UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA

ALICE GOMES DE CARVALHO RAMOS

**Associação entre Tipos Morfológicos Faciais e Maloclusões
Esqueléticas com as variações genéticas em *IGF2R***

Ribeirão Preto

2019

ALICE GOMES DE CARVALHO RAMOS

**Associação entre Tipos Morfológicos Faciais e Maloclusões
Esqueléticas com as variações genéticas em *IGF2R***

Versão Corrigida

A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Professor Dr. Fábio Lourenço Romano

Co-Orientador: Professor Dr. Paulo Nelson Filho

Ribeirão Preto

2019

Autorizo para reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

ALICE GOMES DE CARVALHO RAMOS

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca

Ramos, Alice Gomes de Carvalho

Associação entre Tipos Morfológicos Faciais e Maloclusões Esqueléticas com as variações genéticas em *IGF2R*. Ribeirão Preto, 2019.
77p.:il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Versão corrigida da Tese.

A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Orientador: Romano, Fábio Lourenço

Co-orientador: Filho, Paulo Nelson

1. Polimorfismo genético; 2. Variação Genética; 3. Fator de crescimento Insulin-like II; 4. Receptores de Somatomedinas; 5. Genes; 6. Face; 7. Ortodontia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ramos, AGC. **Associação entre Tipos Morfológicos Faciais e Maloclusões Esqueléticas com as variações genéticas em *IGF2R***

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano – Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

ALICE GOMES DE CARVALHO RAMOS

- Nascimento** 26 de fevereiro de 1983 – Manaus/AM.
- Filiação** Aparecida Gomes de Carvalho.
Francisco Fernandes de Carvalho.
- 2000-2004** Curso de Graduação em Odontologia.
Centro Universitário Nilton Lins (UNL/AM).
- 2006-2009** Curso de Pós-Graduação em Ortodontia, nível Especialização. Monografia: Prevalência dos tipos de malformação congênita de lábio e palato em pacientes atendidos no programa de reabilitação das fissuras lábio-palatais, Centrinho-Manaus.
Orientadora: Profa. Dra. Kathleen Rebelo de Sousa.
Faculdade do Amazonas (IAES/AM).
- 2009-2014** Curso de Pós-Graduação em Ortodontia, nível Mestrado. Dissertação: Prevalência do Tipo de Padrão Facial em escolares da rede pública do município de Manaus – AM.
Orientadora: Profa. Dra. Cecília Pedroso Turssi.
São Leopoldo Mandic-Campinas/SP.
- 2010- Atual** Docente na disciplina de Ortodontia Preventiva e Interceptativa. Faculdade do Amazonas (IAES-AM).
Docente do curso de Especialização em Ortodontia. Faculdade do Amazonas (IAES-AM).
- 2016-Atual** Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Doutorado (DINTER) – tese: Associação entre Tipos Morfológicos Faciais e Maloclusões Esqueléticas com as variações genéticas em *IGF2R*.
Orientador: Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano.
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson Filho.
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto /USP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus** e a **Mateus**, meu anjo da guarda, por nunca me desampararem em todas as etapas da minha vida, me guiando, iluminando, protegendo e agraciando. Aos meus **pais**, à minha pequena **Clara**, aos meus **irmãos** e ao meu **marido**.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, pela paciência e competência nas correções do meu trabalho.

Ao meu Co-Orientador **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, pelo exemplo de docente que se mostrou, ministrando suas aulas com maestria e amor. Um exemplo de profissional, onde se vê o brilho no olhar ao falar de Odontopediatria. Agradeço a oportunidade que pude ter ao conhecê-lo e ao ser meu co-orientador, onde recebi muitos conhecimentos. A minha eterna gratidão e admiração.

À **Profª. Dra. Erika Calvano Küchler**, onde não há palavras o suficiente para agradecê-la. Agradeço todo esforço, preocupação, apoio, incentivo, disponibilidade, paciência, amizade, transmissão de conhecimento e acompanhamento desde o início deste trabalho até a última linha escrita. Extremamente competente e inteligente. Minha gratidão eterna por sua humanidade, compreensão e esforço para que o estudo não parasse enquanto eu passava por uma etapa complicada de minha vida. Meu grande exemplo de Pesquisadora e Geneticista, onde me mostrou um mundo novo que existe dentro de um laboratório. Obrigada por ter sido você!

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, por me permitir esta oportunidade nesta vida, me abençoando, iluminando, guiando, acolhendo e aconselhando em todos os momentos.

Ao meu **anjo da guarda Mateus**, por me guiar, me iluminar, me proteger e nunca me abandonar, até mesmo em momentos quando o cansaço é grande e durmo sem agradecê-lo e sem pedir a Deus fortalecimento a ele.

Aos meus **pais**, pelo amor, pela fortaleza que são para mim, pelos valores transmitidos durante todos esses anos, pelo apoio a todo e qualquer passo que tenho dado em minha vida, por ficar com minha pequena para que eu pudesse concluir este trabalho. Sem vocês eu não conseguiria. Não há palavras que possam traduzir a gratidão, amor e orgulho que sinto por vocês.

Aos meus **irmãos**, exemplos de profissionais, de pessoas, de humanidade, de simplicidade, de família. Agradeço todo o apoio, esclarecimentos e incentivos que recebi em toda minha vida.

À minha pequena **Clara**, tão desejada e, portanto, fui agraciada como mãe durante o curso de Doutorado, onde Deus a me emprestou para eu conhecer realmente o sentimento amor. Minha razão de viver.

Ao meu **marido**, pelo amor, apoio, incentivo e paciência por minhas ausências durante a realização deste sonho.

À Universidade de São Paulo, nas pessoas do atual Reitor **Prof. Dr. Vahan Agopyan**, e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Antônio Carlos Hernandez**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora **Prof^á. Dr^a Léa Assed Bezerra da Silva** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Prof^á. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato**.

À Universidade de São Paulo-USP e à Faculdade do Amazonas-IAES, por tornarem possível este doutorado Dinter .

À Faculdade do Amazonas-IAES, na pessoa da Diretora **Prof^a. Dra. Zobélia Maria de Souza Lopes** e do coordenador **Prof. Dr. Alberto Tadeu do Nascimento Borges**. Minha eterna gratidão.

À **Prof^a. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva**, sempre extremamente gentil, educada, solícita e pronta a ajudar a qualquer momento.

A **todos os funcionários** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela cordialidade e atenção.

Aos **professores** do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Prof.^a Dr^a. Aldevina Campos de Freitas**, **Dr. Alberto Consolaro**, **Prof^á. Dr^a Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Prof^á. Dr^a. Andíara De Rossi Daldegan**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia Paula-Silva**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Prof^á. Dr^a. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Prof^á. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Prof^á. Dr^a. Maria Bernadete Sasso Stuaní**, **Prof^á. Dr^a. Maria Cristina Borsato**, **Prof^á. Dr^a. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, **Prof^á. Dr^a. Mírian Aiko Nakane Matsumoto**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho** e **Prof^á Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato**.

Em especial aos **professores** que ministraram disciplinas durante o curso de doutorado, obrigada pela formação sólida que me proporcionaram.

À **Nilza Letícia Magalhães**, pela ajuda, esclarecimentos e apoio no laboratório de genética.

À **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, pela simpatia, rapidez e eficiência, em toda assistência prestada durante este curso, mesmo longe geograficamente.

Aos **professores da banca examinadora**, meu enorme agradecimento por concederem o precioso tempo de vocês para lerem minha tese.

À querida **Beatriz Dantas**, compartilhamos muitas etapas desta jornada, se mostrou extremamente preocupada e prestativa, me ajudando em etapas de minha pesquisa que estava impossibilitada de realizar devido minha gravidez de risco. Minha eterna gratidão.

A todas as **minhas amigas e amigos** de Doutorado, obrigada por todo apoio, incentivo e momentos compartilhados.

Ao **Arthur, Mariele, Ju**, a todos do grupo de Ortodontia e em especial ao **Guido**, obrigada pela ajuda durante as etapas deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP**, em nome da Prof^a Doutora Érika Calvano Küchler, pelo financiamento e incentivo à pesquisa.

Aos **pacientes** das clínicas de Especialização em Ortodontia das Faculdades de Odontologia de Manaus, Ribeirão Preto, Rio de Janeiro e Curitiba, participantes da pesquisa, tornando-a possível.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

A Parte experimental desta Tese foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.
- Vieira Lab, do Departamento de Biologia Oral, Escola de Medicina Dentária, Universidade de Pittsburgh.

RESUMO

Ramos, AGC. **Associação entre Tipos Morfológicos Faciais e Maloclusões Esqueléticas com as variações genéticas em *IGF2R***. Ribeirão Preto, 2019. 77p. Tese [Doutorado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre variações genéticas no Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 2 (*IGF2R*) com os Tipos Morfológicos Faciais e Maloclusões Esqueléticas. A amostra foi composta por 596 pacientes em tratamento nas clínicas de especialização em Ortodontia do Instituto Amazônia de Ensino Superior (Manaus-AM), da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (Rio de Janeiro-RJ) e da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Ribeirão Preto – SP), além de uma amostra de 98 pacientes que necessitavam de cirurgia ortognática, recrutados do centro de cirurgia ambulatorial bucomaxilofacial da Universidade Positivo e Universidade Federal do Paraná – Curitiba, totalizando 694 pacientes. Foram incluídos no estudo, pacientes com idade entre 7 a 67 anos, de ambos os gêneros. Os Tipos Morfológicos Faciais e as Maloclusões Esqueléticas foram determinados por meio de radiografias cefalométricas laterais, utilizando pontos de referências da mandíbula, maxila e da base do crânio. O DNA foi extraído por meio da coleta de saliva, como fonte de material biológico. As genotipagens das variações genéticas rs2277071, rs6909681 e rs6920141 no gene candidato foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR), pela técnica TaqMan. Os dados obtidos foram tabulados e analisados no programa Epi Info 3.5.2 e no software Plink. Os testes Qui-quadrado ou exato de Fisher foram utilizados para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e para avaliar a associação entre os genótipos e as frequências alélicas para cada variação genética e os fenótipos. As variáveis entre as cidades foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado. O nível de significância adotado foi 5%. Os resultados obtidos permitiram concluir que não houve associação entre os genótipos e alelos para os polimorfismos estudados com as Maloclusões Esqueléticas, em relação aos diferentes Tipos Morfológicos Faciais, o único polimorfismo em *IGF2R* onde foi encontrada associação foi o rs2277071, com os tipos faciais Dolicofacial e Braquifacial na região de Ribeirão Preto - SP. Portanto, novos estudos são necessários para avaliar o papel de polimorfismos genéticos em *IGF2R* com os Tipos Morfológicos Faciais e as Maloclusões Esqueléticas.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. Variação genética. Fator de Crescimento Insulin-Like II. Receptores de Somatomedinas. Genes. Face. Ortodontia.

ABSTRACT

Ramos, AGC. **Relationship between Facial Morphology types and Skeletal Malocclusions with genetic variants in *IGF2R***. Ribeirão Preto, 2019. 77p. Thesis [Doctorate]. Ribeirão Preto Dental school, São Paulo University.

The aim of the present study was to evaluate the relationship between genetic variants in the Insulin-like Growth Factor type 2 Receptor (*IGF2R*) with Facial Morphological Types and Skeletal Malocclusions. The sample consisted of 596 orthodontic patients in treatment in the orthodontic clinics of the Amazonas Dental School (Manaus-AM), Fluminense Federal University (Rio de Janeiro-RJ) and the School of Dentistry of Ribeirão Preto - USP (Ribeirão Preto - SP), additionally, a sample of 98 patients who required orthognathic surgery, recruited from the oral and maxillofacial surgery service of the Positivo University and the Federal University of Paraná - Curitiba was included, totalizing 694 patients. Patients, age ranging from 7 to 67 years, of both genders, were included in the study. To determined the Facial Morphological Type and Skeletal Malocclusion, reference landmerks of the jaws and the base of the skull were used in cephalometric radiographs. DNA was extracted by collecting saliva as a source of biological sample. The genotyping of the genetic variants rs2277071, rs6909681 and rs6920141 in the candidate gene was performed in the real-time polymerase chain reaction (PCR), Taqman technology. The data obtained were tabulated and analyzed using Epi Info 3.5.2 and Plink software. Chi-square or Fisher's exact calculations were used to assess Hardy-Weinberg equilibrium and to evaluate the association between genotype and allele frequencies for each genetic variants and phenotypes. The variables between the cities were evaluated by the chi-square test. The significance level adopted was 5%. The results demonstrated that there wasn't association between genotypes and alleles for the polymorphisms studied with Skeletal Malocclusion, in relation to different Morphological Facial Types, that the polymorphism rs2277071 in *IGF2R*, was associated with the Dolichofacial and Brachyfacial facial types in Ribeirão Preto - SP. However, further analysis should be performed to evaluate the role of genetic polymorphisms in *IGF2R* with Facial Morphological Types and Skeletal Malocclusion.

Keywords: Polymorphism, Genetic. Genetic Variation. Insulin-Like Growth Factor II. Receptors, Somatomedin. Genes. Face. Orthodontics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. PROSOSIÇÃO	33
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Caracterização da amostra	39
3.2 Critérios de inclusão e exclusão	39
3.3 Determinação do fenótipo	40
3.4 Coleta de material biológico, extração e quantificação do DNA	40
3.5 Seleção das Variações Genéticas e Genotipagem por PCR em tempo Real	41
3.6 Análise estatística	42
4. RESULTADOS.....	43
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	67
APÊNDICES.....	73

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento craniofacial humano se inicia desde a concepção, na fase pré-natal, até a fase pós-natal (Spalding, 2004). Segundo Moyers (1991), a face forma-se muito cedo, iniciando no período pré-natal (3ª semana) e se desenvolvendo completamente em um período curto, até o final da 8ª semana.

Devido às proeminências mandibulares, a mandíbula é a primeira porção da face a se formar, onde constituem o primeiro arco faríngeo e fundem-se na linha média dias antes que as outras proeminências se fundam (Brito, 1998; Bronner et al., 2010). Estas proeminências dão origem ao lábio inferior, queixo e região inferior das bochechas (Moore, 1990). As proeminências maxilares formam os lados do rosto e ossos associados aos arcos zigomáticos, maxila e palato secundário (Bronner et al., 2010).

No início da sétima semana, a face é reconhecidamente humana devido à posição frontal dos olhos, diferenciação do nariz e aumento da mandíbula. Durante o período de organização da face, os processos maxilares e mandibulares emergem do primeiro arco branquial, enquanto que a área nasal e a testa surgem de tecidos que revestem o prosencéfalo. Estas diferentes origens seriam a principal causa de variabilidade facial (Moyers, 1991; Brito, 1998; Sadler, 2010).

A ossificação do esqueleto da cabeça utiliza processos endocondrais e intramembranosos (Bronner et al., 2010). Segundo Kjaer (1995), a ossificação das estruturas esqueléticas se inicia pela mandíbula, seguida pela maxila, ossos palatinos, base craniana e crânio, onde os centros de ossificação intramembranosos geralmente precedem os endocondrais. O crânio aumenta principalmente ao longo das margens das suturas, por deposição óssea. Um ligeiro movimento é permitido nas suturas, quando estas ainda estão abertas, o que é importante para o desenvolvimento e crescimento do crânio (Ohazama e Sharpe, 2015). A abóbada craniana é uma das primeiras regiões do esqueleto craniofacial a atingir o tamanho total (Pinzan et al., 2013).

Segundo Pinzan et al. (2013), à medida que a maxila cresce para cima e para trás, sofre também um deslocamento em direção anterior e inferior aumentando, assim, a profundidade facial. Deve-se atribuir também aos ossos vômer e septo nasal a influência no aumento pósterio-anterior da face. A deposição óssea do processo alveolar contribui primordialmente para o aumento da altura maxilar, mas também auxilia no aumento do comprimento, pois acompanha o crescimento da tuberosidade. Na mandíbula, existe um crescimento endocondral gerando um movimento para trás e para cima nos côndilos,

contribuindo principalmente para o crescimento em altura da mandíbula e um deslocamento de todo o osso para baixo e para a frente. Do nascimento até aproximadamente os 6 anos de idade, a maxila e a mandíbula apresentam um significativo alargamento, pelo crescimento na sutura palatina e na sincondrose mandibular.

Dados cefalométricos mostraram que, em todas as faixas etárias, há um crescimento contínuo do complexo craniofacial. As alterações vistas em adultos são similares às observadas na adolescência, porém em menor magnitude. No adulto jovem, a tendência de crescimento segue a tendência normal de seu padrão facial, independente de qual seja (vertical ou horizontal). Ao final da idade adulta, no entanto, as modificações são principalmente verticais (Enlow, 1993).

Durante o crescimento e desenvolvimento de um indivíduo, há interações de marcadores moleculares, desde o período pré-natal (Cruz e Oliveira, 2007). Devido aos avanços tecnológicos, têm-se identificado diversos fatores de crescimento e de diferenciação óssea (FCDO), como TGF- β , BMP, PDGF, FGF e IGF. Os FCDOs são polipeptídeos sintetizados em pequenas concentrações e armazenados na matriz óssea, estando ligados diretamente à formação e reparo ósseo, apresentando diferentes variações espaciais (Mohan, 1991).

O Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF) é um polipeptídeo mitogênico estruturalmente semelhante à pró-insulina, de cadeia única, que funciona de maneira autócrina/parácrina, e apresenta atividade sobre o metabolismo intermediário e sobre a proliferação, crescimento e diferenciação celular (Martinelli et al., 2008; Agrogiannis et al., 2014). Considerado um dos mais abundantes no tecido ósseo, o IGF compreende dois polipeptídeos (*IGF1*- somatomedina-C; 7,5 kd e *IGF2*- fator de crescimento esquelético; 8,7 kd), dois receptores de superfície celular (*IGF1R* e *IGF2R*) e seis proteínas solúveis de ligação de *IGF* de alta afinidade (*IGFBP-1-6*). O eixo *IGF* desempenha papel crucial no desenvolvimento e manutenção dos tecidos mineralizados, assim como regula os osteoblastos e a diferenciação dos osteoclastos no desenvolvimento do tecido ósseo (Liu et al., 1993; Woods et al., 1996; Al-Khafaji et al., 2018).

O Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (*IGF1*) intermedeia efeitos do Hormônio do Crescimento (GH), regulando e desempenhando papel importante no crescimento e desenvolvimento fetal e pós-natal, tanto na fase de formação de osso quanto de cartilagem, devido à expressão dos osteoblastos e condrócitos (Solheim, 1998; Boguszewski, 2001; Grochowska et al., 2001). A concentração de *IGF1* apresenta um aumento na puberdade, diferente do *IGF2*, cuja concentração se mantém constante no crescimento pós-

natal. Segundo Wood et al. (1996) e Solheim (1998), o *IGF2* é o fator de crescimento semelhante à insulina mais abundante na matriz óssea, exercendo sua função sobre o crescimento somático intra-uterino, cuja concentração pode ser até 15 vezes maior que a de *IGF1*, e uma produção celular aproximadamente 100 vezes maior (Mohan e Baylink, 1991).

Nos anos 90, a função fisiológica de *IGF2* não estava totalmente esclarecida, porém indicava estar relacionada com o crescimento do feto antes do nascimento e com atuação como mitógeno nas células ósseas, onde sua concentração é bem maior que a de *IGF1* (Ganong, 1991). Entretanto, trabalhos mais recentes têm demonstrado que o *IGF2* promove a diferenciação de células osteogênicas (Kang et al., 2012) e tem um papel fundamental no desenvolvimento da cartilagem (Uchimura et al., 2017).

O *IGF2* exerce suas funções por meio da ligação a receptores de membrana celular Tipo 2 (Mohan e Baylink, 1991). O Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do Tipo 2 (*IGF2R*) é uma glicoproteína integral expressa ubiquamente, com uma massa molecular variando de 200 a 300 kDa. Quatro classes diferentes de ligantes são conhecidas, unindo-se a locais distintos no domínio receptor extracitoplasmático: enzimas lisossômicas contendo manose 6-fosfato, o *IGF2* não glicosilado, o ácido retinóico e o receptor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinas (Urist et al. 1979; Braulke, 1999; Leal-Guadarrama et al., 2003; Martinelli, 2008).

Segundo Petry et al. (2005), acredita-se que o *IGF2* funcione por meio da ligação ao receptor de *IGF1* (*IGF1R*) e ao receptor de *IGF2* (*IGF2R*) porém, ao se ligar a *IGF2R*, em vez de iniciar uma resposta de sinalização, causa a captação de *IGF2*, transporte para lisossomos e, em última instância, degradação do fator de crescimento em lisossomos (Braulke, 1999). Uma forma circulante solúvel de *IGF2R*, resultante da clivagem proteolítica do receptor intacto ligado à membrana, pode funcionar de forma semelhante ao seu parceiro ligado à membrana (ou seja, *IGF2* livre de ligação, inibe sua ação no receptor *IGF1*), demonstrando inibir a síntese de DNA mediada por *IGF2*. Essa forma solúvel de *IGF2R* na circulação foi relacionada ao tamanho do corpo em bebês a termo, sendo essencial para a regulação do crescimento pré-natal (Czech, 1989; Ong et al., 2000).

O receptor Tipo 2 liga-se ao *IGF2* com melhor afinidade que o *IGF1*. As diferenças na união de substratos residem principalmente nas diferenças entre subunidades alfa (Martinelli, 2008). Tanto o *IGF1* como o *IGF2* ligam-se ao receptor da insulina, porém apenas com 1% da afinidade que a insulina apresenta. A afinidade pelo *IGF2* é alta e aproximadamente 500 vezes maior que pelo *IGF1*. Há indícios de que o *IGF2R* possa participar da remoção do *IGF2*

do ambiente extracelular (Czech, 1989; Jones e Clemmons, 1995; Leal-Guadarrama et al., 2003).

As características morfológicas definidas pelo processo de crescimento e desenvolvimento craniofacial são, na sua grande maioria, dependentes de componentes genéticos. Os avanços em genética humana e em biologia molecular têm proporcionado um maior conhecimento sobre o desenvolvimento facial e levado à identificação de novos genes e loci envolvidos com a etiologia de alterações faciais (Cruz e Oliveira, 2007). Na literatura específica, há estudos que demonstraram a associação das alterações do Tipo Morfológico Facial (TMF) e das Maloclusões Esqueléticas (ME) com alguns genes e *loci* em diversas populações (Liu et al., 2012; Silva Filho et al., 2015; Adhikari et al., 2016). A principal alteração avaliada é o prognatismo (Yamaguchi et al., 2005; Frazier-Bowers et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Li et al., 2010; Jang et al., 2010; Xue et al., 2010; Li et al., 2011; Cruz et al., 2011; Tassopoulou-Fishell et al., 2012; Xue et al., 2014; Da Fontoura et al., 2015; Perillo et al., 2015; Guan et al., 2015).

O gene de *IGF2R* codifica um receptor para o *IGF2*, que se localiza no braço longo do cromossomo 6 (6q26-27), sendo estrutural e imunologicamente distinto do *IGF1R* (Urist et al., 1979; Braulke, 1999; Leal-Guadarrama et al., 2003; Martinelli, 2008). Os locais de ligação para cada ligante estão localizados em diferentes segmentos da proteína, que mostra níveis de expressão específicos do estágio de desenvolvimento que são mais altos no feto e declinam rapidamente após o nascimento (Mohan e Baylink, 1991; Braulke, 1999).

Tem sido demonstrado que determinadas variações genéticas ou polimorfismos do gene que codifica *IGF2R* estão associadas à um menor crescimento ósseo nos primeiros anos de vida, sugerindo que o *IGF2R* possa ter um papel na regulação do crescimento fetal (Petri et al., 2005). Embora os receptores do Tipo II ainda não tenham papel definido na cascata de eventos desencadeada pela formação destes complexos moleculares, tem sido sugerida uma ação mitogênica na ligação *IGF2R* (Mohan, 1991).

Nos casos onde o polimorfismo ocorre na região codificadora do gene, pode resultar na substituição de um aminoácido, alterando a síntese de uma proteína e podendo alterar a função da célula (Ikuta et al., 2015). Se a função das proteínas for afetada em um processo biológico, o polimorfismo de alguns genes pode aumentar ou diminuir o risco do paciente à expressão fenotípica da doença ou da alteração avaliada (Kinane e Hart, 2003; Quilez et al., 2016).

De acordo com a literatura, os fatores genéticos são claramente predominantes durante a morfogênese craniofacial embriológica, porém a atuação dos genes nos diferentes TMF e

ME é um tema pouco estudado. Não foram encontrados estudos associando o gene *IGF2R* às alterações dos tipos morfológicos faciais e maloclusões esqueléticas. Portanto, devido à participação deste gene no crescimento e desenvolvimento ósseo ser expressivo no período pré-natal, é possível hipotetizar que as variações genéticas rs2277071, rs6909681 e rs6920141, localizadas nas regiões reguladoras e codificadoras do gene *IGF2R*, possam estar associadas aos TMF e das ME.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre os Tipos Morfológicos Faciais (TMF) e Maloclusões Esqueléticas (ME) com as variações genéticas no gene *IGF2R* em populações de regiões distintas do país (Rio de Janeiro - RJ, Manaus - AM, Ribeirão Preto - SP e Curitiba - PR).

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar:

1. a associação entre a relação esquelética ântero-posterior da maxila e mandíbula (Maloclusões Esqueléticas- ME) com as variações genéticas em *IGF2R*; e
2. a associação entre as alterações verticais faciais (TMF) com as variações genéticas em *IGF2R*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi previamente submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (CAAE: 50765715.3.0000.5419 – Anexo A), tendo sido aprovado. Todos os pacientes e seus responsáveis receberam informações sobre o projeto de pesquisa e foram incluídos após lerem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.1 Caracterização da amostra

O presente estudo se caracterizou por uma investigação do tipo transversal e multicêntrica. A amostra de conveniência total foi composta de 596 pacientes em tratamento nas clínicas de especialização em Ortodontia de do Instituto Amazônia de Ensino Superior (Manaus-AM), da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (Rio de Janeiro-RJ) e da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Ribeirão Preto – SP). Além disso, uma amostra de 98 pacientes que necessitavam de cirurgias ortognáticas, foram recrutados do centro de cirurgia ambulatorial bucomaxilofacial da Universidade Positivo e Universidade Federal do Paraná - Curitiba, totalizando 694 indivíduos. Foram incluídos, no estudo, pacientes com idade entre 7 a 67 anos, de ambos os gêneros. Após assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) e de Assentimento (Apêndice B) pelos pacientes ou por seus responsáveis, foram obtidas informações como gênero e idade, a partir do prontuário de cada paciente.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos pacientes com um conjunto completo de registros pré-tratamento ortodôntico, incluindo radiografia cefalométrica lateral da face, radiografia panorâmica, fotografias intra e extra-bucais e modelos de gesso. Não foram incluídos pacientes com doenças sistêmicas que envolvem distúrbios de crescimento, tais como alterações nutricionais, síndromes genéticas ou fissura de lábio e palato. Não foram incluídos, também, pacientes que até o momento não haviam recebido tratamento ortodôntico e que não tiveram o TCLE ou o Termo de Assentimento assinados.

3.3 Determinação do fenótipo

A radiografia cefalométrica lateral da face de cada paciente foi avaliada para análise dos seguintes parâmetros:

- Análise da relação esquelética ântero-posterior da maxila e da mandíbula, dependendo da medida do ângulo ANB, formado pela intersecção das linhas NA e NB. O ângulo ANB foi classificado em Classe I ($ANB=0$ a 4°), Classe II ($ANB>4^\circ$) ou Classe III ($ANB<0^\circ$).
- Eixo facial, ângulo formado pelo plano básico-násio e o eixo facial (BaN.PtGn), que expressa a relação entre a altura e a profundidade facial, sendo classificados em Mesofacial (BaN.PtGn = 87° - 93°), Dolicofacial (BaN.Pt.Gn $<87^\circ$) e Braquifacial (BaN.PtGn $>93^\circ$).

Para a amostra de Curitiba, as radiografias cefalométricas laterais da face foram obtidas por meio da documentação do paciente na fase pré-cirúrgica.

As radiografias foram obtidas em máxima intercuspidação habitual (MIH) com os lábios em repouso.

Traçados cefalométricos digitais foram realizados utilizando o software Dolphin (Chatsworth, CA, EUA). Quatro avaliadores previamente treinados e calibrados realizaram todas as avaliações.

3.4 Coleta de material biológico, extração e quantificação do DNA

Durante o tratamento ortodôntico, amostras de saliva foram coletadas como fonte de DNA genômico, seguindo protocolo previamente estabelecido (Kühler et al., 2012). Para a coleta, os indivíduos realizaram bochecho com 5mL de solução salina a 5% durante 1 minuto, sendo o volume do bochecho acondicionado em tubos para centrifuga de 15mL (Corning Inc., Corning, NY, EUA).

Cada tubo contendo a saliva coletada foi centrifugado a 550rpm durante 15 minutos, para sedimentação do *pellet* de células. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1mL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM, pH 7,8; EDTA 5mM; SDS 0,5%). As amostras foram, então, transferidas para um tubo *ependorf* de 1,5mL, o qual foi congelado a -20°C , até o momento da extração do DNA.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas e incubadas com 100ng/mL de Proteinase K (4μL de Proteinase K - Fungal, Invitrogen Laboratories, na concentração de 25mg/mL), em banho-maria a 56°C *overnight* e, então, submetidas a processos de precipitação utilizando-se 400μL de solução de acetato de amônio a 10M. A seguir, todos os tubos foram agitados manualmente por 5 minutos, centrifugados por 15 minutos (12000rpm), sendo o sobrenadante dividido em dois tubos *eppendorf* de 700μL cada. O mesmo volume (700μL) de álcool isopropílico foi acrescentado e os tubos foram resfriados e agitados vigorosamente.

Após nova centrifugação por 20 minutos (12000rpm) a 4°C a formação da "nuvem de DNA" foi observada em cada *eppendorf* de todas as alíquotas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado com cuidado para não deslocar o *pellet* de DNA e 1mL de etanol a 70% resfriado foi adicionado, seguido de centrifugação por 15 minutos (12000rpm), a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o tubo aberto e emborcado em papel para secar por pelo menos 30 minutos e evaporar o excesso de etanol. O *pellet* de DNA foi ressuspensionado em 400μL de Tampão de Extração (TE) e congelado a -20°C.

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®2000c, Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, EUA) utilizando-se 2μL do material extraído. A concentração de DNA foi avaliada em um comprimento de onda de 260 nm. A razão entre os valores obtidos nos comprimentos de onda 260nm e 280nm foi usada para estimar a pureza do DNA genômico. As amostras foram diluídas em água Milli-Q a 2ng/ μL.

3.5 Seleção das Variações Genéticas e Genotipagem por PCR em tempo Real

As variações genéticas no gene IGF2R foram analisadas por PCR em Tempo real. Foram selecionados polimorfismos que se classificaram como potencialmente funcionais (por alterarem a sequência de aminoácidos da proteína final ou por potencialmente influenciarem a expressão gênica).

As variações polimórficas do gene candidato foram selecionadas e avaliadas com auxílio do *USCS GenomeBioinformatics*. As variações foram genotipadas por PCR em tempo real usando o método *Taqman* (Ranade et al., 2001), no Departamento de Clínica infantil da FORP/USP. A interpretação dos dados foi realizada com auxílio do software fornecido pela *AppliedBiosystems* (Foster City, CA, USA) para discriminação alélica. Os reagentes foram fornecidos pela *AppliedBiosystems* (Foster City, CA, EUA).

As variações genéticas avaliadas para o gene IGF2R se apresentam na Tabela 1.

Tabela 1. Variações genéticas para o gene *IGF2R*

Gene	Loci	Sequência de Referência	Tipo da Alteração	Mudança na base (Sequência de contexto)	Menor Frequência Alélica Global
<i>IGF2R</i>	6q25.3	rs2277071	intron variant	ATA[A/G]CAT	0.2718/1361
<i>IGF2R</i>	6q25.3	rs6909681	intron variant	AAC[A/T]GTC	0.4287/2147
<i>IGF2R</i>	6q25.3	rs6920141	intron variant	TGT[C/T]GAT	0.4629/2318

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>; <http://genome.uscs.edu/>; <https://www.thermofisher.com>.

Nota: Na mudança de base, a letra em negrito significa a de menor frequência alélica.

3.6 Análise estatística

Como método para avaliar a confiabilidade da identificação dos pontos anatômicos nas radiografias cefalométricas laterais da face, realizadas pelos examinadores por meio do programa Dolphin, foi utilizado o ICC – Coeficiente de Correlação IntraClasse. Dez por cento do total das radiografias cefalométricas laterais da face foram aleatoriamente selecionadas para avaliação de 2 dos 4 examinadores, com um intervalo de 2 semanas.

Os testes Qui-quadrado ou exato de Fisher foram utilizados para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e para avaliar a associação entre o genótipo e as frequências alélicas para cada variação genética avaliada com cada ME e TMF, individualmente para cada cidade. Os dados foram analisados usando Epi Info 3.5.2. (www.cdc.gov/epiinfo) e pacote GraphPadPrism 5.0 (gráfico-Pad, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Um total de 694 pacientes foram incluídos e analisados neste estudo, dos quais 273 (39,3%) eram do gênero masculino e 421(60,7%) do gênero feminino. A média de idade dos indivíduos incluídos na amostra do Rio de Janeiro, Manaus e Ribeirão Preto foi de 22,9 anos (DP- 11 anos). Na amostra de Curitiba, onde os indivíduos iriam realizar cirurgia ortognática, a media de idade foi de 29,3 anos (DP 9,1 anos). As características da amostra por região são apresentadas na Tabela 2. Todos os polimorfismos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada cidade avaliada.

Tabela 2. Características da amostra por região

		Rio de Janeiro (RJ)	Manaus (M)	Ribeirão Preto (RP)	Amostras Totais (RJ+M+RP)	Curitiba (Amostras Cirúrgicas)
Idade	Desvio Padrão (DP)	24,7 (10,7)	26,5 (11)	14,9 (7,1)	22,9 (11)	29,3 (9,1)
	Média	22	24	12	20	28
	Min	7	14	7	7	16
	Max	67	66	51	67	55
Gênero n (%)	Masculino	124 (37,1)	51 (39,2))	65 (49,2)	240 (40,3)	33 (33,7)
	Feminino	210 (62,9)	79 (60,8)	67 (50,8)	356 (59,7)	65 (66,3)
Maloclusão esquelética	Classe I n (%)	128 (38,3)	68 (52,3)	73 (55,3)	269 (45,1)	21 (21,4)
	Classe II n (%)	173 (51,8)	50 (38,5)	42 (31,8)	265 (44,5)	19 (19,4)
	Classe III n (%)	33 (9,9)	12 (9,2)	17 (12,9)	62 (10,4)	58 (59,2)
Tipo Morfológico Facial	Mesofacial n (%)	155 (46,4)	68 (52,3)	64 (48,5)	287 (48,2)	24 (24,5)
	Dolicofacial n(%)	94 (28,1)	33 (25,4)	53 (40,2)	180 (30,2)	15 (15,3)
	Braquifacial n (%)	85 (25,4)	29 (22,3)	15 (11,4)	129 (21,6)	59 (60,2)

Comparações entre os genótipos e as frequências alélicas encontradas nas variações avaliadas no gene *IGF2R* com a ME são apresentadas na Tabela 3. Não foi possível evidenciar associação estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas e/ou alélicas para as variações genéticas estudadas no gene e a presença das diferentes ME ($p>0,05$).

Tabela 3. Frequências genotípicas e alélicas de acordo com a ME.

		Genótipos n (%)				Alelos n (%)		
IGF2R rs2277071		AA	AG	GG	P valor	A	G	P valor
Variação Genética								
Rio de Janeiro	Classe I	6 (4,8)	50 (40)	69 (55,2)	Referência	62 (24,8)	188 (75,2)	Referência
	Classe II	6 (3,5)	69 (40,6)	95 (55,9)	0,8607	81 (23,8)	259 (76,2)	0,8625
	Classe III	2 (6,5)	8 (25,8)	21 (67,7)	0,3396	12 (19,4)	50 (80,6)	0,4624
Manaus	Classe I	13 (19,1)	28 (41,2)	27 (39,7)	Referência	54 (39,7)	82 (60,3)	Referência
	Classe II	12 (24,5)	14 (28,6)	23 (46,9)	0,3697	38 (38,8)	60 (61,2)	0,9999
	Classe III	4 (33,3)	5 (41,7)	3 (25)	0,4584	13 (54,2)	11 (45,8)	0,2713
Ribeirão Preto	Classe I	4 (5,7)	19 (27,1)	47 (67,1)	Referência	27 (19,3)	113 (80,7)	Referência
	Classe II	4 (9,8)	17 (41,5)	20 (48,8)	0,1596	25 (30,5)	57 (69,5)	0,0822
	Classe III	0 (0)	4 (25)	12 (75)	0,5916	4 (12,5)	28 (87,5)	0,5169
Amostras Totais (RJ+M+RP)	Classe I	23 (8,7)	97 (36,9)	143 (54,4)	Referência	143 (27,2)	383 (72,8)	Referência
	Classe II	22 (8,5)	100 (38,5)	138 (53,1)	0,9324	144 (27,7)	376 (72,3)	0,9203
	Classe III	6 (10,2)	17 (28,8)	36 (61)	0,5016	29 (24,6)	89 (75,4)	0,639
Curitiba (Amostras Cirúrgicas)	Classe I	2 (9,5)	9 (42,9)	10 (47,6)	Referência	13 (31)	29 (69)	Referência
	Classe II	1 (5,6)	11 (61,1)	6 (33,3)	0,5194	13 (36,1)	23 (63,9)	0,8065
	Classe III	3 (5,6)	20 (37)	31 (57,4)	0,6873	26 (24,1)	82 (75,9)	0,512
IGF2R rs6909681		AA	AT	TT	P valor	A	T	P valor
Variação Genética								
Rio de Janeiro	Classe I	27 (21,1)	74 (57,8)	27 (21,1)	Referência	128 (50)	128 (50)	Referência
	Classe II	51 (29,5)	87 (50,3)	35 (20,2)	0,2466	189 (54,6)	157 (45,4)	0,2987
	Classe III	7 (21,2)	21 (63,6)	5 (15,2)	0,7334	35 (53)	31 (47)	0,7642
Manaus	Classe I	17 (26,6)	27 (42,2)	20 (31,3)	Referência	61 (47,7)	67 (52,3)	Referência
	Classe II	13 (32,5)	18 (45)	9 (22,5)	0,6005	44 (55)	36 (45)	0,3741
	Classe III	5 (41,7)	5 (41,7)	2 (16,7)	0,463	15 (62,5)	9 (37,5)	0,2655
Ribeirão Preto	Classe I	22 (32,8)	32 (47,8)	13 (19,4)	Referência	76 (56,7)	58 (43,3)	Referência
	Classe II	17 (41,5)	15 (36,6)	9 (22)	0,5117	49 (59,8)	33 (40,2)	0,7642
	Classe III	5 (29,4)	9 (52,9)	3 (17,6)	0,9277	19 (55,9)	15 (44,1)	0,9203
Amostras Totais (RJ+M+RP)	Classe I	66 (25,5)	133 (51,4)	60 (23,2)	Referência	265 (51,2)	253 (48,8)	Referência
	Classe II	81 (31,9)	120 (47,2)	53 (20,9)	0,2753	282 (55,5)	226 (44,5)	0,1821
	Classe III	17 (27,4)	35 (56,5)	10 (16,1)	0,4819	69 (55,6)	55 (44,4)	0,4237
Curitiba (Amostras Cirúrgicas)	Classe I	4 (22,2)	11 (61,1)	3 (16,7)	Referência	19 (52,8)	17 (47,2)	Referência
	Classe II	4 (21,1)	11 (57,9)	4 (21,1)	0,9418	19 (50)	19 (50)	0,9999
	Classe III	15 (27,8)	25 (46,3)	14 (25,9)	0,5379	55 (50,9)	53 (49,1)	0,9999
IGF2R rs6920141		CC	CT	TT	P valor	C	T	P valor
Variação Genética								
Rio de Janeiro	Classe I	12 (10,1)	57 (47,9)	50 (42)	Referência	81 (34)	157 (66)	Referência
	Classe II	19 (11,5)	79 (47,9)	67 (40,6)	0,9231	117 (35,5)	213 (64,5)	0,7913
	Classe III	1 (3,1)	18 (56,3)	13 (40,6)	0,4107	20 (31,3)	44 (68,8)	0,7913
Manaus	Classe I	16 (24,2)	30 (45,5)	20 (30,3)	Referência	62 (47)	70 (53)	Referência
	Classe II	15 (34,9)	17 (39,5)	11 (25,6)	0,4843	47 (54,7)	39 (45,3)	0,3323
	Classe III	4 (36,4)	4 (36,4)	3 (27,3)	0,6907	12 (54,5)	10 (45,5)	0,6714
Ribeirão Preto	Classe I	5 (7,4)	16 (23,5)	47 (69,1)	Referência	26 (19,1)	110 (80,9)	Referência
	Classe II	5 (13,2)	11 (28,9)	22 (57,9)	0,4449	21 (27,6)	55 (72,4)	0,2088
	Classe III	3 (18,8)	4 (25)	9 (56,3)	0,3499	10 (31,3)	22 (68,8)	0,2059
Amostras Totais (RJ+M+RP)	Classe I	33 (13)	103 (40,7)	117 (46,2)	Referência	169 (33,4)	337 (66,6)	Referência
	Classe II	39 (15,9)	107 (43,5)	100 (40,7)	0,4045	185 (37,6)	307 (62,4)	0,1859
	Classe III	8 (13,6)	26 (44,1)	25 (42,4)	0,8607	42 (35,6)	76 (64,4)	0,729

* Associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

As distribuições genotípicas e alélicas das variações avaliadas no gene *IGF2R*, de acordo com TMF apresentado (Mesofacial, Dolicocefal e Braquicefal) são mostradas na Tabela 4. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a frequência genotípica e alélica e a presença do padrão Dolicocefal para a variação genética rs2277071 ($p=0,01$) e ($p=0,02$) respectivamente, na amostra da cidade de Ribeirão Preto - São Paulo. Adicionalmente, foi encontrada a associação estatisticamente significativa entre a frequência alélica e a presença do padrão Braquicefal para a mesma variação ($p=0,03$), também na amostra da cidade de Ribeirão Preto - São Paulo. Não foi possível evidenciar associação estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas e/ou alélicas para as demais variações estudadas no gene *IGF2R* e a presença dos diferentes TMF ($p>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas de acordo com o TMF.

		Genótipos n (%)				Alelos n (%)		
IGF2R rs2277071 Varição Genética		AA	AG	GG	P valor	A	G	P valor
Rio de Janeiro	Mesofacial	8 (5,2)	63 (41,2)	82 (53,6)	Referência	79 (25,8)	227 (74,2)	Referência
	Dolicofacial	3 (3,3)	36 (39,6)	52 (57,1)	0,7261	42 (23,1)	140 (76,9)	0,5716
	Braquifacial	3 (3,7)	28 (34,1)	51 (62,2)	0,436	34 (20,7)	130 (79,3)	0,2636
Manaus	Mesofacial	13 (19,1)	27 (39,7)	28 (41,2)	Referência	53 (39)	83 (61)	Referência
	Dolicofacial	12 (37,5)	7 (21,9)	13 (40,6)	0,0829	31 (48,4)	33 (51,6)	0,2655
	Braquifacial	4 (13,8)	13 (44,8)	12 (41,4)	0,7945	21 (36,2)	37 (63,8)	0,8415
Ribeirão Preto	Mesofacial	3 (4,9)	12 (19,7)	46 (75,4)	Referência	18 (14,8)	104 (85,2)	Referência
	Dolicofacial	3 (5,7)	23 (43,4)	27 (50,9)	0,0194*	29 (27,4)	77 (72,6)	0,0291*
	Braquifacial	2 (15,4)	5 (38,5)	6 (46,2)	0,0958	9 (34,6)	17 (65,4)	0,0357*
Amostras Totais (RJ+M+RP)	Mesofacial	24 (8,5)	102 (36,2)	156 (55,3)	Referência	150 (26,6)	414 (73,4)	Referência
	Dolicofacial	18 (10,2)	66 (37,5)	92 (52,3)	0,7445	102 (29)	250 (71)	0,4795
	Braquifacial	9 (7,3)	46 (37,1)	69 (55,6)	0,9094	64 (25,8)	184 (74,2)	0,8875
Curitiba (Amostras Cirúrgicas)	Mesofacial	2 (8,3)	8 (33,3)	14 (58,3)	Referência	12 (25)	36 (75)	Referência
	Dolicofacial	1 (7,1)	9 (64,3)	4 (28,6)	0,1686	11 (39,3)	17 (60,7)	0,2943
	Braquifacial	3 (5,5)	23 (41,8)	29 (52,7)	0,7334	29 (26,4)	81 (73,6)	0,9999
IGF2R rs6909681 Varição Genética		AA	AT	TT	P valor	A	T	P valor
Rio de Janeiro	Mesofacial	39 (25,2)	87 (56,1)	29 (18,7)	Referência	165 (53,2)	145 (46,8)	Referência
	Dolicofacial	25 (26,6)	50 (53,2)	19 (20,2)	0,9003	100 (53,2)	88 (46,8)	0,9203
	Braquifacial	21 (24,7)	45 (52,9)	19 (22,4)	0,7906	87 (51,2)	83 (48,8)	0,7401
Manaus	Mesofacial	19 (30,6)	23 (37,1)	20 (32,3)	Referência	61 (49,2)	63 (50,8)	Referência
	Dolicofacial	8 (29,6)	13 (48,1)	6 (22,2)	0,5434	29 (53,7)	25 (46,3)	0,6985
	Braquifacial	8 (29,6)	14 (51,9)	5 (18,5)	0,323	30 (55,6)	24 (44,4)	0,5376
Ribeirão Preto	Mesofacial	21 (34,4)	27 (44,3)	13 (21,3)	Referência	69 (56,6)	53 (43,4)	Referência
	Dolicofacial	18 (36)	23 (46)	9 (18)	0,9094	59 (59)	41 (41)	0,8231
	Braquifacial	5 (35,7)	6 (42,9)	3 (21,4)	0,995	16 (57,1)	12 (42,9)	0,8875
Amostras Totais (RJ+M+RP)	Mesofacial	79 (28,4)	137 (49,3)	62 (22,3)	Referência	295 (53,1)	261 (46,9)	Referência
	Dolicofacial	51 (29,8)	86 (50,3)	34 (19,9)	0,827	188 (55)	154 (45)	0,6242
	Braquifacial	34 (27)	65 (51,6)	27 (21,4)	0,9094	133 (52,8)	119 (47,2)	0,9999
Curitiba (Amostras Cirúrgicas)	Mesofacial	5 (21,7)	15 (65,2)	3 (13)	Referência	25 (54,3)	21 (45,7)	Referência
	Dolicofacial	3 (21,4)	7 (50)	4 (28,6)	0,4843	13 (46,4)	15 (53,6)	0,6714
	Braquifacial	15 (27,8)	25 (46,3)	14 (25,9)	0,279	55 (50,9)	53 (49,1)	0,8231
IGF2R rs6920141 Varição Genética		CC	CT	TT	P valor	C	T	P valor
Rio de Janeiro	Mesofacial	16 (11)	72 (49,3)	58 (39,7)	Referência	104 (35,6)	188 (64,4)	Referência
	Dolicofacial	9 (9,8)	46 (50)	37 (40,2)	0,9608	64 (34,8)	120 (65,2)	0,9203
	Braquifacial	7 (9)	36 (46,2)	35 (44,9)	0,7334	50 (32,1)	106 (67,9)	0,512
Manaus	Mesofacial	20 (29,9)	24 (35,8)	23 (34,3)	Referência	64 (47,8)	70 (52,2)	Referência
	Dolicofacial	7 (26,9)	13 (50)	6 (23,1)	0,4148	27 (51,9)	25 (48,1)	0,729
	Braquifacial	8 (29,6)	14 (51,9)	5 (18,5)	0,2417	30 (55,6)	24 (44,4)	0,4201
Ribeirão Preto	Mesofacial	6 (10,7)	12 (21,4)	38 (67,9)	Referência	24 (21,4)	88 (78,6)	Referência
	Dolicofacial	4 (7,7)	16 (30,8)	32 (61,5)	0,5117	24 (23,1)	80 (76,9)	0,8875
	Braquifacial	3 (21,4)	3 (21,4)	8 (57,1)	0,5488	9 (32,1)	19 (67,9)	0,3455
Amostras Totais (RJ+M+RP)	Mesofacial	42 (15,6)	108 (40,1)	119 (44,2)	Referência	192 (35,7)	346 (64,3)	Referência
	Dolicofacial	20 (11,8)	75 (44,1)	75 (44,1)	0,4747	115 (33,8)	225 (66,2)	0,6242
	Braquifacial	18 (15,1)	53 (44,5)	48 (40,3)	0,7082	89 (37,4)	149 (62,6)	0,7083

* Associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A amostra do presente estudo foi constituída por pacientes em tratamento ortodôntico de 4 cidades brasileiras diferentes. As 4 amostras caracterizam-se como amostra consecutiva de conveniência, uma vez que foi realizada por acessibilidade. Este tipo de amostragem, que é não probabilística, carece de rigor estatístico, uma vez que o pesquisador inclui apenas os pacientes a que tem acesso, assumindo que estes venham a representar um universo amostral maior. Apesar disso, o emprego de amostras por conveniência não só é bastante aplicado como também adequado para a criação de idéias em pesquisas do tipo exploratórias (Marotti et al., 2008), como no presente estudo.

Cabe ainda ressaltar que um desenho de estudo com amostra representativa da população incorreria em questões éticas, uma vez que são necessárias radiografias do complexo craniofacial de todos os pacientes incluídos no estudo. Desta forma, pacientes que estavam em tratamento ortodôntico e orto-cirúrgico representaram a melhor abordagem para a realização do presente estudo.

Na literatura específica, o presente estudo foi o primeiro a avaliar a associação entre polimorfismos genéticos no gene *IGF2R* com as dimensões craniofaciais, em população humana. Os estudos de associação são importantes ferramentas para a identificação de polimorfismos genéticos que podem predispor a alterações complexas. Com isso, o objetivo foi verificar se um determinado genótipo, alelo ou haplótipo de um gene candidato, neste caso o *IGF2R*, estaria associado a alguma alteração permitindo, assim, a identificação de genes candidatos a condições específicas de fenótipo. Estudos associativos podem ser realizados por meio de famílias de indivíduos afetados (Li et al., 2010; Chen et al., 2015; Guan et al., 2015; Perillo et al., 2015), o que é mais complexo, pois o acesso a todos os familiares é difícil, mas também pode ser realizado com indivíduos não relacionados entre si, como na presente pesquisa. Esse modelo de estudo permite o agrupamento de maior número de indivíduos sem que exista a necessidade da inclusão de seus familiares (Risch, 2000).

No presente estudo, para a caracterização fenotípica, foi adotada a análise da radiografia cefalométrica lateral da face (2D), por ser o método que tem sido extensivamente utilizado para estudo da maxila e da mandíbula, nas pesquisas realizadas em Ortodontia (Todorova-Plachiyaska e Stoilova-Todorova, 2018). Além disso, essas imagens estão disponíveis no prontuário odontológico dos pacientes, sem necessidade de exposição a uma nova tomada radiográfica.

A análise cefalométrica tem como objetivo avaliar as variações individuais nas dimensões maxilares e mandibulares (Durão et al., 2013). É importante ressaltar que os pontos e planos cefalométricos utilizados no presente estudo foram selecionados com base em revisão sistemática da literatura previamente realizada (Nascimento et al., 2016), a qual demonstrou que essas medidas são as mais utilizadas nos estudos de associação entre polimorfismos genéticos e alterações dimensionais da maxila e da mandíbula.

A seleção dos polimorfismos rs2277071, rs6909681 e rs6920141 foi realizada por meio de busca no “dbSNP”, base de dados que funciona como um repositório central para variações moleculares. Essa escolha baseou-se na menor frequência alélica, que deveria ser maior que 20%. A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real, por meio do método TaqMan. Este método foi selecionado por ser uma técnica simples, além de apresentar alta especificidade e confiabilidade dos resultados, amplamente utilizado em pesquisas dessa natureza (Antunes et al., 2017; Lips et al., 2017; Kuchler et al., 2017; Kuchler et al., 2018a; Kuchler et al., 2018b; Cunha et al., 2019).

Especificamente no presente estudo, por se tratar de pesquisa envolvendo discriminação alélica, foi utilizada a técnica específica proposta por Ranade et al. (2001), a qual consiste na utilização de sondas fluorescentes alelo-específicas, que combinam as etapas de amplificação e detecção dos alelos em uma única etapa. A fluorescência é medida durante a reação de PCR e os genótipos inferidos a partir desses valores. Desta forma, o método Taqman elimina viés por erros interpretativos, uma vez que os genótipos são gerados de maneira automática, ou seja, sem interferência humana. Apesar dessas vantagens, esta é uma técnica onerosa por ser indispensável o uso de um equipamento especial para detecção de fluorescências em diferentes comprimentos de onda, além do alto custo das sondas (Ranade et al., 2001).

O presente estudo teve como objetivo avaliar se existe associação entre variantes genéticas em *IGF2R* com TMF e ME. O *IGF2R* é o gene que codifica o receptor do *IGF2* e, desta forma, no presente trabalho optou-se por avaliar variações genéticas nesse gene. Essa mesma abordagem de seleção de genes candidatos para o crescimento da maxila e da mandíbula foi utilizada anteriormente (Xue et al., 2010; Jang et al., 2010; Tassopoulou-Fishell et al., 2012; Xue et al., 2014; Guan et al., 2015; Perillo et al., 2015; da Fontoura et al., 2015; Cruz et al., 2017; Chen et al., 2015), como no caso do hormônio do crescimento (GH), onde polimorfismos genéticos no Receptor do Hormônio do Crescimento (GHR) foram selecionados e associados com alterações dimensionais, sejam elas discrepâncias maxilo-mandibulares (Cruz et al., 2017), variações na altura mandibular (Yamaguchi et al., 2001;

Zhou et al., 2005; Kang et al., 2012; Tomoyasu et al., 2009) ou também reduções tanto na altura facial inferior bem como no comprimento mandibular (Bayram et al., 2014).

Cabe aqui ressaltar que o *IGF2R* não foi avaliado anteriormente com TMF e ME, porém é um gene candidato por atuar no metabolismo de ossos e cartilagens (Kang et al., 2012; Uchimura et al., 2017). Pesquisas anteriores também já associaram diferentes genes candidatos (*PAX5*, *SNAI3*, *MYO1H*, *TWIST1*, *PAX7*, *FGFR2*, *EDN1*, *TBX5*, *COL1A1*, *RANKL*, *ACTN3* e *MYO1H*) com TMF (da Fontoura et al., 2015, Kuchler et al., 2018, Cunha et al., 2019). Além disso, estudos prévios envolvendo análise genética em populações humanas evidenciaram associação tanto do prognatismo mandibular com outros cromossomos como 1, 3, 5, 11, 12 e 19 (Yamaguchi et al., 2005; Frazier-Bowers et al., 2009; Li et al., 2011), quanto do retrognatismo (Cruz et al., 2011). Além disso, não somente cromossomos, mas inclusive regiões cromossômicas específicas (loci 1p36, 1q32.2, 1p22.3, 4p16.1, 6q25, 19p13, 14q24.3, 14q31.1 e 14q31.2) já foram considerados como de susceptibilidade ao prognatismo mandibular em populações asiáticas (Yamaguchi et al., 2005; Li et al., 2010; Li et al., 2011), sendo que genes propostos localizados nos loci acima citados como *EVC1*, *EVC2*, *LTBP2*, *TGF- β* e *MATN1* são, em sua maioria, associados com desenvolvimento esquelético e/ou com a formação cartilaginosa, assim como o gene candidato selecionado para o presente estudo.

Polimorfismos em *IGF2R* já foram associados com diversas outras condições, como osteosarcoma (Savage et al., 2006), peso ao nascimento (Adkins et al., 2010) e adenocarcinomas (Hoyo et al., 2010). No presente estudo, o polimorfismo rs2277071 em *IGF2R* foi o único polimorfismo associado com o aumento do risco de apresentar os tipos faciais Dolicofacial e Braquifacial, apenas na população de Ribeirão Preto - SP. Entretanto, como não foi possível observar essa associação nas demais populações, é possível que o presente resultado seja um falso positivo, onde estaria ocorrendo um erro do tipo I devido às múltiplas comparações.

Durante as buscas nas bases de dados utilizadas, não foram encontradas publicações prévias avaliando associações de polimorfismos genéticos em *IGF2R* com os diferentes tipos morfológicos faciais. Desta forma, como os resultados deste estudo são inéditos, há necessidade de estudos adicionais futuros, principalmente com o polimorfismo rs2277071 em *IGF2R*, para realização comparações entre os resultados obtidos, refutando ou corroborando os resultados observados no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Baseado na metodologia aplicada e nos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se concluir que:

- Não houve associação entre os genótipos e alelos para os polimorfismos rs2277071, rs6909681 e rs6920141 em *IGF2R* com as maloclusões esqueléticas.
- O polimorfismo rs2277071 em *IGF2R* foi associado com os tipos morfológicos faciais Dolicofacial e Braquifacial, na população de Ribeirão Preto - SP.
- Os polimorfismos rs6909681 e rs6920141 em *IGF2R* não apresentaram associação com os diferentes tipos morfológicos faciais, nas diferentes regiões estudadas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Adhikari K, Fuentes-Guajardo M, Quinto-Sanchez M, Chacon-Duque JC, Acuna-Alonzo V, Jaramillo C, et al. A genome-wide association scan implicates DCHS2, RUNX2, GLI3, PAX1 and EDAR in human facial variation. *Nature communications* 2016;1-11.

Adkins RM, Somes G, Morrison JC, Hill JB, Watson EM, Magann EF, et al. Association of Birth Weight With Polymorphisms in the *IGF2*, *H19*, and *IGF2R* Genes. *Pediatric Research* 2010;68:429–434.

Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, Konstantinidou AE. Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). *Molecular medicine reports* 2014;10: 579-584.

Al-Khafajia H, Noerd PR, Alkharobib H, Alhodhodia A, Meadea J, El-Gendya R, et al. A characteristic signature of insulin-like growth factor (*IGF*) axis expression during osteogenic differentiation of human dental pulp cells (hDPCs): Potential co-ordinated regulation of *IGF* action. *Growth Hormone & IGF Research* 2018; 42(43):14–21.

Antunes LAA, Machado CMC, Couto ACK, Lopes LB, Sena FC, Abreu FV, et al. A Polymorphism in the *MTRR* Gene Is Associated with Early Childhood Caries and Underweight. *Caries Res* 2017;51(2):102–8.

Bayram S, Basciftci FA, Kurar E. Relationship between P561T and C422F polymorphisms in growth hormone receptor gene and mandibular prognathism. *Angle Orthod* 2014; 84(5): 803–9.

Boguszewski CL. Genética Molecular do Eixo GH-*IGF1*. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2001;45(1):5-14.

Braulke T. Type-2 *IGF* receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res.* 1999;31(2-3):242-6.

Brito, JH. Fundamentos de embriologia bucodentária. 1^o ed. Porto Alegre/RS: Edipucrs, 1998.

Bronner F, Farach-Carson MC, Roach HI. Bone and Development. 6^a ed. Springer Science & Business Media, 2010.

Chen F, Li Q, Gu M, Li X, Yu J, Zhang Y-B. Identification of a Mutation in *FGF23* Involved in Mandibular Prognathism. *Sci Rep* 2015; 5: 11250.conditions. *Acta Odontol. Scand.* 1995;53(3):35-143.

Cruz RM e Oliveira SF. Análise genética de problemas craniofaciais – revisão da literatura e diretrizes para investigações clínico-laboratoriais (parte 1). *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2007;12(5):133-140.

Cruz RM, Hartsfield JK, Falcão-Alencar G, Koller DL, Pereira RW, Mah J, et al. Exclusion of Class III malocclusion candidate loci in Brazilian families. *J Dent Res* 2011;90(10):1202-5.

Cunha A, Nelson-Filho P, Maranon-Vasquez GA, Ramos AGC, Dantas B, Sebastiani AM, et al. Genetic variants in ACTN3 and MYO1H are associated with sagittal and vertical craniofacial skeletal patterns. *Archives of Oral Biology* 2019;97:85–90.

Czech MP. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 1989;59(2):235-238.

Da Fontoura CS, Miller SF, Wehby GL, Amendt BA, Holton NE, Southard TE, et al. Candidate Gene Analyses of Skeletal Variation in Malocclusion. *J Dent Res* 2015;94(7):913-20.

Durão AR, Pittayapat P, Rockenbach MIB, Olszewski R, Ng S, Ferreira AP, et al. Validity of 2D lateral cephalometry in orthodontics: a systematic review. *Prog Orthod* 2013; 14: 31.

Enlow DH. Crescimento facial. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 1993.

Frazier-Bowers S, Rincon-Rodriguez R, Zhou J, Alexander K, Lange E. Evidence of linkage in a Hispanic cohort with a Class III dentofacial phenotype. *J Dent Res* 2009; 88(1): 56–60.

Ganong WF. Review of medical physiology, 15ª ed. New Jersey, Prentice Hall International Inc, 1991; 210-86.

Grochowska R, Lundén A, Zwierzchowski L, Snochowski M, Oprzadek J. Association between gene polymorphism of growth hormone and carcass traits in dairy bulls. *Animal Science* 2001; 72:441-447.

Guan X, Song Y, Ott J, Zhang Y, Li C, Xin T, et al. The ADAMTS1 Gene Is Associated with Familial Mandibular Prognathism. *J Dent Res* 2015;94(9):1196-201.

Hoyo C, Schildkraut JM, Murphy SK, Chow WH, Vaughan TL, Risch V, et al. *IGF2R* polymorphisms and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* 2009;125:2673–2678.

Ikuta T, Inagaki Y, Tanaka K, Saito T, Nakajima Y, Bando M, et al. Gene polymorphism of β -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology*. 2015;103(1):66-74.

Jang JY, Park EK, Ryoo HM, Shin HI, Kim TH, Jang JS, et al. Polymorphisms in the Matrilin-1 gene and risk of mandibular prognathism in Koreans. *J Dent Res* 2010;89(11):1203-7.

Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* 1995;16:3-34.

Kang H, Sung J, Jung HM, Woo KM, Hong SD, Roh S. Insulin-like growth factor 2 promotes osteogenic cell differentiation in the parthenogenetic murine embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2012;18(3-4):331-41.

Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(6):430-49.

- Kjaer I. Human prenatal craniofacial development under normal and pathologic. Journal Acta Odontologica Scandinavica 1995;53: 135-143.
- Küchler EC, Dea Bruzamolín C, Ayumi Omori M, Costa MC, Antunes LS, Pecharki GD, et al. Polymorphisms in Nonamelogenin Enamel Matrix Genes Are Associated with Dental Fluorosis. Caries Res 2018a; 52(1-2): 1–6.
- Küchler EC, Nascimento MAD, Matsumoto MAN, Romano FL, da Silva RAB, Ayumi Omori M, Antunes LA, Antunes LS, da Silva LAB, Nelson-Filho P. Genetic polymorphism in RANK is associated with mandibular size. J Orthod. 2018b;45(3):157-162.
- Küchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LMF. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. J Appl Oral Sci 2012; 20(4): 467–71.
- Küchler EC, Tannure PN, Oliveira DSBd, Charone S, Nelson-Filho P, Silva RABd, et al. Polymorphisms in genes involved in enamel development are associated with dental fluorosis. Arch Oral Biol 2017; 76: 66–9.
- Leal-Guadarrama IL, Ochoa-Rojas MC, Méndez JD. Importancia clínica de los factores de crecimiento parecidos a la insulina. Gac Méd Méx 2003;139(6):589-600.
- Li Q, Li X, Zhang F, Chen F. The identification of a novel locus for mandibular prognathism in the Han Chinese population. J Dent Res 2011;90(1):53-7.
- Li Q, Zhang F, Li X, Chen F. Genome scan for locus involved in mandibular prognathism in pedigrees from China. PLoS One 2010; 5(9).
- Li Q, Zhang F, Li X, Chen F. Genome scan for locus involved in mandibular prognathism in pedigrees from China. Plos One 2010;5(9)1-4.
- Lips A, Antunes LS, Antunes LA, Abreu JGBd, Barreiros D, Oliveira DSBd, et al. Genetic Polymorphisms in DEFB1 and miRNA202 Are Involved in Salivary Human β -Defensin 1 Levels and Caries Experience in Children. Caries Res 2017; 51(3): 209–15.
- Liu F, Van der Lijn F, Schurmann C, Zhu G, Chakravarty MM, Hysi PG, et al. A Genome-Wide Association Study Identifies Five Loci Influencing Facial Morphology in Europeans. Plos Genet 2012;8(9):1-13.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice Carrying Null Mutations of the Genes Encoding Insulin-like Growth Factor I (*IGF-1*) and Type 1 *IGF* Receptor (*IGF1R*). Cell Press 1993; 75:59-72.
- Marotti JG, Furuyama R, Pigozzo M, Campos T, Laganá D. Amostragem em pesquisa clínica: Tamanho da amostra. Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo 2008(20): 186–94.
- Martinelli Jr. CE, Custódio RJ, Aguiar-Oliveira MH. Fisiologia do Eixo GH-Sistema *IGF*. Arq Bras Endocrinol Metab 2008;52(5):717-725.

- Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. Clin Orthop Relat Res. 1991;(263):30-48.
- Moore KL. Embriologia Clínica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.
- Moyers RE. Ortodontia. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.
- Nascimento MA, Sérvulo SS, Terada H, Romano FL, Nelson-Filho P, Küchler EC. Associação entre polimorfismo P561 no GHR e no prognatismo mandibular: revisão sistemática e metanálise. SBPqO- Brazilian Oral Research 2016.
- Ohazama A e Sharpe PT. Craniofacial Development and Growth in Polycystic Kidney Disease. In: Xiaogang L. Polycystic kidney disease. Australia: Codon publications; 2015. p.457-470.
- Ong K, Kratzsch J, Kiess W, Alspac study team, Costello M, Scott C et al. Size at Birth and Cord Blood Levels of Insulin, Insulin- Like Growth Factor I (*IGF-I*), *IGF-II*, *IGF*-Binding Protein-1 (*IGFBP-1*), *IGFBP-3*, and the Soluble *IGF-II*/ Mannose-6-Phosphate Receptor in Term Human Infants. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000;85(11):4266-69.
- Perillo L, Monsurrò A, Bonci E, Torella A, Mutarelli M, Nigro V. Genetic association of ARHGAP21 gene variant with mandibular prognathism. J Dent Res 2015;94(4):569-76.
- Petry CJ, Ong KK, Wingate DL, Brown J, Scott CD, The Alspac Study Team, et al. Genetic variation in the type 2 insulin-like growth factor receptor gene and disparity in childhood height. Growth Hormone & *IGF* Research 2005;15: 363–368.
- Pinzan A, Garib DG, Sanches FSH, Pereira SCC. Crescimento e desenvolvimento craniofacial. In: Janson G, Garib DG, Pinzan A, Henriques JFC, Freitas MR. Introdução a Ortodontia. São Paulo: Artes Médicas Ltda; 2013. p.11-22.
- Quillez J, Guilmatre A, Garg P, Highnam G, Gymrek M, Erlich Y, et al. Polymorphic tandem repeats within gene promoters act as modifiers of gene expression and DNA methylation in humans. Nucleic Acids Res 2016;44(8):3750–3762.
- Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. Genome Res 2001;11:1262-68.
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. Nature 2000; 405(6788): 847–56.
- Sadler TW. Longman's Medical Embryology. 9ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2010.
- Sasaki Y, Satoh K, Hayasaki H, Fukumoto S, Fujiwara T, Nonaka K. The P561T polymorphism of the growth hormone receptor gene has an inhibitory effect on mandibular growth in young children. Eur J Orthod 2009;31(5):536-41.
- Savage SA, Modi W, Douglass C, Hoover RN, Chanock SJ. Identification of a haplotype block in *IGF2R* associated with increased risk For osteosarcoma. Proc Amer Assoc Cancer Res 2006;47.

Silva Filho OG, Garib DG, Lara TS. Ortodontia Interceptiva: Protocolo de Tratamento em Duas Fases. São Paulo: Ed. Artes Médicas; 2015. Cap.6, p.156-190

Solheim E. Growth factors in bone. *International Orthopaedics* 1998;22:410-6.

Spalding PM. Craniofacial Growth and development: current understanding and clinical considerations. In: Miloro M. et al. *Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery*. London: B.C. Becker Inc; 2004. p.1051-1086.

Tassopoulou-Fishell M, Deeley K, Harvey EM, Sciote J, Vieira AR. Genetic variation in myosin 1H contributes to mandibular prognathism. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012; 141(1): 51-9.

Todorova-Plachiyska KG, Stoilova-Todorova MG. Lateral Cephalometric Study in Adult Bulgarians with Normal Occlusion. *Folia Med (Plovdiv)* 2018; 60(1): 141-6.

Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Inoue I, Maki K. Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor gene in a Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009; 136(4): 536-41.

Uchimura T, Hollander JM, Nakamura DS, Liu Z, Rosen CJ, Georgakoudi I, Zeng L. An essential role for *IGF2* in cartilage development and glucose metabolism during postnatal long bone growth. *Development* 2017;144(19):3533-3546.

Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(4):1828-32.

Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJL. Intrauterine growth retardation and post natal growth failure associated with deletion of the insulin - like growth factor 1 gene. *The New England Journal of Medicine* 1996;335(18):1363-1367.

Xue F, Rabie AB, Luo G. Analysis of the association of *COL2A1* and *IGF-1* with mandibular prognathism in a Chinese population. *Orthod Craniofac Res* 2014;17(3):144-9.

Xue F, Wong R, Rabie AB. Identification of SNP markers on 1p36 and association analysis of EPB41 with mandibular prognathism in a Chinese population. *Arch Oral Biol* 2010;55(11):867-72.

Yamaguchi T, Maki K, Shibasaki Y. Growth hormone receptor gene variant and mandibular height in the normal Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001; 119(6): 650-3.

Yamaguchi T, Park SB, Narita A, Maki K, Inoue I. Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patients. *J Dent Res* 2005; 84(3): 255-9.

Zhou J, Lu Y, Gao XH, Chen YC, Lu JJ, Bai YX, et al. The growth hormone receptor gene is associated with mandibular height in a Chinese population. *J Dent Res* 2005; 84(11): 1052-6.

ANEXO

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre polimorfismos genéticos e alterações no perfil esquelético facial

Pesquisador: Mariele Andrade do Nascimento

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 50765715.3.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.338.841

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa em questão pretende analisar a associação entre polimorfismos genéticos e alterações no padrão esquelético facial. Pacientes em tratamento ortodôntico na clínica de especialização de Ortodontia/Ortopedia da FORP-USP, com idade superior a oito anos, serão incluídos nesse estudo. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pacientes ou por seus responsáveis, a determinação do fenótipo do padrão esquelético facial será realizada por meio de teleradiografias, usando referências cefalométricas da mandíbula, da maxila e da base do crânio. Será realizada a coleta da saliva como fonte de material biológico para a extração de DNA. A genotipagem dos genes candidatos será realizada por PCR em tempo real/ Taqman. Os dados serão tabulados e analisados no programa Epi Info 7.0 e no software Plink. Todos os polimorfismos serão avaliados para verificar se estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher serão utilizados para avaliar se algum alelo ou genótipo está preferencialmente associado com algum padrão esquelético facial específico. O nível de significância adotado será de 5%. A temática proposta é original e importante para a área da saúde humana. O projeto está bem estruturado, com revisão bibliográfica adequada, pertinente ao tema e atualizada. Os pesquisadores apresentam formação

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP**

Continuação do Parecer: 1.338.841

acadêmica adequada para desenvolver o projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Polimorfismos genéticos participam da etiologia dos diversos Padrões Esqueléticos Faciais.

Objetivo Primário:

Avaliar a associação entre polimorfismos genéticos e alterações fenotípicas nos Padrões Esqueléticos Faciais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto apresenta riscos mínimos, relacionados com possíveis desconfortos como cuspir e ocupar um pouco o tempo do paciente.

Benefícios:

Os participantes da pesquisa não terão ganhos diretos com os resultados da mesma, mas terão como benefício orientação sobre técnica de higiene bucal, limpeza.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP. Os pesquisadores são habilitados para execução do mesmo. Relevante para a área da saúde. Bem embasado cientificamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 186ª Reunião Ordinária do CEP, realizada em 25/11/2015.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_606659.pdf	04/11/2015 20:14:36		Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP**

Continuação do Parecer: 1.338.841

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProejtoDetalhado.docx	03/11/2015 22:12:09	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	03/11/2015 22:06:39	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEparamenores.doc	03/11/2015 22:04:46	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimento.doc	03/11/2015 21:56:07	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaodainfraestruturaLab.pdf	28/10/2015 15:47:59	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
Folha de Rosto	Fohaderosto.pdf	28/10/2015 14:30:24	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	20/10/2015 13:17:51	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaodainfraestruturaClinica.pdf	20/10/2015 12:33:27	Mariele Andrade do Nascimento	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Novembro de 2015

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Resolução 466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Eu, Alice Gomes de Carvalho Ramos, doutoranda da Universidade de São Paulo (FORP/USP) DINTER, responsável pelo projeto “**ASSOCIAÇÃO ENTRE TIPOS MORFOLÓGICOS FACIAIS E MALOCCLUSÕES ESQUELÉTICAS COM VARIAÇÕES GENÉTICAS EM IGF2R.**”, convido você

_____, a participar do referido projeto de pesquisa, que será realizado sob orientação do Prof. Dr. Paulo Nelson Filho na Faculdade do Amazonas (IAES-AM). Este termo consta 2(duas) vias idênticas, as quais serão assinadas por todos os pesquisadores e por você, participante da pesquisa. Uma via ficará com você e a outra será arquivada pelo pesquisador.

Este trabalho tem como objetivo avaliar se a genética tem associação com o tipo de face (rosto) dos pacientes que estão em tratamento na especialização de ortodontia da Faculdade do Amazonas (IAES-AM). Para tanto, será necessário que o paciente faça um bochecho com soro fisiológico e depois cuspa. Com esta saliva avaliaremos a genética do paciente e o tipo facial será avaliado pela documentação ortodôntica que o paciente já possui.

Você e o participante de pesquisa virão a Clínica do IAES-AM, para atendimento ortodôntico e será coletada a saliva no dia da consulta. Você está sendo esclarecido que esta pesquisa pode oferecer incômodos, como desconforto ao cuspir e aumento de permanência na Faculdade no dia da consulta ao ortodontista.

Os participantes da pesquisa não terão ganhos diretos com os resultados da mesma, mas terão como benefício orientação sobre técnica de higiene bucal. A participação de vocês nesta pesquisa é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer vários benefícios à ciência e ajudar outras pessoas. Não será oferecido nenhum tipo de pagamento pela participação de vocês na pesquisa, e todo o atendimento ao participante da pesquisa será gratuito. A sua identidade, bem como a do participante da pesquisa serão mantidos em segredo, mas participando da pesquisa você autoriza que os resultados obtidos sejam divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo) que garantem a privacidade de vocês.

Você terá total liberdade para pedir maiores esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento da pesquisa.

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Alice Gomes de Carvalho Ramos – Avenida Maceió, 861 – Faculdade do Amazonas- IAES-AM).

Rubrica do participante

Rubrica do pesquisador

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Alice Gomes de Carvalho Ramos – Avenida Maceió, 861 – Faculdade do Amazonas- IAES-AM. – Tel:(92) 3584-6066. Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à secretaria do IAES-AM (92) 3584-6066 - Horário de atendimento das 8h às 12h, de segunda a sexta-feira, devendo conter seu nome , o qual será mantido em sigilo. A participação de vocês não é obrigatória, e vocês poderão desistir a qualquer momento, retirando sua autorização. A não autorização para participação neste trabalho não trará nenhum prejuízo a vocês, bem como a sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade do Amazonas - IAES.

Eu _____, portador do RG _____,
CPF _____, residente a _____,
número _____, na cidade de _____ no Estado _____, Telefone
_____, declaro que li, compreendi e concordo com o presente Termo. Por isso,
assino este documento de livre e espontânea vontade.

Manaus, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do participante da pesquisa

Alice Gomes de Carvalho Ramos
CPF: 744.649.142.68
Pesquisador responsável.

Prof. Dr. Paulo Nelson Filho
CPF: 156.200.398-46
Pesquisador Orientador.

APÊNDICE B - Termo de Assentimento

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você, _____ está sendo convidado (a) por mim, Alice Gomes de Carvalho Ramos, doutoranda da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (DINTER), responsável pelo projeto **“ASSOCIAÇÃO ENTRE TIPOS MORFOLÓGICOS FACIAIS E MALOCCLUSÕES ESQUELÉTICAS COM VARIAÇÕES GENÉTICAS EM *IGF2R*.”**, a concordar em participar da pesquisa. Este papel tem duas vias idênticas (folhas iguais), que será assinada por você, pelo seu responsável legal e por mim. Uma via (folha) ficará com você e a outra será guardada por mim.

Esta pesquisa quer saber se o formato do seu rosto tem relação com a genética. Nós vamos analisar o formato do seu rosto pela documentação ortodôntica (pasta que fez para colocar aparelho) que já possui e as genéticas serão identificadas através da sua saliva.

Você e o seu responsável legal virão à Clínica de Especialização para atendimento ortodôntico (que cuida dos dentes desalinhados, colocando aparelho) e no mesmo dia será coletada saliva, se assim permitirem. Se você quiser participar deste projeto de pesquisa, seu responsável também terá que concordar. Mas se você não quiser, mesmo que seu responsável concorde, você poderá falar que não quer. Você pode conversar com seu responsável antes de decidir se quer ou não participar. Pode ter algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais, porque você ficou interessado ou preocupado. Por favor, peça que eu pare, a qualquer momento, e explique novamente. Ninguém ficará bravo com você se você disser não: a escolha é sua.

Esta pesquisa não machuca, não causa dor e não causa danos. Poderá haver apenas o desconforto durante a coleta da saliva, que terá que cuspir. A sua participação é muito importante, pois os resultados encontrados poderão trazer vários benefícios à ciência e ajudar outras pessoas. O seu nome, bem como o do seu responsável serão mantidas em segredo, mas participando da pesquisa você autoriza que os resultados obtidos sejam divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo) que garantem a privacidade de vocês.

Se tiver alguma dúvida poderá ligar para o pesquisador para pedir qualquer informação (Alice Gomes de Carvalho Ramos – Avenida Maceió, 861 – Faculdade do Amazonas- IAES-AM. – Tel: (92) 3584-6066). Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à secretaria do IAES-AM (92- 3584-6066 - Horário de atendimento das 8h às 12h e de 14h às 18h de segunda a sexta-feira), devendo conter seu nome que será mantido em sigilo.

Manaus, ____ de _____ de 20____.

Nome do responsável legal:_____.

Assinatura e CPF:_____.

Nome da criança ou adolescente:_____.

Assinatura:_____.

Alice Gomes de Carvalho Ramos

CPF:744.649.142.68

Pesquisadora responsável