39	3	1	43	81	5	86	0.37/0.74
Incompleta	11	9	1	0	10	19	1	20	0.94/0.75
Incompleta + FP	6	6	0	0	6	12	0	12	0.64/0.19
Unilateral Esquerda	140	122	12	1	135	256	14	270	0.62/0.37
Completa	93	81	9	1	91	171	11	182	0.80/0.73
Incompleta	44	39	2	0	41	80	2	82	0.33/0.12
Incompleta + FP	3	2	1	0	3	5	1	6	0.53/0.33
Bilateral	123	106	10	0	116	222	10	232	0.39/0.18
Completa	101	86	10	0	96	182	10	192	0.64/0.44
Incompleta	6	6	0	0	6	12	0	12	0.64/0.19
Incompleta + FP	13	11	0	0	11	22	0	22	0.45/0.08
Incompleta Mista	3	3	0	0	3	6	0	6	0.80/0.36
FL direita + FL/P esquerda	2	2	0	0	2	4	0	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Fissura Mediana	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	324	283	26	2	311	592	30	622	0.32/0.15
Tipo/lado desconhecido		13	1	0	14	27	1	28	----
Total fissurados	377	340	32	5	377	712	42	754	0.24/0.37
Sem fissura (Controles)	285	245	34	2	281	524	38	562	----

rs2013162 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	15	5	6	4	15	16	14	30	0.18/0.10
Incompleta	38	8	19	11	38	35	41	76	0.43/0.19
Total FP	53	13	25	15	53	51	55	106	0.17/0.05
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	22	107	99	228	151	305	456	0.13/0.08
Incompleta	86	5	33	43	81	43	119	162	0.02/0.005
Unilateral	200	15	95	85	195	125	265	390	0.03/0.04
Completa	136	10	69	55	134	89	179	268	0.06/0.15
Incompleta	64	5	26	30	61	36	86	122	0.19/0.06
Unilateral Direita	60	5	29	25	59	39	79	118	0.36/0.28
Completa	43	3	23	17	43	29	57	86	0.29/0.41
Incompleta	11	2	3	5	10	7	13	20	0.63/0.76
Incompleta + FP	6	0	3	3	6	3	9	12	0.56/0.34
Unilateral Esquerda	140	10	66	60	136	86	186	272	0.06/0.05
Completa	93	7	46	38	91	60	122	182	0.16/0.19
Incompleta	44	2	19	21	42	23	61	84	0.13/0.05
Incompleta + FP	3	1	1	1	3	3	3	6	0.70/0.55
Bilateral	123	12	45	55	112	69	155	224	0.15/0.04
Completa	101	12	38	44	94	62	126	188	0.40/0.19
Incompleta	6	0	2	4	6	2	10	12	0.32/0.12
Incompleta + FP	13	0	4	7	11	4	18	22	0.17/0.05
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.56/0.27
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	2	2	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	324	27	140	143	310	194	426	620	0.02/0.01
Tipo/lado desconhecido	16	4	8	2	14	16	12	28	----
Total fissurados	377	44	173	160	377	261	493	754	0.31/0.16
Sem fissura (Controles)	285	44	128	110	282	216	348	564	----

rs2073487 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	15	5	6	4	15	16	14	30	0.20/0.10
Incompleta	38	8	18	11	37	34	40	74	0.49/0.22
Total FP	53	13	24	15	52	50	54	104	0.20/0.07
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	21	107	101	229	149	309	458	0.06/0.04
Incompleta	86	5	47	43	95	57	133	190	0.03/0.03
Unilateral	200	15	108	86	209	138	280	418	0.01/0.06
Completa	136	10	68	56	134	88	180	268	0.05/0.10
Incompleta	64	5	40	30	75	50	100	150	0.10/0.23
Unilateral Direita	60	5	44	25	74	54	94	148	0.04/0.62
Completa	43	3	23	17	43	29	57	86	0.27/0.38
Incompleta	11	2	18	5	25	22	28	50	0.04/0.45
Incompleta + FP	6	0	3	3	6	3	9	12	0.55/0.33
Unilateral Esquerda	140	10	64	61	135	84	186	270	0.05/0.03
Completa	93	7	45	39	91	59	123	182	0.14/0.13
Incompleta	44	2	18	21	41	22	60	82	0.11/0.03
Incompleta + FP	3	1	1	1	3	3	3	6	0.71/0.57
Bilateral	123	11	46	58	115	68	162	230	0.06/0.01
Completa	101	11	39	45	95	61	129	190	0.28/0.10
Incompleta	6	0	2	4	6	2	10	12	0.31/0.12
Incompleta + FP	13	0	4	7	11	4	18	22	0.16/0.05
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.55/0.27
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	0	0	0	0	0	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	324	26	154	145	325	206	444	650	0.008/0.01
Tipo/lado desconhecido	16	4	8	2	14	16	12	28	----
Total fissurados	377	43	186	162	391	272	510	782	0.17/0.14
Sem fissura (Controles)	285	45	128	109	282	218	346	564	----

rs4844880 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		AA	AT	TT		A	T		
Fissura Palatina									
Completa	15	1	2	12	15	4	26	30	0.22/0.19
Incompleta	38	2	18	18	38	22	54	76	0.31/0.31
Total FP	53	3	20	30	53	26	80	106	0.91/0.85
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	13	96	128	237	122	352	474	0.39/0.44
Incompleta	86	4	28	77	109	36	182	218	0.09/0.02
Unilateral	200	10	74	139	223	94	352	446	0.58/0.32
Completa	136	7	55	74	136	69	203	272	0.51/0.59
Incompleta	64	3	19	65	87	25	149	174	0.03/0.008
Unilateral Direita	60	2	23	58	83	27	139	166	0.13/0.04
Completa	43	0	19	24	43	19	67	86	0.16/0.74
Incompleta	11	1	3	30	34	5	63	68	0.004/0.002
Incompleta + FP	6	1	1	4	6	3	9	12	0.45/0.91
Unilateral Esquerda	140	8	51	81	140	67	213	280	0.93/0.93
Completa	93	7	36	50	93	50	136	186	0.67/0.37
Incompleta	44	1	13	30	44	15	73	88	0.38/0.16
Incompleta + FP	3	0	2	1	3	2	4	6	0.50/0.58
Bilateral	123	7	50	68	125	64	186	250	0.59/0.55
Completa	101	6	41	54	101	53	149	202	0.57/0.46
Incompleta	6	1	1	4	6	3	9	12	0.45/0.91
Incompleta + FP	13	0	7	6	13	7	19	26	0.29/0.70
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.89/0.68
FL direita + FL/P esquerda	2	0	1	1	2	1	3	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	324	17	124	206	347	158	536	694	0.73/0.70
Tipo/lado desconhecido	16	0	2	13	15	2	28	30	----
Total fissurados	377	20	146	249	415	186	644	830	0.69/0.57
Sem fissura (Controles)	285	18	99	168	285	135	435	570	----

rs658860 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos		Total	Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T		
Fissura Palatina									
Completa	15	1	3	11	15	5	25	30	0.48/0.84
Incompleta	38	1	10	27	38	12	64	76	0.98/0.91
Total FP	53	2	13	38	53	17	89	106	0.75/0.84
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	5	72	155	232	82	382	464	0.50/0.30
Incompleta	86	3	28	51	82	34	130	164	0.25/0.09
Unilateral	200	3	62	133	198	68	328	396	0.46/0.43
Completa	136	2	41	93	136	45	227	272	0.66/0.64
Incompleta	64	1	21	40	62	23	101	124	0.48/0.37
Unilateral Direita	60	2	10	48	60	14	106	120	0.26/0.30
Completa	43	1	7	35	43	9	77	86	0.36/0.23
Incompleta	11	0	3	8	11	3	19	22	0.88/0.83
Incompleta + FP	6	1	0	5	6	2	10	12	0.03/0.89
Unilateral Esquerda	140	0	52	85	137	52	222	274	0.01/0.17
Completa	93	0	34	58	92	34	150	184	0.07/0.30
Incompleta	44	0	17	25	42	17	67	84	0.12/0.24
Incompleta + FP	3	2	1	2	5	5	5	10	0.94/0.002
Bilateral	123	5	38	73	116	48	184	232	0.17/0.06
Completa	101	3	31	62	96	37	155	192	0.43/0.19
Incompleta	6	0	2	4	6	2	10	12	0.88/0.89
Incompleta + FP	13	2	4	5	11	8	14	22	0.003/0.008
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.94/0.92
FL direita + FL/P esquerda	2	0	1	1	2	1	3	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	324	10	100	207	317	120	514	634	0.24/0.09
Tipo/lado desconhecido		0	2	13	15	2	28	30	----
Total fissurados	377	10	115	258	383	135	631	766	0.51/0.26
Sem fissura (Controles)	285	6	74	201	281	86	476	562	----

rs861019 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos				Alelos			
		AA	AG	GG	Total	A	G	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	15	7	5	3	15	19	11	30	0.35/0.32
Incompleta	38	17	15	5	37	49	25	74	0.12/0.05
Total FP	53	24	20	8	52	68	36	104	0.06/0.03
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	62	112	59	233	236	230	466	0.49/0.24
Incompleta	86	19	47	18	84	85	83	168	0.42/0.40
Unilateral	200	46	109	45	200	201	199	400	0.26/0.22
Completa	136	33	72	31	136	138	134	272	0.51/0.34
Incompleta	64	13	37	14	64	63	65	128	0.29/0.30
Unilateral Direita	60	13	34	13	60	60	60	120	0.43/0.39
Completa	43	8	26	9	43	42	44	86	0.28/0.34
Incompleta	11	3	6	2	11	12	10	22	0.94/0.97
Incompleta + FP	6	2	2	2	6	6	6	12	0.69/0.77
Unilateral Esquerda	140	33	75	30	138	141	135	276	0.44/0.38
Completa	93	25	46	22	93	96	90	186	0.82/0.53
Incompleta	44	8	28	6	42	44	40	84	0.10/0.74
Incompleta + FP	3	0	1	2	3	1	5	6	0.14/0.06
Bilateral	123	35	50	32	117	120	114	234	0.35/0.44
Completa	101	29	40	28	97	98	96	194	0.25/0.36
Incompleta	6	2	1	3	6	5	7	12	0.17/0.38
Incompleta + FP	13	4	6	1	11	14	8	22	0.61/0.38
Incompleta Mista	3	0	3	0	3	3	3	6	0.21/0.83
FL direita + FL/P esquerda	2	0	2	0	2	2	2	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	324	81	160	77	318	322	314	636	0.45/0.21
Tipo/lado desconhecido		2	8	4	14	12	16	28	----
Total fissurados	377	106	188	89	383	400	366	766	0.77/0.46
Sem fissura (Controles)	285	84	139	60	283	307	259	566	----

rs10943944

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	15	5	0	20	35	5	40	0.44/0.35
Incompleta	45	27	12	6	45	66	24	90	0.006/0.05
Total FP	66	42	17	6	65	101	29	130	0.07/0.25
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	169	93	22	284	431	137	568	0.007/0.005
Incompleta	104	59	37	6	102	135	43	178	0.16/0.06
Unilateral	250	146	75	17	238	347	103	450	0.0003/0.04
Completa	175	97	53	13	163	247	79	326	0.02/0.01
Incompleta	75	49	22	4	75	100	24	124	0.69/0.31
Unilateral Direita	78	48	21	6	75	117	33	150	0.15/0.26
Completa	54	32	15	4	51	79	23	102	0.27/0.28
Incompleta	16	11	4	1	16	26	6	32	0.77/0.93
Incompleta + FP	8	5	2	1	8	12	4	16	0.37/0.48
Unilateral Esquerda	172	98	54	11	163	250	76	326	0.09/0.04
Completa	121	65	38	9	112	168	56	224	0.04/0.02
Incompleta	46	30	14	2	46	74	18	92	0.92/0.74
Incompleta + FP	5	3	2	0	5	8	2	10	0.76/0.88
Bilateral	154	82	55	11	148	219	77	296	0.01/0.003
Completa	125	72	40	9	121	184	58	242	0.08/0.04
Incompleta	8	3	5	0	8	11	5	16	0.11/0.18
Incompleta + FP	17	4	9	2	15	17	13	30	0.002/0.0005
Incompleta Mista	4	3	1	0	4	7	1	8	0.84/0.67
FL direita + FL/P esquerda	3	2	1	0	3	5	1	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Fissura Mediana	2	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	406	229	130	28	387	349	103	452	0.0008/0.04
Tipo/lado desconhecido	28	22	4	1	27	48	6	54	----
Total fissurados	500	293	151	35	479	498	138	636	0.01/0.08
Sem fissura (Controles)	500	320	142	16	478	782	174	956	----

rs1171105

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	10	7	3	20	27	13	40	0.61/0.64
Incompleta	45	21	19	5	45	61	29	90	0.75/0.47
Total FP	66	31	26	8	65	88	42	130	0.57/0.40
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	125	119	39	283	369	197	566	0.57/0.63
Incompleta	104	40	47	17	104	127	81	208	0.58/0.42
Unilateral	250	98	109	33	240	305	175	480	0.92/0.86
Completa	175	70	70	23	163	210	116	326	0.77/0.88
Incompleta	75	28	39	10	77	95	59	154	0.76/0.58
Unilateral Direita	78	27	39	9	75	93	57	150	0.63/0.63
Completa	54	17	26	8	51	60	42	102	0.56/0.30
Incompleta	16	6	9	1	16	21	11	32	0.62/0.84
Incompleta + FP	8	4	4	0	8	12	4	16	0.32/0.36
Unilateral Esquerda	172	71	70	24	165	212	118	330	0.71/0.93
Completa	121	53	44	15	112	150	74	224	0.39/0.40
Incompleta	46	14	22	9	45	50	40	90	0.27/0.11
Incompleta + FP	5	4	4	0	8	12	4	16	0.56/0.36
Bilateral	154	67	57	23	147	191	103	294	0.27/0.75
Completa	125	55	49	16	120	159	81	240	0.55/0.51
Incompleta	8	2	5	1	8	9	7	16	0.62/0.52
Incompleta + FP	17	8	2	5	15	18	12	30	0.01/0.65
Incompleta Mista	4	2	1	1	4	5	3	8	0.63/0.93
FL direita + FL/P esquerda	3	2	1	0	3	5	1	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	165	166	56	387	496	278	774	0.58/0.96
Tipo/lado desconhecido	28	11	12	4	27	34	20	54	----
Total fissurados	500	207	204	68	479	618	340	958	0.52/0.81
Sem fissura (Controles)	500	196	221	62	479	613	345	958	----

rs1171114

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	8	9	2	19	25	13	38	0.92/0.83
Incompleta	45	17	19	7	43	53	33	86	0.19/0.27
Total FP	66	25	28	9	62	78	46	124	0.30/0.31
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	89	137	53	279	315	243	558	0.00001*
Incompleta	104	35	53	16	104	123	85	208	0.03/0.02
Unilateral	250	81	111	39	231	273	189	462	0.007/0.002
Completa	175	60	71	28	159	191	127	318	0.01/0.01
Incompleta	75	21	40	11	72	82	62	144	0.03/0.01
Unilateral Direita	78	23	39	9	71	85	57	142	0.09/0.07
Completa	54	16	28	5	49	60	38	98	0.19/0.21
Incompleta	16	5	7	2	14	17	11	28	0.47/0.45
Incompleta + FP	8	2	4	2	8	8	8	16	0.27/0.14
Unilateral Esquerda	172	58	72	30	160	188	132	320	0.005/0.004
Completa	121	44	43	23	110	131	89	220	0.004/0.02
Incompleta	46	11	27	7	45	49	41	90	0.02/0.01
Incompleta + FP	5	3	2	0	5	8	2	10	0.67/0.39
Bilateral	154	43	79	30	152	165	139	304	0.00001*
Completa	125	29	66	25	120	124	116	240	0.00001*
Incompleta	8	4	3	1	8	11	5	16	0.88/0.91
Incompleta + FP	17	6	7	3	16	19	13	32	0.47/0.33
Incompleta Mista	4	4	3	1	8	11	5	16	0.50/0.91
FL direita + FL/P esquerda	3	2	0	0	2	4	0	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	0	0	0	0	0	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	124	191	69	384	439	329	768	0.00001*
Tipo/lado desconhecido	28	8	14	4	26	30	22	52	----
Total fissurados	500	157	233	82	472	547	397	944	0.00001*
Sem fissura (Controles)	500	213	220	46	479	646	312	958	----

rs1325469

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		AA	AG	GG	Total	A	G	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	15	5	0	20	35	5	40	0.36/0.33
Incompleta	45	28	13	3	44	69	19	88	0.76/0.49
Total FP	66	43	18	3	64	104	24	128	0.99/0.96
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	173	89	15	277	435	119	554	0.39/0.17
Incompleta	104	52	29	5	86	133	39	172	0.37/0.21
Unilateral	250	132	76	12	220	340	100	440	0.10/0.07
Completa	175	93	57	10	160	243	77	320	0.08/0.03
Incompleta	75	39	19	2	60	97	23	120	0.46/0.87
Unilateral Direita	78	44	24	6	74	112	36	148	0.33/0.09
Completa	54	29	18	4	51	76	26	102	0.26/0.09
Incompleta	16	10	3	2	15	23	7	30	0.26/0.51
Incompleta + FP	8	5	3	0	8	13	3	16	0.60/0.98
Unilateral Esquerda	172	95	58	6	159	248	70	318	0.12/0.18
Completa	121	64	39	6	109	167	51	218	0.22/0.10
Incompleta	46	29	16	0	45	74	16	90	0.08/0.85
Incompleta + FP	5	2	3	0	5	7	3	10	0.24/0.35
Bilateral	154	93	42	8	143	228	58	286	0.81/0.52
Completa	125	80	32	5	117	192	42	234	0.97/0.82
Incompleta	8	4	4	0	8	12	4	16	0.29/0.51
Incompleta + FP	17	7	4	3	14	18	10	28	0.01/0.02
Incompleta Mista	4	2	2	0	4	6	2	8	0.54/0.64
FL direita + FL/P esquerda	3	1	2	0	3	4	2	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Fissura Mediana	2	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	406	226	118	20	364	570	158	728	0.23/0.11
Tipo/lado desconhecido	28	14	10	2	26	38	14	52	----
Total fissurados	500	283	146	25	454	712	196	908	0.22/0.10
Sem fissura (Controles)	500	323	134	22	479	780	178	958	----

rs1325474

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		AA	AG	GG	Total	A	G	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	0	4	14	18	0	32	32	0.37/0.06
Incompleta	45	3	11	27	41	6	65	71	0.72/0.25
Total FP	66	3	15	41	59	6	97	103	0.95/0.80
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	14	82	165	261	28	412	440	0.37/0.41
Incompleta	104	6	34	54	94	12	142	154	0.12/0.20
Unilateral									
Completa	250	12	77	134	223	24	345	369	0.10/0.38
Incompleta	175	8	53	93	154	16	239	255	0.19/0.52
	75	4	24	41	69	8	106	114	0.34/0.43
Unilateral Direita									
Completa	78	4	24	43	71	8	110	118	0.43/0.49
Incompleta	54	3	16	30	49	6	76	82	0.59/0.42
Incompleta + FP	16	1	5	9	15	2	23	25	0.78/0.54
	8	0	3	4	7	0	11	11	0.50/0.43
Unilateral Esquerda									
Completa	172	8	53	91	152	16	235	251	0.16/0.49
Incompleta	121	5	37	63	105	10	163	173	0.24/0.77
Incompleta + FP	46	1	15	27	43	2	69	71	0.48/0.37
	5	2	1	1	4	4	3	7	0.0001/0.00001
Bilateral									
Completa	154	8	42	85	135	16	212	228	0.48/0.30
Incompleta	125	6	32	72	110	12	176	188	0.82/0.53
Incompleta + FP	8	0	4	4	8	0	12	12	0.27/0.25
	17	2	4	7	13	4	18	22	0.17/0.009
Incompleta Mista	4	0	2	2	4	0	6	6	0.52/0.42
FL direita + FL/P esquerda	3	0	2	1	3	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	2	0	2	1	3	0	4	4	----
Total FL/P	406	20	116	220	356	40	556	596	0.15/0.24
Tipo/lado desconhecido	28	1	8	16	25	2	40	42	----
Total fissurados	500	24	140	277	441	48	694	742	0.22/0.30
Sem fissuras (Controles)	500	21	126	317	464	42	760	802	----

rs2023238

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	2	9	9	20	13	27	40	0.74/0.92
Incompleta	45	5	21	18	44	31	57	88	0.36/0.50
Total FP	66	7	30	27	64	44	84	128	0.30/0.55
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	39	108	129	276	186	366	552	0.72/0.44
Incompleta	104	16	43	38	97	75	119	194	0.16/0.06
Unilateral	250	37	94	100	231	168	294	462	0.25/0.08
Completa	175	24	62	74	160	110	210	320	0.71/0.38
Incompleta	75	13	32	26	71	58	84	142	0.10/0.03
					0				
Unilateral Direita	78	13	29	31	73	55	91	146	0.41/0.15
Completa	54	10	19	22	51	39	63	102	0.42/0.18
Incompleta	16	3	7	5	15	13	17	30	0.43/0.18
Incompleta + FP	8	0	3	4	7	3	11	14	0.36/0.40
Unilateral Esquerda	172	24	65	69	158	113	203	316	0.40/0.19
Completa	121	14	43	52	109	71	147	218	0.88/0.81
Incompleta	46	10	20	14	44	40	48	88	0.04/0.008
Incompleta + FP	5	0	2	3	5	2	8	10	0.48/0.42
Bilateral	154	18	57	67	142	93	191	284	0.77/0.75
Completa	125	15	46	55	116	76	156	232	0.85/0.77
Incompleta	8	1	5	2	8	7	9	16	0.30/0.30
Incompleta + FP	17	2	5	7	14	9	19	28	0.99/0.96
Incompleta Mista	4	0	1	3	4	1	7	8	0.42/0.24
FL direita + FL/P esquerda	3	0	0	3	3	0	6	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	55	152	167	374	262	486	748	0.32/0.15
Tipo/lado desconhecido	28	3	13	10	26	19	33	52	----
Total fissurados	500	65	195	204	464	325	603	928	0.17/0.13
Sem fissuras (Controles)	500	64	177	239	490	305	655	960	----

rs217290

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	6	10	4	20	22	18	40	0.78/0.50
Incompleta	45	14	26	5	45	54	36	90	0.56/0.96
Total FP	66	20	36	9	65	76	54	130	0.69*
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	110	133	35	278	353	203	556	0.44/0.21
Incompleta	104	41	53	7	101	135	67	202	0.09/0.08
Unilateral	250	94	110	28	232	298	166	464	0.33/0.14
Completa	175	61	75	22	158	197	119	316	0.76/0.50
Incompleta	75	33	35	6	74	101	47	148	0.15/0.06
Unilateral Direita	78	33	35	6	74	101	47	148	0.15/0.06
Completa	54	20	26	5	51	66	36	102	0.59/0.38
Incompleta	16	9	6	0	15	24	6	30	0.08/0.02
Incompleta + FP	8	4	3	1	8	11	5	16	0.68/0.49
Unilateral Esquerda	172	61	75	22	158	197	119	316	0.76/0.50
Completa	121	41	49	17	107	131	83	214	0.75/0.79
Incompleta	46	18	24	4	46	60	32	92	0.51/0.35
Incompleta + FP	5	2	2	1	5	6	4	10	0.89/0.98
Bilateral	154	57	76	14	147	190	104	294	0.24/0.17
Completa	125	49	58	13	120	156	84	240	0.38/0.17
Incompleta	8	3	5	0	8	11	5	16	0.48/0.49
Incompleta + FP	17	5	10	0	15	20	10	30	0.21/0.47
Incompleta Mista	4	0	3	1	4	3	5	8	0.33/0.19
FL direita + FL/P esquerda	3	0	2	1	3	2	4	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	151	186	42	379	488	270	758	0.17/0.08
Tipo/lado desconhecido	28	10	11	5	26	31	21	52	----
Total fissurados	500	181	234	56	471	596	346	942	0.33/0.17
Sem fissura (Controles)	500	169	238	71	478	576	380	956	----

rs217308

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		AA	AG	GG	Total	A	G	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	21	4	10	6	20	18	22	40	0.72/0.49
Incompleta	45	7	24	13	44	38	50	88	0.78/0.51
Total FP	66	11	34	19	64	56	72	128	0.64/0.37
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	33	129	113	275	195	355	550	0.19/0.10
Incompleta	104	8	53	37	98	69	127	196	0.30/0.24
Unilateral	250	27	112	92	231	166	296	462	0.35/0.17
Completa	175	21	75	63	159	117	201	318	0.50/0.36
Incompleta	75	6	37	29	72	49	95	144	0.36/0.19
Unilateral Direita	78	5	35	34	74	45	103	148	0.08/0.03
Completa	54	4	25	22	51	33	69	102	0.32/0.15
Incompleta	16	0	6	9	15	6	24	30	0.07/0.02
Incompleta + FP	8	1	4	3	8	6	10	16	0.98/0.86
Unilateral Esquerda	172	22	77	58	157	121	193	314	0.83/0.72
Completa	121	17	50	41	108	84	132	216	0.59/0.83
Incompleta	46	4	24	16	44	32	56	88	0.67/0.54
Incompleta + FP	5	1	3	1	5	5	5	10	0.77/0.50
Bilateral	154	14	70	58	142	98	186	284	0.26/0.11
Completa	125	12	54	50	116	78	154	232	0.19/0.09
Incompleta	8	0	5	3	8	5	11	16	0.30/0.49
Incompleta + FP	17	1	8	5	14	10	18	28	0.76/0.67
Incompleta Mista	4	1	3	0	4	5	3	8	0.17/0.18
FL direita + FL/P esquerda	3	1	2	0	3	4	2	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	41	183	150	374	265	483	748	0.17/0.07
Tipo/lado desconhecido	28	4	13	9	26	21	31	52	----
Total fissurados	500	56	230	178	464	342	586	928	0.61/0.21
Sem fissuras (Controles)	500	66	247	165	478	379	577	956	----

rs217325

	N	Genótipos				Alelos			Pgen/Palelo
Subfenótipo		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	1	10	9	20	12	28	40	0.13/0.15
Incompleta	45	4	16	25	45	24	66	90	0.18/0.17
Total FP	66	5	26	34	65	36	94	130	0.14/0.06
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	30	115	140	285	175	395	570	0.00001*
Incompleta	104	13	39	51	103	65	141	206	0.005/0.0006
Unilateral	250	22	99	117	238	143	333	476	0.0003/0.00001
Completa	175	15	69	79	163	99	227	326	0.001/0.0003
Incompleta	75	7	30	38	75	44	106	150	0.05/0.01
Unilateral Direita	78	7	29	39	75	43	107	150	0.09/0.02
Completa	54	3	22	26	51	28	74	102	0.11/0.10
Incompleta	16	3	6	7	16	12	20	32	0.07/0.02
Incompleta + FP	8	1	1	6	8	3	13	16	0.49/0.85
Unilateral Esquerda	172	15	70	78	163	100	226	326	0.0006/0.0002
Completa	121	12	47	53	112	71	153	224	0.002/0.0003
Incompleta	46	3	23	20	46	29	63	92	0.01/0.01
Incompleta + FP	5	0	0	5	5	0	10	10	0.10/0.03
Bilateral	154	21	55	74	150	97	203	300	0.0003/0.00001
Completa	125	15	46	61	122	76	168	244	0.004/0.0004
Incompleta	8	2	4	2	8	8	8	16	0.02/0.004
Incompleta + FP	17	4	3	9	16	11	21	32	0.01/0.06
Incompleta Mista	4	0	2	2	4	2	6	8	0.61/0.76
FL direita + FL/P esquerda	3	0	1	2	3	1	5	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	43	155	191	389	241	537	778	0.00001*
Tipo/lado desconhecido	28	3	9	15	27	15	39	54	----
Total fissurados	500	51	190	240	481	292	670	962	0.00001*
Sem fissuras (Controles)	500	29	140	311	480	198	762	960	----

rs3798867

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	6	10	4	20	22	18	40	0.80/0.55
Incompleta	45	14	23	7	44	51	37	88	0.94/0.75
Total FP	66	20	33	11	64	73	55	128	0.84/0.57
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	115	123	35	273	353	193	546	0.09/0.05
Incompleta	104	38	51	8	97	127	67	194	0.11/0.13
Unilateral	250	95	106	28	229	296	162	458	0.16/0.07
Completa	175	65	71	22	158	201	115	316	0.28/0.21
Incompleta	75	30	35	6	71	95	47	142	0.22/0.09
Unilateral Direita	78	32	34	6	72	98	46	144	0.14/0.05
Completa	54	20	25	5	50	65	35	100	0.55/0.29
Incompleta	16	9	6	0	15	24	6	30	0.06/0.02
Incompleta + FP	8	3	3	1	7	9	5	14	0.88/0.72
Unilateral Esquerda	172	63	72	22	157	198	116	314	0.40/0.28
Completa	121	45	46	17	108	136	80	216	0.27/0.37
Incompleta	46	17	23	4	44	57	31	88	0.55/0.34
Incompleta + FP	5	1	3	1	5	5	5	10	0.79/0.53
Bilateral	154	58	68	15	141	184	98	282	0.22/0.09
Completa	125	50	52	13	115	152	78	230	0.16/0.07
Incompleta	8	3	5	0	8	11	5	16	0.48/0.46
Incompleta + FP	17	5	8	1	14	18	10	28	0.71/0.62
Incompleta Mista	4	0	3	1	4	3	5	8	0.35/0.20
FL direita + FL/P esquerda	3	0	2	1	3	2	4	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	153	175	43	371	481	261	742	0.06/0.02
Tipo/lado desconhecido	28	10	12	4	26	32	20	52	----
Total fissurados	500	183	220	58	461	586	336	922	0.17/0.08
Sem fissuras (Controles)	500	163	242	71	476	568	384	952	----

rs512140

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	1	8	11	20	10	30	40	0.81/0.91
Incompleta	45	4	18	23	45	26	64	90	0.75/0.52
Total FP	66	5	26	34	65	36	94	130	0.71/0.64
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	24	115	145	284	163	405	568	0.27/0.21
Incompleta	104	6	48	47	101	60	142	202	0.05/0.25
Unilateral	250	17	102	118	237	136	338	474	0.09/0.24
Completa	175	14	65	84	163	93	233	326	0.48/0.33
Incompleta	75	3	37	34	74	43	105	148	0.03/0.39
Unilateral Direita	78	5	31	38	74	41	107	148	0.2/0.620
Completa	54	4	22	25	51	30	72	102	0.49/0.42
Incompleta	16	1	6	8	15	8	22	30	0.90/0.91
Incompleta + FP	8	0	3	5	8	3	13	16	0.69/0.52
Unilateral Esquerda	172	12	71	80	163	95	231	326	0.13/0.23
Completa	121	10	43	59	112	63	161	224	0.73/0.01
Incompleta	46	2	27	17	46	31	61	92	0.005/0.10
Incompleta + FP	5	0	1	4	5	1	9	10	0.54/0.25
Bilateral	154	13	61	74	148	87	209	296	0.32/0.21
Completa	125	10	50	61	121	70	172	242	0.40/0.32
Incompleta	8	1	4	3	8	6	10	16	0.55/0.28
Incompleta + FP	17	2	5	8	15	9	21	30	0.79/0.60
Incompleta Mista	4	0	2	2	4	2	6	8	0.73/0.95
FL direita + FL/P esquerda	3	0	1	2	3	1	5	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	406	30	164	192	386	224	548	772	0.07/0.13
Tipo/lado desconhecido	28	2	12	13	27	16	38	54	----
Total fissurados	500	37	202	239	478	276	680	956	0.06/0.12
Sem fissuras (Controles)	500	40	167	272	479	247	711	958	----

rs614565

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	2	6	12	20	10	30	40	0.80*
Incompleta	45	6	22	15	43	34	52	86	0.03/0.01
Total FP	66	8	28	27	63	44	82	126	0.16/0.05
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	16	92	163	271	124	418	542	0.38/0.09
Incompleta	104	2	44	51	97	48	146	194	0.05/0.56
Unilateral	250	9	91	128	228	109	347	456	0.10/0.25
Completa	175	9	57	91	157	75	239	314	0.55/0.31
Incompleta	75	0	34	37	71	34	108	142	0.02/0.48
Unilateral Direita	78	4	26	42	72	34	110	144	0.69/0.42
Completa	54	4	15	31	50	23	77	100	0.59/0.41
Incompleta	16	0	7	8	15	7	23	30	0.45/0.67
Incompleta + FP	8	0	4	3	7	4	10	14	0.47/0.87
Unilateral Esquerda	172	5	65	86	156	75	237	312	0.08/0.34
Completa	121	5	42	60	107	52	162	214	0.45/0.46
Incompleta	46	0	20	24	44	20	68	88	0.11/0.41
Incompleta + FP	5	0	3	2	5	3	7	10	0.52/0.81
Bilateral	154	9	45	86	140	63	217	280	0.36/0.15
Completa	125	7	35	72	114	49	179	228	0.25/0.10
Incompleta	8	0	1	7	8	1	15	16	0.17/0.06
Incompleta + FP	17	2	7	5	14	11	17	28	0.34/0.14
Incompleta Mista	4	0	2	2	4	2	6	8	0.76/0.91
FL direita + FL/P esquerda	3	0	1	2	3	1	5	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	18	136	215	369	172	566	738	0.25/0.10
Tipo/lado desconhecido	28	3	6	16	25	12	38	50	----
Total fissurados	500	29	170	258	457	228	686	914	0.53/0.37
Sem fissuras (Controles)	500	39	176	260	475	254	696	950	----

rs6940766

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	0	4	16	20	4	36	40	0.03/0.005
Incompleta	45	2	19	24	45	23	67	90	0.30/0.34
Total FP	66	2	23	40	65	27	103	130	0.07/0.02
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	12	86	187	285	110	460	570	0.00001*
Incompleta	104	8	33	62	103	49	157	206	0.20/0.06
Unilateral	250	17	77	144	238	111	365	476	0.04/0.005
Completa	175	10	51	102	163	71	255	326	0.003*
Incompleta	75	7	26	42	75	40	110	150	0.69/0.36
Unilateral Direita	78	4	24	47	75	32	118	150	0.10/0.02
Completa	54	2	16	33	51	20	82	102	0.09/0.02
Incompleta	16	2	6	8	16	10	22	32	0.99/0.91
Incompleta + FP	8	0	2	6	8	2	14	16	0.34/0.12
Unilateral Esquerda	172	13	53	97	163	79	247	326	0.21/0.03
Completa	121	8	35	69	112	51	173	224	0.10/0.02
Incompleta	46	5	17	24	46	27	65	92	0.97/0.84
Incompleta + FP	5	0	1	4	5	1	9	10	0.41/0.16
Bilateral	154	3	42	105	150	48	252	300	0.00001*
Completa	125	2	35	85	122	39	205	244	0.0001/0.00001
Incompleta	8	0	3	5	8	3	13	16	0.56/0.31
Incompleta + FP	17	1	3	12	16	5	27	32	0.17/0.07
Incompleta Mista	4	0	1	3	4	1	7	8	0.58/0.27
FL direita + FL/P esquerda	3	0	1	2	3	1	5	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	20	119	250	389	159	619	778	0.00001*
Tipo/lado desconhecido	28	0	8	19	27	8	46	54	----
Total fissurados	500	22	150	309	481	194	768	962	0.00001*
Sem fissuras (Controles)	500	57	176	245	478	290	666	956	----

rs624076

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	3	7	10	20	13	27	40	0.73/0.59
Incompleta	45	6	20	15	41	32	50	82	0.13/0.04
Total FP	66	9	27	25	61	45	77	122	0.18/0.05
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	16	104	137	257	136	378	514	0.25/0.38
Incompleta	104	2	44	51	97	48	146	194	0.03/0.27
Unilateral	250	15	97	115	227	127	327	454	0.25/0.81
Completa	175	5	63	79	147	73	221	294	0.86/0.20
Incompleta	75	0	34	36	70	34	106	140	0.01/0.29
Unilateral Direita	78	7	31	34	72	45	99	144	0.67/0.51
Completa	54	7	19	23	49	33	65	98	0.54/0.29
Incompleta	16	0	7	8	15	7	23	30	0.41/0.52
Incompleta + FP	8	0	5	3	8	5	11	16	0.30/0.81
Unilateral Esquerda	172	8	62	81	151	78	224	302	0.23/0.35
Completa	121	8	44	56	108	60	156	216	0.70/0.81
Incompleta	46	0	19	23	42	19	65	84	0.09/0.24
Incompleta + FP	5	0	3	2	5	3	7	10	0.52/0.92
Bilateral	154	3	51	73	127	57	197	254	0.02/0.05
Completa	125	1	41	58	100	43	157	200	0.01/0.04
Incompleta	8	0	1	7	8	1	15	16	0.14/0.04
Incompleta + FP	17	2	7	6	15	11	19	30	0.62/0.33
Incompleta Mista	4	0	2	2	4	2	6	8	0.75/0.82
FL direita + FL/P esquerda	3	0	1	2	3	1	5	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	18	148	189	355	184	526	710	0.03/0.22
Tipo/lado desconhecido	28	4	6	14	24	14	34	48	----
Total fissurados	500	31	181	228	440	243	637	880	0.27/0.64
Sem fissuras (Controles)	500	46	179	249	474	271	677	948	----

rs7753918

	N	Genótipos				Alelos			Pgen/Palelo
Subfenótipo		AA	AG	GG	Total	A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	21	0	5	15	20	5	35	40	0.28/0.41
Incompleta	45	6	8	31	45	20	70	90	0.60/0.26
Total FP	66	6	13	46	65	25	105	130	0.83/0.62
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	300	4	89	192	285	97	473	570	0.00001/0.80
Incompleta	104	3	26	73	102	32	172	204	0.02/0.73
Unilateral	250	4	67	166	237	75	399	474	0.00001/0.42
Completa	175	3	49	111	163	55	271	326	0.00001/0.79
Incompleta	75	1	18	55	74	20	128	148	0.03/0.22
Unilateral Direita	78	1	21	53	75	23	127	150	0.01/0.51
Completa	54	1	14	36	51	16	86	102	0.06/0.64
Incompleta	16	0	3	13	16	3	29	32	0.45/0.23
Incompleta + FP	8	0	4	4	8	4	12	16	0.04/0.43
Unilateral Esquerda	172	3	46	113	162	52	272	324	0.00001/0.54
Completa	121	2	35	75	112	39	185	224	0.0003/0.97
Incompleta	46	1	10	34	45	12	78	90	0.23/0.31
Incompleta + FP	5	0	1	4	5	1	9	10	0.78/0.53
Bilateral	154	3	48	99	150	54	246	300	0.00001/0.84
Completa	125	1	40	81	122	42	202	244	0.00001/0.0008
Incompleta	8	0	3	5	8	3	13	16	0.25/0.89
Incompleta + FP	17	2	5	9	16	9	23	32	0.26/0.12
Incompleta Mista	4	0	0	4	4	0	8	8	0.49/0.19
FL direita + FL/P esquerda	3	0	0	3	3	0	6	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	2	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	406	7	115	266	388	129	647	776	0.00001/0.62
Tipo/lado desconhecido	28	0	3	23	26	3	49	52	----
Total fissurados	500	13	131	335	479	157	801	958	0.00001/0.51
Sem fissuras (Controles)	500	43	82	355	480	168	792	960	----

rs10943944 Caucasianos

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo									
Fissura Palatina		CC	CT	TT	Total	C	T	Total	Pgen/Palelo
Completa	15	13	2	0	15	28	2	30	0.21/0.09
Incompleta	38	24	8	6	38	56	20	76	0.0003/0.12
Total FP	53	37	10	6	53	84	22	106	0.002/0.64
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	139	79	18	236	357	115	472	0.01/0.03
Incompleta	86	51	28	6	85	130	40	170	0.13/0.17
Unilateral									
Completa	336	203	107	26	336	513	159	672	0.03*
Incompleta	200	123	62	15	200	308	92	400	0.02/0.11
Incompleta	136	80	45	11	136	205	67	272	0.21/0.05
Unilateral Direita									
Completa	60	41	13	6	60	95	25	120	0.008/0.61
Incompleta	43	29	10	4	43	68	18	86	0.04/0.64
Incompleta	11	8	2	1	11	18	4	22	0.28/0.93
Incompleta + FP	6	4	1	1	6	9	3	12	0.09/0.59
Unilateral Esquerda									
Completa	140	82	49	9	140	213	67	280	0.09/0.08
Incompleta	93	51	35	7	93	137	49	186	0.03/0.02
Incompleta	44	29	13	2	44	71	17	88	0.69/0.91
Incompleta + FP	3	2	1	0	3	5	1	6	0.96/0.89
Bilateral									
Completa	123	67	45	9	121	179	63	242	0.02/0.02
Incompleta	101	59	34	7	100	152	48	200	0.10/0.11
Incompleta	6	2	4	0	6	8	4	12	0.21/0.20
Incompleta + FP	13	3	7	2	12	13	11	24	0.001*
Incompleta Mista	3	3	0	0	3	6	0	6	0.44/0.11
FL direita + FL/P esquerda	2	2	0	0	2	4	0	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	0	0	0	0	0	----
Fissura Mediana	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	377	191	107	24	322	489	155	644	0.01/0.02
Tipo/lado desconhecido	16	14	2	0	16	30	2	32	----
Total Fissurados	393	242	119	30	391	603	179	782	0.01/0.07
Sem fissura (Controles)	285	184	93	7	284	461	107	568	----

rs1171105 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	6	7	2	15	19	11	30	0.96/0.83
Incompleta	38	17	16	4	37	50	24	74	0.53/0.30
Total FP	53	23	23	6	52	69	35	104	0.57/0.34
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	105	98	31	234	308	160	468	0.14/0.14
Incompleta	86	41	37	15	93	119	67	186	0.25/0.53
Unilateral	336	91	148	45	284	330	238	568	0.26/0.25
Completa	200	60	90	27	177	210	144	354	0.31/0.20
Incompleta	136	31	58	18	107	120	94	214	0.60/0.26
Unilateral Direita	60	32	29	9	70	93	47	140	0.36/0.27
Completa	43	17	18	8	43	52	34	86	0.55/0.26
Incompleta	11	13	7	1	21	33	9	42	0.06/0.02
Incompleta + FP	6	2	4	0	6	8	4	12	0.55/0.71
Unilateral Esquerda	140	59	61	18	138	179	97	276	0.46/0.33
Completa	93	43	40	10	93	126	60	186	0.24/0.12
Incompleta	44	14	20	8	42	48	36	84	0.65/0.45
Incompleta + FP	3	2	1	0	3	5	1	6	0.52/0.27
Bilateral	123	55	45	19	119	155	83	238	0.09/0.32
Completa	101	45	40	13	98	130	66	196	0.24/0.22
Incompleta	6	2	3	1	6	7	5	12	0.97/0.82
Incompleta + FP	13	6	2	4	12	14	10	24	0.04/0.75
Incompleta Mista	3	2	0	1	3	4	2	6	0.21/0.79
FL direita + FL/P esquerda	2	2	0	0	2	4	0	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	377	146	136	46	328	428	228	656	0.10/0.16
Tipo/lado desconhecido	16	7	7	2	16	21	11	32	----
Total Fissurados	393	176	168	54	398	520	276	796	0.09/0.14
Sem fissura (Controles)	285	104	141	39	284	349	219	568	----

rs1171114 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	5	9	1	15	19	11	30	0.69/0.93
Incompleta	38	14	17	6	37	45	29	74	0.77/0.76
Total FP	53	19	26	7	52	64	40	104	0.96/0.83
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	77	114	43	234	268	200	468	0.13/0.07
Incompleta	86	23	46	16	85	92	78	170	0.11/0.04
Unilateral	236	65	99	34	198	229	167	396	0.26/0.13
Completa	200	52	61	22	135	165	105	270	0.45/0.67
Incompleta	136	13	38	12	63	64	62	126	0.02/0.01
Unilateral Direita	60	16	34	10	60	66	54	120	0.24/0.11
Completa	43	14	24	5	43	52	34	86	0.77/0.69
Incompleta	11	2	6	3	11	10	12	22	0.22/0.10
Incompleta + FP	6	0	4	2	6	4	8	12	0.09/0.03
Unilateral Esquerda	140	49	65	24	138	163	113	276	0.36/0.31
Completa	93	38	37	17	92	113	71	184	0.16/0.76
Incompleta	44	9	27	7	43	45	41	86	0.10/0.06
Incompleta + FP	3	2	1	0	3	5	1	6	0.54/0.29
Bilateral	123	35	61	25	121	131	111	242	0.05/0.02
Completa	101	25	53	21	99	103	95	198	0.02/0.008
Incompleta	6	3	2	1	6	8	4	12	0.71/0.77
Incompleta + FP	13	5	5	3	13	15	11	26	0.47/0.61
Incompleta Mista	3	2	1	0	3	5	1	6	0.54/0.29
FL direita + FL/P esquerda	2	2	0	0	2	4	0	4	----
FL esquerda + FP bilateral		0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	377	100	161	59	320	361	279	640	0.06/0.02
Tipo/lado desconhecido	16	7	5	2	14	19	9	28	----
Total fissurados	393	126	192	68	386	444	328	772	0.12/0.05
Sem fissura (Controles)	285	107	143	35	285	357	213	570	----

rs1325469 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	13	2	0	15	28	2	30	0.37/0.13
Incompleta	38	26	9	2	37	61	13	74	0.97/0.88
Total FP	53	39	11	2	52	89	15	104	0.82/0.53
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	148	72	9	229	368	90	458	0.22/0.25
Incompleta	86	52	28	2	82	132	32	164	0.18/0.43
Unilateral	200	119	69	7	195	307	83	390	0.03/0.08
Completa	136	79	48	6	133	206	60	266	0.05/0.05
Incompleta	64	40	21	1	62	101	23	124	0.21/0.65
Unilateral Direita	60	39	16	4	59	94	24	118	0.68/0.37
Completa	43	27	13	3	43	67	19	86	0.53/0.23
Incompleta	11	7	2	1	10	16	4	20	0.71/0.71
Incompleta + FP	6	5	1	0	6	11	1	12	0.75/0.43
Unilateral Esquerda	140	80	53	3	136	213	59	272	0.007/0.09
Completa	93	52	35	3	90	139	41	180	0.03/0.07
Incompleta	44	27	16	0	43	70	16	86	0.10/0.69
Incompleta + FP	3	1	2	0	3	4	2	6	0.24/0.28
Bilateral	123	81	31	4	116	193	39	232	0.81/0.97
Completa	101	69	24	3	96	162	30	192	0.82/0.68
Incompleta	6	3	3	0	6	9	3	12	0.34/0.46
Incompleta + FP	13	7	3	1	11	17	5	22	0.75/0.47
Incompleta Mista	3	2	1	0	3	5	1	6	0.88/0.98
FL direita + FL/P esquerda	2	1	1	0	2	3	1	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Fissura Mediana	1	1	0	0	1	2	0	2	----
Total FL/P	377	201	100	11	312	502	122	624	0.12/0.23
Tipo/lado desconhecido	16	8	6	1	15	22	8	30	----
Total fissurados	393	248	117	14	379	613	145	758	0.19/0.29
Controles (sem fissura)	285	201	70	13	284	472	96	568	----

rs1325474 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos				Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG	Total	A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	0	1	12	13	1	25	26	0.20/0.08
Incompleta	38	2	7	25	34	11	57	68	0.90/0.96
Total FP	53	2	8	37	47	12	82	94	0.61/0.37
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	10	71	139	220	91	349	440	0.08*
Incompleta	86	4	22	49	75	30	120	150	0.53/0.29
Unilateral		10	60	116	186	80	292	372	0.09/0.04
Completa	200	6	44	79	129	56	202	258	0.07/0.06
Incompleta	136	4	16	37	57	24	90	114	0.53/0.22
Unilateral Direita	60	4	13	59	76	21	131	152	0.50/0.44
Completa	43	3	12	27	42	18	66	84	0.56/0.25
Incompleta	11	1	1	8	10	3	17	20	0.49/0.87
Incompleta + FP	6	0	0	4	4	0	8	8	0.26/0.09
Unilateral Esquerda	140	6	47	77	130	59	201	260	0.02/0.02
Completa	93	3	32	52	87	38	136	174	0.04/0.09
Incompleta	44	1	15	25	41	17	65	82	0.17/0.32
Incompleta + FP	3	2	0	0	2	4	0	4	0.00001†
Bilateral	123	4	32	72	108	40	176	216	0.43/0.47
Completa	101	4	27	60	91	35	147	182	0.48/0.37
Incompleta	6	0	2	4	6	2	10	12	0.66/0.97
Incompleta + FP	13	0	3	6	9	3	15	18	0.54/0.97
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.81/0.98
FL direita + FL/P esquerda	2	0	1	1	2	1	3	4	----
FL esquerda + FP bilateral		0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	377	14	93	189	296	121	471	592	0.09/0.07
Tipo/lado desconhecido	16	0	5	9	14	5	23	28	----
Total fissurados	393	16	106	235	357	138	576	714	0.20/0.17
Controles (sem fissura)	285	13	65	200	278	91	465	556	----

rs2023238 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	2	9	9	20	13	27	40	0.46/0.92
Incompleta	38	5	21	18	44	31	57	88	0.62/0.50
Total FP	53	7	30	27	64	44	84	128	0.36/0.55
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	39	108	129	276	186	366	552	0.84/0.44
Incompleta	86	16	43	38	97	75	119	194	0.18/0.06
Unilateral	200	37	94	100	231	168	294	462	0.46/0.08
Completa	136	24	62	74	160	110	210	320	0.92/0.38
Incompleta	64	13	32	26	71	58	84	142	0.11/0.03
Unilateral Direita	60	13	29	31	73	55	91	146	0.47/0.15
Completa	43	10	19	22	51	39	63	102	0.43/0.18
Incompleta	11	3	7	5	15	13	17	30	0.32/0.18
Incompleta + FP	6	0	3	4	7	3	11	14	0.49/0.40
Unilateral Esquerda	140	24	65	69	158	113	203	316	0.33/0.19
Completa	93	14	43	52	109	71	147	218	0.48/0.81
Incompleta	44	10	20	14	44	40	48	88	0.11/0.008
Incompleta + FP	3	0	2	3	5	2	8	10	0.71/0.42
Bilateral	123	18	57	67	142	93	191	284	0.84/0.75
Completa	101	15	46	55	116	76	156	232	0.83/0.77
Incompleta	6	1	5	2	8	7	9	16	0.77/0.30
Incompleta + FP	13	2	5	7	14	9	19	28	0.94/0.96
Incompleta Mista	3	0	1	3	4	1	7	8	0.71/0.24
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	3	3	0	6	6	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	377	55	152	167	374	262	486	748	0.55/0.15
Tipo/lado desconhecido	16	3	13	10	26	19	33	52	----
Total fissurados	393	65	195	203	463	325	601	926	0.37/0.12
Sem fissura (Controles)	285	64	177	239	480	305	655	960	----

rs217290 Caucasianos

	N	Genótipos				Alelos			
Subfenótipo		AA	AG	GG	Total	A	G	Total	Pgen/Palelo
Fissura Palatina									
Completa	15	4	9	2	15	17	13	30	0.78/0.58
Incompleta	38	12	12	4	28	36	20	56	0.61/0.69
Total FP	53	16	21	6	43	53	33	86	0.88/0.99
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	89	111	31	231	289	173	462	0.58/0.76
Incompleta	86	34	44	6	84	112	56	168	0.39/0.23
Unilateral	200	79	92	24	195	250	140	390	0.46/0.44
Completa	136	51	62	19	132	164	100	264	0.53/0.89
Incompleta	64	28	30	5	63	86	40	126	0.33/0.16
Unilateral Direita	60	27	27	5	59	81	37	118	0.29/0.15
Completa	43	17	21	5	43	55	31	86	0.86/0.68
Incompleta	11	7	3	0	10	17	3	20	0.06/0.03
Incompleta + FP	6	3	3	0	6	9	3	12	0.58/0.34
Unilateral Esquerda	140	52	65	19	136	169	103	272	0.63/0.89
Completa	93	34	41	14	89	109	69	178	0.43/0.91
Incompleta	44	17	23	4	44	57	31	88	0.81/0.57
Incompleta + FP	3	1	1	1	3	3	3	6	0.51/0.55
Bilateral	123	44	63	13	120	151	89	240	0.93/0.73
Completa	101	38	49	12	99	125	73	198	0.84/0.71
Incompleta	6	2	4	0	6	8	4	12	0.62/0.72
Incompleta + FP	13	4	8	0	12	16	8	24	0.39/0.62
Incompleta Mista	3	0	2	1	3	2	4	6	0.32/0.15
FL direita + FL/P esquerda	2	0	1	1	2	1	3	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	377	123	156	37	316	402	230	632	0.65/0.48
Tipo/lado desconhecido	16	6	5	0	11	17	5	22	----
Total fissurados	393	145	182	43	370	472	268	740	0.59/0.43
Sem fissura (Controles)	285	100	149	34	283	349	217	566	----

rs217308 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	2	9	4	15	13	17	30	0.74/0.50
Incompleta	38	5	21	11	37	31	43	74	0.70/0.44
Total FP	53	7	30	15	52	44	60	104	0.56/0.33
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	29	108	91	228	166	290	456	0.46/0.76
Incompleta	86	7	42	32	81	56	106	162	0.77/0.52
Unilateral	200	23	94	77	194	140	248	388	0.64/0.69
Completa	136	18	64	51	133	100	166	266	0.59/0.94
Incompleta	64	5	30	26	61	40	82	122	0.59/0.34
Unilateral Direita	60	4	27	28	59	35	83	118	0.23/0.11
Completa	43	4	21	18	43	29	57	86	0.77/0.51
Incompleta	11	0	3	7	10	3	17	20	0.08/0.04
Incompleta + FP	6	0	3	3	6	3	9	12	0.61/0.38
Unilateral Esquerda	140	19	67	49	135	105	165	270	0.62/0.66
Completa	93	14	43	33	90	71	109	180	0.45/0.60
Incompleta	44	4	23	15	42	31	53	84	0.95/0.94
Incompleta + FP	3	1	1	1	3	3	3	6	0.45/0.52
Bilateral	123	13	56	46	115	82	148	230	0.74/0.65
Completa	101	11	44	40	95	66	124	190	0.53/0.52
Incompleta	6	0	4	2	6	4	8	12	0.64/0.77
Incompleta + FP	13	1	6	4	11	8	14	22	0.98/0.92
Incompleta Mista	3	1	2	0	3	4	2	6	0.28/0.13
FL direita + FL/P esquerda	2	1	1	0	2	3	1	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	377	36	151	123	310	223	397	620	0.60/0.62
Tipo/lado desconhecido	16	3	7	5	15	13	17	30	----
Total fissurados	393	46	188	143	377	280	474	754	0.73/0.94
Sem fissura (Controles)	285	31	150	103	284	212	356	568	----

rs217325 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	1	9	5	15	11	19	30	0.16/0.15
Incompleta	38	4	13	21	38	21	55	76	0.73/0.63
Total FP	53	5	22	26	53	32	74	106	0.55/0.27
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	22	102	113	237	146	328	474	0.10/0.03
Incompleta	86	12	33	41	86	57	115	172	0.09/0.03
Unilateral	200	17	88	95	200	122	278	400	0.12/0.06
Completa	136	10	61	65	136	81	191	272	0.20/0.14
Incompleta	64	7	27	30	64	41	87	128	0.28/0.10
Unilateral Direita	60	6	23	31	60	35	85	120	0.64/0.35
Completa	43	2	18	23	43	22	64	86	0.69/0.92
Incompleta	11	3	4	4	11	10	12	22	0.04/0.03
Incompleta + FP	6	1	1	4	6	3	9	12	0.47/0.99
Unilateral Esquerda	140	11	65	64	140	87	193	280	0.09/0.06
Completa	93	8	43	42	93	59	127	186	0.14/0.07
Incompleta	44	3	22	19	44	28	60	88	0.19/0.18
Incompleta + FP	3	0	0	3	3	0	6	6	0.32/0.06
Bilateral	123	17	47	61	125	81	169	250	0.07/0.03
Completa	101	12	41	48	101	65	137	202	0.15/0.05
Incompleta	6	2	3	1	6	7	5	12	0.02/0.009
Incompleta + FP	13	3	2	8	13	8	18	26	0.05/0.51
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.87/0.63
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	2	2	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	377	34	135	154	323	203	443	646	0.05/0.01
Tipo/lado desconhecido	16	2	5	9	16	9	23	32	----
Total fissurados	393	41	163	189	393	245	541	786	0.05/0.01
Sem fissura (Controles)	285	20	103	162	285	143	427	570	----

rs3798867 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	4	9	2	15	17	13	30	0.81/0.59
Incompleta	38	12	20	5	37	44	30	74	0.93/0.73
Total FP	53	16	29	7	52	61	43	104	0.83/0.58
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	93	103	31	227	289	165	454	0.18/0.03
Incompleta	86	33	40	7	80	106	54	160	0.50/0.27
Unilateral	200	80	88	24	192	248	136	384	0.23/0.33
Completa	136	53	60	19	132	166	98	264	0.30/0.70
Incompleta	64	27	28	5	60	82	38	120	0.30/0.16
Unilateral Direita	60	27	25	5	57	79	35	114	0.19/0.11
Completa	43	17	20	5	42	54	30	84	0.74/0.62
Incompleta	11	7	3	0	10	17	3	20	0.06/0.03
Incompleta + FP	6	3	2	0	5	8	2	10	0.43/0.23
Unilateral Esquerda	140	53	63	19	135	169	101	270	0.41/0.76
Completa	93	36	40	14	90	112	68	180	0.29/0.86
Incompleta	44	16	22	4	42	54	30	84	0.87/0.62
Incompleta + FP	3	1	1	1	3	3	3	6	0.49/0.56
Bilateral	123	46	55	14	115	147	83	230	0.56/0.52
Completa	101	40	43	12	95	123	67	190	0.22/0.42
Incompleta	6	2	4	0	6	8	4	12	0.63/0.71
Incompleta + FP	13	4	6	1	11	14	8	22	0.96/0.84
Incompleta Mista	3	0	2	1	3	2	4	6	0.31/0.15
FL direita + FL/P esquerda	2	0	1	1	2	1	3	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	377	126	144	38	308	396	220	616	0.23/0.32
Tipo/lado desconhecido	16	6	6	3	15	18	12	30	----
Total fissurados	393	148	179	48	375	475	275	750	0.33/0.50
Sem fissura (Controles)	285	98	151	33	282	347	217	564	----

rs512140 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	1	7	7	15	9	21	30	0.84/0.66
Incompleta	38	3	16	19	38	22	54	76	0.69/0.39
Total FP	53	4	23	26	53	31	75	106	0.62/0.35
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	18	97	121	236	133	339	472	0.14/0.04
Incompleta	86	6	43	35	84	55	113	168	0.38/0.78
Unilateral	200	14	89	96	199	117	281	398	0.22/0.14
Completa	136	11	54	71	136	76	196	272	0.23/0.08
Incompleta	64	3	35	25	63	41	85	126	0.14/0.77
Unilateral Direita	60	5	25	29	59	35	83	118	0.67/0.37
Completa	43	4	16	23	43	24	62	86	0.49/0.27
Incompleta	11	1	6	3	10	8	12	20	0.61/0.56
Incompleta + FP	6	0	3	3	6	3	9	12	0.67/0.52
Unilateral Esquerda	140	9	64	67	140	82	198	280	0.23/0.18
Completa	93	7	38	48	93	52	134	186	0.32/0.13
Incompleta	44	2	26	16	44	30	58	88	0.13/0.96
Incompleta + FP	3	0	0	3	3	0	6	6	0.15/0.02
Bilateral	123	10	51	60	121	71	171	242	0.44/0.20
Completa	101	7	43	50	100	57	143	200	0.34/0.16
Incompleta	6	1	3	2	6	5	7	12	0.85/0.57
Incompleta + FP	13	2	4	6	12	8	16	24	0.71/0.95
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.67/0.37
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	2	2	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Total FL/P	377	24	141	156	321	189	453	642	0.17/0.09
Tipo/lado desconhecido	16	1	7	8	16	9	23	32	----
Total fissurados	393	29	171	190	390	229	551	780	0.14/0.07
Sem fissura (Controles)	285	33	127	125	285	193	377	570	----

rs614565 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	1	4	10	15	6	24	30	0.63/0.38
Incompleta	38	3	20	113	136	26	246	272	0.09/0.00001
Total FP	53	4	24	23	51	32	70	102	0.42/0.38
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	13	73	140	226	99	353	452	0.16/0.05
Incompleta	86	2	35	43	80	39	121	160	0.14/0.47
Unilateral	200	7	74	111	192	88	296	384	0.10/0.13
Completa	136	7	46	79	132	60	204	264	0.37/0.16
Incompleta	64	0	28	32	60	28	92	120	0.04/0.38
Unilateral Direita	60	2	20	35	57	24	90	114	0.35/0.17
Completa	43	2	12	28	42	16	68	84	0.29/0.11
Incompleta	11	0	6	4	10	6	14	20	0.28/0.78
Incompleta + FP	6	0	2	3	5	2	8	10	0.79/0.61
Unilateral Esquerda	140	5	54	76	135	64	206	270	0.19/0.27
Completa	93	5	34	51	90	44	136	180	0.64/0.46
Incompleta	44	0	18	24	42	18	66	84	0.13/0.26
Incompleta + FP	3	0	2	1	3	2	4	6	0.55/0.73
Bilateral	123	8	34	72	114	50	178	228	0.25/0.12
Completa	101	6	27	61	94	39	149	188	0.18/0.07
Incompleta	6	0	1	5	6	1	11	12	0.34/0.14
Incompleta + FP	13	2	5	4	11	9	13	22	0.38/0.15
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.83/0.56
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	2	2	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	0	0	0	0	0	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	377	15	108	184	307	138	476	614	0.13/0.05
Tipo/lado desconhecido	16	1	5	8	14	7	21	28	----
Total fissurados	393	20	137	215	372	177	567	744	0.25/0.15
Sem fissura (Controles)	285	24	105	152	281	153	409	562	----

rs624076 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	1	5	9	15	7	23	30	0.79/0.49
Incompleta	38	4	18	13	35	26	44	70	0.26/0.17
Total FP	53	5	23	22	50	33	67	100	0.57/0.44
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	16	86	124	226	118	334	452	0.48/0.27
Incompleta	86	2	35	43	80	39	121	160	0.09/0.23
Unilateral	200	9	83	98	190	101	279	380	0.09/0.38
Completa	136	9	55	67	131	73	189	262	0.53/0.69
Incompleta	64	0	28	31	59	28	90	118	0.03/0.23
Unilateral Direita	60	3	26	28	57	32	82	114	0.40/0.81
Completa	43	3	17	21	41	23	59	82	0.84/0.83
Incompleta	11	0	6	4	10	6	14	20	0.30/0.93
Incompleta + FP	6	0	3	3	6	3	9	12	0.66/0.75
Unilateral Esquerda	140	6	57	70	133	69	197	266	0.15/0.33
Completa	93	6	38	46	90	50	130	180	0.58/0.71
Incompleta	44	0	17	23	40	17	63	80	0.11/0.14
Incompleta + FP	3	0	2	1	3	2	4	6	0.57/0.82
Bilateral	123	9	38	71	118	56	180	236	0.28/0.11
Completa	101	7	31	57	95	45	145	190	0.35/0.14
Incompleta	6	0	1	5	6	1	11	12	0.29/0.11
Incompleta + FP	13	2	5	5	12	9	15	24	0.68/0.38
Incompleta Mista	3	0	1	2	3	1	5	6	0.79/0.50
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	2	2	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	0	1	1	1	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	377	18	121	168	307	157	457	614	0.18/0.16
Tipo/lado desconhecido	16	2	4	7	13	8	18	26	----
Total fissurados	393	25	148	197	370	198	542	740	0.33/0.33
Sem fissura (Controles)	285	28	108	145	281	164	398	562	----

rs6940766 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		AA	AG	GG		A	G	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	0	2	13	15	2	28	30	0.04/0.01
Incompleta	38	2	16	20	38	20	56	76	0.52/0.76
Total FP	53	2	18	33	53	22	84	106	0.28/0.12
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	10	63	144	217	83	351	434	0.003/0.001
Incompleta	86	6	28	53	87	40	134	174	0.48/0.19
Unilateral	200	14	54	122	190	82	298	380	0.10/0.02
Completa	136	8	33	85	126	49	203	252	0.04/0.01
Incompleta	64	6	21	37	64	33	95	128	0.88/0.62
Unilateral Direita	60	3	17	40	60	23	97	120	0.17/0.04
Completa	43	1	13	29	43	15	71	86	0.14/0.04
Incompleta	11	2	3	6	11	7	15	22	0.66/0.68
Incompleta + FP	6	0	1	5	6	1	11	12	0.26/0.13
Unilateral Esquerda	140	11	47	82	140	69	211	280	0.62/0.31
Completa	93	7	30	56	93	44	142	186	0.56/0.25
Incompleta	44	4	17	23	44	25	63	88	0.90/0.92
Incompleta + FP	3	0	0	3	3	0	6	6	0.15/0.04
Bilateral	123	2	37	85	124	41	207	248	0.002/0.0005
Completa	101	2	30	69	101	34	168	202	0.008/0.001
Incompleta	6	0	3	3	6	3	9	12	0.45/0.82
Incompleta + FP	13	0	3	10	13	3	23	26	0.12/0.06
Incompleta Mista	3	0	1	3	4	1	7	8	0.54/0.33
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	2	2	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	1	1	2	1	3	4	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	377	16	91	198	305	123	487	610	0.005/0.001
Tipo/lado desconhecido	16	0	5	11	16	5	27	32	----
Total fissurados	393	18	114	242	374	150	598	748	0.002/0.0008
Sem fissura (Controles)	285	29	100	154	283	158	408	566	----

rs7753918 Caucasianos

Subfenótipo	N	Genótipos			Total	Alelos			Pgen/Palelo
		CC	CT	TT		C	T	Total	
Fissura Palatina									
Completa	15	0	2	13	15	2	28	30	0.37/0.10
Incompleta	38	5	5	28	38	15	61	76	0.70/0.78
Total FP	53	5	7	41	53	17	89	106	0.75/0.55
Fissura Labial e/ou Palatina									
Completa	237	3	77	157	237	83	391	474	0.00001/0.7
Incompleta	86	3	21	61	85	27	143	170	0.07/0.44
Unilateral	200	4	55	140	199	63	335	398	0.0002/0.29
Completa	136	3	42	91	136	48	224	272	0.0003/0.78
Incompleta	64	1	13	49	63	15	111	126	0.09/0.07
Unilateral Direita	60	1	14	45	60	16	104	120	0.08/0.18
Completa	43	1	11	31	43	13	73	86	0.14/0.45
Incompleta	11	0	1	10	11	1	21	22	0.37/0.09
Incompleta + FP	6	0	2	4	6	2	10	12	0.47/0.87
Unilateral Esquerda	140	3	41	95	139	47	231	278	0.0007/0.58
Completa	93	2	31	60	93	35	151	186	0.0006/0.9
Incompleta	44	1	10	32	43	12	74	86	0.20/0.31
Incompleta + FP	3	0	0	3	3	0	6	6	0.57/0.11
Bilateral	123	2	43	78	123	47	199	246	0.00001/0.81
Completa	101	0	35	66	101	35	167	202	0.00001/0.72
Incompleta	6	0	3	3	6	3	9	12	0.10/0.56
Incompleta + FP	13	2	5	6	13	9	17	26	0.09/0.04
Incompleta Mista	3	0	0	3	3	0	6	6	0.57/0.11
FL direita + FL/P esquerda	2	0	0	2	2	0	4	4	----
FL esquerda + FP bilateral	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Fissura Mediana	1	0	0	1	1	0	2	2	----
Total FL/P	377	6	96	219	321	108	534	642	0.00001/0.46
Tipo/lado desconhecido	16	0	2	13	15	2	28	30	----
Total fissurados	393	11	105	273	389	127	651	778	0.00001/0.31
Sem fissura (Controles)	285	28	49	208	285	105	465	570	----

ANEXO 8. Estudos genéticos utilizando anomalias dentárias como subfenótipos adicionais para FL/P (Seção 5.4)

Frequências obtidas para genótipos e alelos referentes a cada polimorfismo estudado:

1. TGFA – amostra completa
2. TGFA – caucasianos
3. IRF6 – amostra completa
4. IRF6 - caucasianos
5. Cromossomo 6q – amostra completa
6. Cromossomo 6q – caucasianos

rs1525305

Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Fissurados				total	CC	CT	TT	Controles			Pgen/Palelo
					Total	C	T	Total					C	T	total	
FP total com agenesia	14	1	8	4	13	10	16	26	101	220	121	442	422	462	884	0.42/0.35
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	108	236	131	475	452	498	950	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	108	236	132	476	452	500	952	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	1	3	2	4	6	106	236	132	474	448	500	948	0.46/0.49
FL/P direita com agenesia	27	6	15	5	26	27	25	52	101	220	121	442	422	462	884	0.63/0.55
FL/P esquerda com agenesia	40	12	14	11	37	38	36	74	101	220	121	442	422	462	884	0.30/0.55
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	2	4	5	11	8	14	22	108	235	132	475	451	499	950	0.43/0.30
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	7	5	5	17	19	15	34	108	236	132	476	452	500	952	0.15/0.33
FL/P bilateral com agenesia	39	10	17	10	37	37	37	74	101	220	121	442	422	462	884	0.83/0.70
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	0	2	2	0	4	4	108	235	132	475	451	499	950	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	1	3	4	8	5	11	16	108	236	132	476	452	500	952	0.37/0.19
FL/P bilateral frustro	27	9	9	8	26	27	25	52	101	220	121	442	422	462	884	0.25/0.55
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	108	236	132	476	452	500	952	---/---

rs2902345

Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Fissurados				total	CC	CT	TT	Controles			Pgen/Palelo
					Total	C	T	Total					C	T	total	
FP total com agenesia	14	5	7	1	13	17	9	26	146	211	87	444	503	385	888	0.56/0.37
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	158	226	93	477	542	412	954	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	159	226	93	478	544	412	956	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	0	3	4	2	6	159	225	92	476	543	409	952	0.49/0.63
FL/P direita com agenesia	27	9	15	2	26	33	19	52	146	211	87	444	503	385	888	0.30/0.33
FL/P esquerda com agenesia	40	11	15	13	39	37	41	78	146	211	87	444	503	385	888	0.12/0.11
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	6	3	2	11	15	7	22	159	225	93	477	543	411	954	0.30/0.29
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	5	5	7	17	15	19	34	159	226	93	478	544	412	956	0.08/0.13
FL/P bilateral com agenesia	39	9	16	12	37	34	40	74	146	211	87	444	503	385	888	0.16/0.07
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	159	225	93	477	543	411	954	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	5	2	1	8	12	4	16	159	226	93	478	544	412	956	0.22/0.14
FL/P bilateral frustro	27	9	11	6	26	29	23	52	146	211	87	444	503	385	888	0.002/0.14
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	159	226	93	478	544	412	956	---/---

rs377122

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	4	9	1	14	17	11	28	99	238	109	446	436	456	892	0.32/0.21
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	105	257	117	479	467	491	958	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	105	257	118	480	467	493	960	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	1	4	4	4	8	105	256	117	478	466	490	956	0.98/0.94
FL/P direita com agenesia	27	4	15	7	26	23	29	52	99	238	109	446	436	456	892	0.71/0.51
FL/P esquerda com agenesia	40	8	19	13	40	35	45	80	99	238	109	446	436	456	892	0.53/0.37
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	4	4	4	12	12	12	24	105	256	118	479	466	492	958	0.37/0.89
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	4	6	7	17	14	20	34	105	257	118	480	467	493	960	0.24/0.39
FL/P bilateral com agenesia	39	7	19	10	36	33	39	72	99	238	109	446	436	456	892	0.87/0.61
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	105	256	118	479	466	492	958	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	5	2	1	8	12	4	16	105	257	118	480	467	493	960	0.02/0.03
FL/P bilateral frustro	27	4	3	10	17	11	23	34	99	238	109	446	436	456	892	0.003/0.05
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	1	0	1	1	1	2	105	257	118	480	467	493	960	---/---

rs930655

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		AA	AG	GG	Total	A	G	total	AA	AG	GG	Total	A	G	total	
FP total com agenesia	14	2	5	7	14	9	19	28	77	222	149	448	376	520	896	0.42/0.29
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	85	239	157	481	409	553	962	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	85	239	158	482	409	555	964	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	2	4	2	6	8	84	239	157	480	407	553	960	0.41/0.32
FL/P direita com agenesia	27	4	14	8	26	22	30	52	77	222	149	448	376	520	896	0.91/0.96
FL/P esquerda com agenesia	40	10	18	11	39	38	40	78	77	222	149	448	376	520	896	0.40/0.24
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	1	5	6	12	7	17	24	85	238	158	481	408	554	962	0.41/0.19
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	7	5	5	17	19	15	34	85	239	158	482	409	555	964	0.04/0.11
FL/P bilateral com agenesia	39	5	21	11	37	31	43	74	77	222	149	448	376	520	896	0.68/0.99
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	85	238	158	481	408	554	962	0.64/0.48
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	1	4	3	8	6	10	16	85	239	158	482	409	555	964	0.91/0.69
FL/P bilateral frustro	27	6	10	10	26	22	30	52	77	222	149	448	376	520	896	0.52/0.96
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	85	239	158	482	409	555	964	---/---

rs1058213 (C3827T)

Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Fissurados				Controles							Pgen/Palelo
					Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	15	0	1	16	30	2	32	399	11	27	437	809	65	874	0.66/0.80
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	429	11	29	469	869	69	938	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	429	11	30	470	869	71	940	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	4	0	0	4	8	0	8	427	11	30	468	865	71	936	---/---
FL/P direita com agenesia	27	25	0	0	25	50	0	50	399	11	27	437	809	65	874	---/---
FL/P esquerda com agenesia	40	37	2	3	42	76	8	84	399	11	27	437	809	65	874	0.66/0.49
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	11	0	1	12	22	2	24	428	11	30	469	867	71	938	0.73/0.88
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	16	0	1	17	32	2	34	429	11	30	470	869	71	940	0.66/0.71
FL/P bilateral com agenesia	39	36	0	2	38	72	4	76	399	11	27	437	809	65	874	0.38/0.48
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	428	11	30	469	867	71	938	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	8	0	0	8	16	0	16	429	11	30	470	869	71	940	---/---
FL/P bilateral frustro	27	24	1	1	26	49	3	52	399	11	27	437	809	65	874	0.82/0.65
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	429	11	30	470	869	71	940	---/---

rs2166975 (C3296T)

Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Fissurados				total	CC	CT	TT	Controles				Pgen/Palelo
					Total	C	T	Total					C	T	total		
FP total com agenesia	14	8	5	1	14	21	7	28	339	79	25	443	757	129	886	0.21/0.22	
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	365	84	26	475	814	136	950	---/---	
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	365	85	26	476	815	137	952	---/---	
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	3	1	0	4	7	1	8	363	85	26	474	811	137	948	0.76/0.87	
FL/P direita com agenesia	27	19	4	1	24	42	6	48	339	79	25	443	757	129	886	0.93/0.69	
FL/P esquerda com agenesia	40	28	6	6	40	62	18	80	339	79	25	443	757	129	886	0.06/0.05	
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	11	1	0	12	23	1	24	364	85	26	475	813	137	950	0.32/0.15	
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	13	3	1	17	29	5	34	365	85	26	476	815	137	952	0.99/0.95	
FL/P bilateral com agenesia	39	23	9	2	34	55	13	68	339	79	25	443	757	129	886	0.44/0.30	
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	1	0	2	3	1	4	364	85	26	475	813	137	950	0.46/0.54	
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	6	1	0	7	13	1	14	365	85	26	476	815	137	952	0.64/0.44	
FL/P bilateral frustro	27	20	5	1	26	45	7	52	339	79	25	443	757	129	886	0.91/0.82	
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	365	85	26	476	815	137	952	---/---	

rs1525305 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	0	7	4	11	7	15	22	62	135	59	256	259	253	512	0.04/0.08
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	66	149	63	278	281	275	556	---/0.01
FP completa com multiplas anomalias	0	0	2	1	3	2	4	6	66	149	64	279	281	277	558	0.43/0.40
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	1	3	2	4	6	64	149	64	277	277	277	554	0.44/0.41
FL/P direita com agenesia	24	6	12	5	23	24	22	46	62	135	59	256	259	253	512	0.97/0.83
FL/P esquerda com agenesia	36	11	15	9	35	37	33	70	62	135	59	256	259	253	512	0.51/0.72
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	2	3	3	8	7	9	16	66	148	64	278	280	276	556	0.58/0.60
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	7	4	3	14	18	10	28	66	149	64	279	281	277	558	0.07/0.15
FL/P bilateral com agenesia	34	9	15	8	32	33	31	64	62	135	59	256	259	253	512	0.81/0.88
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	0	2	2	0	4	4	66	148	64	278	280	276	556	0.01/0.01
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	1	3	2	6	5	7	12	66	149	64	279	281	277	558	0.81/0.55
FL/P bilateral frustro	22	8	7	6	21	23	19	42	62	135	59	256	259	253	512	0.20/0.60
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	66	149	64	279	281	277	558	---/---

rs2902345 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	5	6	0	11	16	6	22	77	125	54	256	279	233	512	0.06/0.09
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	83	139	56	278	305	251	556	---/0.008
FP completa com multiplas anomalias	0	1	2	0	3	4	2	6	84	139	56	279	307	251	558	0.50/0.56
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	0	3	4	2	6	84	138	55	277	306	248	554	0.50/0.57
FL/P direita com agenesia	24	9	12	2	23	30	16	46	77	125	54	256	279	233	512	0.32/0.16
FL/P esquerda com agenesia	36	9	14	12	35	32	38	70	77	125	54	256	279	233	512	0.21/0.16
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	4	2	2	8	10	6	16	84	138	56	278	306	250	556	0.35/0.55
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	3	4	7	14	10	18	28	84	139	56	279	307	251	558	0.02/0.04
FL/P bilateral com agenesia	34	6	14	12	32	26	38	64	77	125	54	256	279	233	512	0.09/0.03
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	84	138	56	278	306	250	556	---/0.02
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	3	2	1	6	8	4	12	84	139	56	279	307	251	558	0.57/0.42
FL/P bilateral frustro	22	7	9	5	21	23	19	42	77	125	54	256	279	233	512	0.87/0.97
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	84	139	56	279	307	251	558	---/0.06

rs377122 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	4	7	1	12	15	9	24	56	144	58	258	256	260	516	0.41/0.21
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	59	160	61	280	278	282	560	---/0.01
FP completa com multiplas anomalias	0	2	1	1	4	5	3	8	59	160	62	281	278	284	562	0.32/0.6
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	1	4	4	4	8	59	159	61	279	277	281	558	0.96/0.98
FL/P direita com agenesia	24	4	13	6	23	21	25	46	56	144	58	258	256	260	516	0.95/0.60
FL/P esquerda com agenesia	36	7	17	12	36	31	41	72	56	144	58	258	256	260	516	0.38/0.29
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	3	3	3	9	9	9	18	59	159	62	280	277	283	560	0.37/0.94
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	3	5	6	14	11	17	28	59	160	62	281	278	284	562	0.16/0.29
FL/P bilateral com agenesia	34	6	16	9	31	28	34	62	56	144	58	258	256	260	516	0.71/0.50
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	59	159	62	280	277	283	560	---/0.01
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	4	1	1	6	9	3	12	59	160	62	281	278	284	562	0.02/0.08
FL/P bilateral frustro	22	4	10	8	22	18	26	44	56	144	58	258	256	260	516	0.33/0.26
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	1	0	1	1	1	2	59	160	62	281	278	284	562	---/0.98

rs930655 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		AA	AG	GG	Total	A	G	total	AA	AG	GG	Total	A	G	total	
FP total com agenesia	12	1	4	7	12	6	18	24	49	127	83	259	225	293	518	0.15/0.07
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	54	139	88	281	247	315	562	---/0.006
FP completa com multiplas anomalias	0	1	1	2	4	3	5	8	54	139	89	282	247	317	564	0.61/0.72
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	2	4	2	6	8	53	139	88	280	245	315	560	0.38/0.28
FL/P direita com agenesia	24	3	12	8	23	18	28	46	49	127	83	259	225	293	518	0.78/0.057
FL/P esquerda com agenesia	36	10	16	9	35	36	34	70	49	127	83	259	225	293	518	0.38/0.20
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	1	4	4	9	6	12	18	54	138	89	281	246	316	562	0.67/0.37
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	7	4	3	14	18	10	28	54	139	89	282	247	317	564	0.02/0.03
FL/P bilateral com agenesia	34	5	18	9	32	28	36	64	49	127	83	259	225	293	518	0.73/0.96
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	54	138	89	281	246	316	562	0.61/0.45
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	1	3	2	6	5	7	12	54	139	89	282	247	317	564	0.98/0.88
FL/P bilateral frustro	22	5	8	8	21	18	24	42	49	127	83	259	225	293	518	0.62/0.94
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	54	139	89	282	247	317	564	---/0.05

rs1058213 (C3827T) caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Fissurados				total	Controles				total	Pgen/Palelo	
					Total	C	T	CC		CT	TT	Total	C			T
FP total com agenesia	12	11	0	1	12	22	2	24	235	1	15	251	471	31	502	0.90/0.67
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	257	1	15	273	515	31	546	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	257	1	16	274	515	33	548	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	4	0	0	4	8	0	8	255	1	16	272	511	33	544	---/---
FL/P direita com agenesia	24	22	0	0	22	44	0	44	235	1	15	251	471	31	502	0.24/0.02
FL/P esquerda com agenesia	36	32	2	2	36	66	6	72	235	1	15	251	471	31	502	0.01/0.48
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	9	0	0	9	18	0	18	256	1	16	273	513	33	546	---/---
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	14	0	0	14	28	0	28	257	1	16	274	515	33	548	---/---
FL/P bilateral com agenesia	34	31	0	2	33	62	4	66	235	1	15	251	471	31	502	0.88/0.97
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	256	1	16	273	513	33	546	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	6	0	0	6	12	0	12	257	1	16	274	515	33	548	---/---
FL/P bilateral frustro	22	20	1	0	21	41	1	42	235	1	15	251	471	31	502	0.02/0.31
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	257	1	16	274	515	33	548	---/---

rs2166975 (C3296T) caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Fissurados				total	Controles				total	Pgen/Palelo	
					Total	C	T	CC		CT	TT	Total	C			T
FP total com agenesia	12	6	5	1	12	17	7	24	199	42	15	256	440	72	512	0.06/0.04
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	217	45	15	277	479	75	554	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	217	46	15	278	480	76	556	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	3	1	0	4	7	1	8	215	46	15	276	476	76	552	0.74/0.91
FL/P direita com agenesia	24	17	3	1	21	37	5	42	199	42	15	256	440	72	512	0.94/0.69
FL/P esquerda com agenesia	36	25	5	6	36	55	17	72	199	42	15	256	440	72	512	0.06/0.03
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	9	0	0	9	18	0	18	216	46	15	277	478	76	554	0.10/0.02
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	11	2	1	14	24	4	28	217	46	15	278	480	76	556	0.94/0.92
FL/P bilateral com agenesia	34	19	8	2	29	46	12	58	199	42	15	256	440	72	512	0.29/0.17
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	1	0	2	3	1	4	216	46	15	277	478	76	554	0.42/0.51
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	4	1	0	5	9	1	10	217	46	15	278	480	76	556	0.73/0.73
FL/P bilateral frustro	22	16	4	1	21	36	6	42	199	42	15	256	440	72	512	0.93/0.96
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	217	46	15	278	480	76	556	---/---

rs2013162

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	2	6	6	14	10	18	28	88	208	148	444	384	504	888	0.73/0.42
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	96	223	158	477	415	539	954	0.009/0.006
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	96	224	158	478	416	540	956	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	2	4	2	6	8	96	223	157	476	415	537	952	0.37/0.29
FL/P direita com agenesia	27	3	11	12	26	17	35	52	88	208	148	444	384	504	888	0.33/0.13
FL/P esquerda com agenesia	40	4	19	16	39	27	51	78	88	208	148	444	384	504	888	0.30/0.13
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	0	4	7	11	4	18	22	96	224	157	477	416	538	954	0.02/0.01
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	1	6	10	17	8	26	34	96	224	158	478	416	540	956	0.06/0.02
FL/P bilateral com agenesia	39	6	13	17	36	25	47	72	88	208	148	444	384	504	888	0.23/0.15
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	96	224	157	477	416	538	954	0.19/0.79
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	2	4	2	8	8	8	16	96	224	158	478	416	540	956	0.87/0.60
FL/P bilateral frustro	27	4	15	8	27	23	31	54	88	208	148	444	384	504	888	0.65/0.92
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	96	224	158	478	416	540	956	---/---

rs2073487

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	2	6	5	13	10	16	26	88	209	148	445	385	505	890	0.89/0.62
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	96	224	158	478	416	540	956	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	96	225	158	479	417	541	958	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	1	3	2	4	6	96	224	157	477	416	538	954	0.48/0.61
FL/P direita com agenesia	27	3	11	12	26	17	35	52	88	209	148	445	385	505	890	0.33/0.13
FL/P esquerda com agenesia	40	4	19	16	39	27	51	78	88	209	148	445	385	505	890	0.30/0.13
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	0	4	7	11	4	18	22	96	225	157	478	417	539	956	0.02/0.01
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	1	6	10	17	8	26	34	96	225	158	479	417	541	958	0.06/0.02
FL/P bilateral com agenesia	39	6	13	18	37	25	49	74	88	209	148	445	385	505	890	0.16/0.11
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	96	225	157	478	417	539	956	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	4	4	2	10	12	8	20	96	225	158	479	417	541	958	0.28/0.14
FL/P bilateral frustro	27	4	15	8	27	23	31	54	88	209	148	445	385	505	890	0.66/0.92
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	96	225	158	479	417	541	958	---/---

rs2235371 (VAL274I)

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	10	3	0	13	23	3	26	319	109	15	443	747	139	886	0.63/0.56
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	345	114	17	476	804	148	952	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	346	114	17	477	806	148	954	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	1	4	4	4	8	344	114	17	475	802	148	950	0.02/0.007
FL/P direita com agenesia	27	23	2	1	26	48	4	52	319	109	15	443	747	139	886	0.14/0.11
FL/P esquerda com agenesia	40	36	3	0	39	75	3	78	319	109	15	443	747	139	886	0.01/0.004
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	10	1	1	12	21	3	24	345	114	17	476	804	148	952	0.34/0.68
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	17	0	0	17	34	0	34	346	114	17	477	806	148	954	---/---
FL/P bilateral com agenesia	39	33	3	1	37	69	5	74	319	109	15	443	747	139	886	0.06/0.03
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	345	114	17	476	804	148	952	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	8	0	0	8	16	0	16	346	114	17	477	806	148	954	---/---
FL/P bilateral frustro	27	24	2	1	27	50	4	54	319	109	15	443	747	139	886	0.12/0.09
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	346	114	17	477	806	148	954	---/---

rs4844880

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		AA	AG	GG	Total	A	G	total	AA	AG	GG	Total	A	G	total	
FP total com agenesia	14	0	6	8	14	6	22	28	55	175	218	448	285	611	896	0.16/0.24
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	62	182	237	481	306	656	962	0.74/0.77
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	62	183	237	482	307	657	964	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	1	4	3	5	8	61	183	236	480	305	655	960	0.23/0.72
FL/P direita com agenesia	27	0	12	15	27	12	42	54	55	175	218	448	285	611	896	0.03/0.14
FL/P esquerda com agenesia	40	3	14	23	40	20	60	80	55	175	218	448	285	611	896	0.48/0.20
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	1	6	5	12	8	16	24	62	182	237	481	306	656	962	0.67/0.87
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	1	6	10	17	8	26	34	62	183	237	482	307	657	964	0.61/0.30
FL/P bilateral com agenesia	39	4	15	19	38	23	53	76	55	175	218	448	285	611	896	0.29/0.78
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	62	182	237	481	306	656	962	0.74/0.77
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	0	4	4	8	4	12	16	62	183	237	482	307	657	964	0.31/0.55
FL/P bilateral frustro	27	1	9	17	27	11	43	54	55	175	218	448	285	611	896	0.23/0.07
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	62	183	237	482	307	657	964	---/---

rs658860

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	2	3	9	14	7	21	28	11	109	324	444	131	757	888	0.03/0.13
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	12	118	347	477	142	812	954	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	12	118	348	478	142	814	956	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	1	3	4	1	7	8	12	118	346	476	142	810	952	0.90/0.84
FL/P direita com agenesia	27	1	4	22	27	6	48	54	11	109	324	444	131	757	888	0.49/0.46
FL/P esquerda com agenesia	40	1	14	24	39	16	62	78	11	109	324	444	131	757	888	0.29/0.17
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	1	4	6	11	6	16	22	12	118	347	477	142	812	954	0.24/0.10
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	1	6	10	17	8	26	34	12	118	348	478	142	814	956	0.38/0.16
FL/P bilateral com agenesia	39	1	9	26	36	11	61	72	11	109	324	444	131	757	888	0.99/0.90
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	12	118	347	477	142	812	954	0.68/0.57
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	0	1	7	8	1	15	16	12	118	348	478	142	814	956	0.57/0.33
FL/P bilateral frustro	27	0	7	20	27	7	47	54	11	109	324	444	131	757	888	0.51/0.71
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	12	118	348	478	142	814	956	---/---

rs861019

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	5	5	4	14	15	13	28	152	210	84	446	514	378	892	0.58/0.66
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	168	223	88	479	559	399	958	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	168	224	88	480	560	400	960	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	2	1	1	4	5	3	8	168	222	88	478	558	398	956	0.69/0.81
FL/P direita com agenesia	27	6	16	5	27	28	26	54	152	210	84	446	514	378	892	0.39/0.40
FL/P esquerda com agenesia	40	9	20	12	41	38	44	82	152	210	84	446	514	378	892	0.15/0.04
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	2	9	0	11	13	9	22	168	223	88	479	559	399	958	0.02/0.96
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	3	10	4	17	16	18	34	168	224	88	480	560	400	960	0.33/0.19
FL/P bilateral com agenesia	39	12	18	7	37	42	32	74	152	210	84	446	514	378	892	0.97/0.88
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	168	223	88	479	559	399	958	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	6	1	1	8	13	3	16	168	224	88	480	560	400	960	0.05/0.06
FL/P bilateral frustro	27	8	14	5	27	30	24	54	152	210	84	446	514	378	892	0.87/0.76
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	168	224	88	480	560	400	960	---/---

rs2013162 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	2	6	4	12	10	14	24	40	117	99	256	197	315	512	0.93/0.75
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	43	129	106	278	215	341	556	0.002/0.003
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	43	130	106	279	216	342	558	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	2	4	2	6	8	43	129	105	277	215	339	554	0.49/0.42
FL/P direita com agenesia	24	3	11	9	23	17	29	46	40	117	99	256	197	315	512	0.94/0.83
FL/P esquerda com agenesia	36	3	17	15	35	23	47	70	40	117	99	256	197	315	512	0.54/0.36
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	0	2	6	8	2	14	16	43	130	105	278	216	340	556	0.04/0.03
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	1	4	9	14	6	22	28	43	130	106	279	216	342	558	0.14/0.06
FL/P bilateral com agenesia	34	4	12	15	31	20	42	62	40	117	99	256	197	315	512	0.57/0.34
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	43	130	105	278	216	340	556	0.19/0.64
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	1	3	2	6	5	7	12	43	130	106	279	216	342	558	0.97/0.83
FL/P bilateral frustro	22	3	13	6	22	19	25	44	40	117	99	256	197	315	512	0.46/0.53
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	43	130	106	279	216	342	558	---/---

rs2073487 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	2	6	3	11	10	12	22	41	117	98	256	199	313	512	0.76/0.53
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	44	129	105	278	217	339	556	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	44	130	105	279	218	340	558	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	1	3	2	4	6	44	129	104	277	217	337	554	0.54/0.77
FL/P direita com agenesia	24	3	11	9	23	17	29	46	41	117	98	256	199	313	512	0.93/0.79
FL/P esquerda com agenesia	36	3	17	15	35	23	47	70	41	117	98	256	199	313	512	0.50/0.33
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	0	1	0	1	1	1	2	44	130	104	278	218	338	556	0.43/0.75
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	1	4	9	14	6	22	28	44	130	105	279	218	340	558	0.13/0.06
FL/P bilateral com agenesia	34	4	12	16	32	20	44	64	41	117	98	256	199	313	512	0.44/0.23
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	44	130	104	278	218	338	556	0.19/0.65
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	1	3	2	6	5	7	12	44	130	105	279	218	340	558	0.97/0.85
FL/P bilateral frustro	22	3	13	6	22	19	25	44	41	117	98	256	199	313	512	0.47/0.57
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	44	130	105	279	218	340	558	0.32/0.15

rs2235371 (VAL274I) caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	8	3	0	11	19	3	22	228	25	2	255	481	29	510	0.16/0.12
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	248	27	2	277	523	31	554	0.00001†
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	249	27	2	278	525	31	556	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	2	1	0	3	5	1	6	247	27	2	276	521	31	552	0.39/0.24
FL/P direita com agenesia	24	21	1	1	23	43	3	46	228	25	2	255	481	29	510	0.20/0.81
FL/P esquerda com agenesia	36	33	2	0	35	68	2	70	228	25	2	255	481	29	510	0.56/0.32
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	7	1	0	8	15	1	16	248	27	2	277	523	31	554	0.91†
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	14	0	0	14	28	0	28	249	27	2	278	525	31	556	0.22/0.07
FL/P bilateral com agenesia	34	29	3	0	32	61	3	64	228	25	2	255	481	29	510	0.78/0.74
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	248	27	2	277	523	31	554	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	6	0	0	6	12	0	12	249	27	2	278	525	31	556	0.51/0.24
FL/P bilateral frustro	22	21	0	1	22	42	2	44	228	25	2	255	481	29	510	0.03/0.75
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	249	27	2	278	525	31	556	---/---

rs4844880 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		AA	AG	GG	Total	A	G	total	AA	AG	GG	Total	A	G	total	
FP total com agenesia	12	0	5	7	12	5	19	24	14	87	158	259	115	403	518	0.47/0.87
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	16	91	174	281	123	439	562	0.79/0.88
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	16	92	174	282	124	440	564	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	1	4	3	5	8	15	92	173	280	122	438	560	0.18/0.28
FL/P direita com agenesia	24	0	9	15	24	9	39	48	14	87	158	259	115	403	518	0.27/0.58
FL/P esquerda com agenesia	36	3	11	22	36	17	55	72	14	87	158	259	115	403	518	0.75/0.78
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	1	4	4	9	6	12	18	16	91	174	281	123	439	562	0.53/0.25
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	1	4	9	14	6	22	28	16	92	174	282	124	440	564	0.93/0.94
FL/P bilateral com agenesia	34	3	13	18	34	19	49	68	14	87	158	259	115	403	518	0.57/0.28
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	16	91	174	281	123	439	562	0.79/0.88
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	0	3	3	6	3	9	12	16	92	174	282	124	440	564	0.51/0.80
FL/P bilateral frustro	22	1	5	16	22	7	37	44	14	87	158	259	115	403	518	0.54/0.33
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	16	92	174	282	124	440	564	---/---

rs658860 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	2	3	5	10	7	13	20	5	65	185	255	75	435	510	0.001/0.01
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	5	73	199	277	83	471	554	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	5	73	200	278	83	473	556	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	1	3	4	1	7	8	5	73	198	276	83	469	552	0.92/0.84
FL/P direita com agenesia	24	1	3	20	24	5	43	48	5	65	185	255	75	435	510	0.30/0.41
FL/P esquerda com agenesia	36	0	13	22	35	13	57	70	5	65	185	255	75	435	510	0.19/0.39
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	0	3	5	8	3	13	16	5	73	199	277	83	471	554	0.69/0.67
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	0	5	9	14	5	23	28	5	73	200	278	83	473	556	0.59/0.67
FL/P bilateral com agenesia	34	1	9	21	31	11	51	62	5	65	185	255	75	435	510	0.80/0.52
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	5	73	199	277	83	471	554	0.73/0.57
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	0	1	5	6	1	11	12	5	73	200	278	83	473	556	0.76/0.52
FL/P bilateral frustro	22	0	5	17	22	5	39	44	5	65	185	255	75	435	510	0.62/0.54
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	5	73	200	278	83	473	556	---/---

rs861019 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	5	3	4	12	13	11	24	72	128	57	257	272	242	514	0.24/0.90
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	82	138	59	279	302	256	558	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	82	139	59	280	303	257	560	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	2	1	1	4	5	3	8	82	137	59	278	301	255	556	0.58/0.63
FL/P direita com agenesia	24	5	14	5	24	24	24	48	72	128	57	257	272	242	514	0.67/0.69
FL/P esquerda com agenesia	36	7	18	10	35	32	38	70	72	128	57	257	272	242	514	0.10/0.25
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	1	7	0	8	9	7	16	82	138	59	279	302	256	558	0.04/0.86
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	2	8	4	14	12	16	28	82	139	59	280	303	257	560	0.46/0.24
FL/P bilateral com agenesia	34	4	17	6	27	25	29	54	72	128	57	257	272	242	514	0.29/0.35
FL/P bilateral com supranumerario	2	2	0	0	2	4	0	4	82	138	59	279	302	256	558	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	4	1	1	6	9	3	12	82	139	59	280	303	257	560	0.12/0.15
FL/P bilateral frustro	22	5	12	5	22	22	22	44	72	128	57	257	272	242	514	0.86/0.70
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	82	139	59	280	303	257	560	---/---

rs10943944

Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Fissurados				CC	CT	TT	Controles				Pgen/Palelo
					Total	C	T	total				Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	7	5	2	14	19	9	28	304	127	15	446	735	157	892	0.07/0.04
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	321	142	16	479	784	174	958	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	322	142	16	480	786	174	960	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	2	1	1	4	5	3	8	321	141	16	478	783	173	956	0.06/0.15
FL/P direita com agenesia	27	17	7	3	27	41	13	54	304	127	15	446	735	157	892	0.12/0.22
FL/P esquerda com agenesia	40	23	14	3	40	60	20	80	304	127	15	446	735	157	892	0.23/0.10
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	7	4	1	12	18	6	24	322	142	15	479	786	172	958	0.55/0.37
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	11	6	0	17	28	6	34	322	142	16	480	786	174	960	0.52/0.94
FL/P bilateral com agenesia	39	21	13	4	38	55	21	76	304	127	15	446	735	157	892	0.05/0.03
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	1	0	2	3	1	4	322	142	15	479	786	172	958	0.78/0.71
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	7	1	1	9	15	3	18	322	142	16	480	786	174	960	0.25/0.87
FL/P bilateral frustro	27	14	11	2	27	39	15	54	304	127	15	446	735	157	892	0.17/0.05
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	322	142	16	480	786	174	960	---/---

rs1171105

Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Fissurados				CC	CT	TT	Controles				Pgen/Palelo
					Total	C	T	total				Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	7	6	1	14	20	8	28	183	206	58	447	572	322	894	0.71/0.41
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	197	220	63	480	614	346	960	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	1	2	1	4	4	4	8	197	221	63	481	615	347	962	0.70/0.41
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	1	4	3	5	8	197	220	63	480	614	346	960	0.10/0.12
FL/P direita com agenesia	27	15	8	4	27	38	16	54	183	206	58	447	572	322	894	0.23/0.34
FL/P esquerda com agenesia	40	13	21	6	40	47	33	80	183	206	58	447	572	322	894	0.58/0.35
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	5	4	3	12	14	10	24	197	221	62	480	615	345	960	0.42/0.56
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	5	8	4	17	18	16	34	197	221	63	481	615	347	962	0.39/0.19
FL/P bilateral com agenesia	39	19	13	5	37	51	23	74	183	206	58	447	572	322	894	0.40/0.39
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	197	221	62	480	615	345	960	---/0.55
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	3	4	1	8	10	6	16	197	221	63	481	615	347	962	0.97/0.90
FL/P bilateral frustro	27	12	11	4	27	35	19	54	183	206	58	447	572	322	894	0.86/0.90
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	197	221	63	481	615	347	962	---/---

rs1171114

	Fissurados								Controles								Pgen/Palelo
Novos subfenotipos propostos	n	CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total		
FP total com agenesia	14	5	7	1	13	17	9	26	191	213	43	447	595	299	894	0.90†	
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	213	220	47	480	646	314	960	---/0.46	
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	213	221	47	481	647	315	962	---/---	
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	0	3	4	2	6	213	219	47	479	645	313	958	0.62/0.97	
FL/P direita com agenesia	27	13	10	4	27	36	18	54	191	213	43	447	595	299	894	0.47/0.98	
FL/P esquerda com agenesia	40	17	18	5	40	52	28	80	191	213	43	447	595	299	894	0.83/0.77	
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	5	4	3	12	14	10	24	212	221	47	480	645	315	960	0.21/0.36	
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	5	8	4	17	18	16	34	213	221	47	481	647	315	962	0.14/0.08	
FL/P bilateral com agenesia	39	12	19	7	38	43	33	76	191	213	43	447	595	299	894	0.15/0.07	
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	1	0	2	3	1	4	212	221	47	480	645	315	960	0.81/0.73	
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	5	1	2	8	11	5	16	213	221	47	481	647	315	962	0.11/0.89	
FL/P bilateral frustro	27	11	9	7	27	31	23	54	191	213	43	447	595	299	894	0.02/0.16	
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	213	221	47	481	647	315	962	---/---	

rs1325469

rs1325469	Fissurados								Controles								Pgen/Palelo
Novos subfenotipos propostos	n	AA	AG	GG	Total	A	G	total	AA	AG	GG	Total	A	G	total		
FP total com agenesia	14	11	2	0	13	24	2	26	304	125	18	447	733	161	894	0.32/0.17	
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	323	135	22	480	781	179	960	---/---	
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	324	135	22	481	783	179	962	---/---	
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	3	0	0	3	6	0	6	322	135	22	479	779	179	958	---/---	
FL/P direita com agenesia	27	16	8	2	26	40	12	52	304	125	18	447	733	161	894	0.60/0.35	
FL/P esquerda com agenesia	40	26	13	0	39	65	13	78	304	125	18	447	733	161	894	0.18/0.76	
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	4	6	1	11	14	8	22	324	135	21	480	783	177	960	0.09/0.03	
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	10	7	0	17	27	7	34	324	135	22	481	783	179	962	0.25/0.77	
FL/P bilateral com agenesia	39	29	8	0	37	66	8	74	304	125	18	447	733	161	894	0.14/0.11	
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	324	135	21	480	783	177	960	---/0.10	
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	5	3	0	8	13	3	16	324	135	22	481	783	179	962	0.60/0.98	
FL/P bilateral frustro	27	19	7	0	26	45	7	52	304	125	18	447	733	161	894	0.34/0.40	
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	324	135	22	481	783	179	962	---/---	

rs1325474

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados								Controles								Pgen/Palelo
		AA	AG	GG	Total	A	G	total	AA	AG	GG	Total	A	G	total			
FP total com agenesia	14	0	2	11	13	2	24	26	17	119	297	433	153	713	866	0.34/0.18		
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	21	127	317	465	169	761	930	---/---		
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	21	127	318	466	169	763	932	---/---		
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	0	3	3	0	6	6	21	127	316	464	169	759	928	---/---		
FL/P direita com agenesia	27	1	8	17	26	10	42	52	17	119	297	433	153	713	866	0.93/0.77		
FL/P esquerda com agenesia	40	0	11	28	39	11	67	78	17	119	297	433	153	713	866	0.22/0.42		
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	1	6	4	11	8	14	22	20	127	318	465	167	763	930	0.08/0.02		
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	0	6	11	17	6	28	34	21	127	318	466	169	763	932	0.38/0.94		
FL/P bilateral com agenesia	39	1	7	26	34	9	59	68	17	119	297	433	153	713	866	0.63/0.35		
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	20	127	318	465	167	763	930	---/0.09		
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	0	3	6	9	3	15	18	21	127	318	466	169	763	932	0.62/0.87		
FL/P bilateral frustro	27	0	5	21	26	5	47	52	17	119	297	433	153	713	866	0.20/0.13		
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	21	127	318	466	169	763	932	---/---		

rs217290

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados				C	T	total	Controles				C	T	total	Pgen/Paleo
		CC	CT	TT	Total				CC	CT	TT	Total				
FP total com agenesia	14	5	9	0	14	19	9	28	155	225	66	446	535	357	892	0.10/0.40
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	170	238	71	479	578	380	958	---/0.67
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	170	239	71	480	579	381	960	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	2	2	0	4	6	2	8	170	237	71	478	577	379	956	0.49/0.39
FL/P direita com agenesia	27	9	11	5	25	29	21	50	155	225	66	446	535	357	892	0.72/0.78
FL/P esquerda com agenesia	40	15	20	5	40	50	30	80	155	225	66	446	535	357	892	0.89/0.65
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	5	5	2	12	15	9	24	169	239	71	479	577	381	958	0.85/0.82
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	8	8	1	17	24	10	34	170	239	71	480	579	381	960	0.46/0.22
FL/P bilateral com agenesia	39	12	21	5	38	45	31	76	155	225	66	446	535	357	892	0.84/0.89
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	169	239	71	479	577	381	958	---/0.67
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	4	3	1	8	11	5	16	170	239	71	480	579	381	960	0.69/0.49
FL/P bilateral frustro	27	10	10	6	26	30	22	52	155	225	66	446	535	357	892	0.38/0.74
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	170	239	71	480	579	381	960	---/---

rs217308

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	14	0	8	5	13	8	18	26	61	235	150	446	357	535	892	0.15/0.34
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	66	247	166	479	379	579	958	---/0.67
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	66	248	166	480	380	580	960	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	1	3	2	4	6	66	246	166	478	378	578	956	0.61/0.75
FL/P direita com agenesia	27	4	10	12	26	18	34	52	61	235	150	446	357	535	892	0.34/0.43
FL/P esquerda com agenesia	40	5	20	14	39	30	48	78	61	235	150	446	357	535	892	0.95/0.78
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	3	4	4	11	10	12	22	66	248	165	479	380	578	958	0.38/0.58
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	1	8	8	17	10	24	34	66	248	166	480	380	580	960	0.46/0.23
FL/P bilateral com agenesia	39	5	18	13	36	28	44	72	61	235	150	446	357	535	892	0.94/0.85
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	66	248	165	479	380	578	958	0.70/0.54
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	1	2	5	8	4	12	16	66	248	166	480	380	580	960	0.24/0.23
FL/P bilateral frustro	27	6	9	11	26	21	31	52	61	235	150	446	357	535	892	0.16/0.95
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	66	248	166	480	380	580	960	---/---

rs217325

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	14	1	5	8	14	7	21	28	26	130	292	448	182	714	896	0.82/0.54
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	30	140	311	481	200	762	962	---/0.15
FP completa com multiplas anomalias	2	1	1	2	4	3	5	8	30	141	311	482	201	763	964	0.30/0.24
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	1	4	4	4	8	30	140	310	480	200	760	960	0.15/0.04
FL/P direita com agenesia	27	1	9	17	27	11	43	54	26	130	292	448	182	714	896	0.82/0.99
FL/P esquerda com agenesia	40	3	19	18	40	25	55	80	26	130	292	448	182	714	896	0.03/0.02
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	1	5	6	12	7	17	24	30	140	311	481	200	762	962	0.57/0.31
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	0	9	8	17	9	25	34	30	141	311	482	201	763	964	0.05/0.42
FL/P bilateral com agenesia	39	6	12	21	39	24	54	78	26	130	292	448	182	714	896	0.05/0.03
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	30	140	311	481	200	762	962	---/0.15
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	1	2	5	8	4	12	16	30	141	311	482	201	763	964	0.76/0.68
FL/P bilateral frustro	27	1	9	17	27	11	43	54	26	130	292	448	182	714	896	0.82/0.99
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	30	141	311	482	201	763	964	---/---

rs2023238

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	14	1	6	6	13	8	18	26	59	162	227	448	280	616	896	0.70/0.95
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	64	177	240	481	305	657	962	---/0.43
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	64	178	240	482	306	658	964	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	0	3	3	3	6	64	178	238	480	306	654	960	---/0.34
FL/P direita com agenesia	27	5	8	13	26	18	34	52	59	162	227	448	280	616	896	0.64/0.61
FL/P esquerda com agenesia	40	8	19	12	39	35	43	78	59	162	227	448	280	616	896	0.05/0.01
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	2	5	4	11	9	13	22	63	178	240	481	304	658	962	0.66/0.35
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	3	9	5	17	15	19	34	64	178	240	482	306	658	964	0.25/0.12
FL/P bilateral com agenesia	39	4	14	18	36	22	50	72	59	162	227	448	280	616	896	0.91/0.90
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	63	178	240	481	304	658	962	---/0.42
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	1	4	3	8	6	10	16	64	178	240	482	306	658	964	0.73/0.62
FL/P bilateral frustro	27	5	10	11	26	20	32	52	59	162	227	448	280	616	896	0.59/0.27
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	64	178	240	482	306	658	964	---/---

rs3798867

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	14	5	8	0	13	18	8	26	149	229	66	444	527	361	888	0.12/0.31
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	164	242	71	477	570	384	954	---/0.69
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	164	243	71	478	571	385	956	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	0	3	4	2	6	164	241	71	476	569	383	952	0.59/0.73
FL/P direita com agenesia	27	10	11	5	26	31	21	52	149	229	66	444	527	361	888	0.63/0.96
FL/P esquerda com agenesia	40	14	20	5	39	48	30	78	149	229	66	444	527	361	888	0.92/0.70
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	4	4	3	11	12	10	22	163	243	71	477	569	385	954	0.45/0.63
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	8	8	1	17	24	10	34	164	243	71	478	571	385	956	0.42/0.20
FL/P bilateral com agenesia	39	14	17	6	37	45	29	74	149	229	66	444	527	361	888	0.80†
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	1	0	2	3	1	4	163	243	71	477	569	385	954	0.69/0.53
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	5	2	1	8	12	4	16	164	243	71	478	571	385	956	0.23/0.21
FL/P bilateral frustro	27	10	10	6	26	30	22	52	149	229	66	444	527	361	888	0.35/0.81
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	164	243	71	478	571	385	956	---/---

rs512140

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	14	0	6	8	14	6	22	28	36	156	255	447	228	666	894	0.29/0.62
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	40	167	273	480	247	713	960	0.78/0.97
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	40	168	273	481	248	714	962	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	1	4	3	5	8	40	167	272	479	247	711	958	0.20/0.45
FL/P direita com agenesia	27	2	9	15	26	13	39	52	36	156	255	447	228	666	894	0.99/0.93
FL/P esquerda com agenesia	40	4	19	17	40	27	53	80	36	156	255	447	228	666	894	0.20/0.10
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	3	4	5	12	10	14	24	39	168	273	480	246	714	960	0.11/0.07
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	4	6	7	17	14	20	34	40	168	273	481	248	714	962	0.08/0.04
FL/P bilateral com agenesia	39	2	16	20	38	20	56	76	36	156	255	447	228	666	894	0.61/0.87
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	39	168	273	480	246	714	960	---/0.26
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	1	3	4	8	5	11	16	40	168	273	481	248	714	962	0.88/0.62
FL/P bilateral frustro	27	4	11	12	27	19	35	54	36	156	255	447	228	666	894	0.30/0.11
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	40	168	273	481	248	714	962	---/---

rs614565

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	14	0	6	7	13	6	20	26	35	163	245	443	233	653	886	0.31/0.71
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	39	177	260	476	255	697	952	0.80/0.93
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	39	178	260	477	256	698	954	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	0	3	3	0	6	6	39	178	258	475	256	694	950	---/---
FL/P direita com agenesia	27	1	10	15	26	12	40	52	35	163	245	443	233	653	886	0.75/0.60
FL/P esquerda com agenesia	40	1	17	21	39	19	59	78	35	163	245	443	233	653	886	0.40/0.70
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	2	5	4	11	9	13	22	38	178	260	476	254	698	952	0.33/0.13
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	2	6	9	17	10	24	34	39	178	260	477	256	698	954	0.86/0.73
FL/P bilateral com agenesia	39	2	12	21	35	16	54	70	35	163	245	443	233	653	886	0.82/0.52
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	0	2	2	0	4	4	38	178	260	476	254	698	952	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	0	2	6	8	2	14	16	39	178	260	477	256	698	954	0.32/0.19
FL/P bilateral frustro	27	2	15	9	26	19	33	52	35	163	245	443	233	653	886	0.09/0.10
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	39	178	260	477	256	698	954	---/---

rs624076

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	14	0	7	6	13	7	19	26	41	169	232	442	251	633	884	0.19/0.86
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	46	180	249	475	272	678	950	0.79/0.87
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	46	181	249	476	273	679	952	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	1	2	3	1	5	6	46	181	247	474	273	675	948	0.69/0.51
FL/P direita com agenesia	27	2	15	17	34	19	49	68	41	169	232	442	251	633	884	0.69/0.93
FL/P esquerda com agenesia	40	2	15	21	38	19	57	76	41	169	232	442	251	633	884	0.70/0.52
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	2	5	4	11	9	13	22	45	181	249	475	271	679	950	0.46/0.20
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	2	4	10	16	8	24	32	46	181	249	476	273	679	952	0.56/0.65
FL/P bilateral com agenesia	39	2	14	19	35	18	52	70	41	169	232	442	251	633	884	0.77/0.63
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	0	1	2	2	2	4	45	181	249	475	271	679	950	0.08/0.34
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	1	2	5	8	4	12	16	46	181	249	476	273	679	952	0.75/0.74
FL/P bilateral frustro	27	2	14	9	25	18	32	50	41	169	232	442	251	633	884	0.20/0.24
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	46	181	249	476	273	679	952	---/---

rs6940766

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	14	0	4	10	14	4	24	28	52	163	231	446	267	625	892	0.10/0.07
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	57	175	247	479	289	669	958	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	57	176	247	480	290	670	960	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	1	4	3	5	8	57	175	246	478	289	667	956	0.21/0.65
FL/P direita com agenesia	27	2	10	15	27	14	40	54	52	163	231	446	267	625	892	0.78/0.53
FL/P esquerda com agenesia	40	3	15	22	40	21	59	80	52	163	231	446	267	625	892	0.72/0.48
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	0	5	7	12	5	19	24	57	175	247	479	289	669	958	0.22/0.32
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	1	7	9	17	9	25	34	57	176	247	480	290	670	960	0.73/0.64
FL/P bilateral com agenesia	39	0	15	24	39	15	63	78	52	163	231	446	267	625	892	0.009/0.04
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	0	2	2	0	4	4	57	175	247	479	289	669	958	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	0	1	7	8	1	15	16	57	176	247	480	290	670	960	0.07/0.03
FL/P bilateral frustro	27	2	9	16	27	13	41	54	52	163	231	446	267	625	892	0.68/0.35
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	57	176	247	480	290	670	960	---/---

rs7753918

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	14	1	3	10	14	5	23	28	39	75	334	448	153	743	896	0.89/0.91
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	43	83	355	481	169	793	962	---/---
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	43	83	356	482	169	795	964	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	1	3	4	1	7	8	43	82	355	480	168	792	960	0.65/0.71
FL/P direita com agenesia	27	1	7	19	27	9	45	54	39	75	334	448	153	743	896	0.35/0.93
FL/P esquerda com agenesia	40	1	11	28	40	13	67	80	39	75	334	448	153	743	896	0.12/0.85
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	12	0	4	8	12	4	20	24	43	83	355	481	169	793	962	0.14/0.90
FL/P esquerda com multiplas anomalias	17	0	3	14	17	3	31	34	43	83	356	482	169	795	964	0.20/0.18
FL/P bilateral com agenesia	39	3	9	27	39	15	63	78	39	75	334	448	153	743	896	0.60/0.62
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	43	83	355	481	169	793	962	0.41/0.69
FL/P bilateral com multiplas anomalias	8	0	1	7	8	1	15	16	43	83	356	482	169	795	964	0.42/0.23
FL/P bilateral frustro	27	1	6	20	27	8	46	54	39	75	334	448	153	743	896	0.54/0.66
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	43	83	356	482	169	795	964	---/---

rs10943944 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	7	3	2	12	17	7	24	168	83	7	258	419	97	516	0.03/0.20
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	181	91	8	280	453	107	560	0.40/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	182	91	8	281	455	107	562	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	2	1	1	4	5	3	8	181	90	8	279	452	106	558	0.04/0.018
FL/P direita com agenesia	24	16	5	3	24	37	11	48	168	83	7	258	419	97	516	0.03/0.48
FL/P esquerda com agenesia	36	20	13	3	36	53	19	72	168	83	7	258	419	97	516	0.17/0.12
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	5	3	1	9	13	5	18	182	91	7	280	455	105	560	0.29/0.33
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	6	4	0	10	16	4	20	182	91	8	281	455	107	562	0.68/0.91
FL/P bilateral com agenesia	34	17	13	3	33	47	19	66	168	83	7	258	419	97	516	0.09/0.05
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	1	0	2	3	1	4	182	91	7	280	455	105	560	0.83/0.74
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	5	1	0	6	11	1	12	182	91	8	281	455	107	562	0.57/0.34
FL/P bilateral frustro	22	12	8	2	22	32	12	44	168	83	7	258	419	97	516	0.22/0.17
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	182	91	8	281	455	107	562	---/---

rs1171105 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	6	5	1	12	17	7	24	92	130	36	258	314	202	516	0.58/0.32
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	2	0	0	2	4	0	4	100	140	40	280	340	220	560	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	1	2	1	4	4	4	8	100	141	40	281	341	221	562	0.80/0.53
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	1	4	3	5	8	99	140	40	279	338	220	558	0.16/0.18
FL/P direita com agenesia	24	13	7	4	24	33	15	48	92	130	36	258	314	202	516	0.12/0.28
FL/P esquerda com agenesia	36	11	20	5	36	42	30	72	92	130	36	258	314	202	516	0.81/0.68
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	4	3	2	9	11	7	18	100	141	39	280	341	219	560	0.57/0.98
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	4	7	3	14	15	13	28	100	141	40	281	341	221	562	0.71/0.45
FL/P bilateral com agenesia	34	17	10	5	32	44	20	64	92	130	36	258	314	202	516	0.10/0.22
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	100	141	39	280	341	219	560	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	2	3	1	6	7	5	12	100	141	40	281	341	221	562	0.98/0.65
FL/P bilateral frustro	22	12	8	2	22	32	12	44	92	130	36	258	314	202	516	0.21/0.11
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	100	141	40	281	341	221	562	---/---

rs1171114 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	5	6	0	11	16	6	22	95	131	33	259	321	197	518	0.22/0.30
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	109	137	35	281	355	207	562	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	109	137	35	281	355	207	562	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	0	3	4	2	6	109	136	35	280	354	206	560	0.61/0.86
FL/P direita com agenesia	24	11	9	4	24	31	17	48	95	131	33	259	321	197	518	0.47/0.72
FL/P esquerda com agenesia	36	15	17	4	36	47	25	72	95	131	33	259	321	197	518	0.83/0.58
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	4	3	3	10	11	9	20	108	138	35	281	354	208	562	0.22†
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	4	7	3	14	15	13	28	109	137	35	281	355	207	562	0.54/0.30
FL/P bilateral com agenesia	34	11	16	6	33	38	28	66	95	131	33	259	321	197	518	0.68/0.48
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	1	0	2	3	1	4	108	138	35	281	354	208	562	0.75†
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	1	1	0	2	3	1	4	109	137	35	281	355	207	562	0.75/0.62
FL/P bilateral frustro	22	8	8	6	22	24	20	44	95	131	33	259	321	197	518	0.14/0.33
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	109	137	35	281	355	207	562	---/---

rs1325469 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		AA	AG	GG	Total	A	G	total	AA	AG	GG	Total	A	G	total	
FP total com agenesia	12	10	1	0	11	21	1	22	185	66	7	258	436	80	516	0.32/0.15
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	0	0	0	0	0	201	71	8	280	473	87	560	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	201	71	8	280	473	87	560	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	3	0	0	3	6	0	6	200	71	8	279	471	87	558	---/---
FL/P direita com agenesia	24	16	6	1	23	38	8	46	185	66	7	258	436	80	516	0.89/0.73
FL/P esquerda com agenesia	36	23	12	0	35	58	12	70	185	66	7	258	436	80	516	0.24/0.72
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	2	5	1	8	9	7	16	202	71	7	280	475	85	560	0.009/0.002
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	8	6	0	14	22	6	28	201	71	8	280	473	87	560	0.25/0.40
FL/P bilateral com agenesia	34	24	8	0	32	56	8	64	185	66	7	258	436	80	516	0.43/0.52
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	201	71	7	279	473	85	558	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	3	4	0	7	10	4	14	201	71	8	280	473	87	560	0.14/0.18
FL/P bilateral frustro	22	16	5	0	21	37	5	42	185	66	7	258	436	80	516	0.55/0.53
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	185	66	7	258	436	80	516	---/---

rs1325474 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		AA	AG	GG	Total	A	G	total	AA	AG	GG	Total	A	G	total	
FP total com agenesia	12	0	1	10	11	1	21	22	7	63	183	253	77	429	506	0.33/0.16
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	8	66	200	274	82	466	548	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	8	66	201	275	82	468	550	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	0	0	0	0	0	0	8	66	199	273	82	464	546	---/---
FL/P direita com agenesia	24	1	6	16	23	8	38	46	7	63	183	253	77	429	506	0.89/0.69
FL/P esquerda com agenesia	36	0	10	25	35	10	60	70	7	63	183	253	77	429	506	0.37/0.83
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	1	5	2	8	7	9	16	7	66	201	274	80	468	548	0.007/0.001
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	0	5	9	14	5	23	28	8	66	201	275	82	468	550	0.43/0.67
FL/P bilateral com agenesia	34	1	7	21	29	9	49	58	7	63	183	253	77	429	506	0.97/0.95
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	7	66	201	274	80	468	548	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	0	3	3	6	3	9	12	8	66	201	275	82	468	550	0.30/0.33
FL/P bilateral frustro	22	0	4	7	11	4	18	22	7	63	183	253	77	429	506	0.53/0.70
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1								8	66	201	275	82	468	550	---/---

rs217290 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	4	8	0	12	16	8	24	92	134	31	257	318	196	514	0.19/0.63
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	102	143	34	279	347	211	558	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	102	144	34	280	348	212	560	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	0	0	0	0	0	0	102	142	34	278	346	210	556	---/---
FL/P direita com agenesia	24	8	10	4	22	26	18	44	92	134	31	257	318	196	514	0.67/0.71
FL/P esquerda com agenesia	36	13	18	5	36	44	28	72	92	134	31	257	318	196	514	0.94/0.90
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	3	4	2	9	10	8	18	101	144	34	279	346	212	558	0.66/0.57
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	6	7	1	14	19	9	28	102	144	34	280	348	212	560	0.80/0.54
FL/P bilateral com agenesia	34	10	19	4	33	39	27	66	92	134	31	257	318	196	514	0.81/0.66
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	101	144	34	279	346	212	558	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	3	3	0	6	9	3	12	102	144	34	280	348	212	560	0.41/0.62
FL/P bilateral frustro	22	8	8	5	21	24	18	42	92	134	31	257	318	196	514	0.24/0.54
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	102	144	34	280	348	212	560	---/---

rs217308 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CT	TT	Total	C	T	total	CC	CT	TT	Total	C	T	total	
FP total com agenesia	12	0	7	4	11	7	15	22	26	141	91	258	193	323	516	0.31/0.59
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	29	149	102	280	207	353	560	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	2	1	3	2	4	6	29	150	102	281	208	354	562	0.69/0.85
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	2	1	3	2	4	6	29	148	102	279	206	352	558	0.69/0.85
FL/P direita com agenesia	24	3	10	10	23	16	30	46	26	141	91	258	193	323	516	0.58/0.72
FL/P esquerda com agenesia	36	4	18	12	34	26	42	68	26	141	91	258	193	323	516	0.95/0.89
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	3	3	2	8	9	7	16	29	150	101	280	208	352	560	0.05/0.11
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	1	7	6	14	9	19	28	29	150	102	281	208	354	562	0.85/0.60
FL/P bilateral com agenesia	34	4	16	11	31	24	38	62	26	141	91	258	193	323	516	0.87/0.84
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	29	150	101	280	208	352	560	0.76/0.61
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	0	2	4	6	2	10	12	29	150	102	281	208	354	562	0.20/0.14
FL/P bilateral frustro	22	5	8	8	21	18	24	42	26	141	91	258	193	323	516	0.11/0.48
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	29	150	102	281	208	354	562	---/---

rs217325 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	12	1	4	7	12	6	18	24	19	92	148	259	130	388	518	0.98/0.99
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	23	100	158	281	146	416	562	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	1	1	2	4	3	5	8	23	101	158	282	147	417	564	0.47/0.46
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	1	4	4	4	8	23	100	157	280	146	414	560	0.47/0.12
FL/P direita com agenesia	24	1	8	15	24	10	38	48	19	92	148	259	130	388	518	0.79/0.51
FL/P esquerda com agenesia	36	3	18	15	36	24	48	72	19	92	148	259	130	388	518	0.70/0.13
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	1	4	4	9	6	12	18	23	100	158	281	146	416	562	0.77/0.48
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	0	8	6	14	8	20	28	23	101	158	282	147	417	564	0.11/0.76
FL/P bilateral com agenesia	34	6	11	17	34	23	45	68	19	92	148	259	130	388	518	0.12†
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	23	100	158	281	146	416	562	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	1	2	3	6	4	8	12	23	101	158	282	147	417	564	0.75/0.57
FL/P bilateral frustro	22	1	8	13	22	10	34	44	19	92	148	259	130	388	518	0.88/0.72
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	23	101	158	282	147	417	564	---/---

rs2023238 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	12	1	5	6	12	7	17	24	35	95	129	259	165	353	518	0.85/0.78
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	39	105	137	281	183	379	562	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	2	1	3	2	4	6	39	106	137	282	184	380	564	0.44/0.97
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	0	3	3	3	6	39	106	135	280	184	376	560	---/---
FL/P direita com agenesia	24	5	6	12	23	16	30	46	35	95	129	259	165	353	518	0.42/0.68
FL/P esquerda com agenesia	36	7	18	10	35	32	38	70	35	95	129	259	165	353	518	0.06/0.02
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	1	4	3	8	6	10	16	38	106	137	281	182	380	562	0.77/0.66
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	2	8	4	14	12	16	28	39	106	137	282	184	380	564	0.29/0.26
FL/P bilateral com agenesia	34	4	12	15	31	20	42	62	35	95	129	259	165	353	518	0.97/0.94
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	2	0	2	2	2	4	38	106	137	281	182	380	562	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	1	3	2	6	5	7	12	39	106	137	282	184	380	564	0.75/0.50
FL/P bilateral frustro	22	4	8	9	21	16	26	42	35	95	129	259	165	353	518	0.73/0.40
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	39	106	137	282	184	380	564	---/---

rs3798867 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesia	12	4	7	0	11	15	7	22	89	138	29	256	316	196	512	0.26/0.54
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	2	0	2	2	2	4	99	147	32	278	345	211	556	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	1	2	0	3	4	2	6	99	148	32	279	346	212	558	0.67/0.81
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	1	2	0	3	4	2	6	99	146	32	277	344	210	554	0.66/0.81
FL/P direita com agenesia	24	9	10	4	23	28	18	46	89	138	29	256	316	196	512	0.54/0.90
FL/P esquerda com agenesia	36	12	18	5	35	42	28	70	89	138	29	256	316	196	512	0.87/0.78
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	2	3	3	8	7	9	16	98	148	32	278	344	212	556	0.10/0.14
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	6	7	1	14	19	9	28	99	148	32	279	346	212	558	0.79/0.53
FL/P bilateral com agenesia	34	12	15	5	32	39	25	64	89	138	29	256	316	196	512	0.68/0.90
FL/P bilateral com supranumerario	2	1	1	0	2	3	1	4	98	148	32	278	344	212	556	0.74/0.58
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	4	2	0	6	10	2	12	99	148	32	279	346	212	558	0.18/0.13
FL/P bilateral frustro	22	8	8	5	21	24	18	42	89	138	29	256	316	196	512	0.17/0.55
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	1	0	0	1	2	0	2	99	148	32	279	346	212	558	---/---

rs512140 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados				C	G	total	Controles				C	G	total	Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total				CC	CG	GG	Total				
FP total com agenesia	14	0	5	7	12	5	19	24	31	119	109	259	181	337	518	0.16/0.15
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	35	129	117	281	199	363	562	0.76/0.66
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	35	130	117	282	200	364	564	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	1	4	3	5	8	35	129	116	280	199	361	560	0.370/0.90
FL/P direita com agenesia	23	2	8	13	23	12	34	46	31	119	109	259	181	337	518	0.40/0.22
FL/P esquerda com agenesia	34	3	18	15	36	24	48	72	31	119	109	259	181	337	518	0.78†
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	13	2	3	4	9	7	11	18	34	130	117	281	198	364	562	0.59/0.74
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	3	5	6	14	11	17	28	35	130	117	282	200	364	564	0.55/0.68
FL/P bilateral com agenesia	42	2	14	17	33	18	48	66	31	119	109	259	181	337	518	0.45/0.21
FL/P bilateral com supranumerario	4	0	2	0	2	2	2	4	34	130	117	281	198	364	562	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	4	1	2	3	6	4	8	12	35	130	117	282	200	364	564	0.82/0.87
FL/P bilateral frustro	27	3	9	10	22	15	29	44	31	119	109	259	181	337	518	0.89/0.90
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias		0	0	1	1	0	2	2	35	130	117	282	200	364	564	---/---

rs614565 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados				C	G	total	Controles				C	G	total	Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total				CC	CG	GG	Total				
FP total com agenesia	12	0	5	6	11	5	17	22	18	95	142	255	131	379	510	0.42/0.75
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	21	104	152	277	146	408	554	0.82/0.95
FP completa com multiplas anomalias	0	0	0	0	0	0	0	0	21	105	152	278	147	409	556	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	0	3	3	0	6	6	21	105	150	276	147	405	552	---/---
FL/P direita com agenesia	24	1	8	14	23	10	36	46	18	95	142	255	131	379	510	0.83/0.55
FL/P esquerda com agenesia	36	1	14	20	35	16	54	70	18	95	142	255	131	379	510	0.63/0.60
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	2	2	4	8	6	10	16	20	105	152	277	145	409	554	0.16/0.31
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	2	3	9	14	7	21	28	21	105	152	278	147	409	556	0.37/0.86
FL/P bilateral com agenesia	34	2	7	19	28	11	45	56	18	95	142	255	131	379	510	0.42/0.32
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	0	2	2	0	4	4	20	105	152	277	145	409	554	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	0	0	6	6	0	12	12	21	105	152	278	147	409	556	---/---
FL/P bilateral frustro	22	2	2	17	21	6	36	42	18	95	142	255	131	379	510	0.03/0.10
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	21	105	152	278	147	409	556	---/---

rs624076 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados				C	G	total	Controles				C	G	total	Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total				CC	CG	GG	Total				
FP total com agenesis	14	0	6	5	11	6	16	22	21	101	133	255	143	367	510	0.29/0.93
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	1	1	2	1	3	4	24	109	144	277	157	397	554	0.81/0.88
FP completa com multiplas anomalias	2	0	0	0	0	0	0	0	24	110	144	278	158	398	556	---/---
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	1	2	3	1	5	6	24	110	142	276	158	394	552	0.71/0.51
FL/P direita com agenesis	23	1	10	11	22	12	32	44	21	101	133	255	143	367	510	0.76/0.51
FL/P esquerda com agenesis	34	2	12	20	34	16	52	68	21	101	133	255	143	367	510	0.73/0.43
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	13	2	2	4	8	6	10	16	23	110	144	277	156	398	554	0.23/0.41
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	2	1	10	13	5	21	26	24	110	144	278	158	398	556	0.06/0.30
FL/P bilateral com agenesis	42	2	10	18	30	14	46	60	21	101	133	255	143	367	510	0.71/0.44
FL/P bilateral com supranumerario	4	1	0	1	2	2	2	4	23	110	144	277	156	398	554	0.09/0.33
FL/P bilateral com multiplas anomalias	4	1	0	5	6	2	10	12	24	110	144	278	158	398	556	0.04/0.37
FL/P bilateral frustro	27	1	11	8	20	13	27	40	21	101	133	255	143	367	510	0.39/0.54
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias		0	0	1	1	0	2	2	24	110	144	278	158	398	556	---/---

rs6940766 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados				C	G	total	Controles				C	G	total	Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total				CC	CG	GG	Total				
FP total com agenesis	12	0	4	8	12	4	20	24	23	90	145	258	136	380	516	0.31/0.28
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	26	98	156	280	150	410	560	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	0	2	2	4	2	6	8	26	99	156	281	151	411	562	0.60/0.90
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	3	1	4	3	5	8	26	98	155	279	150	408	558	0.20/0.50
FL/P direita com agenesis	24	2	8	14	24	12	36	48	23	90	145	258	136	380	516	0.97/0.83
FL/P esquerda com agenesis	36	3	14	19	36	20	52	72	23	90	145	258	136	380	516	0.89/0.79
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	0	4	5	9	4	14	18	26	98	156	280	150	410	560	0.39/0.66
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	1	6	7	14	8	20	28	26	99	156	281	151	411	562	0.83/0.84
FL/P bilateral com agenesis	34	0	13	21	34	13	55	68	23	90	145	258	136	380	516	0.05/0.19
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	0	2	2	0	4	4	26	98	156	280	150	410	560	---/---
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	0	1	5	6	1	11	12	26	99	156	281	151	411	562	0.28/0.14
FL/P bilateral frustro	22	2	7	13	22	11	33	44	23	90	145	258	136	380	516	0.95/0.84
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	26	99	156	281	151	411	562	---/---

rs7753918 caucasianos

Novos subfenotipos propostos	n	Fissurados							Controles							Pgen/Palelo
		CC	CG	GG	Total	C	G	total	CC	CG	GG	Total	C	G	total	
FP total com agenesis	12	1	1	10	12	3	21	24	21	48	190	259	90	428	518	0.66/0.53
FP completa com retencao de dentes permanentes	2	0	0	2	2	0	4	4	24	52	205	281	100	462	562	---/---
FP completa com multiplas anomalias	0	1	1	2	4	3	5	8	24	52	206	282	100	464	564	0.44/0.14
FP incompleta com giroversao/lateroversao	4	0	1	3	4	1	7	8	24	51	205	280	99	461	560	0.67/0.70
FL/P direita com agenesis	24	1	4	19	24	6	42	48	21	48	190	259	90	428	518	0.74/0.38
FL/P esquerda com agenesis	36	1	10	25	36	12	60	72	21	48	190	259	90	428	518	0.26/0.88
FL/P esquerda com microdontia ou supranumerario	9	0	3	6	9	3	15	18	24	52	205	281	100	462	562	0.27/0.90
FL/P esquerda com multiplas anomalias	14	0	2	12	14	2	26	28	24	52	206	282	100	464	564	0.25/0.14
FL/P bilateral com agenesis	34	2	9	23	34	13	55	68	21	48	190	259	90	428	518	0.52/0.72
FL/P bilateral com supranumerario	2	0	1	1	2	1	3	4	24	52	205	281	100	462	562	0.46/0.70
FL/P bilateral com multiplas anomalias	6	0	1	5	6	1	11	12	24	52	206	282	100	464	564	0.57/0.39
FL/P bilateral frustro	22	1	3	18	22	5	39	44	21	48	190	259	90	428	518	0.67/0.30
FL/P bilateral frustro com multiplas anomalias	1	0	0	1	1	0	2	2	24	52	206	282	100	464	564	---/---

ANEXO 9. Análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados (Seção 5.5)

TGFA – CASOS AMOSTRA COMPLETA

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	455	453	452	29.93	0.00000	0.043	0.434
1	3	2	2	465	463	462	18.93	0.00001	0.017	0.717
1	4	2	2	462	460	459	24.10	0.00000	0.024	0.742
1	5	2	2	462	460	459	18.70	0.00002	0.018	0.712
1	6	2	2	466	464	463	0.15	0.70126	0.000	0.065
2	3	2	2	459	457	456	20.88	0.00000	0.032	0.450
2	4	2	2	453	451	450	20.67	0.00001	0.036	0.413
2	5	2	2	455	453	452	18.65	0.00002	0.031	0.420
2	6	2	2	460	458	457	0.87	0.35026	0.002	0.074
3	4	2	2	464	462	461	119.04	0.00000	0.223	0.536
3	5	2	2	464	462	461	124.39	0.00000	0.232	0.494
3	6	2	2	472	470	469	3.80	0.05113	0.008	0.092
4	5	2	2	465	463	462	562.15	0.00000	0.741	0.954
4	6	2	2	467	465	464	8.03	0.00459	0.018	0.160
5	6	2	2	467	465	464	6.79	0.00917	0.015	0.160

TGFA – CONTROLES AMOSTRA COMPLETA

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	466	464	463	46.68	0.00000	0.074	0.390
1	3	2	2	467	465	464	3.21	0.07311	0.004	0.249
1	4	2	2	463	461	460	60.78	0.00000	0.055	0.875
1	5	2	2	466	464	463	31.54	0.00000	0.030	0.698
1	6	2	2	467	465	464	0.41	0.52199	0.000	0.074
2	3	2	2	473	471	470	0.12	0.72519	0.000	0.040
2	4	2	2	468	466	465	19.27	0.00001	0.030	0.446
2	5	2	2	471	469	468	13.48	0.00024	0.021	0.409
2	6	2	2	472	470	469	0.18	0.66824	0.000	0.040
3	4	2	2	473	471	470	6.30	0.01206	0.015	0.137
3	5	2	2	475	473	472	4.03	0.04473	0.009	0.098
3	6	2	2	477	475	474	0.02	0.90189	0.000	0.006
4	5	2	2	470	468	467	245.73	0.00000	0.421	0.704
4	6	2	2	472	470	469	0.00	0.94663	0.000	0.003
5	6	2	2	475	473	472	0.46	0.49756	0.001	0.038

TGFA – CASOS CAUCASIANOS

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	370	368	367	30.65	0.00000	0.055	0.473
1	3	2	2	379	377	376	16.16	0.00006	0.019	0.689
1	4	2	2	375	373	372	17.57	0.00003	0.022	0.695
1	5	2	2	376	374	373	15.35	0.00009	0.018	0.682
1	6	2	2	379	377	376	0.07	0.79429	0.000	0.047
2	3	2	2	373	371	370	19.98	0.00001	0.038	0.465
2	4	2	2	367	365	364	10.93	0.00095	0.024	0.341
2	5	2	2	370	368	367	9.87	0.00168	0.020	0.339
2	6	2	2	373	371	370	0.43	0.51308	0.001	0.056
3	4	2	2	377	375	374	104.52	0.00000	0.243	0.528
3	5	2	2	378	376	375	115.55	0.00000	0.263	0.525
3	6	2	2	384	382	381	2.91	0.08790	0.007	0.088
4	5	2	2	378	376	375	452.55	0.00000	0.748	0.950
4	6	2	2	379	377	376	3.43	0.06389	0.010	0.120
5	6	2	2	380	378	377	4.25	0.03932	0.012	0.142

TGFA – CONTROLES CAUCASIANOS

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	270	268	267	27.62	0.00000	0.078	0.439
1	3	2	2	271	269	268	2.86	0.09091	0.005	0.330
1	4	2	2	270	268	267	27.86	0.00000	0.044	0.865
1	5	2	2	270	268	267	9.89	0.00166	0.017	0.575
1	6	2	2	271	269	268	0.24	0.62279	0.000	0.087
2	3	2	2	276	274	273	0.73	0.39241	0.002	0.128
2	4	2	2	274	272	271	6.96	0.00832	0.020	0.351
2	5	2	2	275	273	272	5.94	0.01480	0.017	0.361
2	6	2	2	276	274	273	0.00	0.97762	0.000	0.003
3	4	2	2	277	275	274	14.56	0.00014	0.062	0.284
3	5	2	2	277	275	274	7.17	0.00743	0.028	0.172
3	6	2	2	279	277	276	0.37	0.54190	0.002	0.045
4	5	2	2	275	273	272	124.52	0.00000	0.394	0.698
4	6	2	2	277	275	274	0.00	0.99668	0.000	0.000
5	6	2	2	277	275	274	1.31	0.25188	0.006	0.086

TGFA – CONTROLES JAPONESES

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	154	152	151	10.79	0.00102	0.061	0.567
1	3	2	2	154	152	151	1.71	0.19140	0.018	0.157
1	4	2	2	152	150	149	12.70	0.00037	0.164	0.677
1	5	2	2	152	150	149	12.86	0.00034	0.266	0.730
1	6	2	2	154	152	151	9.05	0.00263	0.077	0.442
2	3	2	2	154	152	151	9.88	0.00167	0.072	0.532
2	4	2	2	152	150	149	11.61	0.00066	0.041	0.772
2	5	2	2	152	150	149	1.08	0.29859	0.023	0.468
2	6	2	2	154	152	151	16.02	0.00006	0.058	0.883
3	4	2	2	154	152	151	13.60	0.00023	0.110	0.633
3	5	2	2	153	151	150	0.42	0.51659	0.028	0.272
3	6	2	2	155	153	152	1.93	0.16450	0.013	0.205
4	5	2	2	155	153	152	8.27	0.00404	0.193	0.548
4	6	2	2	155	153	152	42.08	0.00000	0.296	0.577
5	6	2	2	155	153	152	0.29	0.58892	0.025	0.178

IRF6 – CASOS AMOSTRA COMPLETA

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	471	469	468	30.39	0.00000	0.057	0.538
1	3	2	2	472	470	469	4.87	0.02734	0.009	0.221
1	4	2	2	477	475	474	5.82	0.01581	0.011	0.190
1	5	2	2	471	469	468	4.77	0.02895	0.009	0.223
1	6	2	2	478	476	475	3.04	0.08120	0.006	0.097
2	3	2	2	469	467	466	53.17	0.00000	0.091	0.858
2	4	2	2	467	465	464	3.42	0.06445	0.005	0.309
2	5	2	2	470	468	467	54.41	0.00000	0.093	0.860
2	6	2	2	468	466	465	3.96	0.04658	0.007	0.677
3	4	2	2	468	466	465	32.87	0.00000	0.070	0.385
3	5	2	2	470	468	467	889.09	0.00000	0.986	1.000
3	6	2	2	468	466	465	55.77	0.00000	0.090	0.873
4	5	2	2	467	465	464	30.69	0.00000	0.066	0.375
4	6	2	2	473	471	470	14.28	0.00016	0.030	0.404
5	6	2	2	468	466	465	59.81	0.00000	0.095	0.903

IRF6 – CONTROLES AMOSTRA COMPLETA

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	474	472	471	72.51	0.00000	0.126	0.562
1	3	2	2	475	473	472	4.22	0.03993	0.007	0.109
1	4	2	2	476	474	473	0.70	0.40421	0.001	0.060
1	5	2	2	476	474	473	4.25	0.03920	0.007	0.110
1	6	2	2	474	472	471	1.36	0.24395	0.002	0.171
2	3	2	2	473	471	470	159.40	0.00000	0.226	0.968
2	4	2	2	474	472	471	87.51	0.00000	0.119	0.948
2	5	2	2	473	471	470	164.05	0.00000	0.231	0.984
2	6	2	2	470	468	467	19.68	0.00001	0.032	1.000
3	4	2	2	475	473	472	400.96	0.00000	0.525	0.973
3	5	2	2	474	472	471	851.77	0.00000	0.940	0.970
3	6	2	2	471	469	468	34.57	0.00000	0.059	0.655
4	5	2	2	475	473	472	390.19	0.00000	0.518	0.966
4	6	2	2	472	470	469	16.20	0.00006	0.030	0.488
5	6	2	2	472	470	469	37.00	0.00000	0.063	0.679

IRF6 – CASOS CAUCASIANOS

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	385	383	382	16.36	0.00005	0.046	0.488
1	3	2	2	389	387	386	1.19	0.27492	0.003	0.067
1	4	2	2	379	377	376	60.44	0.00000	0.112	1.000
1	5	2	2	379	377	376	52.58	0.00000	0.104	0.957
1	6	2	2	380	378	377	8.22	0.00415	0.012	1.000
2	3	2	2	389	387	386	3.42	0.06436	0.008	0.173
2	4	2	2	379	377	376	20.32	0.00001	0.056	0.346
2	5	2	2	380	378	377	22.41	0.00000	0.062	0.359
2	6	2	2	380	378	377	0.40	0.52469	0.001	0.130
3	4	2	2	382	380	379	3.05	0.08052	0.008	0.222
3	5	2	2	383	381	380	3.08	0.07939	0.008	0.219
3	6	2	2	383	381	380	24.23	0.00000	0.060	0.556
4	5	2	2	381	379	378	705.42	0.00000	0.983	1.000
4	6	2	2	382	380	379	43.59	0.00000	0.091	0.902
5	6	2	2	381	379	378	42.45	0.00000	0.089	0.900

IRF6 – CONTROLES CAUCASIANOS

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	276	274	273	16.90	0.00004	0.064	0.548
1	3	2	2	277	275	274	0.10	0.75747	0.000	0.041
1	4	2	2	277	275	274	1.14	0.28608	0.004	0.108
1	5	2	2	277	275	274	0.08	0.77064	0.000	0.038
1	6	2	2	275	273	272	0.51	0.47620	0.002	0.179
2	3	2	2	276	274	273	26.53	0.00000	0.070	0.858
2	4	2	2	276	274	273	19.53	0.00001	0.041	0.899
2	5	2	2	275	273	272	30.98	0.00000	0.080	0.927
2	6	2	2	272	270	269	1.62	0.20369	0.007	0.835
3	4	2	2	277	275	274	237.20	0.00000	0.528	0.988
3	5	2	2	276	274	273	466.58	0.00000	0.925	0.969
3	6	2	2	273	271	270	12.84	0.00034	0.037	0.573
4	5	2	2	276	274	273	209.54	0.00000	0.497	0.952
4	6	2	2	273	271	270	6.70	0.00963	0.028	0.425
5	6	2	2	273	271	270	12.58	0.00039	0.037	0.569

IRF6 – CONTROLES JAPONESES

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	157	155	154	3.54	0.05982	0.058	0.255
1	3	2	2	157	155	154	9.34	0.00224	0.129	0.471
1	4	2	2	158	156	155	0.25	0.61389	0.003	0.061
1	5	2	2	158	156	155	0.19	0.66383	0.001	0.048
1	6	2	2	158	156	155	0.03	0.86837	0.000	0.028
2	3	2	2	157	155	154	20.11	0.00001	0.325	0.792
2	4	2	2	157	155	154	15.44	0.00008	0.204	0.648
2	5	2	2	157	155	154	0.83	0.36333	0.008	0.137
2	6	2	2	157	155	154	7.97	0.00476	0.129	0.499

3	4	2	2	157	155	154	0.12	0.72502	0.015	0.182
3	5	2	2	157	155	154	1.38	0.23981	0.012	0.124
3	6	2	2	157	155	154	4.08	0.04345	0.125	0.469
4	5	2	2	158	156	155	116.78	0.00000	0.553	0.796
4	6	2	2	158	156	155	39.98	0.00000	0.209	0.908
5	6	2	2	158	156	155	24.38	0.00000	0.078	0.593

CROMOSSOMO 6q - CASOS AMOSTRA COMPLETA

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	485	483	482	243.17	0.00000	0.421	0.804
1	3	2	2	480	478	477	1.00	0.31647	0.002	0.092
1	4	2	2	485	483	482	3.51	0.06106	0.006	0.221
1	5	2	2	480	478	477	3.05	0.08063	0.006	0.182
1	6	2	2	469	467	466	3.75	0.05273	0.007	0.224
1	7	2	2	466	464	463	0.36	0.54920	0.001	0.071
1	8	2	2	486	484	483	2.39	0.12238	0.004	0.078
1	9	2	2	469	467	466	0.01	0.91708	0.000	0.011
1	10	2	2	474	472	471	0.71	0.40085	0.002	0.097
1	11	2	2	460	458	457	2.99	0.08399	0.006	0.090
1	12	2	2	464	462	461	6.83	0.00899	0.014	0.129
1	13	2	2	486	484	483	0.42	0.51796	0.001	0.098
1	14	2	2	449	447	446	6.80	0.00910	0.015	0.124
1	15	2	2	472	470	469	7.07	0.00785	0.014	0.121
2	3	2	2	481	479	478	4.85	0.02770	0.011	0.272
2	4	2	2	484	482	481	20.88	0.00000	0.041	0.717
2	5	2	2	480	478	477	37.61	0.00000	0.061	0.743
2	6	2	2	469	467	466	24.09	0.00000	0.039	0.624
2	7	2	2	466	464	463	12.33	0.00045	0.026	0.283
2	8	2	2	487	485	484	0.27	0.60122	0.000	0.075
2	9	2	2	470	468	467	10.31	0.00133	0.022	0.262
2	10	2	2	475	473	472	4.87	0.02729	0.011	0.180
2	11	2	2	461	459	458	0.44	0.50680	0.001	0.042
2	12	2	2	463	461	460	1.55	0.21330	0.003	0.073
2	13	2	2	487	485	484	1.05	0.30618	0.002	0.185
2	14	2	2	448	446	445	3.90	0.04820	0.009	0.116
2	15	2	2	472	470	469	2.31	0.12881	0.005	0.083
3	4	2	2	479	477	476	236.08	0.00000	0.387	0.846
3	5	2	2	474	472	471	123.04	0.00000	0.226	0.547
3	6	2	2	470	468	467	88.62	0.00000	0.169	0.478
3	7	2	2	467	465	464	141.16	0.00000	0.252	0.768
3	8	2	2	482	480	479	110.08	0.00000	0.201	0.592
3	9	2	2	469	467	466	130.89	0.00000	0.242	0.749
3	10	2	2	472	470	469	128.62	0.00000	0.241	0.748
3	11	2	2	459	457	456	0.99	0.32049	0.002	0.063
3	12	2	2	462	460	459	0.02	0.88037	0.000	0.012
3	13	2	2	482	480	479	0.55	0.45694	0.001	0.073
3	14	2	2	449	447	446	9.06	0.00261	0.017	0.294
3	15	2	2	472	470	469	4.37	0.03655	0.008	0.198
4	5	2	2	479	477	476	413.07	0.00000	0.590	0.902
4	6	2	2	469	467	466	399.75	0.00000	0.587	0.904
4	7	2	2	466	464	463	132.46	0.00000	0.204	0.951
4	8	2	2	485	483	482	242.23	0.00000	0.403	0.656
4	9	2	2	469	467	466	134.52	0.00000	0.210	0.952
4	10	2	2	474	472	471	115.73	0.00000	0.190	0.903
4	11	2	2	460	458	457	4.59	0.03218	0.010	0.101
4	12	2	2	464	462	461	3.12	0.07750	0.007	0.091
4	13	2	2	485	483	482	0.02	0.87883	0.000	0.008
4	14	2	2	449	447	446	31.02	0.00000	0.060	0.756
4	15	2	2	472	470	469	25.03	0.00000	0.048	0.662
5	6	2	2	463	461	460	559.43	0.00000	0.752	0.877
5	7	2	2	461	459	458	195.52	0.00000	0.290	0.943
5	8	2	2	480	478	477	171.32	0.00000	0.292	0.614
5	9	2	2	465	463	462	196.43	0.00000	0.291	0.934
5	10	2	2	469	467	466	191.29	0.00000	0.287	0.933
5	11	2	2	458	456	455	1.14	0.28638	0.002	0.055
5	12	2	2	459	457	456	0.34	0.56074	0.001	0.032
5	13	2	2	480	478	477	1.99	0.15816	0.004	0.088

5	14	2	2	447	445	444	1.86	0.17304	0.004	0.155
5	15	2	2	467	465	464	2.87	0.09022	0.005	0.187
6	7	2	2	465	463	462	204.89	0.00000	0.300	0.966
6	8	2	2	470	468	467	162.28	0.00000	0.287	0.624
6	9	2	2	467	465	464	196.37	0.00000	0.293	0.954
6	10	2	2	465	463	462	204.31	0.00000	0.304	0.977
6	11	2	2	452	450	449	0.62	0.43115	0.001	0.042
6	12	2	2	461	459	458	0.55	0.45872	0.001	0.043
6	13	2	2	470	468	467	0.56	0.45587	0.001	0.046
6	14	2	2	448	446	445	3.26	0.07121	0.006	0.201
6	15	2	2	467	465	464	10.37	0.00128	0.018	0.346
7	8	2	2	467	465	464	128.34	0.00000	0.205	0.950
7	9	2	2	465	463	462	775.62	0.00000	0.936	0.972
7	10	2	2	464	462	461	695.83	0.00000	0.886	0.948
7	11	2	2	451	449	448	0.36	0.55017	0.001	0.034
7	12	2	2	461	459	458	3.35	0.06730	0.007	0.115
7	13	2	2	467	465	464	0.14	0.71076	0.000	0.024
7	14	2	2	449	447	446	0.01	0.94294	0.000	0.004
7	15	2	2	466	464	463	0.13	0.71902	0.000	0.038
8	9	2	2	470	468	467	129.58	0.00000	0.212	0.951
8	10	2	2	476	474	473	109.29	0.00000	0.183	0.863
8	11	2	2	461	459	458	0.00	0.97448	0.000	0.001
8	12	2	2	464	462	461	0.96	0.32707	0.002	0.126
8	13	2	2	488	486	485	0.60	0.43787	0.001	0.044
8	14	2	2	449	447	446	4.94	0.02629	0.011	0.326
8	15	2	2	473	471	470	0.29	0.59056	0.001	0.069
9	10	2	2	467	465	464	652.70	0.00000	0.856	0.929
9	11	2	2	454	452	451	0.69	0.40539	0.002	0.049
9	12	2	2	461	459	458	5.54	0.01861	0.012	0.149
9	13	2	2	470	468	467	0.21	0.64494	0.000	0.032
9	14	2	2	448	446	445	0.02	0.88710	0.000	0.009
9	15	2	2	469	467	466	0.43	0.51298	0.001	0.070
10	11	2	2	454	452	451	1.69	0.19329	0.004	0.078
10	12	2	2	460	458	457	1.91	0.16731	0.004	0.088
10	13	2	2	476	474	473	0.07	0.79104	0.000	0.030
10	14	2	2	446	444	443	0.00	0.97421	0.000	0.002
10	15	2	2	469	467	466	0.02	0.87947	0.000	0.015
11	12	2	2	448	446	445	359.27	0.00000	0.618	0.847
11	13	2	2	461	459	458	0.18	0.66903	0.000	0.058
11	14	2	2	437	435	434	2.82	0.09282	0.006	0.091
11	15	2	2	455	453	452	11.37	0.00075	0.023	0.183
12	13	2	2	464	462	461	0.62	0.43278	0.001	0.117
12	14	2	2	447	445	444	1.01	0.31387	0.002	0.049
12	15	2	2	461	459	458	5.87	0.01542	0.012	0.118
13	14	2	2	449	447	446	0.02	0.90121	0.000	0.005
13	15	2	2	473	471	470	0.03	0.85923	0.000	0.007
14	15	2	2	449	447	446	389.85	0.00000	0.672	0.828

CROMOSSOMO 6q – CONTROLES AMOSTRA COMPLETA

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	476	474	473	45.99	0.00000	0.080	0.288
1	3	2	2	475	473	472	0.31	0.58051	0.001	0.076
1	4	2	2	476	474	473	1.24	0.26593	0.002	0.063
1	5	2	2	475	473	472	0.19	0.66417	0.000	0.032
1	6	2	2	476	474	473	0.02	0.89530	0.000	0.007
1	7	2	2	473	471	470	2.06	0.15144	0.005	0.179
1	8	2	2	476	474	473	0.22	0.64146	0.000	0.081
1	9	2	2	476	474	473	3.31	0.06896	0.008	0.230
1	10	2	2	475	473	472	2.14	0.14369	0.005	0.182
1	11	2	2	472	470	469	0.10	0.75553	0.000	0.018
1	12	2	2	472	470	469	0.02	0.88999	0.000	0.007
1	13	2	2	474	472	471	1.40	0.23602	0.003	0.071
1	14	2	2	462	460	459	0.04	0.83717	0.000	0.009
1	15	2	2	476	474	473	0.08	0.77527	0.000	0.053
2	3	2	2	477	475	474	8.44	0.00367	0.013	0.354
2	4	2	2	477	475	474	2.72	0.09922	0.004	0.238
2	5	2	2	477	475	474	12.98	0.00031	0.020	0.413

2	6	2	2	478	476	475	3.14	0.07657	0.004	0.203
2	7	2	2	475	473	472	1.45	0.22837	0.002	0.084
2	8	2	2	478	476	475	0.26	0.60829	0.000	0.023
2	9	2	2	477	475	474	2.93	0.08696	0.004	0.115
2	10	2	2	477	475	474	2.30	0.12908	0.003	0.102
2	11	2	2	473	471	470	0.03	0.86024	0.000	0.009
2	12	2	2	474	472	471	0.04	0.84638	0.000	0.010
2	13	2	2	476	474	473	5.66	0.01737	0.008	0.129
2	14	2	2	463	461	460	4.92	0.02650	0.006	0.353
2	15	2	2	478	476	475	3.13	0.07708	0.004	0.279
3	4	2	2	476	474	473	14.29	0.00016	0.028	0.199
3	5	2	2	476	474	473	4.48	0.03438	0.010	0.107
3	6	2	2	477	475	474	0.92	0.33745	0.002	0.041
3	7	2	2	474	472	471	1.84	0.17459	0.004	0.117
3	8	2	2	477	475	474	1.55	0.21328	0.003	0.075
3	9	2	2	476	474	473	1.16	0.28149	0.003	0.094
3	10	2	2	476	474	473	2.07	0.15032	0.005	0.123
3	11	2	2	472	470	469	0.02	0.88523	0.000	0.006
3	12	2	2	473	471	470	0.49	0.48502	0.001	0.037
3	13	2	2	475	473	472	15.57	0.00008	0.029	0.376
3	14	2	2	462	460	459	0.11	0.74256	0.000	0.044
3	15	2	2	477	475	474	0.31	0.57487	0.001	0.072
4	5	2	2	476	474	473	380.41	0.00000	0.554	0.950
4	6	2	2	477	475	474	37.79	0.00000	0.071	0.310
4	7	2	2	474	472	471	68.77	0.00000	0.131	0.757
4	8	2	2	477	475	474	91.56	0.00000	0.170	0.480
4	9	2	2	477	475	474	45.71	0.00000	0.099	0.662
4	10	2	2	476	474	473	78.88	0.00000	0.143	0.795
4	11	2	2	473	471	470	23.56	0.00000	0.043	0.224
4	12	2	2	473	471	470	26.60	0.00000	0.050	0.233
4	13	2	2	475	473	472	13.96	0.00019	0.020	0.368
4	14	2	2	463	461	460	32.72	0.00000	0.053	0.845
4	15	2	2	477	475	474	24.36	0.00000	0.041	0.718
5	6	2	2	477	475	474	101.72	0.00000	0.196	0.485
5	7	2	2	475	473	472	158.64	0.00000	0.270	0.847
5	8	2	2	477	475	474	48.84	0.00000	0.095	0.455
5	9	2	2	476	474	473	114.70	0.00000	0.218	0.772
5	10	2	2	477	475	474	173.30	0.00000	0.284	0.877
5	11	2	2	473	471	470	5.55	0.01843	0.011	0.121
5	12	2	2	474	472	471	5.51	0.01895	0.011	0.128
5	13	2	2	475	473	472	1.84	0.17527	0.003	0.112
5	14	2	2	463	461	460	1.83	0.17608	0.004	0.179
5	15	2	2	477	475	474	2.82	0.09334	0.006	0.210
6	7	2	2	475	473	472	19.85	0.00001	0.038	0.347
6	8	2	2	478	476	475	9.39	0.00218	0.017	0.175
6	9	2	2	477	475	474	23.91	0.00000	0.048	0.395
6	10	2	2	477	475	474	18.20	0.00002	0.034	0.335
6	11	2	2	473	471	470	2.84	0.09220	0.005	0.074
6	12	2	2	474	472	471	2.42	0.11995	0.004	0.070
6	13	2	2	476	474	473	0.79	0.37430	0.001	0.078
6	14	2	2	463	461	460	0.22	0.63722	0.000	0.060
6	15	2	2	478	476	475	0.11	0.74321	0.000	0.041
7	8	2	2	475	473	472	43.44	0.00000	0.088	0.713
7	9	2	2	474	472	471	392.76	0.00000	0.613	0.792
7	10	2	2	475	473	472	752.08	0.00000	0.905	0.964
7	11	2	2	473	471	470	0.26	0.61339	0.001	0.029
7	12	2	2	474	472	471	0.89	0.34531	0.002	0.059
7	13	2	2	473	471	470	0.09	0.76320	0.000	0.015
7	14	2	2	463	461	460	2.87	0.09003	0.006	0.205
7	15	2	2	475	473	472	2.37	0.12340	0.005	0.179
8	9	2	2	477	475	474	99.80	0.00000	0.159	0.976
8	10	2	2	477	475	474	50.37	0.00000	0.097	0.760
8	11	2	2	473	471	470	7.61	0.00581	0.014	0.148
8	12	2	2	474	472	471	3.49	0.06186	0.006	0.094
8	13	2	2	476	474	473	11.37	0.00074	0.017	0.396
8	14	2	2	463	461	460	1.02	0.31143	0.002	0.178
8	15	2	2	478	476	475	0.05	0.83009	0.000	0.035
9	10	2	2	476	474	473	375.50	0.00000	0.590	0.770

9	11	2	2	473	471	470	1.46	0.22670	0.003	0.071
9	12	2	2	473	471	470	1.14	0.28572	0.002	0.065
9	13	2	2	475	473	472	1.32	0.25069	0.002	0.061
9	14	2	2	463	461	460	1.08	0.29837	0.002	0.122
9	15	2	2	477	475	474	0.14	0.70695	0.000	0.044
10	11	2	2	473	471	470	0.36	0.55021	0.001	0.034
10	12	2	2	474	472	471	0.18	0.66931	0.000	0.026
10	13	2	2	475	473	472	0.33	0.56472	0.001	0.029
10	14	2	2	463	461	460	2.56	0.10991	0.005	0.185
10	15	2	2	477	475	474	1.85	0.17414	0.004	0.155
11	12	2	2	472	470	469	597.00	0.00000	0.813	0.943
11	13	2	2	471	469	468	1.01	0.31550	0.002	0.100
11	14	2	2	462	460	459	5.85	0.01559	0.011	0.142
11	15	2	2	473	471	470	13.52	0.00024	0.026	0.213
12	13	2	2	472	470	469	1.36	0.24294	0.002	0.121
12	14	2	2	462	460	459	1.34	0.24682	0.003	0.065
12	15	2	2	474	472	471	3.23	0.07247	0.006	0.098
13	14	2	2	461	459	458	3.64	0.05647	0.007	0.118
13	15	2	2	476	474	473	3.64	0.05645	0.007	0.115
14	15	2	2	463	461	460	476.12	0.00000	0.788	0.910

CROMOSSOMO 6q – CASOS CAUCASIANOS

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	396	394	393	227.63	0.00000	0.464	0.839
1	3	2	2	391	389	388	2.51	0.11304	0.006	0.165
1	4	2	2	396	394	393	5.51	0.01888	0.011	0.302
1	5	2	2	392	390	389	5.84	0.01567	0.013	0.278
1	6	2	2	381	379	378	6.90	0.00860	0.017	0.330
1	7	2	2	379	377	376	0.09	0.76865	0.000	0.037
1	8	2	2	397	395	394	2.42	0.11970	0.005	0.089
1	9	2	2	381	379	378	0.07	0.79296	0.000	0.019
1	10	2	2	386	384	383	0.43	0.51082	0.001	0.084
1	11	2	2	374	372	371	0.00	0.97793	0.000	0.001
1	12	2	2	377	375	374	3.42	0.06443	0.009	0.100
1	13	2	2	364	362	361	4.13	0.04223	0.011	0.112
1	14	2	2	397	395	394	1.14	0.28523	0.002	0.175
1	15	2	2	383	381	380	5.20	0.02261	0.014	0.124
2	3	2	2	392	390	389	2.34	0.12588	0.007	0.215
2	4	2	2	395	393	392	15.44	0.00009	0.041	0.704
2	5	2	2	392	390	389	27.43	0.00000	0.057	0.717
2	6	2	2	381	379	378	18.75	0.00001	0.038	0.599
2	7	2	2	379	377	376	7.49	0.00619	0.019	0.244
2	8	2	2	398	396	395	0.01	0.90400	0.000	0.017
2	9	2	2	382	380	379	7.55	0.00601	0.020	0.250
2	10	2	2	387	385	384	3.92	0.04773	0.011	0.182
2	11	2	2	375	373	372	0.21	0.64613	0.000	0.084
2	12	2	2	376	374	373	0.49	0.48308	0.001	0.043
2	13	2	2	363	361	360	3.16	0.07552	0.010	0.111
2	14	2	2	398	396	395	1.34	0.24776	0.003	0.226
2	15	2	2	383	381	380	1.73	0.18879	0.004	0.074
3	4	2	2	390	388	387	199.45	0.00000	0.408	0.860
3	5	2	2	386	384	383	104.74	0.00000	0.242	0.569
3	6	2	2	382	380	379	71.62	0.00000	0.171	0.469
3	7	2	2	380	378	377	110.80	0.00000	0.246	0.759
3	8	2	2	393	391	390	100.75	0.00000	0.228	0.621
3	9	2	2	381	379	378	104.48	0.00000	0.241	0.747
3	10	2	2	384	382	381	108.06	0.00000	0.247	0.752
3	11	2	2	373	371	370	0.75	0.38583	0.002	0.063
3	12	2	2	375	373	372	0.02	0.87944	0.000	0.011
3	13	2	2	364	362	361	4.59	0.03217	0.011	0.255
3	14	2	2	393	391	390	0.46	0.49573	0.001	0.077
3	15	2	2	383	381	380	2.42	0.11941	0.006	0.180
4	5	2	2	391	389	388	335.14	0.00000	0.597	0.896
4	6	2	2	381	379	378	322.85	0.00000	0.585	0.913
4	7	2	2	379	377	376	110.85	0.00000	0.214	0.960
4	8	2	2	396	394	393	216.82	0.00000	0.440	0.690
4	9	2	2	381	379	378	112.95	0.00000	0.221	0.961

4	10	2	2	386	384	383	95.86	0.00000	0.199	0.904
4	11	2	2	374	372	371	3.62	0.05699	0.010	0.106
4	12	2	2	377	375	374	2.62	0.10532	0.007	0.096
4	13	2	2	364	362	361	21.39	0.00000	0.055	0.758
4	14	2	2	396	394	393	0.05	0.81573	0.000	0.033
4	15	2	2	383	381	380	18.19	0.00002	0.043	0.673
5	6	2	2	376	374	373	467.01	0.00000	0.767	0.886
5	7	2	2	375	373	372	164.77	0.00000	0.299	0.958
5	8	2	2	392	390	389	149.82	0.00000	0.317	0.628
5	9	2	2	378	376	375	165.19	0.00000	0.301	0.946
5	10	2	2	382	380	379	163.21	0.00000	0.299	0.946
5	11	2	2	372	370	369	1.40	0.23660	0.003	0.071
5	12	2	2	373	371	370	0.23	0.63220	0.001	0.030
5	13	2	2	362	360	359	0.95	0.33092	0.002	0.130
5	14	2	2	392	390	389	2.47	0.11619	0.006	0.112
5	15	2	2	379	377	376	1.53	0.21631	0.004	0.163
6	7	2	2	378	376	375	170.11	0.00000	0.311	0.959
6	8	2	2	382	380	379	142.41	0.00000	0.311	0.653
6	9	2	2	379	377	376	161.82	0.00000	0.303	0.946
6	10	2	2	377	375	374	172.48	0.00000	0.321	0.972
6	11	2	2	367	365	364	0.84	0.35959	0.002	0.058
6	12	2	2	374	372	371	0.75	0.38604	0.002	0.060
6	13	2	2	363	361	360	1.10	0.29423	0.002	0.132
6	14	2	2	382	380	379	0.61	0.43568	0.001	0.054
6	15	2	2	379	377	376	5.69	0.01706	0.012	0.299
7	8	2	2	380	378	377	104.05	0.00000	0.216	0.959
7	9	2	2	378	376	375	640.51	0.00000	0.944	0.977
7	10	2	2	377	375	374	574.69	0.00000	0.894	0.959
7	11	2	2	366	364	363	0.17	0.68190	0.000	0.027
7	12	2	2	374	372	371	1.07	0.30012	0.003	0.077
7	13	2	2	364	362	361	0.15	0.70246	0.000	0.051
7	14	2	2	380	378	377	0.16	0.68910	0.000	0.030
7	15	2	2	379	377	376	0.34	0.56258	0.001	0.075
8	9	2	2	382	380	379	100.01	0.00000	0.215	0.940
8	10	2	2	388	386	385	89.81	0.00000	0.192	0.857
8	11	2	2	375	373	372	0.04	0.83228	0.000	0.011
8	12	2	2	377	375	374	0.04	0.83469	0.000	0.029
8	13	2	2	364	362	361	8.34	0.00388	0.025	0.513
8	14	2	2	399	397	396	0.22	0.63899	0.000	0.030
8	15	2	2	384	382	381	2.17	0.14076	0.005	0.232
9	10	2	2	379	377	376	540.58	0.00000	0.867	0.931
9	11	2	2	369	367	366	0.66	0.41604	0.002	0.057
9	12	2	2	374	372	371	2.27	0.13171	0.006	0.112
9	13	2	2	363	361	360	0.02	0.87667	0.000	0.019
9	14	2	2	382	380	379	0.23	0.63348	0.001	0.037
9	15	2	2	381	379	378	0.45	0.50371	0.001	0.087
10	11	2	2	369	367	366	1.16	0.28074	0.004	0.077
10	12	2	2	373	371	370	0.62	0.42923	0.002	0.059
10	13	2	2	361	359	358	0.02	0.89124	0.000	0.018
10	14	2	2	388	386	385	0.20	0.65209	0.001	0.059
10	15	2	2	381	379	378	0.04	0.84281	0.000	0.026
11	12	2	2	363	361	360	270.99	0.00000	0.600	0.825
11	13	2	2	353	351	350	0.20	0.65226	0.001	0.028
11	14	2	2	375	373	372	1.39	0.23830	0.003	0.194
11	15	2	2	369	367	366	4.94	0.02618	0.014	0.147
12	13	2	2	362	360	359	0.03	0.86512	0.000	0.029
12	14	2	2	377	375	374	0.82	0.36635	0.002	0.157
12	15	2	2	374	372	371	1.39	0.23796	0.004	0.069
13	14	2	2	364	362	361	0.20	0.65253	0.001	0.024
13	15	2	2	364	362	361	290.91	0.00000	0.656	0.810
14	15	2	2	384	382	381	0.80	0.37061	0.002	0.048

CROMOSSOMO 6q – CONTROLES CAUCASIANOS

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	278	276	275	31.06	0.00000	0.098	0.327
1	3	2	2	278	276	275	2.48	0.11514	0.009	0.255
1	4	2	2	278	276	275	1.00	0.31621	0.004	0.170

1	5	2	2	277	275	274	2.19	0.13907	0.011	0.272
1	6	2	2	278	276	275	0.42	0.51891	0.001	0.102
1	7	2	2	276	274	273	0.00	0.98413	0.000	0.001
1	8	2	2	278	276	275	0.02	0.89726	0.000	0.008
1	9	2	2	278	276	275	1.54	0.21412	0.007	0.232
1	10	2	2	277	275	274	0.01	0.91524	0.000	0.017
1	11	2	2	275	273	272	1.51	0.21960	0.007	0.265
1	12	2	2	275	273	272	2.04	0.15311	0.008	0.304
1	13	2	2	272	270	269	0.14	0.71002	0.001	0.026
1	14	2	2	277	275	274	2.47	0.11571	0.009	0.116
1	15	2	2	278	276	275	0.01	0.90790	0.000	0.008
2	3	2	2	279	277	276	8.50	0.00355	0.021	0.417
2	4	2	2	279	277	276	3.06	0.08028	0.009	0.272
2	5	2	2	278	276	275	5.74	0.01658	0.017	0.360
2	6	2	2	279	277	276	1.56	0.21126	0.003	0.183
2	7	2	2	277	275	274	0.12	0.72553	0.000	0.050
2	8	2	2	279	277	276	0.03	0.87361	0.000	0.010
2	9	2	2	279	277	276	0.19	0.66284	0.000	0.036
2	10	2	2	278	276	275	0.02	0.89127	0.000	0.019
2	11	2	2	276	274	273	0.00	0.95491	0.000	0.004
2	12	2	2	276	274	273	0.01	0.91460	0.000	0.018
2	13	2	2	273	271	270	3.72	0.05389	0.007	0.445
2	14	2	2	278	276	275	1.60	0.20638	0.004	0.081
2	15	2	2	279	277	276	0.97	0.32345	0.002	0.234
3	4	2	2	279	277	276	3.79	0.05156	0.014	0.122
3	5	2	2	278	276	275	1.70	0.19215	0.007	0.089
3	6	2	2	279	277	276	0.87	0.35007	0.003	0.058
3	7	2	2	277	275	274	0.01	0.92876	0.000	0.008
3	8	2	2	279	277	276	0.27	0.60404	0.001	0.069
3	9	2	2	279	277	276	0.00	0.96249	0.000	0.004
3	10	2	2	278	276	275	0.07	0.78688	0.000	0.030
3	11	2	2	276	274	273	0.15	0.69955	0.001	0.028
3	12	2	2	276	274	273	1.44	0.23082	0.005	0.094
3	13	2	2	273	271	270	1.40	0.23744	0.005	0.228
3	14	2	2	278	276	275	9.29	0.00231	0.029	0.370
3	15	2	2	279	277	276	2.71	0.09999	0.009	0.293
4	5	2	2	278	276	275	335.77	0.00000	0.763	0.947
4	6	2	2	279	277	276	26.11	0.00000	0.088	0.314
4	7	2	2	277	275	274	58.36	0.00000	0.199	0.772
4	8	2	2	279	277	276	53.03	0.00000	0.171	0.524
4	9	2	2	279	277	276	38.97	0.00000	0.150	0.683
4	10	2	2	278	276	275	67.46	0.00000	0.213	0.799
4	11	2	2	276	274	273	14.48	0.00014	0.048	0.254
4	12	2	2	276	274	273	17.21	0.00003	0.060	0.299
4	13	2	2	273	271	270	15.46	0.00008	0.053	0.754
4	14	2	2	278	276	275	3.14	0.07646	0.009	0.215
4	15	2	2	279	277	276	8.42	0.00371	0.030	0.548
5	6	2	2	278	276	275	24.11	0.00000	0.090	0.345
5	7	2	2	277	275	274	92.14	0.00000	0.299	0.876
5	8	2	2	278	276	275	37.60	0.00000	0.127	0.490
5	9	2	2	278	276	275	57.33	0.00000	0.213	0.752
5	10	2	2	278	276	275	97.84	0.00000	0.303	0.879
5	11	2	2	276	274	273	12.97	0.00032	0.046	0.271
5	12	2	2	276	274	273	12.58	0.00039	0.047	0.286
5	13	2	2	273	271	270	2.55	0.11064	0.010	0.310
5	14	2	2	277	275	274	2.34	0.12624	0.007	0.176
5	15	2	2	278	276	275	2.02	0.15487	0.008	0.259
6	7	2	2	277	275	274	3.11	0.07781	0.011	0.187
6	8	2	2	279	277	276	5.81	0.01596	0.018	0.161
6	9	2	2	279	277	276	2.54	0.11071	0.009	0.177
6	10	2	2	278	276	275	2.41	0.12047	0.008	0.163
6	11	2	2	276	274	273	3.14	0.07651	0.010	0.108
6	12	2	2	276	274	273	1.74	0.18696	0.005	0.082
6	13	2	2	273	271	270	2.95	0.08596	0.008	0.307
6	14	2	2	278	276	275	0.98	0.32277	0.003	0.127
6	15	2	2	279	277	276	1.62	0.20358	0.005	0.229
7	8	2	2	277	275	274	32.02	0.00000	0.119	0.753
7	9	2	2	277	275	274	174.87	0.00000	0.532	0.744

7	10	2	2	277	275	274	426.88	0.00000	0.909	0.954
7	11	2	2	276	274	273	1.30	0.25416	0.006	0.151
7	12	2	2	276	274	273	0.93	0.33464	0.004	0.134
7	13	2	2	273	271	270	0.00	0.95475	0.000	0.008
7	14	2	2	276	274	273	0.22	0.64061	0.001	0.057
7	15	2	2	277	275	274	0.12	0.73198	0.000	0.064
8	9	2	2	279	277	276	63.67	0.00000	0.187	0.966
8	10	2	2	278	276	275	37.08	0.00000	0.130	0.792
8	11	2	2	276	274	273	1.54	0.21409	0.005	0.078
8	12	2	2	276	274	273	1.09	0.29687	0.004	0.062
8	13	2	2	273	271	270	0.62	0.43226	0.002	0.191
8	14	2	2	278	276	275	2.58	0.10821	0.008	0.247
8	15	2	2	279	277	276	0.42	0.51456	0.001	0.051
9	10	2	2	278	276	275	179.02	0.00000	0.534	0.745
9	11	2	2	276	274	273	0.01	0.90885	0.000	0.014
9	12	2	2	276	274	273	0.29	0.58959	0.001	0.073
9	13	2	2	273	271	270	0.05	0.82146	0.000	0.026
9	14	2	2	278	276	275	0.08	0.77589	0.000	0.036
9	15	2	2	279	277	276	0.60	0.43968	0.003	0.095
10	11	2	2	276	274	273	0.28	0.59998	0.001	0.067
10	12	2	2	276	274	273	1.57	0.21036	0.006	0.170
10	13	2	2	273	271	270	0.19	0.66704	0.001	0.049
10	14	2	2	277	275	274	0.04	0.83942	0.000	0.024
10	15	2	2	278	276	275	0.06	0.80214	0.000	0.027
11	12	2	2	275	273	272	321.84	0.00000	0.783	0.931
11	13	2	2	272	270	269	1.94	0.16322	0.007	0.127
11	14	2	2	275	273	272	0.00	0.95632	0.000	0.007
11	15	2	2	276	274	273	10.02	0.00155	0.036	0.284
12	13	2	2	272	270	269	0.32	0.57459	0.001	0.050
12	14	2	2	275	273	272	0.05	0.82634	0.000	0.033
12	15	2	2	276	274	273	2.42	0.12001	0.008	0.129
13	14	2	2	272	270	269	0.46	0.49547	0.002	0.060
13	15	2	2	273	271	270	228.47	0.00000	0.732	0.880
14	15	2	2	278	276	275	1.35	0.24525	0.005	0.104

CROMOSSOMO 6q – CONTROLES JAPONESES

M1	M2	all	al2	N	df(0)	df(1)	ChiSq	pvalue	delta2	D'
1	2	2	2	156	154	153	2.76	0.09686	0.107	0.498
1	3	2	2	155	153	152	7.97	0.00474	0.210	0.633
1	4	2	2	155	153	152	1.51	0.21854	0.025	0.300
1	5	2	2	156	154	153	15.36	0.00009	0.286	0.696
1	6	2	2	156	154	153	2.62	0.10585	0.121	0.519
1	7	2	2	155	153	152	0.97	0.32474	0.045	0.342
1	8	2	2	155	153	152	0.89	0.34611	0.007	0.104
1	9	2	2	156	154	153	10.70	0.00107	0.236	0.925
1	10	2	2	156	154	153	20.29	0.00001	0.321	0.807
1	11	2	2	155	153	152	0.01	0.91131	0.000	0.023
1	12	2	2	155	153	152	1.39	0.23919	0.012	0.271
1	13	2	2	155	153	152	2.07	0.15056	0.038	0.204
1	14	2	2	148	146	145	0.05	0.82091	0.000	0.026
1	15	2	2	148	146	145	22.32	0.00000	0.358	0.862
2	3	2	2	155	153	152	21.28	0.00000	0.344	0.642
2	4	2	2	155	153	152	8.17	0.00425	0.114	0.485
2	5	2	2	156	154	153	38.51	0.00000	0.463	0.698
2	6	2	2	156	154	153	35.02	0.00000	0.406	0.650
2	7	2	2	155	153	152	15.30	0.00009	0.243	0.599
2	8	2	2	155	153	152	1.60	0.20542	0.012	0.217
2	9	2	2	156	154	153	29.61	0.00000	0.349	0.740
2	10	2	2	156	154	153	49.77	0.00000	0.521	0.770
2	11	2	2	155	153	152	8.63	0.00330	0.124	0.489
2	12	2	2	155	153	152	0.40	0.52653	0.004	0.120
2	13	2	2	155	153	152	1.30	0.25347	0.067	0.360
2	14	2	2	148	146	145	0.62	0.43200	0.013	0.199
2	15	2	2	148	146	145	53.92	0.00000	0.575	0.811
3	4	2	2	155	153	152	5.55	0.01845	0.141	0.519
3	5	2	2	155	153	152	64.21	0.00000	0.609	0.877
3	6	2	2	156	154	153	39.13	0.00000	0.472	0.742

3	7	2	2	155	153	152	28.73	0.00000	0.375	0.680
3	8	2	2	155	153	152	7.58	0.00589	0.089	0.528
3	9	2	2	155	153	152	30.49	0.00000	0.390	0.858
3	10	2	2	155	153	152	83.10	0.00000	0.692	0.853
3	11	2	2	154	152	151	17.58	0.00003	0.268	0.649
3	12	2	2	154	152	151	0.41	0.52161	0.007	0.143
3	13	2	2	155	153	152	5.38	0.02042	0.173	0.641
3	14	2	2	147	145	144	0.43	0.50966	0.012	0.176
3	15	2	2	147	145	144	0.00	0.98937	0.000	0.001
4	5	2	2	155	153	152	0.00	0.98670	0.000	0.001
4	6	2	2	155	153	152	0.32	0.57047	0.015	0.171
4	7	2	2	154	152	151	0.20	0.65860	0.003	0.070
4	8	2	2	154	152	151	0.67	0.41294	0.005	0.096
4	9	2	2	155	153	152	1.68	0.19489	0.037	0.195
4	10	2	2	155	153	152	0.00	1.00000	0.000	0.000
4	11	2	2	154	152	151	1.46	0.22742	0.017	0.137
4	12	2	2	154	152	151	7.44	0.00639	0.045	0.276
4	13	2	2	154	152	151	0.13	0.71728	0.002	0.088
4	14	2	2	147	145	144	1.43	0.23220	0.012	0.249
4	15	2	2	147	145	144	7.82	0.00516	0.221	0.635
5	6	2	2	156	154	153	41.73	0.00000	0.501	0.741
5	7	2	2	155	153	152	66.11	0.00000	0.548	0.916
5	8	2	2	155	153	152	5.46	0.01940	0.049	0.443
5	9	2	2	156	154	153	105.66	0.00000	0.670	1.000
5	10	2	2	156	154	153	0.00	1.00000	0.000	0.000
5	11	2	2	155	153	152	21.04	0.00000	0.282	0.752
5	12	2	2	155	153	152	1.29	0.25609	0.028	0.266
5	13	2	2	155	153	152	16.48	0.00005	0.279	0.863
5	14	2	2	148	146	145	1.06	0.30408	0.045	0.388
5	15	2	2	148	146	145	126.00	0.00000	0.816	1.000
6	7	2	2	156	154	153	4.14	0.04178	0.147	0.411
6	8	2	2	156	154	153	5.67	0.01728	0.050	0.432
6	9	2	2	156	154	153	28.01	0.00000	0.371	0.778
6	10	2	2	156	154	153	87.16	0.00000	0.684	0.865
6	11	2	2	155	153	152	7.10	0.00769	0.144	0.517
6	12	2	2	155	153	152	0.00	0.98630	0.000	0.002
6	13	2	2	156	154	153	18.49	0.00002	0.276	0.835
6	14	2	2	148	146	145	0.00	0.94849	0.000	0.010
6	15	2	2	148	146	145	0.00	0.98406	0.000	0.001
7	8	2	2	156	154	153	24.33	0.00000	0.163	0.648
7	9	2	2	155	153	152	47.21	0.00000	0.382	0.936
7	10	2	2	155	153	152	26.87	0.00000	0.400	0.710
7	11	2	2	155	153	152	8.70	0.00318	0.108	0.376
7	12	2	2	155	153	152	1.54	0.21475	0.013	0.222
7	13	2	2	156	154	153	0.54	0.46173	0.017	0.223
7	14	2	2	148	146	145	0.46	0.49867	0.009	0.140
7	15	2	2	148	146	145	36.70	0.00000	0.477	0.770
8	9	2	2	155	153	152	27.84	0.00000	0.104	0.792
8	10	2	2	155	153	152	0.03	0.87240	0.000	0.035
8	11	2	2	155	153	152	54.79	0.00000	0.301	0.779
8	12	2	2	155	153	152	0.45	0.50442	0.002	0.132
8	13	2	2	156	154	153	0.32	0.57426	0.002	0.055
8	14	2	2	148	146	145	0.50	0.48158	0.003	0.063
8	15	2	2	148	146	145	0.04	0.85010	0.001	0.051
9	10	2	2	156	154	153	0.00	1.00000	0.000	0.000
9	11	2	2	155	153	152	21.41	0.00000	0.202	0.778
9	12	2	2	155	153	152	6.75	0.00936	0.076	0.362
9	13	2	2	155	153	152	5.41	0.02004	0.165	0.813
9	14	2	2	148	146	145	1.63	0.20142	0.019	0.305
9	15	2	2	148	146	145	61.55	0.00000	0.550	1.000
10	11	2	2	155	153	152	6.89	0.00865	0.203	0.587
10	12	2	2	155	153	152	0.30	0.58209	0.006	0.141
10	13	2	2	155	153	152	16.64	0.00005	0.293	0.813
10	14	2	2	148	146	145	0.84	0.35897	0.035	0.314
10	15	2	2	148	146	145	0.00	0.99772	0.000	0.000
11	12	2	2	155	153	152	59.34	0.00000	0.342	0.793
11	13	2	2	155	153	152	0.70	0.40163	0.009	0.110
11	14	2	2	148	146	145	0.00	0.99529	0.000	0.000

11	15	2	2	148	146	145	13.33	0.00026	0.283	0.687
12	13	2	2	155	153	152	1.80	0.17999	0.011	0.122
12	14	2	2	148	146	145	4.10	0.04290	0.029	0.497
12	15	2	2	148	146	145	0.06	0.81088	0.002	0.071
13	14	2	2	148	146	145	5.96	0.01466	0.057	0.273
13	15	2	2	148	146	145	19.51	0.00001	0.334	0.853
14	15	2	2	148	146	145	2.16	0.14155	0.086	0.494

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABECASIS GR, COOKSON WOC. GOLD – Graphical Overview of Linkage Disequilibrium. **Bioinformatics**, v. 16, n. 2, p. 182-3, 2000.
2. ADAMS MS, NISWANDER JD. Developmental ‘noise’ and a congenital malformation. **Genet Res**, v. 10, n. 3, p. 313-317, 1967.
3. AIZENBUD D, CAMASUVI S, PELED M, BRIN I. Congenitally missing teeth in the Israeli cleft population. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 42, n. 3, p. 314-7, 2005.
4. ALVES-SILVA J, DA SILVA SANTOS M, GUIMARAES PE, FERREIRA AC, BANDELT HJ, PENA SD, PRADO VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet**, v. 67, n. 2, p. 444-61, 2000.
5. ARDINGER HH, BUETOW KH, BELL GI, BARDACH J, VAN DEMARK DR, MURRAY JC. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. **Am J Hum Genet**, v. 45, n. 3, p.348-53, 1989.
6. ASTOLFI CM, SHINOHARA AL, DA SILVA RA, SANTOS MC, LINE SR, DE SOUZA AP. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 genes may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. **J Clin Periodontol**, v. 33, n. 10, p. 699-703, 2006.
7. AVILA JR, JEZEWSKI PA, VIEIRA AR, ORIOLI IM, CASTILLA EE, CHRISTENSEN K, DAACK-HIRSCH S, ROMITTI PA, MURRAY JC. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. **Am J Med Genet**, v. 140A, n. 23, p. 2562-70, 2006.
8. BAILIT HL, THOMSON LA, NISWANDER JD. Dental eruption and hypodontia. **J Dent Res**, v. 47, n. 4, p. 669, 1968.

*Normas recomendadas para o uso no âmbito da Universidade de São Paulo com base no documento “Referências Bibliográficas: exemplos”, emanado do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP em reunião de 20 de setembro de 1990.

9. BEATY TH, HETMANSKI JB, FALLIN MD, PARK JW, SULL JW, McINTOSH I, LIANG KY, VANDERKOLK CA, REDETT RJ, BOYADJIEV SA, JABS EW, CHONG SS, CHEAH FSH, WU-CHOW YH, CHEN PK, CHIU YF, YEOW V, NG ISL, CHENG J, HUANG S, YE X, WANG H, INGERSOLL R, SCOTT AF. Analysis of candidate genes on chromosome 2 in oral cleft case-parent trios from three populations. **Hum Genet**, v. 120, n. 4, p. 501-18, 2006.
10. BEATY TH, HETMANSKI JB, ZEIGER JS ET AL. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. **Genet Epidemiol**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2002.
11. BEATY TH, MAESTRI NE, HETMANSKI JB ET AL. Testing for interaction between maternal smoking and *TGFA* genotype among oral cleft cases born in Maryland 1992-1996. **Cleft Palate-Craniofac J**, v. 34, n. 5, p. 47-54, 1997.
12. BEATY TH, WANG H, HETMANKSI JB ET AL. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. **Ann Epidemiol**, v. 11, n. 6, p. 434-42, 2001.
13. BEN-KHAIAL GS, SHAM RM. Effects of 5-fluorouracil on collagen synthesis in the developing palate of hamster. **Anti-Cancer Drugs**, v. 5, n. 1 p. 99-104, 1994.
14. BLANTON SH, CORTEZ A, STAL S, MULLIKEN JB, FINNELL RH, HECHT JT. Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. **Am J Med Genet**, v. 137A, n. 3, p. 259-62, 2005.
15. BLANTON SH, CROWDER E, MALCOLM S, WINTER R, GASSER DL, STAL S, MULLIKEN J, HECHT JT. Exclusion of linkage between cleft lip with or without cleft palate and markers on chromosomes 4 and 6. **Am J Hum Genet**, v. 58, n. 1, p. 239-41, 1996.
16. BLANTON SH, BERTIN T, SERNA ME, STAL S, MULLIKEN JB, HECHT JT. Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13, and 16p13.3 with nonsyndromic cleft lip and palate. **Am J Med Genet**, v. 125A, n. 1, p. 23-7, 2004.

17. BLAVIER L, LAZARYEV A, GROFFEN J, HEISTERKAMP N, DECLERCK YA, KAARTINEN V. TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 5, p. 1457-66, 2001.
18. BRISENDEN JE, DERYNCK R, FRANCKE U. Mapping of transforming growth factor alpha gene on human chromosome 2 close to the breakpoint of the Burkitt's lymphoma t(2;8) variant translocation. **Cancer Res**, v. 45 (11 Pt 2), p. 5593-7, 1985.
19. BROWN NL, YARRAM SJ, MANSELL JP, SANDY JR. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. **J Dent Res**, v. 81, n. 12, p. 826-30, 2002.
20. BULLIET RF, ZIMMERMANN EF. The influence of the epithelium on palate shelf reorientation. **J Embryol Exp Morph**, v. 88, p. 265-79, 1985.
21. CALLAHAN N, MEIRA R, MODESTO A, VIEIRA AR. Further Evidence on the Association between *TGFA* and Human Tooth Agenesis. IADR General Session & Exhibition. #2411, 2007.
22. CALZOLARI EL, PIERINI A, ASTOLFI G, BIANCHI F, NEVILLE AJ, RIVIERI F, and EUROCAT Working Group. Associated anomalies in multi-malformed infants with cleft lip and palate: An epidemiologic study of nearly 6 million births in 23 EUROCAT registries. **Am J Med Genet**, v. 143A, n. 6, p. 528-37, 2007.
23. CARETTE MJ, FERGUSON MW. The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: an analysis by DiI labelling and confocal microscopy. **Development**, v. 114, n. 2, p. 379-88, 1992.
24. CARLSON CS, EBERLE MA, RIEDER MJ, YI Q, KRUGLYAK L, NICKERSON DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. **Am J Hum Genet**, v. 74, n. 1, p. 106-120, 2004.
25. CARSTENS MH. Development of the facial midline. **J Craniofac Surg**, v. 13, n. 1, p. 129-87, 2002.

26. CHAKRAVARTI A. Finding needles in haystacks--IRF6 gene variants in isolated cleft lip or cleft palate. **N Engl J Med**, v. 351, n. 8, p. 822-4, 2004.
27. CHENEVIX-TRECH G, JONES G, GREEN AC, DUFFY DL, MARTIN NG. Cleft lip with or without palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. **Am J Hum Genet**, v. 51, n. 6, p. 1377-85, 1992.
28. CHENEVIX-TRECH G, JONES G, GREEN AC, MARTIN NG. Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate. **Am J Hum Genet**, v. 48, n. 5, p. 1012-3, 1991.
29. CHRISTENSEN K, OLSEN J, NØRGAARD-PEDERSEN B ET AL. Oral clefts, transforming growth factor-alpha gene variants, and maternal smoking: a population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. **Am J Epidemiol**, v. 149, n. 3, p. 248-55, 1999.
30. COBOURNE MT. The complex genetics of cleft lip and palate. **Eur J Orthod**, v. 26, n. 1, p. 7-16, 2004.
31. DE SOUZA AP, TREVILATTO PC, SCAREL-CAMINAGA RM, BRITO RB, LINE SR. MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 2, p. 154-8, 2003.
32. DEWINTER G, QUIRYNEN M, HEIDBÜCHEL K, VERDONCK A, WILLEMS G, CARELS C. Dental abnormalities, bone graft quality, and periodontal conditions in patients with unilateral cleft lip and palate at different phases of orthodontic treatment. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 40, n. 4, p. 343-350, 2003.
33. DIEWERT VM, LOSANOFF S. Animal models of facial clefting: experimental, congenital, and transgenic. In: Mooney MP, Siegel MI. **Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting**. John Wiley and Sons, New York, p. 251-72, 2002.

34. DIEWERT VM, LOZANOFF S. Growth and morphogenesis of the human embryonic midface during primary palate formation analyzed in frontal sections. **J Craniofac Genet Dev Biol**, v. 13, n. 3, p. 162-83, 1993.
35. DIXON DA. Defects of structure and formation of the teeth in persons with cleft palate and the effect of reparative surgery on the dental tissues. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 25, n. 3, p. 435-46, 1968.
36. DIXON MJ, GARNER J, FERGUSON MWJ. Immunolocalization of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and transforming growth factor alpha (TGF α) during murine palatogenesis in vivo and in vitro. **Anat Embryol (Berl)**, v. 184, n. 1, p. 83-91, 1991.
37. DIXON MJ, FERGUSON MWJ. The effects of epidermal growth factor, transforming growth factor α e β and platelet-derived growth factor on murine palatal shelves in organ culture. **Arch Oral Biol**, v. 37, n. 5, p.395-410, 1992.
38. DONNAI D, HEATHER LJ, SINCLAIR P, THAKKER Y, SCAMBLER PJ, DIXON MJ. Association of autosomal dominant cleft lip and palate and translocation 6p23;9q22.3. **Clin Dysmorphol**, v. 1, n. 2, p. 89-97, 1992.
39. DUNLEAVEY L, BEYZADE S, YE S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. **Matrix Biol**, v. 19, n. 2, p.175-7, 2000.
40. EERENS K, VLIETINCK R, HEIDBÜCHEL K, VAN OLMEN A, DEROM C, WILLEMS G, CARELS C. Hypodontia and tooth formation in groups of children with cleft, siblings without cleft, and nonrelated controls. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 38, n. 4, p. 374-378, 2001.
41. EIBERG H, BIXLER D, NIELSEN LS, CONNEALLY PM, MOHR J. Suggestion of linkage of a major locus for non-syndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. **Clin Genet**, v. 32, n. 2, p. 129-32, 1987.
42. EROSHKIN A, MUSHEGIAN A. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. **J Mol Med**, v. 77, n. 5, p.

- 403-5, 1999.
43. FARRAL M, HOLDER S. Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. **Am J Hum Genet**, v. 50, n. 2, p. 270-7, 1992.
 44. FENG H, SASSANI R, BARTLETT SP, LEE A, HECHT JT, MALCOLM S, WINTER RM, VINTINER GM, BUETOW KH, GASSER DL. Evidence from family studies for linkage disequilibrium between TGFA and a gene for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **Am J Hum Genet**, v. 55, n. 5, p. 932-6, 1994.
 45. FERGUSON MWJ. Palate development. **Development**, v. 103 (Suppl), p. 41-60, 1988.
 46. FIELD LL, RAY K, MARAZITA ML. Transforming growth factor alpha: a modifying locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate? **Eur J Hum Genet**, v. 2, n. 3, p. 159-65, 1994.
 47. FITCHETT JE, HAY ED. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. **Dev Biol**, v. 131, n. 2, p. 455-74, 1989.
 48. FOGH-ANDERSEN. **Inheritance of harelip and cleft palate**. Copenhagen: Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck; 1942.
 49. FOSTER TD, LAVELLE CL. The size of the dentition in complete cleft lip and palate. **Cleft Palate J**, v. 8, p. 177-84, 1971.
 50. FREBOURG T, OLIVEIRA C, HOCHAIN P, KARAM R, MANOUVRIER S, GRAZIADIO C, VEKEMANS M, HARTMANN A, BAERT-DESURMONT S, ALEXANDRE C, LEJEUNE DUMOULIN S, MARRONI C, MARTIN C, CASTEDO S, LOVETT M, WINSTON J, MACHADO JC, ATTIE T, JABS EW, CAI J, PELLERIN P, TRIBOULET JP, SCOTTE M, LE PESSOT F, HEDOUIN A, CARNEIRO F, BLAYAU M, SERUCA R. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. **J Med Genet**, v. 43, n. 2, p. 138-42, 2006.
 51. GARCIA-CASTRO M, BRONNER-FRASER M. Induction and differentiation of the neural crest. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, n. 6, p. 695-8, 1999.

52. GHASSISBÉ M, BAYET B, REVCNU N, VERELLEN-DUMOULIN C, GILLEROT Y, VANWIJCK R, VIKKULA M. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without palate in the Belgian population. **Eur J Hum Genet**, v. 13, n. 11, p. 1239-42, 2005.
53. GOLDSBERRY G, O'LEARY D, HICHA R, NOPOULOS P. Functional abnormalities in the neural circuitry of reading in men with non syndromic clefts of the lip or palate. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 43, n. 6, p. 683-90, 2006.
54. GOVIL M, MARAZITA ML, MURRAY JC, FIELD LL, VIELAND VJ. Multipoint PPL analysis of cleft lip with/without cleft palate (CL/P) provides compelling evidence in favor of linkage. Annals of the 2006 Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Abstract #1491, 2006.
55. GRAHNEN H. Hypodontia in the permanent dentition: a clinical and genetic investigation. **Odont Revy**, v. 7, p. 1-100, 1956.
56. HAINES JL, PERICAK-VANCE MA. Overview of mapping common and genetically complex human disease genes. In: Haines JL, Pericak-Vance MA, eds. *Approaches to Gene Mapping in Complex Human Diseases*. New York:Wiley- Liss; p. 1-16, 1998.
57. HANNAS AR, PEREIRA JC, GRANJEIRO JM, TJADERHANE L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontol Scand**, v. 65, n. 1, p.1-13, 2007.
58. HANSEN K, MEHDINIA M. Isolated soft tissue cleft lip: the influence on the nasal cavity and supernumerary laterals. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 39, n. 3, p. 322-6, 2002.
59. HARRIS EF, HULLINGS JG. Delayed dental development in children with isolated cleft lip and palate. **Arch Oral Biol**, v. 35, n. 6, p. 469-73, 1990.
60. HASSEL JR, ORKIN RW. Synthesis and distribution of collagen in the rat palate during shelf elevation. **Dev Biol**, v. 49, n. 1, p. 80-8, 1976.
61. HECHT JT, WANG YP, BLANTON SH, MICHELS VV, DAIGER SP. Cleft lip and palate: no evidence of linkage to transforming growth factor alpha.

- Am J Hum Genet**, v. 49, n. 3, p. 682-6, 1991.
62. HECHT JT, WANG Y, CONNOR B, BLANTON SH, DAIGER SP. Nonsyndromic cleft lip and palate: no evidence of linkage to HLA or factor 13A. **Am J Hum Genet**, v. 52, n. 6, p. 1230-3, 1993.
 63. HINODA Y, OKAYAMA N, TAKANO N, FUJIMURA K, SUEHIRO Y, HAMANAKA Y, HAZAMA S, KITAMURA Y, KAMATANI N, OKA M. Association of functional polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP) -1 and -3 genes with colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 102, n. 5, p.526-9, 2002.
 64. HOLDER SE, VINTINER GM, FARREN B, MALCOLM S, WINTER RM. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. **J Med Genet**, v. 29, n. 6, p. 390-2, 1992.
 65. HUNSTADBRATEN K. Hypodontia in the permanent dentition. **ASDC J Dent Child**, v. 40, n. 2, p. 115-7, 1973.
 66. HWANG SJ, BEATY TH, PANNY SR, STREET NA, JOSEPH JM, GORDON S, MCINTOSH I, FRANCOMANO CA. Association study of transforming growth factor alpha (TGF α) *TaqI* polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interactions in a population-based sample of infants with birth defects. **Am J Epidemiol**, v. 141, n. 7, p. 629-36, 1995.
 67. IAMAROON A, TAIT B, DIEWERT VM. Cell proliferation and expression of EGF, TGF- α and EGF receptor in the developing primary palate. **J Dent Res**, v. 75, n. 8, p.1534-9, 1996.
 68. IAMAROON A, WALLON UM, OVERALL CM, DIEWERT VM. Expression of 72-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. **Arch Oral Biol**, v. 41, n. 12, p. 1109-19, 1996.
 69. INGRAHAM CR, KINOSHITA A, KONDO S, YANG B, SAJAN S, TROUT KJ, MALIK MI, DUNNWALD M, GOUDY SL, LOVETT M, MURRAY JC, SCHUTTE BC. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). **Nat Genet**, v. 38, n. 11, p.

- 1335-40, 2006.
70. IOANNIDIS JP. Genetic associations: false or true? **Trends Mol Med**, v. 9, n. 4, p. 135-8, 2003.
71. IOANNIDIS JP, NTZANI EE, TRIKALINOS TA, CONTOPOULOS-IOANNIDIS DG. Replication validity of genetic association studies. **Nat Genet**, v. 29, n. 3, p. 306-9, 2001.
72. ISHIKAWA K, NAGASE T, SUYAMA M, MIYAJIMA N, TANAKA A, KOTANI H, NOMURA N, OHARA O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. **DNA Res**, v. 5, p. 169-176, 1998.
73. JAKSIC N, SCEPAN I, GLISIC B, STAMENIC E, STAMENKOVIC Z. Mesiodistal size of deciduous teeth in subjects with unilateral cleft lip and palate. **Orthod Craniofac Res**, v. 5, n. 1, p. 17-21, 2002.
74. JARA L, BLANCO R, CHIFFELLE I, PALOMINO H, CARRENO H. Evidence for an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha (locus) and nonsyndromic cleft lip/palate in a South American population. **Am J Hum Genet**, v. 56, n. 1, p. 339-41, 1995.
75. JARA L, BLANCO R, CHIFFELLE I, PALOMINO H, CARRENO H. Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and cleft lip and palate in the Chilean population. **Am J Med Genet**, v. 57, n. 4, p. 548-51, 1995.
76. JEZEWSKI PA, VIEIRA AR, NISHIMURA C, LUDWIG B, JOHNSON M, O'BRIEN SE, DAACK-HIRSCH S, SCHULTZ RE, WEBER A, NEPOMUCENA B, ROMITTI PA, CHRISTENSEN K, ORIOLI IM, CASTILLA EE, MACHIDA J, NATSUME N, MURRAY JC. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. **J Med Genet**, v. 40, n. 6, p. 399-407, 2003.
77. JIROUTOVA O. Hypodontia in patients with isolated cleft palate, its

- relationship to etiopathogenesis. **Acta Chir Plast**, v. 33, n. 1, p. 57-63, 1991.
78. JOHNSTON MC, BRONSKY PT. Craniofacial embryogenesis: abnormal developmental mechanisms. In: Mooney MP, Siegel MI. **Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting**. John Wiley and Sons, New York, p. 61-124, 2002.
79. JUGESSUR A, LIE RT, WILCOX AJ, MURRAY JC, TAYLOR JA, SAUGSTAD OD, VINDENES HA, ABYHOLM FE. Cleft palate, transforming growth factor-alpha gene variants, and maternal exposures: assessing gene-environment interactions in case-parent triads. **Genet Epidemiol**, v. 25, n. 4, p. 367-74, 2003.
80. JUGESSUR A, MURRAY JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, n. 3, p. 270-8, 2005.
81. KAARTINEN V, CUI XM, HEISTERKAMP N, GROFFEN J, SHULER CF. Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. **Dev Dyn**, v. 209, n. 3, p. 255-60, 1997.
82. KANG P, SVOBODA KK. Epithelial-mesenchymal transformation during craniofacial development. **J Dent Res**, v. 84, n. 8, p. 678-90, 2005.
83. KERRIGAN JJ, MANSELL JP, SENGUPTA A, BROWN N, SANDY JR. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. **J R Coll Surg Edinb**, v. 45, n. 6, p. 351-8, 2000.
84. KONDO S, SCHUTTE BC, RICHARDSON RJ, BJORK BC, KNIGHT AS, WATANABE Y, HOWARD E, DE LIMA RL, DAACK-HIRSCH S, SANDER A, MCDONALD-MCGINN DM, ZACKAI EH, LAMMER EJ, AYLSWORTH AS, ARDINGER HH, LIDRAL AC, POBER BR, MORENO L, ARCOS-BURGOS M, VALENCIA C, HOUDAYER C, BAHUAU M, MORETTI-FERREIRA D, RICHIERI-COSTA A, DIXON MJ, MURRAY JC. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. **Nat Genet**, v. 32, n. 2, p. 285-9, 2002.

85. KORMANN-BORTOLOTTI MH, FARAH LM, SOARES D, CORBANI M, MULLER R, ADELL AC. Terminal deletion 6p23: a case report. **Am J Med Genet**, v. 37, n. 4, p. 475-7, 1990.
86. KORNMAN KS, CRANE A, WANG HY, DI GIOVINE FS, NEWMAN MG, PIRK FW, WILSON TG JR, HIGGINBOTTOM FL, DUFF GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 1, p. 72-7, 1997.
87. LAATIKAINEN T, RANTA R. Hypodontia in twins discordant or concordant for cleft lip and/or palate. **Scand J Dent Res**, v. 102, n. 2, p. 88-91, 1994.
88. LACOMBE D, PEDESPAN JM, FONTAN D, CHATEIL JF, VERLOES A. Phenotypic variability in van der Woude syndrome. **Genet Couns**, v. 6, n. 3, p. 221-6, 1995.
89. LANDER ES, SCHORK NJ. Genetic dissection of complex traits. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2037-48, 1994.
90. LARSON M, HELLQUIST R, JAKOBSSON OP. Dental abnormalities and ectopic eruption in patients with isolated cleft palate. **Scand J Plast Reconstr Surg**, v. 32, n. 2, p. 203-212, 1998.
91. LAVELLE CL, ASHTON EH, FLINN RM. Cusp pattern, tooth size and third molar agenesis in the human mandibular dentition. **Arch Oral Biol**, v. 15, n. 3, p. 227-37, 1970.
92. LI M, BOEHNKE M, ABECASIS GR. Efficient study designs for test of genetic association using sibship data and unrelated cases and controls. **Am J Hum Genet**, v. 78, n. 5, p. 778-92, 2006.
93. LIDRAL AC, MORENO LM. Progress toward discerning the genetics of cleft lip. **Curr Opin Pediatr**, v. 17, n. 6, p. 731-9, 2005.
94. LIDRAL AC, MURRAY JC, BUETOW KH ET AL. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Phillipines. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 34, n. 1, p. 1-6, 1997.

95. LIDRAL AC, ROMITTI PA, BASART AM, DOETSCHMAN T, LEYSENS NJ, DAACK-HIRSCH S, SEMINA EV, JOHNSON LR, MACHIDA J, BURDS A, PARNELL TJ, RUBENSTEIN JL, MURRAY JC. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. **Am J Hum Genet**, v. 63, n. 2, p. 557-68, 1998.
96. LIDRAL AC, MURRAY JC. Genetic approaches to identify disease genes for birth defects with cleft lip/palate as a model. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 70, n. 12, p. 893-901, 2004.
97. LIEVRE A, MILET J, CARAYOL J, LE CORRE D, MILAN C, PARIENTE A, NALET B, LAFON J, FAIVRE J, BONITHON-KOPP C, OLSCHWANG S, BONAITE-PELLIE C, LAURENT-PUIG P. Genetic polymorphisms of MMP1, MMP3 and MMP7 gene promoter and risk of colorectal adenoma. **BMC Cancer**, v. 24, n. 11, p. 270.
100. LOPES LD, MATTOS BSC, ANDRÉ M. Anomalies in number of teeth in patients with lip and/or palate clefts. **Braz Dent J**, v. 2, n. 1, p. 9-17, 1991.
101. LU W, VOLCIK K, ZHU H, WEN S, SHAW GM, LAMMER EJ, FINNELL RH. Genetic variation in the proto-oncogene SKI and risk for orofacial clefting. **Mol Genet Metab**, v. 86, n. 3, p. 412-6, 2005.
102. LUETTEKE NC, QIU TH, PFEIFFER RL, OLIVER P, SMITHIES O, LEE DC. TGF α deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waived-1 mice. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 263-78, 1993.
103. MACHIDA J, YOSHIURA K, FUNKHAUSER CD ET AL. transforming growth factor- α (*TGFA*): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. **Genomics**, v. 61, n. 3, p. 237-42, 1999.
104. MAESTRI NE, BEATY TH, HETMANSKI JB ET AL. Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. **Am J Med Genet**, v. 73, n. 3, p. 337-44, 1997.

105. MALANCZUK T, OPITZ C, RETZLAFF R. Structural changes of dental enamel in both dentitions of cleft lip and palate patients. **J Orofac Orthop**, v. 60, n. 4, p. 259-68, 1999.
106. MALIK SA. Missing and rudimentary upper lateral incisors: a statistical survey. **J Dent**, v. 1, n. 1, p. 25-7, 1972.
107. MANSELL JP, KERRIGAN J, MCGILL J, BAILEY J, TEKOPPELE J, SANDY JR. Temporal changes in collagen composition and metabolism during rodent palatogenesis. **Mech Ageing Dev**, v. 119, n. 1-2, p. 49-62, 2000.
108. MANN GB, FOWLER KJ, GABRIEL A, NICE AC, WILLIAMS RL, DUNN AR. Mice with a null mutation of the *TGF α* gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 249-61, 1993.
109. MANIATIS T. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd Edition, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
110. MARAZITA ML, FIELD LL, COOPER ME, TOBIAS R, MAHER BS, PEANCHITLERTKAJORN S, LIU YE. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 2, p. 349-64, 2002.
111. MARAZITA ML, MAHER BS, MURRAY JC, LIDRAL A, FIELD LL, McHENRY TG, COOPER ME, DAACK-HIRSCH S, JUGESSUR A, RILEY B, MORENO L, CHINES P. Candidate gene analyses for nonsyndromic cleft lip (CL) with or without cleft palate (CP) in families from six countries. The American Society of Human Genetics. 56th Annual Meeting. Platform Session 38: Molecular Basis of Disorders with Complex Inheritance. Session 166. 2006.
112. MARAZITA ML, MOONEY MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and palate. **Clin Plastic Surg**, v. 31, n. 2, p. 125-40, 2004.
113. MARAZITA ML, MURRAY JC, LIDRAL AC, ARCOS-BURGOS M, COOPER ME, GOLDSTEIN T, MAHER NS, DAACK-HIRSCH S, SCHULTZ R, MANSILLA MA, FIELD LL, LIU YE, PRESCOTT N, MALCOLM S,

- WINTER R, RAY A, MORENO L, VALENCIA C, NEISWANGER K, WYSZYNSKI DF, BAILEY-WILSON JB, TUNCBILEK G, EDWARDS M, HARKIN L, SCOTT R, RODDICK LG. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. **Am J Hum Genet**, v. 75, n. 2, p. 161-73, 2004.
114. MARAZITA ML, SPENCE MA, MELNICK M. Genetic analysis of cleft lip with or without cleft palate in Danish kindreds. **Am J Med Genet**, v. 19, n. 1, p. 9-18, 1984.
115. MARTINEZ-ALVARES C, TUDELA C, PEREZ-MIGUELSANZ J, O'KANE S, PUERTA J, FERGUSON MWJ. Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. **Dev Biol**, v. 220, n. 2, p. 343-57, 2000.
116. MIETTINEN PJ, CHIN JR, SHUM L, SLAVKIN HC, SHULER CF, DERYNCK R, WERB Z. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. **Nat Genet**, v. 22, n. 1, p. 69-73, 1999.
117. MITCHELL LE. Transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reappraisal. **Genet Epidemiol**, v. 14, n. 3, p. 231-40, 1997.
118. MORKŪNIENĖ A, STEPONAVICIUT D, UTKUS A, KUCINSKAS V. Few associations of candidate genes with nonsyndromic orofacial clefts in the population of Lithuania. **J Appl Genet**, v. 48, n. 1, p. 89-91, 2007.
119. MORRIS-WIMAN J, BURCH H, BASCO E. Temporospacial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. **Anat Embryol (Berl)**, v. 202, n. 2, p. 129-41, 2000.
120. MORRIS-WIMAN J, DU Y, BRINKLEY L. Occurrence and temporal variation in matrix metalloproteinases and their inhibitors during murine secondary palatal morphogenesis. **J Craniofac Genet Dev Biol**, v. 19, n. 4, p. 201-12, 1999.
121. MOSSEY PA, LITTLE J. Epidemiology of oral clefts: an international

- perspective. In: Wyszynski DF (ed.). **Cleft lip and Palate. From origin to treatment**. New York: Oxford, p.127-158, 2002.
122. MOXHAM BJ. The development of the palate – a brief review. **Eur J Anat**, v. 7, n. 1, p.53-74, 2003.
123. MULLER TP, HILL IN, PETERSON AC, BLAYNEY JR. A survey of congenitally missing permanent teeth. **J Am Dent Assoc**, v. 81, n. 1, p. 101-7, 1970.
124. MURRAY JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. **Clin Genet**, v. 61, n. 4, p. 248-56, 2002.
125. NAGAI I, FUJIKI Y, FUCHIHATA H, YOSHIMOTO T. SUPERNUMERARY TOOTH ASSOCIATED WITH CLEFT LIP AND PALATE. **J Am Dent Assoc**, v. 70, p. 642-7, 1970.
126. NAGASE H, VISSE R, MURPHY G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 562-73, 2006.
127. NATSUME N, SUZUKI T, KAWAI T. The prevalence of cleft lip and palate in the Japanese: their birth prevalence in 40,304 infants born during 1982. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 63, n. 4, p. 421-3, 1987.
128. NEISWANGER K, DELEYIANNIS FW, AVILA JR, COOPER ME, BRANDON CA, VIEIRA AR, NOORCHASHM N, WEINBERG SM, BARDI KM, MURRAY JC, MARAZITA ML. Candidate genes for oral-facial clefts in Guatemalan families. **Ann Plast Surg**, v. 56, n. 5, p. 518-21, 2006.
129. NYSTROM M, RANTA R. Dental age and asymmetry in the formation of mandibular teeth in twins concordant or discordant for oral clefts. **Scand J Dent Res**, v. 96, n. 5, p. 393-8, 1988.
130. PARK JW, CAI J, MCINTOSH I, JABS EW, FALLIN MD, INGERSOLL R, HETMANSKI JB, VEKEMANS M, ATTIE-BITACH T, LOVETT M, SCOTT AF, BEATY TH. High throughput SNP and expression analyses of candidate genes for non-syndromic oral clefts. **J Med Genet**, v. 43, n. 7, p. 598-608, 2006.

131. PASSOS-BUENO MR, GASPAR DA, KAMIYA T, TESCAROLLO G, RABANEA D, RICHIERI-COSTA A, ALONSO N, ARAUJO B. Transforming growth factor-alpha and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: results of a large case-control study. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 41, n. 4, p. 387-91, 2004.
132. PERES RC, LINE SR. Analysis of MMP-9 and TIMP-2 gene promoter polymorphisms in individuals with hypodontia. **Braz Dent J**, v. 16, n. 3, p. 231-6, 2005.
133. PETERKA M, MULLEROVA Z. Tooth size in children with cleft lip and palate. **Cleft Palate J**, v. 20, n. 4, p. 307-313, 1983.
134. PRATT RM, KING CTG. Inhibition of collagen crosslinking associated with β -aminopropionitrile-induced cleft palate in the rat. **Dev Biol**, v. 27, n. 3, p. 322-8, 1972.
135. PRESCOTT NJ, LEES MM, WINTER RM, MALCOLM S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. **Hum Genet**, v. 106, n. 3, p. 345-50, 2000.
136. PRZYBYŁOWSKA K, KLUCZNA A, ZADROZNY M, KRAWCZYK T, KULIG A, RYKALA J, KOLACINSKA A, MORAWIEC Z, DRZEWOSKI J, BLASIAK J. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 95, n. 1, p. 65-72, 2006.
137. PURCELL S, CHERNY SS, SHAM PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. **Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 149-150, 2003.
138. RANADE K, CHANG MS, TING CT, PEI D, HSIAO CF, OLIVIER M, PESICH R, HEBERT J, CHEN YD, DZAU VJ, CURB D, OLSHEN R, RISCH N, COX DR, BOTSTEIN D. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. **Genome Res**, v.11, n. 7, p. 1262-68, 2001.

139. RANDALL LE, HALL RC. Temporospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 during early tooth development. **Connect Tissue Res**, v. 43, n. 2-3, p.205-11, 2002.
140. RANTA R. A review of tooth formation in children with cleft lip/palate. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 90, n. 1, p. 11-8, 1986.
141. RANTA R. Associations of some variables to tooth formation in children with isolated cleft palate. **Scand J Dent Res**, v. 92, n. 6, p. 496-502, 1984.
142. RANTA R. Comparison of tooth formation in noncleft and cleft-affected children with and without hypodontia. **ASDC J Dent Child**, v. 49, n. 3, p. 197-9, 1982.
143. RANTA R. Hypodontia and delayed development of the second premolars in cleft palate children. **Eur J Orthod**, v. 5, n. 2, p. 145-8, 1983.
144. RANTA R. Numeric anomalies of teeth in concomitant hypodontia and hyperdontia. **J Craniofac Genet Dev Biol**, v. 8, n. 3, p. 245-251, 1988.
145. RANTA R, TULENSALO T. Symmetry and combinations of hypodontia in non-cleft and cleft palate children. **Scand J Dent Res**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 1988.
146. RICE JP, SACCONI NL, RASMUSSEN E. Definition of the Phenotype. In: **Genetic dissection of complex traits**. Rao DC, Province MA, editors. San Diego: Academic Press, pp. 69-76, 2001.
147. RAPOLEE DA, BRENNER CA, SCHULTZ R, MARK D, WERB Z. Developmental expression of *PDGF*, *TGF- α* and *TGF- β* genes in preimplantation mouse embryos. **Science**, v. 241, n. 4874, p. 1823-5, 1988.
148. RILEY BM, MANSILLA A, MA J, DAACK-HIRSCH S, MAHER BS, RAFFENSBERGER M, RUSSO ET, VIEIRA AR, DODÉ C, MOHAMMADI M, MARAZITA ML, MURRAY JC. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. **PNAS**, v. 104, n.11, 2007.
149. RISCH NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 847-56, 2000.

150. ROMITTI PA, LIDRAL AC, MUNGER RG, DAACK-HIRSCH S, BURNS T, MURRAY JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based study of orofacial clefts. **Teratology**, v. 59, n. 1, p. 39-50, 1999.
151. RUTTER JL, MITCHELL TI, BUTTICE G, MEYERS J, GUSELLA JF, OZELIUS LJ, BRINCKERHOFF CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. **Cancer Res**, v. 58, n. 23, p. 5321-5, 1998.
152. SABETI PC, REICH DE, HIGGINS JM, LEVINE HZ, RICHTER DJ, SCHAFFNER SF, GABRIEL SB, PLATKO JV, PATTERSON NJ, MCDONALD GJ, ACKERMAN HC, CAMPBELL SJ, ALTSHULER D, COOPER R, KWIATKOWSKI D, WARD R, LANDER ES. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. **Nature**, v. 419, n. 6909, p. 832-7, 2002.
153. SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-4, 1985.
154. SANGUINETTI CJ, DIAS NETO E, SIMPSON AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 914-21, 1994.
155. SASSANI R, BARTLETT SP, FENG H, GOLDNER-SAUVE A, HAQ AK, BUETOW KH, GASSER DL. Association between alleles of the transforming growth factor-alpha locus and the occurrence of cleft lip. **Am J Med Genet**, v. 45, n. 5, p. 565-9, 1993.
156. SCAPOLI L, PALMIERI A, MARTINELLI M, PEZZETTI F, CARINCI P, TOGNON M, CARINCI F. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. **Am J Hum Genet**, v. 76, n. 1, p. 180-3,

2005.

157. SCAPOLI L, PEZZETTI F, CARINCI F, MARTINELLI M, CARINCI P, TOGNON M. Lack of linkage disequilibrium between transforming growth factor alpha Taq I polymorphism and cleft lip with or without cleft palate in families from Northeastern Italy. **Am J Med Genet**, v. 75, n. 2, p. 203-6, 1998.
158. SCHLIEKELMAN P, SLATKIN M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 6, p. 1369-85, 2002.
159. SCHROEDER DC, GREEN LJ. Frequency of dental trait anomalies in cleft, sibling and non-cleft groups. **J Dent Res**, v. 54, p. 802-7, 1975.
160. SCHUTTE BC, MURRAY JC. The many faces and factors of orofacial clefts. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 10, p. 1853-9, 1999.
161. SHAPIRA Y, LUBIT E, KUFTINEC M. Congenitally missing second premolars in cleft lip and cleft palate children. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 115, n. 4, p. 396-400, 1999.
162. SHAPIRA Y, LUBIT E, KUFTINEC M. Hypodontia in children with various types of clefts. **Angle Orthod**, v. 70, n. 1, p. 16-21, 2000.
163. SHAW D, RAY A, MARAZITA M, FIELD L. Further evidence of a relationship between the retinoic acid receptor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL +/- P). **Am J Hum Genet**, v.53, n. 5, p. 1156-7, 1993.
164. SHAW GM, WASSERMAN CR, LAMMER EJ, O'MALLEY CD, MURRAY JC, BASART AM, TOLAROVA MM. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. **Am J Hum Genet**, v. 58, n. 3, p.551-61, 1996.
165. SHI M, CAPRAU D, DAGLE J, CHRISTIANSEN L, CHRISTENSEN K, MURRAY JC. Application of kinetic polymerase chain reaction and molecular beacon assays to pooled analyses and high-throughput genotyping for candidate genes. **Birth Defects Res**, v. 70, n. 2, p. 65-74, 2004.

166. SHIANG R, LIDRAL AC, ARDINGER HH, BUETOW KH, ROMITTI PA, MUNGER RG, MURRAY JC. Association of transforming growth-factor alpha gene polymorphisms with nonsyndromic cleft palate only (CPO). **Am J Hum Genet**, v. 53, n. 4, p. 836-43, 1993.
167. SHPRINTZEN RJ. Terminology and classification of facial clefting. In: Mooney MP, Siegel MI. **Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting**. John Wiley and Sons, New York, p. 17-28, 2002.
168. SHULER CF, HALPERN DE, GUO Y, SANK AC. Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation in vivo. **Dev Biol**, v. 154, n. 2, p. 318-30, 1992.
169. SIOMI H, DREYFUSS G. RNA-binding proteins as regulators of gene expression. **Curr Opin Genet Dev**, v. 7, n. 3, p. 345-53, 1997.
170. SLAYTON RL, WILLIAMS L, MURRAY JC, WHEELER JJ, LIDRAL AC, NISHIMURA CJ. Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 40, n. 3, p. 274-9, 2003.
171. SOFAER JA. Human tooth-size asymmetry in cleft lip with or without cleft palate. **Arch Oral Biol**, v. 24, n. 2, p. 141-6, 1979.
172. SOZEN MA, SUZUKI K, TOLAROVA MM, BUSTOS T, FERNANDEZ IGLESIAS JE, SPRITZ RA. Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. **Nat Genet**, v. 29, n. 2, p. 141-2, 2001.
173. SPERBER GH. Craniofacial embryogenesis: normal developmental mechanisms. In: Mooney MP, Siegel MI. **Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting**. John Wiley and Sons, New York, p. 31-60, 2002.
174. SPERBER GH. Formation of the primary palate. In: Wyszynski DF, editor. **Cleft lip and palate: from origin to treatment**. Oxford: Oxford University

- Press, p. 5-13, 2002.
175. SPERBER GH. Palatogenesis: closure of the secondary palate. In: Wyszynski DF, editor. **Cleft lip and palate: from origin to treatment**. Oxford: Oxford University Press, p. 14-24, 2002.
 176. SRICHOMTHONG C, SIRIWAN P, SHOTELERSUK V. Significant association between IRF6 820G/A and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. **J Med Genet**, v. 42, n. 7, p. e46, 2005.
 177. STAHL F, GRABOWSKI R, WIGGER K. Epidemiology of Hoffmeister's "genetically determined predisposition to disturbed development of the dentition" in patients with cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 43, n. 4, p. 457-65, 2006.
 178. STEIN J, MULLIKEN JB, STAL S, GASSER DL, MALCOLM S, WINTER R, BLANTON SH, AMOS C, SEEMANOVA E, HECHT JT. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. **Am J Hum Genet**, v. 57, n. 2, p. 257-72, 1995.
 179. STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001.
 180. STOLL C, QIAN JF, FEINGOLD J ET AL. Genetic variation in transforming growth factor alpha: possible association of *Bam*HI polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate. **Hum Genet**, v. 92, n. 1, p. 81-2, 1993.
 181. SUAZO J, SANTOS JL, SILVA V, JARA L, PALOMINO H, BLANCO R. Possible association due to linkage disequilibrium of TGFA, RARA and BCL3 with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. **Rev Med Chil**, v. 133, n. 9, p. 1051-8, 2005.
 182. SUZUKI Y, JEZEWSKI PA, MACHIDA J, WATANABE Y, SHI M, COOPER ME, VIET le T, NGUYEN TD, HAI H, NATSUME N, SHIMOZATO K, MARAZITA ML MURRAY JC. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. **Genet Med**, v. 6, n. 3, p. 117-25, 2004.
 183. TANABE A, TAKETANI S, TOKUNAGA R, HIRAMOTOS M. Analysis of

- the candidate genes responsible for nonsyndromic cleft lip and palate in Japanese people. **Clin Sci**, v. 99, n. 2, p. 105-11, 2000.
184. TANIGUCHI T, OGASAWARA K, TAKAOKA A, TANAKA N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 623-55, 2001.
185. TAYA Y, O'KANE S, FERGUSON MW. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. **Development**, v. 126, n. 17, p. 3869-79, 1999.
186. THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. The International HapMap Project. **Nature**, v. 426, p.789-96, 2003.
187. TONGE CH. Identification of cell patterns in human tooth differentiation. **J Dent Res.**, v. 46, n. 5, p. 876-8, 1967.
188. TREVILLATO PC, LINE SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. **J Forensic Odonto Stomatol**, v. 18, n. 1, p. 6-9, 2000.
189. TRICOLI JV, NAKAI H, BYERS MG, RALL LB, BELL GI, SHOWS TB. The gene for human transforming growth factor alpha is on the short arm of chromosome 2. **Cytogenet Cell Genet**, v. 42, n. 1-2, p. 94-8, 1986.
190. TSAI TP, HUANG CS, HUANG CC, SEE LC. Distribution patterns of primary and permanent dentition in children with unilateral complete cleft lip and palate. **Cleft Palate J**, v. 35, n. 2, p. 154-60, 1998.
191. TUDELA C, FORMOSO MA, MARTINEZ T, PEREZ R, APARICIO M, MAESTRO C, DEL RIO A, MARTINEZ E, FERGUSON M, MARTINEZ-ALVAREZ C. TGF-beta3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. **Int J Dev Biol**, v. 46, n. 3, p. 333-6, 2002.
192. VAN DEN BOOGAARD MJH, DORLAND M, BEEMER FA, VAN AMSTEL HKP. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 342-343, 2000.

193. VANDERAS AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 24, n. 3, p.216-25, 1987.
194. VASTARDIS H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 117, n. 6, p. 650-6, 2000.
195. VICHI M, FRANCHI L. Abnormalities of the maxillary incisors in children with cleft lip and palate. **J Dent Child**, v. 62, n. 6, p. 412-417, 1995.
196. VIEIRA AR. Association between the Transforming Growth Factor Alpha Gene and Nonsyndromic Oral Clefts: A HuGE Review. **Am J Epidemiol**, v. 163, n. 9, p. 790-810, 2006.
197. VIEIRA AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. **J Dent Res**, v. 82, n. 3, p. 162-5, 2003.
198. VIEIRA AR, AVILA JR, DAACK-HIRSCH S, DRAGAN E, FELIX TM, RAHIMOV F, HARRINGTON J, SCHULTZ RR, WATANABE Y, JOHNSON M, FANG J, O'BRIEN SE, ORIOLI IM, CASTILLA EE, FITZPATRICK DR, JIANG R, MARAZITA ML, MURRAY JC. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. **PloS Genet**, v. 1, n. 6, p. e64, 2005.
199. VIEIRA AR, KARRAS JC, ORIOLI IM, CASTILLA EE, MURRAY JC. Genetic origins in a South American clefting population. **Clin Genet**, v. 62, n. 6, p. 458-63, 2002.
200. VIEIRA AR, MEIRA R, MODESTO A, MURRAY JC. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. **J Dent Res**, v. 83, n. 9, p. 723-7, 2004.
201. VIEIRA AR, MODESTO A, MEIRA R, BARBOSA AR, LIDRAL AC, MURRAY JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. **Am J Med Genet**, v. 143A, n. 6, p. 538-45, 2007.
202. VIEIRA AR, MURRAY JC, TREMBATH D, ORIOLI IM, CASTILLA EE, COOPER ME, MARAZITA ML, LENNON-GRAHAM F, SPEER M. Studies

- of reduced folate carrier 1 (RFC1) A80G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects. **Am J Med Genet**, v. 135, n. 2, p. 220-3, 2005.
203. VIEIRA AR, ORIOLI IM, CASTILLA EE, COOPER ME, MARAZITA ML, MURRAY JC. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. **J Dent Res**, v. 82, n. 4, p. 289-92, 2003.
204. VIELAND VJ. Bayesian linkage analysis, or: How I learned to stop worrying and love the posterior probability of linkage. **Am J Hum Genet**, v. 63, n. 4, p.:947-954, 1998.
205. VINTINER GM, HOLDER SE, WINTER RM, MALCOLM S. No evidence of linkage between the transforming growth factor-alpha gene in families with apparently autosomal dominant inheritance of cleft lip and palate. **J Med Genet**, v. 29, n. 6, p. 393-7, 1992.
206. VU TH, SHIPLEY JM, BERGERS G, BERGER JE, HELMS JA, HANAHAN D, SHAPIRO SD, SENIOR RM, WERB Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 411-22, 1998.
207. WARRINGTON A, VIEIRA AR, CHRISTENSEN K, ORIOLI IM, CASTILLA EE, ROMITTI PA, MURRAY JC. Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. **J Med Genet**, v. 43, n. 6, p. e26, 2006.
208. WEINBERG SM, NEISWANGER K, MARTIN RA, MOONEY MP, KANE AA, WENGER SL, LOSEE J, DELEYIANNIS F, MA L, DE SALAMANCA JE, CZEIZEL AE, MARAZITA ML. The Pittsburgh Oral-Facial Cleft study: expanding the cleft phenotype. Background and justification. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 43, n. 1, p. 7-20, 2006.
209. WERNER SP, HARRIS EF. Odontometrics of the permanent teeth in cleft lip and palate: systemic size reduction and amplified asymmetry. **Cleft Palate J**, v. 26, n. 1, p. 36-41, 1989.
210. WILCOX JN, DERYNCK R. Developmental expression of transforming

- growth factors alpha and beta in mouse fetus. **Mol Cell Biol**, v. 8, n. 8, p. 3415-22, 1988.
211. WYSZYNSKI DF, MAESTRI N, LEWANDA AF, MCINTOSH I, SMITH EA, GARCIA-DELGADO C, VINAGERAS-GUARNEROS E, WULFSBERG E, BEATY TH. No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations. **Hum Hered**, v. 47, n. 2, p. 101-9, 1997.
212. WYSZYNSKI DF, MAESTRI N, MCINTOSH I, SMITH EA, LEWANDA AF, GARCIA-DELGADO C, VINAGERAS-GUARNEROS E, WULFSBERG E, BEATY TH. Evidence for an association between markers on chromosome 19q and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two groups of multiplex families. **Hum Genet**, v. 99, n. 1, p. 22-6, 1997.
213. YAMADA Y. Identification of genetic factors and development of genetic risk diagnosis systems for cardiovascular diseases and stroke. **Circ J**, v. 70, n. 10, p. 1240-8, 2006.
214. YAO PJ, O'HERRON TM, COLEMAN PD. Immunohistochemical characterization of clathrin assembly protein AP180 and synaptophysin in human brain. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 1, p. 173-8, 2003.
215. YE S, ERIKSSON P, HAMSTEN A, KURKINEN M, HUMPHRIES SE, HENNEY AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. **J Biol Chem**, v. 271, n. 22, p. 13055-60, 1996.
216. YE S, WATTS GF, MANDALIA S, HUMPHRIES SE, HENNEY AM. Genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. **Br Heart J**, v. 73, n. 3, p. 209-15, 1995.
217. YE S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. **Matrix Biol**, v. 19, n. 7, p. 623-9, 2000.
218. YOUNG DL, SCHNEIDER RA, HU D, HELMS JA. Genetic and teratogenic

- approaches to craniofacial development. **Crit Rev Oral Biol Medical**, v. 11, n. 3, p. 304-17, 2000.
219. YOSHIURA K, MACHIDA J, DAACK-HIRSCH S, PATIL SR, ASHWORTH LK, HECHT JT, MURRAY JC. Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in a family with cleft lip and palate. **Genomics**, v. 54, n. 2, p. 231-40, 1998.
220. YUAN KF, LAI QG, LI DR, YANG ZJ, ZHOU XH. Relationship between transforming growth factor-alpha gene polymorphism and non-syndromic cleft lip with cleft palate. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 24, n. 6, p. 533-5, 2006.
221. XIE J, ZHU H, LARADE K, LADOUX A, SEGURITAN A, CHU M, ITO S, BRONSON RT, LEITER EH, ZHANG CY, ROSEN ED, BUNN HF. Absence of a reductase, NCB5OR, causes insulin-deficient diabetes. **Proc Nat Acad Sci**, v. 101, n. 29, p. 10750-5, 2004.
222. ZHANG B, HENNEY A, ERIKSSON P, HAMSTEN A, WATKINS H, YE S. Genetic variation at the metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. **Hum Genet**, v. 105, n. 5, p. 418-23, 1999.
223. ZHU H, QIU H, YOON HWP, HUANG S, BUNN HF. Identification of a cytochrome b-type NAD(P)H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. **Proc Nat Acad Sci**, v. 96, n. 26, p. 14742-7, 1999.
224. ZUCCHERO TM, COOPER ME, MAHER BS, DAACK-HIRSCH S, NEPOMUCENO B, RIBEIRO L, CAPRAU D, CHRISTENSEN K, SUZUKI Y, MACHIDA J, NATSUME N, YOSHIURA KI, VIEIRA AR, ORIOLI IM, CASTILLA EE, MORENO L, ARCOS-BURGOS M, LIDRAL AC, FIELD LL, LIU Y, RAY A, GOLDTEIN T, SCHULTZ RE, SHI M, JOHNSON MK, KONDO S, SCHUTTE BC, MARAZITA ML, MURRAY JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. **New Engl J Med**, v. 351, n. 8, p. 769-780, 2004.

ABSTRACT

ABSTRACT

DENTAL ANOMALIES AS PHENOTYPIC EXTENSION OF ORAL CLEFTS: MOLECULAR STUDIES OF CANDIDATE GENES AND CHROMOSOMAL REGIONS

Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) is a common craniofacial anomaly in humans, and may occur as part of a syndrome or isolated, when the affected individuals do not present any associated structural anomalies. The etiology of CL/P is complex, with both genetic and environmental factors involved. Several genes/loci have been suggested in the past years although discrepancies among results are often found. Some investigators consider CL/P as part of a broader phenotype, and suggest that additional clinical characteristics, such as the presence of dental anomalies, could be used for a better description of the individual phenotype in genetic studies. Five hundred individuals with CL/P and five hundred non-related individuals without CL/P were examined regarding type of cleft and dental anomalies and saliva samples were collected from each individual for molecular analysis. The frequencies of the dental anomalies were significantly higher in CL/P individuals than controls, and the preferential associations observed for certain anomalies in specific cleft subphenotypes were considered new subphenotypes and included in the molecular analyses. A total of 30 polymorphisms distributed in MMP1, MMP3, MMP9, TGFA, and IRF6 genes and in chromosome region 6q were assayed regarding association with CL/P and its subphenotypes through restriction-fragment length polymorphism, kinetic PCR and Taqman methods. Differences in allele and genotype frequencies observed in cases and controls for each polymorphism were assessed using Chi-square test and Bonferroni correction. The pattern of linkage disequilibrium among the markers was also evaluated. Associations between CL/P and markers in MMP3, TGFA, and IRF6 genes were observed. Additionally, three genes (PRSS35, SNAP91 and CYB5R4) and two polymorphisms in chromosome 6q region also demonstrated association to CL/P and its phenotypes in the population studied.

Key words: cleft lip/palate, subphenotype, dental anomalies, genetic polymorphisms.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO

Letra A, Silva RA, Menezes R, de Souza AP, Almeida ALPF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Studies with MMP-9 (C-1562 T) Gene Promoter Polymorphism in Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *Am J Med Genet Part A*, v. 89, n. 1, p. 89-91, 2007.

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

American Journal of Medical Genetics Part A 143A:89–91 (2007)

Research Letter

Studies With *MMP9* Gene Promoter Polymorphism and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate

Ariadne Letra,¹ Rodrigo A. da Silva,² Renato Menezes,¹ Ana P. de Souza,²
Ana L.P.F. de Almeida,³ Mari C. Sogayar,⁴ and Jose M. Granjeiro^{5*}

¹Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil

²Oral Biology Program, University of Sagrado Coração, Bauru, São Paulo, Brazil

³Department of Periodontology, Hospital of Rehabilitation and Craniofacial Anomalies, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil

⁴Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵Department of Cellular and Molecular Biology, Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

Received 9 May 2006; Accepted 20 August 2006

How to cite this article: Letra A, da Silva RA, Menezes R, de Souza AP, de Almeida ALPF, Sogayar MC, Granjeiro JM. 2007. Studies with *MMP9* gene promoter polymorphism and nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet Part A* 143A:89–91.

To the Editor:

Nonsyndromic cleft lip with or without palate (CL/P) is one of the most common congenital defects in humans. Birth prevalence varies based on ethnicity and geographic location [Vanderas, 1987]. Etiology still remains unclear whilst the molecular mechanisms that control palate development are complex and not thoroughly understood.

Palatogenesis requires remodeling of the extracellular matrix (ECM) and subsequent fusion of the palatal shelves. In normal physiologic conditions, ECM remodeling is a strictly controlled process necessary for embryonic development and organogenesis [Woessner, 1994]. Disruption of the coordinated migration and fusion of facial processes by genetic, environmental, or combined factors at any time point could lead to CL/P [Wong and Hägg, 2004].

Matrix metalloproteinases (MMPs) comprise a group of likely candidate proteins involved in the etiology of CL/P because of their role in modeling craniofacial tissues [Iamaroon et al., 1996]. Temporospatial expression of MMPs 2, 3, 7, 9, and 13 was observed during murine palatal fusion [Morris-Wiman et al., 1999, 2000]. Moreover, previous studies have demonstrated an involvement of MMPs in the developing palate implying that such process requires proteolytic degradation of ECM, and MMPs as a necessary step for lip and palatal fusion [Morris-Wiman et al., 2000; Blavier et al., 2001; Brown et al., 2002]. *MMP9* gene maps to chromosome 20q12.2 and is known for its ability in degrading type IV collagen, a main component of the ECM, and

facilitating cell migration [Zhang et al., 1999]. Blavier et al. [2001] detected a selective expression of MMP-9 in the ossification centers in the midline of the developing maxilla; however, nothing has ever been mentioned known about a role of *MMP9* in the occurrence of CL/P. Nevertheless, the finding that degradation of the basal membrane adjacent to the medial epithelial edge (MEE) occurs simultaneously to epithelial-mesenchymal transformation (EMT), and the overexpression of certain MMPs in the MEE between the palatal shelves during fusion suggest that they might somehow be involved [Kaartinen et al., 1997; Blavier et al., 2001; Brown et al., 2002; Kang and Svoboda, 2005].

Polymorphisms in genes including *TGF α* [Ardinger et al., 1989; Machida et al., 1999; Jugessur et al., 2003], *MSX1* [Jezewski et al., 2003; Vieira et al., 2003], and *TGF- β 3* [Jugessur et al., 2003; Vieira et al., 2003] have been associated to CL/P in nonsyndromic patients. A polymorphism on chromosome 16p13, comprising *MMP25* gene, has also yielded evidence for linkage and association with CL/P [Blanton et al., 2004].

Grant sponsor: CAPES and PROAP/FOB/USP; Grant sponsor: FAPESP; Grant numbers: 03/10422-8, 01/10707-7; Grant sponsor: CNPq; Grant number: 50.5350/2004-1 and 479043/2004-3.

*Correspondence to: Jose M. Granjeiro, Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho—Outeiro de São João Baptista s/n, Centro, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: jmgranjeiro@vm.uff.br

DOI 10.1002/ajmg.a.31492

A polymorphism on the *MMP9* gene promoter (−1562 C/T) causes a functional effect on transcription, in which a C to T substitution results in the loss of binding of a nuclear protein to this region of the *MMP9* gene and an increase in transcriptional activity [Zhang et al., 1999]. Palate EMT requires several steps for the two epithelial sheets to fuse at the apical membranes and some cells may move to the oral or nasal epithelium. The cells increase, among other signaling molecules, in MMPs, for matrix degradation [Kang and Svoboda, 2005]. A decrease in MMP levels could hypothetically lead to failure of fusion and a cleft of the lip and/or palate.

To address this hypothesis, genomic DNA samples from 125 nonsyndromic cleft lip/palate individuals ascertained through the Hospital of Rehabilitation and Craniofacial Anomalies of the University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil and 173 healthy control individuals were analyzed by PCR-RFLP and gel electrophoresis. The study was approved by the IRB of the University of São Paulo and by the Brazilian Council for Ethics and Research on Human Subjects. All patients signed an informed consent sheet in agreement to the terms of the study.

Basic parameters of the population studied are shown on Table I. Genotypes were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). PCR was carried out in a total volume of 25 μ l containing 50 ng genomic DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 μ M of each primer, 200 mM dNTPs, and 2.5 units *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Primer sequences were 5'-GCC-TGGCACATAGTAGGCC-3' (forward) and 5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3' (reverse). Reaction cycles were 95°C for 3 min, 35 cycles at 95°C for 1 min, 65°C for 45 sec, 72°C for 45 sec, and final extension at 72°C for 7 min. Enzyme digestion was realized adding 2 μ l of PCR products to a 8 μ l solution containing 1 μ l 10X NE buffer, 0.3 μ l *Sph* I (20 units/ml) (New England Biolabs, Ipswich, MA), and 6.7 μ l sterile deionized water at 37°C overnight. The total amount of the digest was electrophoresed on a 10% vertical nondenaturing polyacrylamide gel

at 20 mA. Staining procedures followed previously published protocols [Sanguinetti et al., 1994].

We tested the association between the *MMP9* −1562 C/T polymorphism and CL/P using a case-control design. Differences in frequencies of the polymorphism in both groups were assessed by Chi-square test (χ^2) and using the odds ratio and 95% confidence intervals. Statistically significant differences were set at $P < 0.05$. The distribution of the *MMP9* genotypes in cases and controls was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$; Table II). We found no evidence for genotypic association in any of the groups (OR = 1.307, 95% CI: 0.74–2.30; Table II). The TT genotype which is believed to increase MMP-9 transcription and reported to be very low was not observed in any of the groups. No significant differences were observed regarding allele frequencies in any of the groups ($P > 0.05$).

Logistic regression showed no differences in genotype distribution between cases and controls adjusted by race and gender (OR = 1.3821, 95% CI: 0.73–2.60, and OR = 1.6193, 95% CI: 0.93–2.82, respectively). The Brazilian population consists of a large ethnic mixture of Latin-European whites, Afro-Brazilian blacks, and Amerindians, which makes it very difficult to match perfectly the ethnicity of cases and controls and may have accounted for some confounding effects of undetectable population stratification. However, the discrete difference in the frequency of the T allele between cases and controls seems not to be enough to account for such effect. In an attempt to overcome the problem of population stratification, since most individuals in this study were of Caucasian ethnicity, we compared genotype and allele frequencies in Caucasians only, and observed no significant differences (OR = 1.11, 95% CI: 0.57–2.13 and OR = 1.09, 95% CI: 0.59–2.03, for genotype and allele frequencies, respectively).

Somewhat interesting results were found when cleft lip only, cleft lip with cleft palate and cleft palate only were evaluated separately (Table III). The CL group did not present significant differences regarding genotype distribution, but CLP and CP groups presented significantly more CC genotypes than CT ($P < 0.05$) (Table III). In addition, the CLP group

TABLE I. Baseline Clinical Characteristics of Individuals

	Cleft (n = 125)	Control (n = 173)	P-value*
	n (%)	n (%)	
Age (mean, years)	19, 42	26, 61	0.9345
Gender (%)			
Female	58 (46)	114 (66)	0.0007
Male	67 (54)	59 (34)	
Ethnic group			
Caucasian	106 (85)	134 (77)	0.00001
Japanese	1 (0.8)	27 (16)	
Afro-American	18 (14.2)	12 (7)	

* χ^2 test; $P \leq 0.05$ was used to indicate statistical difference.

TABLE II. Genotype and Allele Frequencies Between Cleft and Control Subjects

Frequency	Cleft (n = 125)	Control (n = 173)	OR (95% CI)*
Genotype			
CC	101	132	1.307 (0.74–2.30)
CT	24	41	
Allele			
C	226	305	1.26 (0.74–2.15)
T	24	41	

*OR, odds ratio; CI, confidence interval.

TABLE III. Genotype Frequencies Between Cleft Subgroups

Cleft group	Genotype				OR (95% CI)*
	CC		CT		
	M	F	M	F	
CL (n=7)	4	1	1	1	
CLP (n=96)	47	32	6	11	21.59 (10.29–45.31)
CPO (n=22)	8	10	1	3	20.25 (4.57–93.72)

*OR, odds ratio; CI, confidence interval.

showed differences in genotype distribution and gender. Male cases frequently presented more CC genotype than females; the opposite was true for the CT genotype (OR = 2.57, 95% CI: 1.00–6.61).

Our hypothesis that CL/P individuals would tend to present significantly more CC genotypes than controls, indicating a possible downregulation of the *MMP9* gene promoter thus decreasing tissue remodeling and further leading to a possible oral cleft was not confirmed. Perhaps this lack of association could be a result of sample size. A convenient sample of 500 cases and 500 controls should achieve 80% statistical power [Purcell et al., 2003]. In addition, other factors such as occupational exposure and certain dietary components might interact with the *MMP9* genotype or act as potential confounders in the analysis. Unfortunately, information on these factors in our case-control study was not available. It would be interesting to investigate the interaction between *MMP9* genotypes and these risk factors in future studies.

Although the results for the *MMP9* –1562 C/T polymorphism in this particular study do not provide evidence of a major role for this gene in NSCLP, other MMPs might present positive levels of involvement and their association with CL/P is yet to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the individuals that contributed DNA samples to this study. AL and RM were supported by CAPES and PROAP/FOB/USP. Dr. Pardo and Dr. Sogayar were supported by FAPESP (grants 03/10422-8 and 01/10707-7, respectively). Dr. Granjeiro was supported by CNPq (grants 50.5350/2004-1 and 479043/2004-3). We also thank TL Silva, O. Sobrinho, and W. Orcini for the technical support and Prof. AR Vieira for the critical reading and comments on the manuscript.

REFERENCES

Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, Van Denmark DR, Murray JC. 1989. Association of genetic variation of the

- transforming growth factor- α gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45:348–353.
- Blanton SH, Bertin T, Sema ME, Stal S, Mulliken JB, Hecht J. 2004. Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13, and 16p13.3 with nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet Part A* 125A:23–27.
- Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, Declerk Y, Kaartinen V. 2001. TGF β 3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol* 12:1457–1466.
- Brown NL, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR. 2002. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res* 81:826–830.
- Iamaroon A, Wallon UM, Overall CM, Diewert VM. 1996. Expression of 72kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. *Arch Oral Biol* 41:1109–1119.
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC. 2003. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in nonsyndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 40:399–407.
- Jugessur A, Lie R, Wilcox A, Murray J, Taylor J, Saugstad O, Vindenes H, Abyholm F. 2003. Variants of developmental genes (*TGF α* , *TGF β 3*, and *MSX1*) and their associations with oral clefts: A case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol* 24:230–239.
- Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, Shuler CF. 1997. Transforming growth factor- β 3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev Dyn* 209:255–260.
- Kang P, Svoboda KKH. 2005. Epithelial-mesenchymal transformation during craniofacial development. *J Dent Res* 84:678–690.
- Machida J, Yoshiura K, Funkhauser C, Natsume N, Kawai T, Murray J. 1999. Transforming growth factor- α (TGFA): Genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics* 61:237–242.
- Morris-Wiman J, Du Y, Brinkley L. 1999. Occurrence and temporal variation in matrix metalloproteinases and their inhibitors of matrix metalloproteinases during murine and secondary palatal morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 19:201–212.
- Morris-Wiman J, Burch H, Basco E. 2000. Temporospatial distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 202:129–141.
- Purcell S, Cherny SS, Sham PC. 2003. Genetic power calculator: Design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19:149–150.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:914–921.
- Vanderas AP. 1987. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: A review. *Cleft Palate J* 24:216–225.
- Vieira A, Orioli I, Castilla E, Cooper M, Marazita M, Murray J. 2003. *MSX1* and *TGF β 3* contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 82:289–292.
- Woessner JF. 1994. The family of matrix metalloproteinases. In: Inhibition of matrix metalloproteinases: Therapeutic potential. *Ann NY Acad Sci* 732:11–21.
- Wong FK, Hägg U. 2004. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J* 10:331–336.
- Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. 1999. Genetic variation at the metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet* 105:418–423.

APÊNDICE 2 – ARTIGO ORIGINAL SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Letra A, Silva RA, Menezes R, Astolfi CM, Shinohara A, de Souza AP, Granjeiro JM. MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1. **Arch Oral Biol** (em fase de revisão)

Elsevier Editorial System(tm) for Archives of Oral Biology

Manuscript Draft

Manuscript Number: AOB-D-06-00382R1

Title: MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1.

Article Type: Original Paper

Section/Category:

Keywords:

Corresponding Author: Dr. Jose Mauro Granjeiro, DDS, MSc, DSc

Corresponding Author's Institution: Fluminense Federal University

First Author: Ariadne Letra, DDS, MS

Order of Authors: Ariadne Letra, DDS, MS; Rodrigo A Silva; Renato Menezes, DDS, MS, PhD; Claudia M Astolfi, DDS, MS; Andre Shinohara, DDS, MS; Ana Paula De Souza, DDS, MS, PhD; Jose M Granjeiro

Manuscript Region of Origin:

Cover Letter

Universidade Federal Fluminense
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular e Molecular
Outeiro de São João Baptista, s/n, Campus do Valonguinho
Centro/Niterói – RJ CEP:24.020-150
FONE: (021) 2629 2324 - FAX: (021) 3701 1617

Niterói, February 6, 2007.

To Mr. Paul Crabtree
Journal Manager
Archives of Oral Biology

Ref.: Ms. No. AOB-D-06-00382

Title: **"Studies of polymorphisms in *MMP1* and *MMP3* gene promoters as contributors for cleft lip and palate"**

Thank you for the opportunity to resubmit our study, hereafter renamed **"MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1"**.

We have read the comments of both reviewers, which were very thorough and constructive and have made substantial alterations accordingly.

We hope that the manuscript is now appropriate for further review. We have addressed each of the referee's questions (in bold) in the List of Revisions.

Thank you very much.

Sincerely,

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (Corresponding author)
(jmgranjeiro@vm.uff.br).
Department of Cell and Molecular Biology, Institute of Biology – Fluminense Federal University /UFF, Outeiro de São João Baptista, s/n
Campus do Valonguinho, Centro/Niterói – RJ, CEP: 24.020-150
Phone: 55 21 2629 2324 Fax: 55 21 3701 1617

* List of revisions made

Ref.: Ms. No. AOB-D-06-00382

Reviewer comments:

Reviewer #1: This manuscript reports an association of a polymorphic variant of the MMP3 locus with cleft lip and/or palate in comparisons with unrelated controls.

Comments:

1. Abstract. Clarify that CLP here means "cleft lip and/or palate" not "cleft lip and palate" as stated in lines 4-5. Some of the cases had cleft palate only (CP). **Yes, CLP has been corrected to CL/P meaning cleft lip with or without cleft palate.**

2. Introduction. (a) The vast majority of the cases in this study had cleft lip with or without cleft palate. The description of development of the face seems to have mixed together the development of the upper lip with the development of the secondary palate, and is confused, and in need of being re-written. The lip develops before the secondary palate, from the fusion of facial prominences, not the fusion of "shelves". These primordia are not "midfacial" as stated, considering that the maxillary prominences are involved and come in from the sides of the embryo. The mesenchyme that achieves confluence to form the upper lip is not the "palatal mesenchyme". The MEE appears to be part of the secondary palate, not the lip. What is the "MES"? **MES means Medial Epithelial Seam, but it has been changed to MEE to standardize nomenclature.** In summary, the development of the upper lip needs to be described separately from the development of the secondary palate. **The formation of primary and secondary palates were discussed separately.**

3. Introduction. All of the studies cited that describe expression of MMPs in the orofacial complex are concerned with the secondary palate, but the vast majority of cases in this study have cleft lip, and the expression in the secondary palate may be irrelevant. MMP expression in the facial prominences is the information needed here, and if the studies do not exist and if it is not known whether MMP3 and MMP1 or any other MMPs are expressed in the facial prominences, this needs to be stated. I am aware of one study by Iamaroon, Wallon, Overall and Diewert (1997, Arch Oral Biol) that has studied MMP expression in the facial prominences. **The study by Iamaroon et al 1996 was incorporated into the text as well as other studies regarding MMP3 and MMP1 during craniofacial development.**

4. Introduction. MMP1 and MMP3 are on Chromosome 11q22 as stated. Linkage studies that specifically suggest the location of genes involved in cleft lip with or without cleft palate on Chromosome 11q should be cited and the fact that a known liability factor in Venezuela, PVRL1, is in the same region (11q22.3) should be noted. I wonder whether there is linkage disequilibrium between MMP3-5A and a CL(P) liability allele at PVRL1 in your population. **Two additional references on the association of PVRL1 and CL/P have been added in the context of being close to the loci of both MMP1 and MMP3.**

5. Materials and Methods. Subjects. It would be better to state here exactly how many had CL(P) and how many had CP. **The number of individuals per cleft type has been included in the M & M section.** Is access to dental care (the source of controls) more associated with socioeconomic status than access to cleft lip and palate clinics? **Not in this study. The great majority of controls and cases were from the same region. Control individuals were seeking treatment at the University Clinics, a free service, as well as the treatment for cleft patients in HRAC hospital. The majority of the patients are of low socioeconomic**

status.

6. Materials and Methods. A reference or name of the analytical program used for logistic regression needs to be stated. **Corrected.**

7. Results. It is not clear what the results of the logistic regression indicate. These results seem to need to be expressed more clearly. What was the question being tested? **We performed regression analyses to test if differences in ethnicity would affect genotype distribution, which was true for MMP3. This can be attributed to the mixed ethnicity seen in Brazilian individuals due to a mixture of Latin-European whites, Afro-Brazilian Blacks and Amerindians which makes matching cases and controls by ethnicity a hard task.**

8. Results. The last paragraph is a bit misleading. The reason the 1G/1G+5A/5A haplotype is not significantly more common in cases is that both the cases and controls have small samples with this combination; the trend is for an excess of this genotype in the cases, as for all of the other haplotypes involving 5A/5A. **We have decided to exclude this analysis from the manuscript, following suggestions of referee #2.**

9. Discussion. The first line is a bit ambiguous. Try "jointly involved". **Corrected.**

10. Discussion. Again, all the references (13, 15-17) are concerned with the secondary palate, which would lead to CP, not the facial prominences, which lead to CL(P). See comment #3. This problem, discussion of the secondary palate, when what needs to be discussed is the upper lip, occurs in several places in the discussion. **Corrected.**

11. Table 1 and Materials and Methods. How was "ethnicity" assigned? Many people are not from a single ethnic origin. Perhaps the "Caucasians" in the case group have more genetic admixture of aboriginal origins than the controls. Ethnic differences in clefting frequencies are well known. **Explained in the Logistic regression part in the results section.**

12. Table 5 and Discussion. My analyses of the data show that in addition to being not different from the CL/P group, the CP group is not significantly different from the control group either. The entire association of "CLP" with 5A may be derived from the CL/P (cleft lip) group. The current presentation in the paper seems to imply that the CP group contributes to the association, and it has no grounds for doing so. **We have provided comparisons of each cleft type with controls.**

13. Table 7. A reference for the specific statistical methods used to obtain P values for each line on this table needs to be provided in the Materials and Methods, including the degrees of freedom. This is not the result of a simple Chi square test. As it stands it looks like it could be an invalid analysis. **Table 7 has been excluded.**

Reviewer #2:

This manuscript reports a highly significant association ($p = 0.00001$) between a polymorphism in the promoter of the gene for the matrix metalloproteinase 3 (MMP3) and nonsyndromic cleft lip + palate (CL/P) in a sample from Brazil. Negative results between CL/P and an MMP1 polymorphism are also reported. If this association between MMP3 and CL/P is confirmed, it will be an important addition to the literature on the genetics of CL/P. However, several aspects of the manuscript are of concern:

1. The rationale for studying MMPs as candidate genes for CL/P could be strengthened. As the authors note, there have been a few reports of MMP3 expression during murine palate formation (e.g., Brown et al., J Dent Res 81:826, 2002). More current literature should be cited on the MMPs (e.g. Verstappen and Von den Hoff, J Dent Res 85:1074, 2006) and the genetics of clefting (e.g., Zuccherro, NEJM 351:19; 2004; Lidral and Moreno, Curr Opin Pediatr 17:731; 2005). This would provide a balanced view of the literature (much of which does not suggest a linkage between clefting and chromosome 11q23, where MMP3 and MMP1 are located), as well as a sense of the recent progress in identifying genes that increase risk for clefting. **The introduction has been rewritten accordingly. The original papers cited in the review by Verstappen and von den Hoff (2006) had been cited previously.**

As a related point, why look at only MMP1 and MMP3? There is a large family of MMPs involved in remodeling the extracellular matrix, some implicated in tooth development. Several MMP genes are located at chromosome 11q23, and could have been studied along with MMP1 and MMP3. The paper would be strengthened by discussing the MMP family as a whole, with a rationale for the specific choices of MMP1 and MMP3. **We have emphasized the roles of other MMPs also and justified our reason for choosing MMP1 and MMP3.**

2. Why weren't more of the original 535 individuals actually genotyped? In a genetic association study, sample sizes should always be as large as possible. If the total sample is unavailable, only those individuals who were actually genotyped should be mentioned, not the 535 individuals. Table 1 should be modified to reflect these smaller samples. **Agreed. Table 1 now contains information of the subjects according to each gene tested.**

3. As the authors appropriately note, population stratification might be a possible explanation for the positive MMP3 result. They report that their cases and controls differ significantly by ethnicity, which is a good reason to use population stratification to discount their result entirely. However, the association between MMP3 and clefting is very strong, and will likely remain after the cases and controls are adjusted to remove the ethnic differences. Analyzing and reporting only Caucasians, which make up the great majority of the sample, would fix this problem. If the authors follow this suggestion, they should still discuss the ethnicity of "Caucasians" in Brazil, since this is a complex designation in and of itself. There is no need to evaluate gender in this context, and the gender differences should be removed from this discussion (Page 7, last paragraph). **Agreed. Analyses with Caucasians subjects only have been provided, in addition to the analyses with the total population.**

4. The DNA Collection, Genotyping, and Gel electrophoresis sections in Materials and Methods can be considerably shortened. These are standard methods, and can be described as such, with appropriate citations to prior publications or lab manuals. The first two sentences of the results section fit better in Methods. Along these lines, Table 2 seems excessive; a citation to the appropriate primers for these polymorphisms would be sufficient here. **Table 2 was removed and M & M section summarized.**

5. The MMP1 analysis was nonsignificant, and can be summarized quickly in a few sentences, eliminating the need for Tables 4 and 6. **Corrected accordingly.**

6. Table 5 could be merged into Table 3, thus shortening the paper, as well as providing all the MMP3 data in one place. The numbers in Table 5 do not add up to the totals provided at the top of the table; please correct these numbers. **Corrected accordingly.**

7. The haplotype analysis is inappropriate. Judging from the results of the two loci analyzed separately, the haplotype analysis appears to be driven by the MMP3 finding, and does not add anything to the paper. It could be deleted, which would eliminate Table 6 and shorten the paper. **It has been removed.**

8. In general the manuscript is well written. However, it could still benefit from a careful editing, to catch typos (e.g., change MES to MEE, Introduction, second paragraph, twice) or awkward wording. Just a note: Manuscripts shouldn't be submitted with comments between authors left in the margins. **Corrected.**

Editor: We have two excellent reviews of your submission. Both recognize the originality and significance of your findings but have a number of concerns that warrant substantial revision. Both reviews are constructive and revision is feasible. If you choose to submit a revised version I will be happy to submit it to further review. If you choose to do this please include a description of how you have addressed each of the referee's concerns.

Abstract

Abstract

(1) Objective: Orofacial clefts result from failures of developing embryonic facial and palatal processes to either completely merge or fuse. Normal development of the facial primordia requires remodeling of the extracellular matrix, which is mediated in part by the matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs can be considered a group of likely candidate proteins for the etiology of cleft lip with or without cleft palate (CL/P) due to their role in craniofacial modeling. The purpose of this study was to investigate if polymorphisms in *MMP1* and *MMP3* gene promoters were associated with CL/P.

(2) Design: DNA was extracted from buccal epithelial cells and genotypes obtained from cases and controls through kinetic PCR (*MMP3*, n=333) and restriction-fragment length polymorphism techniques (*MMP1*, n=395).

(3) Results: Significant differences were observed for *MMP3* (5A/6A) allele ($p=0.00001$), and genotype frequencies ($p=0.00001$) between cases and controls; and between cleft types and controls ($p=0.00001$ for CL/P; $p=0.04$ for CP). No significant differences were found for *MMP1* allele and genotype frequencies between cases and controls or between cleft types and controls ($p>0.05$).

(4) Conclusions: An association between a polymorphism in *MMP3* gene and CL/P has been shown. Although the extent to which this polymorphism may actually contribute to the affected cleft status is yet to be clarified, polymorphisms of *MMP* genes may be good candidates as genetic factors for their role in active ECM remodeling.

Key words: matrix metalloproteinase, polymorphism, cleft lip/palate.

MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1.

Ariadne Letra ¹, Rodrigo A. Silva ², Renato Menezes ¹, Claudia M. Astolfi ², André Shinohara ², Ana Paula de Souza ², José Mauro Granjeiro ^{3*}

¹Department of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo

²Oral Biology Program, University of Sagrado Coração, Bauru, SP, Brazil

³Department of Cellular and Molecular Biology, Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil

***Corresponding author:**

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Departamento de Biologia Celular

Universidade Federal Fluminense

Campus do Valonguinho

Outeiro de São João Baptista s/n, Centro, Niterói, RJ, Brazil.

Telephone: (55) 21 2629-2324.

Email: jmgranjeiro@vm.uff.br

Running title: MMP polymorphisms and cleft lip/palate.

Abstract

- (1) Objective: Orofacial clefts result from failures of developing embryonic facial and palatal processes to either completely merge or fuse. Normal development of the facial primordia requires remodeling of the extracellular matrix, which is mediated in part by the matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs can be considered a group of likely candidate proteins for the etiology of cleft lip with or without cleft palate (CL/P) due to their role in craniofacial modeling. The purpose of this study was to investigate if polymorphisms in *MMP1* and *MMP3* gene promoters were associated with CL/P.
- (2) Design: DNA was extracted from buccal epithelial cells and genotypes obtained from cases and controls through kinetic PCR (*MMP3*, n=333) and restriction-fragment length polymorphism techniques (*MMP1*, n=395).
- (3) Results: Significant differences were observed for *MMP3* (5A/6A) allele ($p=0.00001$), and genotype frequencies ($p=0.00001$) between cases and controls; and between cleft types and controls ($p=0.00001$ for CL/P; $p=0.04$ for CP). No significant differences were found for *MMP1* allele and genotype frequencies between cases and controls or between cleft types and controls ($p>0.05$).
- (4) Conclusions: An association between a polymorphism in *MMP3* gene and CL/P has been shown. Although the extent to which this polymorphism may actually contribute to the affected cleft status is yet to be clarified, polymorphisms of *MMP* genes may be good candidates as genetic factors for their role in active ECM remodeling.

Key words: matrix metalloproteinase, polymorphism, cleft lip/palate.

Introduction

Orofacial clefting is a failure of developing embryonic facial and palatal processes to either completely merge or fuse which results in a predictable series of postnatal deformities. Clefts of the lip with or without palate (CL/P) account for about 65% of all congenital anomalies¹ occurring in about 1/700 live births with wide variability related to geographic origin² and socioeconomic status³. Life-long treatment including surgical, dental, nutritional, speech, medical and behavioral interventions accompanies affected individuals throughout their entire lives⁴. Isolated or non-syndromic CL/P, which represents 70–90% of all CL/P cases, is considered to be multifactorial in origin, with both genetic and environmental components involved¹.

The distinct timing and complex coordination of developmental events leading to the formation of the primary palate clearly distinguish CL/P and cleft palate only (CP) as separate biological entities. The primary palate initially forms around the developing olfactory placodes with the rapid proliferation of the lateral epithelium and underlying mesenchyme^{5,6,7}. Thereafter, spatial and biomechanical changes associated with craniofacial growth must occur in sequence within a critical period in development, during week 5 to week 7 in humans. The upper lip is completed after fusion of the maxillary and frontonasal prominences and requires critically timed coordination of growth between these processes, exact spatial localization and further differentiation (or degradation) of the epithelium to allow for the uninterrupted flow of mesenchymal cells within the upper lip by 7 weeks of development^{6,7,8}. As with primary palatogenesis, closure and fusion of the secondary palate require strict coordination between the palatal shelves, including shelf growth and apoptosis (or further differentiation) of the epithelium along the medial edges of the palatal shelves. At week 8 of development, the palatal shelves rotate from a vertical

position on each side of the tongue and elevate to a horizontal position forming the medial edge epithelia (MEE) between the two shelves. Upon contact in the midline, adhesive contact, seam fusion along the medial edges and apoptosis of the epithelium are essential for normal palatal closure^{6,7,8,9,10}. Defects or failures at any time point during early embryonic development may result in the formation of clefts of the lip and/or palate^{11,12}.

During embryonic development, the process of morphogenesis is accompanied by changes within the composition of the extracellular matrix which further allows for cell migration and differentiation, cell-cell interactions and tissue resorption. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of proteolytic enzymes involved in normal and pathological tissue remodeling known for their ability of collectively degrading all components of the ECM and may be implicated in cleft lip/palate¹⁴. The MMP family is composed of 23 enzymes that share significant sequence homologies and is divided into five classes: collagenases, gelatinases, stromelysins, membrane-type MMPs, and others, including a few of the most recently identified MMPs¹³.

Strong evidence for implying MMPs as candidates for CL/P comes from a variety of biological studies. Regarding the primary palate, Iamaroon et al. (1996)¹⁵ demonstrated the temporo-spatial distribution of MMP-2 in early development of the mouse craniofacial complex, in which the expression of MMP-2 was intensely localized to the outgrowing regions of the primary palate, with concomitant localization of fibronectin, and further suggested that aberrant expression or function of the enzyme may have causative role in craniofacial anomalies. Other MMPs have been shown in the developing secondary palate^{16,17,18} associated with degradation of the extracellular matrix required for palatal fusion¹⁸. The increased expression of MMPs 2, 3, 9 and 13 has been demonstrated within the medial mesenchyme surrounding the degenerating medial edge epithelia during murine palatal

fusion, whereas MMP-3 showed the most extensive distribution of all MMPs during palatal shelf morphogenesis^{16,17}.

MMP-3, also known as stromelysin-1, has been detected *in vivo* subjacent to the medial edge epithelium following contact of the palatal shelves¹⁴ and has been demonstrated to play a role in epithelial-mesenchymal transformation (EMT), once induction of its expression results in cleavage of cadherin, loss of the epithelial phenotype and subsequent stable conversion of epithelia into mesenchyme¹⁹. Constantly high levels of active MMP-3 were observed during the latter stages of palatogenesis and may represent an important stimulus for EMT¹⁴. MMP-3 presents a broad substrate specificity, including type III, IV and V collagens, and non-collagenous ECM components such as proteoglycans, fibronectin and laminin. MMP-3 is capable of activating other MMPs, including MMP-1. MMP-1, or collagenase-1, is the most widely expressed MMP that possesses proteolytic activities against fibrillar collagens (collagens types I, II and III), the most abundant class of ECM proteins in interstitial connective tissue²¹. Although until now there are no specific reports regarding MMP-1 expression during lip or palate development, MMP-1 is expressed during facial development and has been implicated as playing a key role during early tooth development²².

Both *MMP1* and *MMP3* genes are located near each other on chromosome 11q23 and the level of expression of these genes can be influenced by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of their respective genes^{23,25}. The promoter region of *MMP1* contains a guanine insertion/deletion polymorphism (1G/2G polymorphism) at position -1607. This 2G allele results in increased transcriptional activity because the guanine insertion creates a binding site for a member of the Ets transcription factor family²⁴. The promoter region of the *MMP3* gene is characterized by a 5A/6A

promoter polymorphism at position -1171 in which one allele has six adenosines (6A) and the second has five adenosines (5A). The 6A allele has a lower promoter activity than the 5A allele *in vitro*²³.

Linkage studies have suggested loci on chromosomes 1, 2, 4, 6, 11, 14, 16, 17 and 19 as candidates for the risk of orofacial clefting²⁶. Inactivation of MMP genes has been correlated with cleft palate²⁷ and a region on chromosome 16p13, containing *MMP25* gene, has yielded evidence for linkage and association with CL/P, suggesting some level of involvement of the MMP family in clefting²⁸. Many MMP genes are clustered in chromosome 11q23 (*MMP1*, *MMP3*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP10*, *MMP12*, *MMP13*, *MMP20*) but have not yet been shown in association to CL/P. Nevertheless, although the 11q23 locus has not been regarded as a very suggestive one, recent studies have shown that the *PVRL1* gene, located in that same region (11q23.2) has been demonstrated as a liability factor for CL/P in Venezuela^{29,30}. Another recent study reported the lack of association between a polymorphism in *MMP9* and CL/P patients³¹ although *MMP9* was considered a liable candidate gene as it has been demonstrated to be selectively expressed in the ossification centers of the maxilla during palatal fusion¹⁸.

Despite the relative unsuccessful results of the studies with MMP genes as possible contributors to CL/P, the fundamental role of the entire MMP family during ECM remodeling in the craniofacial complex warrants further investigations. Hence, the purpose of the present study was to investigate the association of polymorphisms in *MMP1* and *MMP3* gene promoters in individuals with isolated CL/P.

Material and methods

Subjects

Table I presents the basic parameters of the studied population. Individuals with non-syndromic cleft lip/palate were ascertained through the Hospital of Rehabilitation and Craniofacial Anomalies (HRAC) of the University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. Individuals without clefts and no positive family history of clefting were used as controls and were ascertained through the Dental Clinics of Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. For *MMP1*, 170 individuals with CL/P (139 with CL/P and 24 with CP) and 225 controls were genotyped; for *MMP3*, 78 individuals with CL/P (62 with CL/P and 11 with CP) and 255 controls were genotyped. The study was approved by the local IRB and all patients signed a consent form in agreement to the terms of the study.

Collection of DNA samples

Genomic DNA was obtained from sampling of epithelial buccal cells as previously described. DNA samples were frozen at -20° C until used for DNA extraction procedures using sequential ammonium acetate purification and salt/ethanol precipitation³¹.

MMP1 promoter SNP genotyping

The *MMP1* genotyping was determined by PCR–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) assay. The primers sequences were: forward 5' TCGTGAGAATGTCTTCCCATT 3' and reverse 5' TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC 3'. PCR was performed in a 25 µL volume containing 500ng genomic DNA, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM

MgCl₂, 1μM of each primer, 200mM each dNTP, and 2.5 units Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR cycling conditions were 1 min at 95° C followed by 35 cycles of 30s at 95° C, 30s at 54° C and 30s at 72° C, and with a final step at 72° C for 7 min to allow for the complete extension of all PCR fragments. A 5μL aliquot of PCR product was digested overnight at 37° C in a 5μL solution containing 2μL 10X NE buffer (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.8, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol pH 7.9, 0.2μL of 20 units/mL *Xmn*I (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA), 0.3μL albumin (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA) and 2.5μL sterile deionized water. After overnight digestion, the products were resolved and separated on a 10% vertical non-denaturing polyacrylamide gel stained according to previously published protocols³². At position -1607 of the MMP-1 promoter, the enzyme *Xmn*I recognizes and cleaves the sequence 5' GAANN...NNTTC 3', and 3' CTTNN...NNAAG 5' originating two fragments of 29bp and 89bp. The 1G allele has this recognition site, whereas the 2G allele destroys the recognition site by inserting a guanine. After electrophoresis, homozygous 2G alleles were represented by a DNA band with size at 118 bp, homozygous 1G alleles were represented by DNA bands with sizes at 29 and 89 bp, whereas heterozygotes displayed a combination of both alleles (118, 29 and 89 bp).

MMP3 promoter SNP genotyping

The MMP3 genotype was determined by the kinetic PCR assay using specific primers forward for 5A/6A alleles and a common reverse primer. The primers sequences were: forward 5' GACAAGACATGGTTTTTC 3' (5A allele), forward 5' AAGACATGGTTTTTTT 3' (6A allele) and reverse 5' AGACATGGGTCACGG 3'. PCR

was performed in a total volume of 25µL containing 500ng genomic DNA, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1µM of each primer, 200mM each dNTP, and 2.5 units Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR cycling conditions were 3 min at 95° C followed by 35 cycles of 1 min at 95° C, 1 min at 41° C (6A allele) / 1 min at 44° C (5A allele) and 1 min at 72° C, with a final step at 72° C for 7 min. After amplification, the products were separated on a 10% vertical non-denaturing polyacrylamide gel stained according to previously published protocols³². After electrophoresis, the 5A alleles were represented by DNA bands with sizes at 95 bp, the 6A alleles were represented by a DNA band with size at 92 bp, whereas the heterozygotes displayed a combination of both alleles (95 and 92 bp).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using EpiInfo 3.3.2 software (<http://www.cdc.gov/epiinfo>). Chi-square and Fisher Exact tests were used to test for deviation in genotype distribution from the Hardy-Weinberg equilibrium and to compare *MMP1* and *MMP3* genotype and allele distribution in the study groups. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also calculated.

Results

The genotype distributions for both *MMP1* and *MMP3* polymorphisms were within Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.9979$ and $p=0.9146$, respectively).

MMP1

No significant differences were found for genotype ($p=0.47$; OR=1.20, 95% CI: 0.90-1.60) or allele ($p=0.21$; OR=0.92, 95%CI: 0.61-1.37) frequencies between cleft and control groups. When comparing different cleft types (CL/P or CP) with controls, no significant differences were observed for allele or genotype frequencies. (For CL/P x controls, $p=0.18$; OR=0.81, 95% CI: 0.6-1.1 for allele and $p=0.33$; OR=1.2, 95% CI: 0.8-1.9 for genotype; For CP x controls, $p=0.98$, OR=1.00, 95%CI: 0.5-1.8 for allele and $p=0.78$, OR=1.2, 95%CI: 0.5-3.0 for genotype).

MMP3

Significant statistical differences were found for allele and genotype frequencies between cases and controls. The 5A allele and the 5A/5A genotype (Table 2) were significantly more frequent in the cleft group (for allele, $p=0.00001$; OR=2.47, 95% CI: 1.68-3.63; for genotype, $p=0.00001$; OR=2.37, 95% CI: 1.40-4.03). In addition, significant differences were also observed for allele and genotype frequencies (Table 3) between each cleft type and controls (for CL/P x controls, $p=0.00001$ for both allele and genotype frequencies; for CP x controls, $p=0.002$ and $p=0.04$ for allele and genotype frequencies respectively).

Logistic regression

In order to verify if population stratification could influence distribution of *MMP3* genotypes, we performed logistic regression adjusted for ethnicity and found significant differences between the groups ($p=0.01$). Since the great majority of the sample consisted of Brazilian Caucasians (here considered any Brazilian individual without known contributions of Afro-American or Japanese genetic makeup), we compared genotype and

allele frequencies between those individuals and controls and still observed significant differences among the groups ($p=0.0002$ and $p=0.00001$, for genotype and allele frequencies, respectively) (Table 2). Nevertheless, differences observed for genotype frequencies between each cleft type and controls remained significant when analyzing Caucasians only ($p=0.00001$ for CL/P and $p=0.01$ for CP) (Table 3).

Discussion

Several genes are likely to be jointly involved in the etiology of congenital anomalies. This may be due to disruption of important signaling pathways at various levels that are required for the formation of specific anatomical structures. The link between the complex multifactorial etiology of CL/P and polymorphisms in MMP genes relies on alterations of ECM homeostasis and functions. Previous studies have suggested MMPs as potential candidate genes for CL/P based on expression patterns and the roles they play in modeling craniofacial tissues during early embryogenesis¹⁵.

Naturally occurring sequence variation has been detected in the promoter of a number of MMP genes. Although the majority of DNA polymorphisms are probably functionally neutral, a proportion of them can exert allele-specific effects on the regulation of gene expression or function of the coded protein and thus contribute to inter-individual differences in susceptibility to common and complex diseases¹³.

Here, we report the frequencies of polymorphisms occurring in the promoter of *MMP1* and *MMP3* genes in cleft individuals, with positive association of the *MMP3* polymorphism and CL/P. A common adenine insertion/deletion polymorphism (5A/6A) at position -1171 of the *MMP3* gene promoter has been described with the 5A allele correlating to higher enzyme activity²³. MMP-3 can degrade a wide range of ECM proteins

including proteoglycans, fibronectin, laminin and collagens IV, V, IX and X and is capable of activating other MMPs, making it likely a key player in ECM degradation and remodeling³³. MMP-3 has been immunolocalized *in vivo* subjacent to the medial edge epithelia following contact of the palatal shelves. High expression of MMP-3 leads to MEE breakdown and cessation of this event by the addition of a synthetic MMP inhibitor allowed palatal shelf fusion¹⁴. This implies that MMP-3 induces breakdown of the MEE if present in appropriate amounts. In the case of persistence of increased expression, degradation might be excessive and prevent fusion of the palatal shelves. Hypothetically, this might confirm the results of this study since we indeed found significant differences in allele and genotype distributions of this *MMP3* polymorphism between cleft and control groups.

We also investigated the frequency of the -1607 (1G/2G) polymorphism in the *MMP1* gene promoter but did not find any differences between cleft and control groups. Although there are no specific reports on MMP-1 expression during palatogenesis, we decided to include the *MMP1* gene in the study because it is adjacently located to the *MMP3* gene in chromosome 11q22.3 and the two loci are in linkage disequilibrium and considered to act in cooperation³⁴. MMP-1 is considered particularly important as it presents proteolytic activities against collagen types I, II and III²⁰. The major structural component of the palatal matrix is type I collagen³⁶ and previous reports have suggested the need for stable, cross-linked collagen, during palate development. Induction of unstable, poorly cross-linked collagen has been associated to CL/P for failure in incorrect shelf elevation prior to fusion^{36,37}. Hence, alterations in the rate of collagen degradation, perhaps by an increased transcription of the *MMP1* gene could affect the stability of the cross-links necessary during palate development.

Only two other studies have attempted to investigate MMP polymorphisms in oral clefts and thus a thorough comparison and interpretation of the results is rather difficult. Blanton et al. (2004)²⁸ examined different blocks of MMP genes including *MMP1* and *MMP3*, in multiplex families of non-syndromic cleft individuals, and found slight evidence of linkage and association for only one locus containing *MMP25*. However, the markers tested in this study represented suggestive chromosomal regions obtained from genomic scans and not necessarily indicated the region of the MMP genes where the variation occurred. Our results derive from the investigation of polymorphisms in the promoter of these genes, which could eventually change the rate of transcription and further lead to alterations in the expression of these enzymes during lip and palate formation. Since it has been reported that the presence of MMPs is spatially and temporarily regulated during craniofacial development^{16,17}, such alterations could implicate in disruptions in this process and further lead to the occurrence of a cleft of the lip and/or palate. We have also used the same “promoter polymorphism” approach for a previous study with *MMP9* gene and CL/P³⁰. Although this polymorphism was not associated with CL/P in our particular population, other populations might demonstrate different distributions.

Contradictory results on gene polymorphisms-disease association studies are often found, and this may occur primarily because distinct populations may have different risk alleles for a same disease³⁸. The Brazilian population represents a mixture of Latin-European whites, Afro-Brazilian blacks, and Amerindians, which makes it very difficult to properly classify and match perfectly the ethnicity of cases and controls. Even though our sample population did not show any discrepancies regarding ethnic distribution, logistic regression adjusted for ethnicity revealed statistical difference in genotype distribution for *MMP3*. To overcome this situation, we analyzed the Caucasian group only, which

accounted for the great majority of the sample, and still observed the association of *MMP3* with the cleft phenotype, indicating that this gene might be somewhat associated with CL/P in our particular population.

Nevertheless, the extent to which polymorphisms in *MMP* genes may actually contribute to the affected cleft status is yet to be clarified. The complexity of the MMP family, in a context that if one enzyme is knocked out, another may become highly expressed to compensate for the loss highlights the difficulties in distinguishing each individual enzyme's role in different scenarios. Nevertheless, polymorphisms of *MMP* genes may be good candidates as genetic factors for diseases whose pathogenesis involve active ECM degradation and remodeling such as cleft lip/palate.

Acknowledgments

The authors are indebted to the participants of this study. Thanks to HRAC (Hospital of Rehabilitation and Craniofacial Anomalies of the University of São Paulo), Bauru Dental School/USP and University Sagrado Coração, Bauru, SP, Brazil. This work was supported by CAPES/BEX 3413/05-5, FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation - 99/10655-5, 01/10707-7, and 04/08095-1), and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development - 350084/03-3, 475721/2003-9, 505350/04-1).

References

1. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 2002; **61**: 2481.
2. Vandas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J* 1987; **24**:216-225.

3. Murray JC, Daack-Hirsch S, Buetow KH, Munger R, Espina L, Paglinawan N et al. Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 1997; **34**:7-10.
4. Strauss RP. The organization and delivery of craniofacial health services: the state of the art. *Cleft Palate Craniofac J* 1999; **36**:189-95.
5. Cartens MH. Development of the facial midline. *J Craniofac Surg* 2002; **13**:129-87.
6. Johnston MC, Bronsky PT. Craniofacial embryogenesis: abnormal developmental mechanisms. In: Mooney MP, Siegel MI, editors. *Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting*. New York: John W. Wiley and Sons 2002, p. 61-124.
7. Diewert VM, Losanoff S. Animal models of facila clefting: experimental, congenital, and transgenic. In: Mooney MP, Siegel MI, editors. *Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting*. New York: John W. Wiley and Sons 2002, p. 251-72.
8. Sperber GH. Craniofacial embryogenesis: normal developmental mechanisms. In: Mooney MP, Siegel MI, editors. *Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting*. New York: John W. Wiley and Sons 2002, p. 31-60.
9. Shprintzen RJ. Terminology and classification of facial clefting. In: Mooney MP, Siegel MI, editors. *Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting*. New York: John W. Wiley and Sons 2002, p. 17-28.
10. Sperber GH. Palatogenesis: closure of the secondary palate. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. Oxford: Oxford University Press; 2002. p.14-24.

11. Pelton RW, Hogan BL, Miller DA, Moses HL. Differential expression of genes encoding TGFs beta 1, beta 2, and beta 3 during murine palate formation. *Dev Biol* 1990; **141**:456-60.
12. Behnan SM, Guo C, Gong TW, Shum L, Gong SG. Gene and protein expression of transforming growth factor β 2 gene during murine primary palatogenesis. *Differentiation* 2005; **73**:233-9.
13. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007; **65**: 1-13.
14. Brown NL, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res* 2002; **81**:826-830.
15. Iamaroon A, Wallon UM, Overall CM, Diewert VM. Expression of 72-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-2) in the developing mouse craniofacial complex. *Arch Oral Biol* 1996; **41**:1109-19.
16. Morris-Wiman J, Du Y, Brinkley L. Occurrence and temporal variation in matrix metalloproteinases and their inhibitors of matrix metalloproteinases during murine and secondary palatal morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1999; **19**:201-12.
17. Morris-Wiman J, Burch H, Basco E. Temporospatial distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 2000; **202**:129-41.
18. Blavier L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, Declerk Y, Kaartinen V. TGFB3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Molec Biology* 2001; **12**:1457-66.
19. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase Stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to

- stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1997; **139**:1861-72.
20. Mansell JP, Kerrigan J, McGill J, Bailey J, TeKoppele J, Sandy JR. Temporal changes in collagen composition and metabolism during rodent palatogenesis. *Mech Aging and Development* 2000; **110**:49-62.
21. Dunleavy L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biol* 2000; **19**:175-7.
22. Randall LE, Hall RC. Temporospatial expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 during early tooth development. *Connect Tissue Res* 2002; **43**:205-11.
23. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996; **271**:13055-60.
24. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998; **58**:5321-5.
25. Tower GB, Coon CC, Benbow U, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Erk 1/2 differentially regulates the expression from the 1G/2G single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1586**:265-74.
26. Eppley BL, van Aalst JA, Robey A, Havlik RJ, Sadove AM. The spectrum of orofacial clefting. *Plast Reconstr Surg* 2005; **115**:101-14.

27. Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, Slavkin HC, Shuler CF, Derynck R, Werb Z. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nature Genet* 1999; **22**:69-73.
28. Blanton SH, Bertin T, Serna ME, Stal S, Mulliken JB, Hecht J. Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13, and 16p13.3 with non syndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet* 2004; **125A**:23-27.
29. Sozen MA, Suzuki K, Tolarova MM, Bustos T, Fernandez Iglesias JE, Spritz RA. Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Nat Genet* 2001; **29**:141-2.
30. Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch S, Romitti PA, Murray JC. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet A* 2006; **140**:2562-70.
31. Letra A, Silva RA, Menezes R, de Souza AP, Almeida ALPF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Studies with MMP9 gene promoter polymorphism and nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A* 2007; **143**:89-91.
32. Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odonto Stomatol* 2000; **18**:6-9.
33. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; **17**:914-21.
34. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; **274**:21492-4.
35. Hinoda Y, Okayama N, Takano N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hazama S, Kitamura Y, Kamatani N, Oka M. Association of functional polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 genes with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; **102**:526-9.

36. D'Angelo M, Chen JM, Ugen K, Greene RM. TGF beta-1 regulation of collagen metabolism by embryonic palate mesenchymal cells. *J Experim Zool* 1994; **270**:189-201.
37. Pratt RM, King CT. Inhibition of collagen cross-linking associated with betaaminopropionitrile-induced cleft palate in the rat. *Dev Biol* 1972; **27**:322-8.
38. Hassel JR, Orkin RW. Synthesis and distribution of collagen in rat palate during shelf elevation. *Dev Biol* 1976; **49**:80-8.
39. Itagaki M, Kubota T, Tai H, Shimada Y, Morozumi T, Yamazaki K. Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; **31**:764-9.

Table(s)

Table 1. Characteristics of the population studied: a) for MMP1 -1607 1G/2G; b) for MMP-3 -1171 5A/6A.

Characteristics	MMP1			MMP3		
	Cleft (n=170)	Control (n=225)	P value*	Cleft (n=78)	Control (n=255)	P value*
<i>Age (years) ± SD</i>	17.1 ± 9.1	38.1 ± 12.8		17.7 ± 10.2	36.2 ± 13	
<i>Gender</i>						
Male	89	86		40	96	
Female	81	139		38	159	
<i>Ethnic group</i>						
Caucasian	131	193	0.1919	64	219	0.6694
Japanese	32	30		11	29	
Afro-American	3	2		2	4	
Unknown	4	0		1	3	

* Chi-square test; statistically significant if $p \leq 0.05$.

Table(s)

Table 2. Allele and genotype distribution of MMP3 (-1171 5A/6A) polymorphism in cases and controls.

	All individuals				Caucasians only			
	Cleft (n = 78)	Control (n = 255)	P value*	OR (95% CI)	Cleft (n = 64)	Control (n = 219)	P *	OR (95% CI)
MMP-3 (-1171 5A/6A)								
<i>Allele</i>								
5A	110	251	0.00001	2.47 (1.7-3.6)	92	225	0.00001	2.4 (1.6-3.7)
6A	46	259			36	213		
<i>Genotype</i>								
5A/5A	35	65	0.00001	2.37 (1.4-4.0)	31	60	0.0002	2.5 (1.4-4.4)
5A/6A	40	121			30	105		
6A/6A	3	69			3	54		

* Chi-square test; statistically significant if $p \leq 0.05$.

**OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table(s)

Table 3. Allele and genotype distribution of MMP3 (-1171 5A/6A) polymorphism in individuals with CL/P and CP.

	All individuals (n=78)*		Caucasians only (n=64)**	
	CL/P (n=62)	CP (n=11)	CL/P (n=50)	CP (n=10)
MMP-3 (-1171 5A/6A)				
<i>Allele</i>				
5A	87	17	72	16
6A	37	5	28	4
P value***	0.00001	0.002	0.0001	0.012
<i>Genotype</i>				
5A/5A	27	6	24	6
5A/6A	33	5	24	4
6A/6A	2	0	2	0
P value***	0.00001	0.04	0.00001	0.011

* Unknown cleft type=5.

** Unknown cleft type=4.

*** Chi-square test, when compared to controls. Significant if $p \leq 0.05$.

APÊNDICE 3 – ARTIGO ORIGINAL SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining Subphenotypes for Oral Clefts Based on Dental Development. **J Dent Res** (em fase de revisão)

1

Defining Cleft Subphenotypes Based on Dental Development.

A. Letra ^{1,2}, R. Menezes ¹, J.M. Granjeiro ³, A.R. Vieira ^{1*}.

¹Department of Oral Biology and Center for Craniofacial and Dental Genetics, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA.

²Department of Biological Sciences, School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil. Bolsista CAPES/BEX, Brasília, Brazil.

³ Department of Cellular and Molecular Biology, Biology Institute, Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil.

* Corresponding author:

Prof. Alexandre R. Vieira

614 Salk Hall, Department of Oral Biology

Center for Craniofacial and Dental Genetics

School of Dental Medicine, University of Pittsburgh

3501 Terrace Street, Pittsburgh, PA 15261

Tel.: (412) 383-8972; Fax: (412) 624-3080

Running head: Subphenotypes for Clefts

Key words: Cleft Lip; Cleft Palate; Tooth Agenesis; Dental Anomalies; Hypodontia

Number of words in abstract: 129

Number of words in abstract and text: 2270

Number of tables and figures: 4

Number of cited references: 26

Conflicts of interest: None.

ABSTRACT

Individuals with clefts present considerably more dental anomalies than individuals without clefts. We used dental development to subphenotype clefts with the goal of identifying cleft subgroups that could have specific genetic contributions. We examined 1000 individuals, 500 with clefts and 500 non-related controls. Several clinical features, such as cleft completeness or incompleteness, laterality, and the presence of dental anomalies, were used to assess each individual's cleft status. Standard chi-square and Fisher exact tests were performed to compare differences in the frequencies of observed anomalies between cases and controls, and between individuals with different cleft subphenotypes. Agenesis of the lateral incisor on the opposite side of the cleft was the most remarkable observation, which could indicate that such cases could be considered incomplete forms of bilateral clefts of the lip.

INTRODUCTION

Fogh-Andersen, in 1942, provided evidence that cleft of the lip and cleft of the palate, which frequently occur together, are developmentally distinct entities. However, differences in etiology or epidemiology of these complex traits may remain undetected because of the high variability in disease phenotype. Whilst many studies assign cleft phenotype as of simply affected or unaffected status, evidences indicate that these phenotypes are sometimes overlooked and should be fully considered with regards to other clinical markers that may help unravel the genetic basis for the condition (Rice *et al.*, 2001).

The formation of tooth germs and the occurrence of cleft lip/palate have a close embryological relationship in terms of timing and anatomical position and numerous studies have reported the presence of dental anomalies in association with various forms of cleft lip, cleft palate, or both (Jordan *et al.*, 1966; Ranta, 1982; 1983; 1986; Tsai *et al.*, 1998; Werner and Harris, 1989; Shapira *et al.*, 2000; Slayton *et al.*, 2003). It has been proposed that individuals with clefts present considerably more dental anomalies than individuals without clefts, and moreover, that severity of anomalies appears to be directly related to severity of the cleft (Adams and Niswander, 1967; Schroeder and Green, 1975; van den Boogard *et al.*, 2000; Eerens *et al.*, 2001; Slayton *et al.*, 2003; Vieira, 2003; Aizenbud *et al.*, 2005; Stahl *et al.*, 2006). In that context, recent studies have implied that the presence of dental anomalies may represent an additional clinical marker for oral clefts suggesting a common genetic background between the two anomalous conditions. Furthermore, the hypothesis of broadening the cleft phenotype would allow identification of healthy individuals presenting an increased risk to be carrying cleft genes, and hence gene-mapping efforts will have increased power and the ability to provide effective genetic counseling (reviewed by Weinberg *et al.*, 2006).

The purpose of this study was to determine if cleft phenotypes and associated dental anomalies could be used in combination to provide new definitions of cleft subphenotypes.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The cleft group consisted of 500 individuals aged 4-59 years old (average age 17.3) enrolled for treatment at the Hospital of Rehabilitation and Craniofacial Anomalies (HRAC) of the University of São Paulo, Bauru, Brazil, with no history of syndromic clefting. Controls consisted of 500 healthy, non-related individuals, aged 4-94 years old (average age 36.8). The study was conducted with the consent of the parents and approved by the Research and Ethics Committee of the Hospital of Rehabilitation and Craniofacial Anomalies, University of São Paulo. In the case of children under 15 years of age, authorization was also requested from their parents or from the individual legally in charge of the child.

Determination of Cleft Phenotypes

Cleft individuals were examined clinically and through their medical files to determine the type and side of the cleft as well as to determine individual's cleft status. Cleft status was based on cleft completeness or incompleteness (comprising primary and secondary palates entirely) and laterality (left, right, bilateral, and central in the cases of median clefts and cleft palate only). An "unknown" cleft status means that either type and/or side of the cleft could not be determined after reviewing medical records.

Determination of Dental Anomalies

Dental anomalies such as tooth agenesis (including hypodontia and oligodontia), microdontia, supernumerary teeth, tooth malposition (rotation or inclination), impaction, shape anomalies and transposition were assessed clinically and through radiographs and recorded for each individual from both groups. For every anomaly, the inclusion criterion was that at least one permanent tooth was affected (children 8 years-old or younger were excluded for this purpose). Instances of anomalies adjacent to the cleft area were not included, because the absence of such teeth is likely the consequence of local development anomalies at the cleft site. Multiple anomalies were characterized by the simultaneous presence of two or more types of dental anomalies in the same individual.

Statistical Analysis

Standard Chi-square and Fisher's exact probabilities were evaluated on all sets of comparisons. Differences observed in the frequencies of dental anomalies between cleft and control groups were assessed by the chi-square test with statistical significance set at $p \leq 0.05$. Odds ratio calculations were performed as well. Regarding differences observed in the frequencies of dental anomalies between different cleft subphenotypes and controls, significance figures were accounted for using Bonferroni correction taking into account the number of tests carried out. With the Bonferroni correction, alpha will be 0.0002 (0.05/176 comparisons). Median and unknown-type clefts were not included in the analysis due to the small number of cases found (Table 1).

RESULTS

Cleft Phenotypes

Out of the 500 cleft individuals, 400 had a cleft lip with cleft palate (168 with left cleft lip, 154 with bilateral cleft lip, 76 with right cleft lip, and 2 median clefts), 6 had cleft lip only (2 on the right side and 4 on the left side), 66 had cleft palate only and 28 had unknown cleft types. Thereafter, we subdivided these cleft types based on cleft completeness or incompleteness and laterality, which generated 18 subtypes of cleft, thoroughly describing each individual's cleft status (Table 1). Since there were only 6 individuals presenting cleft lip only (unilateral left, n=4; unilateral right, n=2), we decided to include them in the cleft lip and palate group for statistical analysis.

Dental Anomalies

The frequency of dental anomalies observed in each individual divided by cleft status is presented on Table 1. Significant differences between cases and controls are expressed as bold characters.

Cleft individuals presented significantly more dental anomalies than controls ($p=0.00001$). The presence of tooth agenesis ($p=0.00001$), microdontia ($p=0.0063$), supernumerary teeth ($p=0.00001$), malposition ($p=0.00001$), transposition ($p=0.0011$) and multiple anomalies (two or more associated anomalies) ($p=0.00001$) were consistently more frequent in the cleft group. Tooth impaction also presented a trend to be more common in the cleft group ($p=0.0578$) (Table 2).

Regarding tooth agenesis, excluding third molars which were the most frequently absent teeth in both cases (179/352; $p=0.00001$) and controls (34/62; $p=0.00001$), premolars were most

commonly absent in the cleft group (108/352; $p=0.0002$) with no significant differences regarding each individuals' cleft status, while control individuals presented more agenesis of the lateral incisors (13/62; $p=0.0491$).

Differences in observed frequencies of dental anomalies between individuals of each cleft status and controls are available as supplemental material.

Searching for cleft subphenotypes

The frequencies of tooth agenesis, microdontia, supernumerary teeth and malposition when divided by side of the anomaly and cleft side are presented on Table 3.

We noticed that tooth agenesis occurred most frequently in cases with complete cleft lip and palate, unilaterally or bilaterally, and also in cases with incomplete bilateral cleft lip and palate plus cleft palate, when compared to controls (Table 1). We also observed that tooth agenesis affected most often the noncleft side in cases with unilateral clefts: agenesis on the right side was more frequent with left clefts ($p=0.0106$) and agenesis on the left side was more frequent with right clefts ($p=0.0115$) (Table 3). Furthermore, the absence of maxillary left lateral incisors was significantly associated with unilateral right clefts (12/78; $p=0.0073$) and, contrarily, the maxillary right lateral incisors were most commonly absent with unilateral left clefts (15/172; $p=0.00001$).

Following a similar pattern, microdontia and supernumerary teeth were also most frequent on the noncleft side, and particularly more common on the right side in cases with unilateral left clefts ($p=0.0682$ and $p=0.0232$, respectively) (Table 3). However, microdontia did not seem to be associated to any cleft phenotype whereas the presence of supernumerary teeth was most frequently associated to complete unilateral cleft lip and palate (Table 1).

Malposition was a common feature in cleft individuals also, and showed preferential association with several cleft lip and palate phenotypes (Table 1). Mandibular canines were the most commonly affected teeth (39/47; $p=0.00001$) often associated to complete bilateral cleft lip and palate.

Tooth impaction showed preferential association with complete cleft palate ($p=0.00001$) (Table 1).

Transposition was observed in cases with complete bilateral or incomplete unilateral left cleft lip and palate and affected mostly the maxillary premolars (6/7; $p=0.0075$) while no control individuals were affected.

The presence of multiple anomalies occurred most commonly in cases with complete and incomplete unilateral left cleft lip and palate (Table 1). Of the 23 cases of multiple anomalies, 20 included tooth agenesis. The most frequent combinations were agenesis plus malposition (11/20) and agenesis plus supernumerary teeth (8/20). Tooth agenesis plus microdontia was seen in one case only, with complete unilateral right cleft lip and palate.

DISCUSSION

Despite the several reports on the incidence of dental anomalies in cleft individuals, to our knowledge, no attempts were ever made to use dental anomalies to subphenotype the three major categories of oral clefts (cleft lip only, cleft lip with cleft palate and cleft palate only).

We used dental development to classify cleft types with the goal of identifying subgroups that could have specific genetic contribution. Therefore, in addition to the major categories aforementioned, we have included detailed descriptions of the subphenotypes observed, which further enabled us to notice preferential associations of specific dental anomalies with each cleft

subphenotype. We believe these more sophisticated clinical definitions provide a powerful tool in gene identification for clefts.

As in agreement to previous reports, the cleft individuals evaluated presented considerably more dental anomalies than controls (Table 2) suggesting a common genetic background for these developmental processes (Shprintzen *et al.*, 1985; Ranta, 1986; Shapira *et al.*, 1999; Eerens *et al.*, 2001; Vieira, 2003). Previous reports have related higher frequencies of dental anomalies as the severity of the cleft increased (Adams and Niswander, 1967; van den Boogard *et al.*, 2000; Eerens *et al.*, 2001; Slayton *et al.*, 2003; Aizenbud *et al.*, 2005). We found this to be true as most cases of multiple anomalies affected individuals in the cleft lip and palate group. However, if this observation were to be always true, we would expect to see more anomalies in cases of bilateral cleft lip and palate but instead, we observed most cases of multiple anomalies to occur in individuals with unilateral left cleft lip and palate (Table 1). We are unaware of other similar studies to compare to our results.

The frequency of tooth agenesis was significantly different between the groups of this study, observed in approximately 26% of the cleft and 7% of the control individuals (Table 2). In humans, tooth agenesis is the most frequent congenital anomaly. Excluding the third molars, which are absent in approximately 20% of the general population, the prevalence of tooth agenesis varies from 2.6% to 11.3% (Nieminen *et al.*, 1995; Larmour *et al.*, 2005) and our results for the control group fall in that range. In cleft individuals, however, previous studies have reported a much higher incidence of tooth agenesis, as high as 67% up to 77% (Shapira *et al.*, 2000; Aizenbud *et al.*, 2005). Discrepancies among ours and these results might be attributed to the inappropriate inclusion of missing teeth in the area of the cleft in those studies. The absence of such teeth is likely the consequence of local development anomalies at the cleft site and

therefore was not considered in our study. Nevertheless, similar to our findings, hypodontia outside the cleft region was reported to occur in 27% of the affected children and 11% of their siblings when compared to 3.6% control children only (Eerens *et al.*, 2001).

Our results demonstrate that the prevalence of dental anomalies as signs of disturbances in dental development was several times higher in cleft individuals than in control individuals and further indicate that dental anomalies can be considered an extended phenotype for clefts. We noticed that the presence of multiple anomalies was significantly more common with complete clefts. Within the cleft lip and palate group, multiple anomalies were more common in unilateral left clefts. We were also able to observe interesting patterns regarding presence of some dental anomalies with specific cleft subphenotypes. For instance, although tooth agenesis was frequently observed in both complete and incomplete cleft lip and palate cases, we noticed that it was significantly more frequent in unilateral complete cases, and both bilateral complete and incomplete plus cleft palate (Table 1). Interestingly, supernumerary teeth were associated to unilateral complete and bilateral incomplete clefts.

The consistent presence of dental anomalies on the opposite side of unilateral clefts with preferential tooth agenesis of the lateral incisor leads us to believe that these unilateral clefts with dental anomalies on the noncleft side could be “unsuccessful” bilateral clefts, which should be considered carefully regarding the genetic etiology of the different cleft types. Moreover, we may even hypothesize that the genes that contribute to laterality of the cleft may be different resulting in alternate phenotypes for dental anomalies also. In such context, we are proposing new subphenotypes based on dental development (Figure 1).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to the participants of the study and their families. AL was supported by CAPES/BEX Grant 3413055 (Brasília, Brazil). This work was also supported by NIH R21-DE016718.

REFERENCES

- Adams MS, Niswander JD (1967). Developmental 'noise' and a congenital malformation. *Genet Res* 10:313-317.
- Aizenbud D, Camasuvi S, Peled M, Brin I (2005). Congenitally missing teeth in the Israeli cleft population. *Cleft Palate Craniofac J* 42:314-317.
- Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch S, Romitti PA, Murray JC (2006). PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet* 140:2562-2570.
- Eerens K, Vlietinck R, Heidbuchel K, Van Olmen A, Derom C, Willems G, Carels C (2001). Hypodontia and tooth formation in groups of children with cleft, siblings without cleft, and nonrelated controls. *Cleft Palate Craniofac J* 38:374-378.
- Fogh-Andersen P (1942). Inheritance of Harelip and Cleft Palate. Copenhagen: Arnold Busck.
- Jordan RE, Kraus BS Neptune CM (1966). Dental abnormalities associated with cleft lip and/or palate. *Cleft Palate J* 3: 22-25.
- Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, Stirrups DR (2005). Hypodontia - a retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence Int* 36:263-270.
- Nieminen P, Arte S, Pirinen S, Peltonen L, Thesleff I (1995). Gene defect in hypodontia: exclusion of MSX1 and MSX2 as candidate genes. *Human Genet* 96:305-308.

- Ranta R (1982). Comparison of tooth formation in non-cleft and cleft-affected children with and without hypodontia. *J Dent Child* 49:197-199.
- Ranta R (1983). Association of hypodontia and delayed development of the second premolars in cleft palate children. *Eur J Orthod* 5:145-148.
- Ranta R (1986). A review of tooth formation in children with cleft lip/palate. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 90:11-18.
- Rice JP, Saccone NL, Rasmussen E (2001). Definition of the Phenotype. In: Genetic dissection of complex traits. Rao DC, Province MA, editors. San Diego: Academic Press, pp. 69-76.
- Schroeder DC, Green LJ (1975). Frequency of dental trait anomalies in cleft, sibling and non-cleft groups. *J Dent Res* 54:802-807.
- Shapira Y, Lubit E, Kuftinec M (1999). Congenitally missing second premolars in cleft lip and cleft palate children. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 115:396-400.
- Shapira Y, Lubit E, Kuftinec M (2000). Hypodontia in children with various types of clefts. *Angle Orthod* 70:16-21.
- Shprintzen RJ, Siegel-sadewitz VL, Amato J, Goldberg RB (1985). Anomalies associated with cleft lip, cleft palate, or both. *Am J Med Genet* 20:585-595.
- Slayton RL, Williams L, Murray JC, Wheeler JJ, Lidral AC, Nishimura CJ (2003). Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate Craniofac J* 40:274-279.
- Stahl F, Grabowski R, Wigger K (2006). Epidemiology of Hoffmeister's "genetically determined predisposition to disturbed development of the dentition" in patients with cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J* 43:457-465.

- Tsai TP, Huang CS, Huang CC, See LC (1998). Distribution patterns of primary and permanent dentition in children with unilateral complete cleft lip and palate. *Cleft Palate J* 35:154-160.
- van den Boogard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK (2000). MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 24:342-343.
- Vieira AR (2003). Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res* 82:162-165.
- Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, Fitzpatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC (2005). Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet* 1:e64.
- Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC (2003). MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 82:289-292.
- Warrington A, Vieira AR, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Romitti PA, Murray JC (2006). Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *J Med Genet* 43:e26.
- Weinberg SM, Neiswanger K, martin R, Mooney MP, Kane AA, Wenger SL, Losee J, Deleyiannis F, Phil M, Ma, L, De Salamanca JE, Czeizel AE, Marazita ML. The Pittsburgh Oral-Facial Cleft Study: Expanding the Cleft Phenotype. Background and Justification (2006). *Cleft Palate Craniofac J* 43:7-20.
- Werner SP, Harris EF (1989). Odontometrics of the permanent teeth in cleft lip and palate: systemic size reduction and amplified asymmetry. *Cleft Palate J* 26:36-41.

Table 1. Distribution of individuals according to cleft status and frequencies of observed dental anomalies ^{a,b}.

Cleft type/subphenotype	No. of individuals	Agenes is	Microd ontia	Supernu merary teeth	Malposit ion	Impacti on	Shape anom aly	Transpo sition	Multiple anomali es	Total anomali es
Cleft Palate										
complete	21	4	0	0	0	2	0	0	2	8
incomplete + submucous	45	10	0	1	4	0	1	0	0	16
Total	66	14	0	1	4	2	1	0	2	24
Cleft lip and palate										
Complete	300	90	7	16	30	3	0	5	17	168
incomplete	104	23	1	4	12	1	0	2	3	46
Unilateral	250	71	6	16	27	3	0	3	16	142
complete	175	57	5	14	19	2	0	1	13	111
incomplete	75	14	1	2	8	1	0	2	3	31
right	78	28	2	3	9	1	0	0	2	45
complete	54	23	2	3	6	0	0	0	2	36
incomplete	16	3	0	0	3	0	0	0	0	6
incomplete + cleft palate	8	1	0	0	1	0	0	0	0	2
left	172	43	4	13	18	2	0	3	14	97
complete	121	34	3	11	13	2	0	1	11	75
incomplete	46	9	1	2	5	0	0	2	3	22
incomplete + cleft palate	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bilateral	154	42	2	4	15	1	0	4	4	72
complete	125	33	2	2	11	1	0	4	4	57
incomplete	8	1	0	1	1	0	0	0	0	3
incomplete + cleft palate	17	7	0	1	3	0	0	0	0	11
incomplete mixed	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1
right cleft lip + left cleft lip and palate	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1
left cleft lip + bilateral cleft palate	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
median cleft	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	406	113	8	20	42	4	0	7	20	214
Unknown type/side of cleft	28	4	1	1	1	0	1	0	1	9
Total clefts	500	131	9	22	47	6	2	7	23	247
No cleft (controls)	500	36	1	1	2	1	0	0	1	42

^a Comparisons between cases and controls. Median and unknown-type clefts were not included in the comparisons.

^b Bold indicates statistically significant differences between cases and controls ($\alpha = 0.0002$).

Table 2. Differences in observed frequencies of dental anomalies between cleft and control groups.

Dental anomaly	Cleft (n=500)	Control (n=500)	p value*	Odds ratio (95% CI)**
Agenesis	131	36	0.00001	4.57 (3.08-6.78)
Microdontia	9	1	0.0063	9.14 (1.15-72.47)
Supernumerary	22	1	0.00001	22.96 (3.08-171.05)
Malposition	47	2	0.00001	25.83 (6.23-106.96)
Impaction	6	1	0.0578	6.06 (0.72-50.52)
Malformation	2	0	0.0830	---
Transposition	7	0	0.0011	---
Multiple	23	1	0.00001	24.06 (3.23-178.87)
Total	247	42	0.00001	10.64 (7.41-15.28)

* Chi-square, 1 degree of freedom; $p \leq 0.05$ indicates statistical difference.

** CI, confidence interval.

Table 3. Number of dental anomalies observed in cleft individuals, divided by side of anomaly.

Anomaly	Side	Cleft side				p value*
		Right (n=78)	Left (n=172)	Bilateral (n=154)	Central (n=66)	
Agenesis	Right	5	16	2	2	0.0106
	Left	8	6	5	0	0.0115
	Bilateral	13	18	34	12	0.0401
	Unknown	2	3	1	0	0.3177
Microdontia	Right	0	3	0	0	0.0682
	Left	2	1	1	0	0.2923
	Bilateral	0	0	1	0	0.4329
	Unknown	0	0	0	0	---
Supernumerary	Right	0	4	0	0	0.0232
	Left	2	3	0	1	0.1511
	Bilateral	0	0	0	0	---
	Unknown	1	6	4	0	0.2062
Malposition	Right	3	11	6	1	0.3857
	Left	4	3	2	2	0.2840
	Bilateral	2	2	6	0	0.1085
	Unknown	0	2	1	1	0.5875

* Chi-square, 3 degrees of freedom; $p \leq 0.05$ indicates statistical difference (in bold).

Figure 1. List of cleft subphenotypes used in epidemiological/genetic studies and the proposed additional subphenotypes based on dental development.

Cleft subphenotypes used in the most recent genetic studies ^a	Proposed cleft subphenotypes based on dental development ^b
<ul style="list-style-type: none"> - All cleft types - Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) (all lips) - Cleft lip only (CLO) - Cleft lip and palate (CLP) - Cleft lip and palate + cleft palate (all palates) - Cleft palate only (CPO) 	<ul style="list-style-type: none"> - Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) <ul style="list-style-type: none"> - unilateral right <ul style="list-style-type: none"> - with/without tooth agenesis outside the cleft area - unilateral left <ul style="list-style-type: none"> - with/without tooth agenesis outside the cleft area - with/without microdontia or supernumerary teeth on the noncleft side - with/without multiple dental anomalies - bilateral <ul style="list-style-type: none"> - with/without tooth agenesis outside the cleft area - with/without supernumerary teeth - with/without malposition of lower canines - with/without multiple dental anomalies - unsuccessful bilateral (unilateral CL/P with agenesis of the lateral incisor on the noncleft side) <ul style="list-style-type: none"> - with/without multiple dental anomalies - Cleft palate only (CPO) <ul style="list-style-type: none"> - complete <ul style="list-style-type: none"> - with/without tooth impaction - with/without multiple dental anomalies - incomplete <ul style="list-style-type: none"> - with/without tooth malposition

^a Vieira et al., 2003; Vieira et al., 2005; Avila et al., 2006; Warrington et al., 2006.

^b Small number of cleft lip only (CLO) did not allow analysis of this specific cleft subtype.

SUPPLEMENTAL MATERIAL I

Differences in observed frequencies of dental anomalies between each different cleft phenotype and controls. Significance figures (in bold) were accounted for using Bonferroni correction (0.05/176 tests; $\alpha=0.0002$).

1. Complete Cleft Palate x Control

Dental Anomaly	Complete Cleft Palate (n=21)	Control (n=500)	p value
Agenesis	4	36	0.0457
Microdontia	0	1	0.8374
Supernumerary	0	1	0.8374
Malposition	0	2	0.7715
Impaction	2	1	0.00001
Malformation	0	0	----
Transposition	0	0	----
Multiple	2	1	0.00001
Total	8	42	0.00001

2. Incomplete Cleft Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Cleft Palate (n=45)	Control (n=500)	p value
Agenesis	10	36	0.0005
Microdontia	0	1	0.7639
Supernumerary	1	1	0.0316
Malposition	4	2	0.00001
Impaction	0	1	0.7639
Malformation	1	0	0.0008
Transposition	0	0	----
Multiple	0	1	0.7639
Total	16	42	0.00001

3. Total Cleft Palate x Control

Dental Anomaly	Cleft Palate (n=66)	Control (n=500)	p value
Agenesis	14	36	0.0001
Microdontia	0	1	0.7161
Supernumerary	1	1	0.0905
Malposition	4	2	0.00001
Impaction	2	1	0.0029
Malformation	1	0	0.0058
Transposition	0	0	----
Multiple	2	1	0.0029
Total	24	42	0.00001

4. Complete Cleft Lip and Palate (unilateral + bilateral) x Control

Dental Anomaly	Complete Cleft Lip and Palate (n=300)	Control (n=500)	p value
Agenesis	90	36	0.00001
Microdontia	7	1	0.0033
Supernumerary	16	1	0.00001
Malposition	30	2	0.00001
Impaction	3	1	0.1204
Malformation	0	0	----
Transposition	5	0	0.0037
Multiple	17	1	0.00001
Total	168	42	0.00001

5. Incomplete Cleft Lip and Palate (unilateral + bilateral) x Control

Dental Anomaly	Incomplete Cleft Lip and Palate (n=104)	Control (n=500)	p value
Agenesis	23	36	0.00001
Microdontia	1	1	0.2187
Supernumerary	4	1	0.0001
Malposition	12	2	0.00001
Impaction	1	1	0.2187
Malformation	0	0	----
Transposition	2	0	0.0018

Multiple	3	1	0.0021
Total	44	42	0.0000001

6. Unilateral Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Unilateral Cleft Lip and Palate (n=250)	Control (n=500)	p value
Agenesis	71	36	0.00001
Microdontia	6	1	0.0031
Supernumerary	16	1	0.00001
Malposition	27	2	0.00001
Impaction	3	1	0.0763
Malformation	0	0	----
Transposition	3	0	0.0141
Multiple	16	1	0.00001
Total	139	42	0.00001

7. Complete Unilateral Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Complete unilateral Cleft Lip and Palate (n=175)	Control (n=500)	p value
Agenesis	57	36	0.00001
Microdontia	5	1	0.0012
Supernumerary	14	1	0.00001
Malposition	19	2	0.00001
Impaction	2	1	0.1065
Malformation	0	0	----
Transposition	1	0	0.0907
Multiple	13	1	0.00001
Total	111	42	0.00001

8. Incomplete Unilateral Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Unilateral Cleft Lip and Palate (n=75)	Control (n=500)	p value
Agenesis	14	36	0.0010
Microdontia	1	1	0.1267
Supernumerary	2	1	0.0064
Malposition	8	2	0.00001
Impaction	1	1	0.1267
Malformation	0	0	----
Transposition	2	0	0.0003
Multiple	3	1	0.0002
Total	31	42	0.00001

9. Unilateral Right Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Total right Cleft Lip and Palate (n=78)	Control (n=500)	p value
Agenesis	28	36	0.00001
Microdontia	2	1	0.0068
Supernumerary	3	1	0.0003
Malposition	9	2	0.00001
Impaction	1	1	0.1301
Malformation	0	0	----
Transposition	0	0	----
Multiple	2	1	0.0068
Total	45	42	0.00001

10. Complete Unilateral Right Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Complete Unilateral Right Cleft Lip and Palate (n=54)	Control (n=500)	p value
Agenesis	23	36	0.00001
Microdontia	2	1	0.0008
Supernumerary	3	1	0.00001

Malposition	6	2	0.00001
Impaction	0	1	0.7422
Malformation	0	0	----
Transposition	0	0	----
Multiple	2	1	0.0008
Total	36	42	0.00001

11. Incomplete Unilateral Right Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Unilateral Right Cleft Lip and Palate (n=16)	Control (n=500)	p value
Agenesis	3	36	0.0853
Microdontia	0	1	0.8578
Supernumerary	0	1	0.8578
Malposition	3	2	0.00001
Impaction	0	1	0.8578
Malformation	0	0	----
Transposition	0	0	----
Multiple	0	1	0.8578
Total	6	42	0.00001

12. Incomplete Unilateral Right Cleft Lip and Palate + Cleft Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Unilateral Right Cleft Lip and Palate + Cleft Palate (n=8)	Control (n=500)	p value
Agenesis	2	36	0.0576
Microdontia	0	1	0.8992
Supernumerary	0	1	0.8992
Malposition	0	2	0.8577
Impaction	1	1	0.8578
Malformation	0	0	----
Transposition	0	0	----
Multiple	0	1	0.8992
Total	3	42	0.0040

13. Unilateral Left Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Unilateral Left Cleft Lip and Palate (n=172)	Control (n=500)	p value
Agenesis	43	36	0.00001
Microdontia	4	1	0.0051
Supernumerary	13	1	0.00001
Malposition	18	2	0.00001
Impaction	2	1	0.1023
Malformation	0	0	----
Transposition	3	0	0.0030
Multiple	14	1	0.00001
Total	97	42	0.00001

14. Complete Unilateral Left Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Complete Unilateral Left Cleft Lip and Palate (n=121)	Control (n=500)	p value
Agenesis	34	36	0.00001
Microdontia	3	1	0.0051
Supernumerary	11	1	0.00001
Malposition	13	2	0.00001
Impaction	2	1	0.0386
Malformation	0	0	----
Transposition	1	0	0.0419
Multiple	11	1	0.00001
Total	75	42	0.00001

15. Incomplete Unilateral Left Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Unilateral Left Cleft Lip and Palate (n=46)	Control (n=500)	p value
Agenesis	9	36	0.0035
Microdontia	1	1	0.0339
Supernumerary	2	1	0.0002

Malposition	5	2	0.00001
Impaction	0	1	0.7614
Malformation	0	0	----
Transposition	2	0	0.00001
Multiple	3	1	0.00001
Total	22	42	0.00001

16. Incomplete Unilateral Left Cleft Lip and Palate + Cleft Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Unilateral Left Cleft Lip and Palate + Cleft Palate (n=5)	Control (n=500)	p value
Agensis	0	36	0.5335
Microdontia	0	1	0.9202
Supernumerary	0	1	0.9202
Malposition	0	2	0.8873
Impaction	0	1	0.9202
Malformation	0	0	----
Transposition	0	0	----
Multiple	0	1	0.9202
Total	0	42	0.4985

17. Bilateral Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Bilateral Cleft Lip and Palate (n=154)	Control (n=500)	p value
Agensis	42	36	0.00001
Microdontia	2	1	0.0724
Supernumerary	4	1	0.0028
Malposition	15	2	0.00001
Impaction	1	1	0.3772
Malformation	0	0	----
Transposition	4	0	0.0003
Multiple	4	1	0.0028
Total	72	42	0.00001

18. Complete Bilateral Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Complete Bilateral Cleft Lip and Palate (n=125)	Control (n=500)	p value
Agenesis	33	36	0.00001
Microdontia	2	1	0.0460
Supernumerary	2	1	0.0460
Malposition	11	2	0.00001
Impaction	1	1	0.2976
Malformation	0	0	----
Transposition	4	0	0.00001
Multiple	4	1	0.0008
Total	57	42	0.0000001

19. Incomplete Bilateral Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Bilateral Cleft Lip (n=8)	Control (n=500)	p value
Agenesis	1	36	0.5671
Microdontia	0	1	0.8992
Supernumerary	1	1	0.00001
Malposition	1	2	0.00001
Impaction	0	1	0.8992
Malformation	0	0	---
Transposition	0	0	---
Multiple	0	1	0.8992
Total	3	42	0.0040

20. Incomplete Bilateral Cleft Lip and Palate + Cleft Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Bilateral Cleft Lip and Palate + Cleft Palate (n=17)	Control (n=500)	p value
Agenesis	7	36	0.00001
Microdontia	0	1	0.8535
Supernumerary	1	1	0.0002
Malposition	3	2	0.00001

Impaction	0	1	0.8535
Malformation	0	0	---
Transposition	0	0	---
Multiple	0	1	0.8535
Total	11	42	0.00001

21. Incomplete Mixed Bilateral Cleft Lip and Palate x Control

Dental Anomaly	Incomplete Mixed Bilateral Cleft Lip and Palate (n=4)	Control (n=500)	p value
Agensis	1	36	0.1739
Microdontia	0	1	0.9286
Supernumerary	0	1	0.9286
Malposition	0	2	0.8991
Impaction	0	1	0.9286
Malformation	0	0	---
Transposition	0	0	---
Multiple	0	1	0.8991
Total	1	42	0.2365

22. Total Cleft Lip and Palate x Control

Dental anomaly	Total Cleft Lip and Palate (n=406)	Control (n=500)	p value
Agensis	113	36	0.00001
Microdontia	8	1	0.0075
Supernumerary	20	1	0.00001
Malposition	42	2	0.00001
Impaction	4	1	0.1126
Malformation	0	0	----
Transposition	7	0	0.0032
Multiple	20	1	0.00001
Total	217	42	0.00001