**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

MELISSA LANCIA

**Estudo de associação entre polimorfismo genético e os fenótipos
fissura labiopalatina e agenesia dentária não sindrômicas**

**BAURU
2014**

MELISSA LANCIA

**Estudo de associação entre polimorfismo genético e os fenótipos
fissura labiopalatina e agenesia dentária não sindrômicas**

Dissertação apresentada ao Hospital de
Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e
Anomalias Relacionadas
Orientadora: Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves

**BAURU
2014**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

Rua Silvio Marchione, 3-20

Caixa Postal: 1501

17012-900 – Bauru – SP – Brasil

Telefone: (14) 3235-8000

Prof. Dr. Marco Antônio Zago – Reitor da USP

Dra. Regina Célia Bortoleto Amantini – Superintendente do HRAC/USP

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial desta Dissertação.

Melissa Lancia

Bauru, ____ de _____ de 2014.

Lancia, Melissa

L225e Estudo de associação entre polimorfismo genético e os fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária não sindrômicas / Melissa Lancia. Bauru, 2014. 92p.; il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado – Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas) – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves

1. Fissura palatina. 2. Fenda labial. 3. Anodontia. 4. Genética. 5. Polimorfismo de nucleotídeo único.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Melissa Lancia

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves - Orientadora

Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP

Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - USP

Profa. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC/USP

Data de depósito da dissertação junto à SPG: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

*A todos os **pacientes, voluntários e familiares** que gentilmente colaboraram
para que esse trabalho se tornasse possível.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela bondade em todos os momentos da minha vida, por ter me proporcionado saúde para que pudesse alcançar meus sonhos e pela perseverança para superar as dificuldades.

À **minha família** por todo apoio, incentivo, carinho e tanta dedicação durante todos esses anos.

À minha **orientadora Profa. Lucimara Teixeira das Neves**, por contribuir em meu crescimento pessoal e profissional, e pela confiança depositada para realização deste trabalho, obrigada pelos ensinamentos.

Ao **Prof. Carlos Ferreira dos Santos**, por ter me recebido no Departamento de Ciências Biológicas, obrigado por proporcionar a oportunidade de convivência no laboratório.

À **Thaís Francine Garbieri e Thiago José Dionísio** por me receberem no laboratório e pelo suporte na metodologia, a realização do trabalho sem vocês não seria possível, obrigada pelo apoio, dedicação, amizade e por estarem juntos.

À **Profa. Terumi Okada Ozawa**, diretora da Divisão Odontológica, pela cordialidade com que sempre recebe os alunos e pelo seu empenho em sempre fazer com que o setor assim como todos que passam por lá, cresçam cada vez mais. Obrigada por proporcionar a oportunidade de convivência no setor odontológico durante a etapa clínica da pesquisa.

À **Profa. Daniela Gamba Garib e Profa. Rita de Cássia Moura Carvalho Lauris**, pela serenidade e por tornar mais iluminado os dias de todos que passam pelo setor. Obrigada por todo apoio e incentivo, o exemplo de vocês é sempre inspirador.

A todos os **professores e profissionais do Setor de Ortodontia do HRAC-USP, Adriano, Aiello, Arlete, Araci, Renata, Rita, Rogério, Sílvia, Tiago**, que cumprem a missão de reabilitar, vocês são exemplos inspiradores, obrigada por terem me recebido mais uma vez sempre me ajudando e incentivando com apoio incondicional. Em especial à **Gleisieli Baessa Cardoso** pelo apoio e colaboração na coleta das amostras.

Aos **residentes e auxiliares representados pela, Denise, Leila, Rô, Sol, Soninha, Suzana**, por me receberem mais uma vez de coração aberto e por toda a atenção e disposição, sempre colaborando para a realização deste trabalho.

Ao **setor de Radiologia do HRAC-USP, representado pela Isabel, Bruna, Carlos e Otávio** pelo constante suporte para triagem e que estiveram sempre dispostos a ajudar.

A todos os **professores, funcionários e alunos do Departamento de Ortodontia da FOB-USP**, por terem me recebido com tanta cordialidade e sempre terem me apoiado na etapa de coleta das amostras.

Aos **alunos de Graduação e Pós-Graduação de Odontologia da FOB-USP e Pós-Graduação do HRAC-USP** pela colaboração, disposição e ajuda na coleta das amostras.

Aos **professores do Curso da Profis, Prof. Flávio e Profa. Celeste**, por terem me recebido mais uma vez, agradeço toda cordialidade e atenção com que me receberam para coleta das amostras.

A todos os **voluntários, pacientes e familiares**, vocês são a razão de nossas pesquisas, obrigada pela confiança, prontidão e colaboração em participar deste trabalho para que este estudo se tornasse possível.

Aos amigos de Bauru e colegas da Pós-Graduação, **Nathália, Maria Eugênia, Priscila, Juliana, Flávia, Marco, Túlio Olano**, pela amizade e companheirismo, a convivência com vocês é sempre um presente.

À equipe do programa de Pós-Graduação, **Mazé, Rogério, Andréia e Tatiana**, por me atender sempre com muita simpatia e carinho.

Ao **Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Centrinho**, representado pela Dra. Regina Amantini.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a conclusão desse trabalho e que porventura não foram relacionados.

Muito obrigada!

RESUMO

Lancia M. Estudo de associação entre polimorfismo genético e os fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária não sindrômicas [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2014.

A fissura labiopalatina é considerada a anomalia craniofacial mais comum nos seres humanos e em relação à cavidade bucal a agenesia dentária se apresenta mais prevalente em indivíduos com fissuras labiopalatinas do que na população em geral. Esses fenótipos são decorrentes de alterações do desenvolvimento embrionário e tem sido apontado que a função anormal de alguns genes que possuem papel na formação craniofacial e dentária poderia estar relacionada à etiologia desses fenótipos. Dentre os genes candidatos para esses fenótipos têm se destacado o *MSX1* entre outros. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a associação entre o polimorfismo no gene *MSX1* (rs12532) com os fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária não sindrômicas isolados ou em associação. A amostra foi composta por 222 indivíduos divididos em 4 grupos: grupo 1, fissura completa de lábio e palato unilateral e agenesia de pré-molares; grupo 2, fissura completa de lábio e palato unilateral sem agenesia dentária; grupo 3, agenesia de pré-molares sem fissura e grupo 4, controle (sem agenesia e sem fissura). Foi realizada a extração do DNA genômico a partir da saliva coletada dos indivíduos. A genotipagem do polimorfismo no gene *MSX1* (rs12532) foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) utilizando o ensaio *TaqMan* (Applied Biosystems). O teste do qui-quadrado ($p < 0,05$) e o cálculo da razão de chances (IC=95%) foram utilizados na análise estatística. O polimorfismo no gene *MSX1* esteve associado aos indivíduos dos grupos com agenesia associada à fissura e agenesia isolada, porém não houve associação para os indivíduos do grupo com fissura isolada. Os resultados sugerem que o polimorfismo no gene *MSX1* (rs12532) exerce um papel na suscetibilidade das agenesias dentárias na população brasileira em indivíduos com e sem fissura.

Palavras-chave: Fissura palatina. Fenda labial. Anodontia. Polimorfismo de nucleotídeo único.

ABSTRACT

Lancia M. Study of association between a genetic polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate and tooth agenesis phenotypes [dissertation]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2014.

Cleft lip and palate is considered the most common craniofacial anomaly in humans, and in relation to the oral cavity, tooth agenesis is significantly more prevalent in individuals with cleft lip and palate when compared to the general population. Cleft lip and palate and tooth agenesis phenotypes are caused by changes in embryonic development, and it has been suggested that abnormal function of genes that play a role in craniofacial and tooth formation could be related to the etiology of these phenotypes. Among the candidate genes for these phenotypes, *MSX1* has been highlighted. The aim of this study was to investigate the association between the *MSX1* gene polymorphism (rs12532) with nonsyndromic cleft lip and palate and tooth agenesis phenotypes isolated or in association. The sample was comprised of 222 individuals divided into 4 groups: group 1, unilateral complete cleft lip and palate and premolar agenesis; group 2, unilateral complete cleft lip and palate without any tooth agenesis; group 3, premolar agenesis without cleft and group 4, a control group without tooth agenesis or cleft. Genomic DNA extraction was performed from the saliva collected from the individuals. Genotyping of the *MSX1* gene polymorphism (rs12532) was carried out by real-time polymerase chain reaction, (real-time PCR) using the *TaqMan* assay (Applied Biosystems). The chi-square ($p < 0.05$) and odds ratio tests (CI=95%) were performed for statistical analyses. The *MSX1* polymorphism was associated with cleft lip and palate with tooth agenesis and isolated tooth agenesis groups, but no association was found between the polymorphism and isolated cleft lip and palate group. This suggests that *MSX1* gene polymorphism (rs12532) plays a role in the susceptibility for tooth agenesis in the Brazilian population with and without cleft lip and palate.

Keywords: Cleft palate. Cleft lip. Hypodontia. Genetics. Polymorphism, single nucleotide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Radiografia panorâmica ilustrando as características da fissura completa de lábio e palato unilateral e agenesia do dente pré-molar	38
Figura 2 -	Radiografia panorâmica ilustrando a fissura completa de lábio e palato unilateral sem a presença de agenesia	38
Figura 3 -	Radiografia panorâmica ilustrando agenesia do dente pré-molar sem a presença da fissura	39
Figura 4 -	Espectrofotômetro (NanoDrop 1000) utilizado para avaliar a pureza e concentração do DNA extraído	44
Figura 5 -	Termociclador utilizado para a reação da PCR em Tempo Real (Viia 7)	46
Figura 6 -	Exemplos de genótipos heterozigotos e homozigotos obtidos pelo método <i>TaqMan</i> para o polimorfismo rs12532 (<i>MSX1</i>). A) Exemplo de uma amostra homozigota para a sonda VIC. B) Representação de uma amostra homozigota para a sonda FAM. C) Exemplo de uma amostra heterozigota - dois tipos de sonda estão representados VIC e FAM.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características da população estudada para o gene <i>MSX1</i> (n=222).....	51
Tabela 2 -	Comparação da distribuição dos alelos e genótipos do gene <i>MSX1</i> (rs12532) entre indivíduos com fissura com agenesia e controle	52
Tabela 3 -	Comparação da distribuição dos alelos e genótipos do gene <i>MSX1</i> (rs12532) entre indivíduos com fissura isolada e controle....	53
Tabela 4 -	Comparação da distribuição dos alelos e genótipos do gene <i>MSX1</i> (rs12532) entre indivíduos com agenesia isolada e controle	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µl	microlitro
3'-UTR	Do inglês, <i>Three prime untranslated region</i>
AXIN2	Do inglês, <i>Axis Inhibition protein 2</i>
CPD	Central de processamento de dados
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
g	Força g/ força gravitacional
HCL	Ácido clorídrico
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IRF6	Do inglês, <i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
M	Molar
ml	mililitro
MSX1	Do inglês, <i>Muscle segment homeobox 1</i>
nm	nanômetro
PAX9	Do inglês, <i>Paired box gene 9</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVRL1	Do inglês, <i>Poliovirus Receptor like-1</i>
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Do inglês, <i>Single nucleotide polymorphism</i>
TGFA	Do inglês, <i>Transforming growth fator alfa</i>
TGFB3	Do inglês, <i>Transforming growth fator beta 3</i>
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	PREVALÊNCIA E ETIOLOGIA DAS FISSURAS LABIOPALATINAS.....	15
1.2	AGENESIAS DENTÁRIAS EM PACIENTES COM FISSURAS LABIOPALATINAS.....	19
1.2.1	Na área da fissura	19
1.2.2	Fora da área da fissura.....	21
1.3	GENÉTICA NO DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL E DENTÁRIO	24
1.3.1	O Gene <i>MSX1</i>	24
2	PROPOSIÇÃO	31
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
3.1	CASUÍSTICA	37
3.2	CRITÉRIOS APLICADOS NO ESTUDO.....	40
3.2.1	Critérios de inclusão	40
3.2.2	Critérios de exclusão.....	40
3.3	TRIAGEM E SELEÇÃO DOS GRUPOS AMOSTRAIS	41
3.4	MÉTODOS.....	42
3.4.1	Coleta de saliva.....	42
3.4.2	Extração do DNA.....	43
3.4.2.1	<i>Protocolo de extração de DNA utilizando acetato de amônio</i>	<i>43</i>
3.4.3	Quantificação e qualificação do DNA	44
3.4.5	Genotipagem.....	45
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4	RESULTADOS	49
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	51
4.2	RESULTADOS DA GENOTIPAGEM	52
5	DISCUSSÃO	55
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	57
5.2	ANÁLISE MOLECULAR	60
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS.....	85

*1 INTRODUÇÃO E
REVISÃO DE LITERATURA*

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PREVALÊNCIA E ETIOLOGIA DAS FISSURAS LABIOPALATINAS

Dentre as malformações craniofaciais, as fissuras labiopalatinas são consideradas as mais comuns e acometem aproximadamente 1 a cada 1000 nascimentos no mundo, com uma prevalência que varia de 1/500 a 1/2500 nascimentos, com grande variabilidade entre as etnias e áreas geográficas (CROEN et al., 1998; SCHUTTE; MURRAY, 1999; MURRAY, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). A prevalência maior ocorre nas populações ameríndia e asiática com 1/500 nascimentos, e decresce na população caucasiana a qual apresenta uma prevalência intermediária de 1/1000, seguida da população afrodescendente de 1/2500 (CROEN et al., 1998; MURRAY, 2002; DIXON et al., 2011).

Essas malformações se estabelecem precocemente, ainda na vida intrauterina em decorrência da falha na fusão dos processos faciais embrionários e dos processos palatinos (SILVA FILHO; SOUZA FREITAS, 2007; MOORE; PERSAUD, 2008). Em um desenvolvimento normal, a fusão dos processos faciais embrionários ocorre entre a 4ª e a 8ª semana de gestação no período embrionário (MOORE; PERSAUD, 2008). Dessa forma, por meio de uma sequência genética de eventos, ocorrerá a fusão dos processos mandibulares (SILVA FILHO; SOUZA FREITAS, 2007; MOORE; PERSAUD, 2008), seguida da formação do palato primário a qual ocorrerá por meio da fusão dos processos nasais mediais (segmento intermaxilar) que, ao se fusionarem com os processos maxilares e com os processos nasais laterais, formarão o lábio superior e a face (DIEWERT; SHIOTA, 1990; TEN CATE, 2001; ALAPPAT; ZHANG; CHEN, 2003; SILVA FILHO; SOUZA FREITAS, 2007; MOORE; PERSAUD, 2008). A formação do palato secundário se inicia por volta da 7ª e 8ª semana, por meio da fusão dos processos palatinos os quais crescem inicialmente no sentido vertical em cada lado da língua e após o abaixamento desta, estes se horizontalizam e se fusionam entre si e com o palato primário (ALAPPAT; ZHANG; CHEN, 2003; TEN CATE, 2001; MOORE; PERSAUD, 2008) completando sua formação até a 12ª semana (MARAZITA, 2012; MOORE; PERSAUD, 2008).

Dessa forma, o desenvolvimento embrionário craniofacial se apresenta como um processo complexo guiado por uma cascata de eventos moleculares. Alterações genéticas e fatores ambientais separadamente ou em conjunto podem desestabilizar toda a sinalização de eventos esperados e resultar em anormalidades nas estruturas orofaciais (KOUSKOURA et al., 2011).

As fissuras de palato isoladas e as fissuras de lábio acompanhadas ou não das de palato têm sido reconhecidas como fenótipos distintos (FOGH-ANDERSEN, 1942 apud FRASER, 1970) em relação a sua etiologia e desenvolvimento, em vista das diferenças genéticas e fatores ambientais existentes (FRASER, 1970; CARINCI et al., 2007; GROSEN et al., 2011), assim como padrões de herança em famílias desses grupos e dados epidemiológicos os quais se apresentam de formas distintas (FRASER, 1970). As primeiras evidências de diferenças genéticas surgiram quando em estudos em famílias foi observado que houve maior recorrência das fissuras de lábio acompanhadas ou não das de palato em irmãos para esse mesmo tipo de fissura, porém não para as de palato isoladas e vice-versa (FOGH-ANDERSEN, 1942 apud FRASER, 1970; FRASER, 1970). A literatura tem reportado diferenças genéticas entre esses tipos de fenda (CARINCI et al., 2007; MARAZITA et al., 2009) e a consideração dos diversos tipos de fissura de forma distinta tem sido apontada como uma pista para melhor compreender sua etiologia (MOSSEY; LITTLE, 2002; MARAZITA et al., 2009).

A maioria das fissuras é considerada como não sindrômica, ou seja, isolada e em sua minoria é denominada sindrômica quando acompanhada de outras anomalias (JONES, 1988; SCHUTTE; MURRAY, 1999; DIXON et al., 2011), as quais são mais raras (SCHUTTE; MURRAY, 1999). Diversas síndromes como a van der Woude, entre outras, apresentam as fissuras labiopalatinas como parte do quadro clínico para diagnóstico da síndrome (DESHMUKH et al., 2014) e as fissuras de palato isoladas se apresentam mais prevalentes e mais propensas a estarem associadas a outras anomalias congênitas do que as de lábio acompanhadas ou não das de palato (JONES, 1988; GORLIN; COHEN JÚNIOR; HENNEKAM, 2001; MARAZITA, 2012; WATKINS et al., 2014). Geralmente, as fissuras sindrômicas apresentam etiologia decorrente de desordens genéticas, cromossômicas ou podem estar associadas a exposições de teratógenos específicos (FRASER, 1970;

MOSSEY, 1999; GORLIN; COHEN JÚNIOR; HENNEKAM, 2001; GARIB et al., 2010; WATKINS et al., 2014).

Entretanto, a etiologia das fissuras não sindrômicas apresenta um padrão de herança multifatorial (SCHUTTE; MURRAY, 1999; GARIB et al., 2010). Estudos têm demonstrado maior concordância entre gêmeos monozigóticos de 50% e 33% em relação aos gêmeos dizigóticos de 8% e 7% para as fissuras de lábio acompanhadas ou não das de palato e para as de palato isoladas respectivamente (GROSEN et al., 2011), além da ocorrência familiar da patologia, em decorrência de um mesmo fundo genético, relacionada aos indivíduos acometidos em diversas etnias (LIDRAL; MORENO, 2005), e maior risco de ocorrência desta entre familiares do que na população em geral (PALOMINO; GUZMÁN; BLANCI, 2000). Contudo, apesar de existir uma relevante predisposição genética relacionada com a etiologia das fissuras labiopalatinas isoladas (MURRAY, 2002; SILVA FILHO et al., 2011), a falta de concordância plena entre gêmeos monozigóticos, indica também a existência da provável influência de fatores ambientais na etiologia dessa malformação (MURRAY, 2002).

Vários genes relacionados à etiologia das fissuras sindrômicas têm sido analisados como candidatos para as fendas não sindrômicas (STANIER; MOORE, 2004; VIEIRA, 2008; KOHLI; KOHLI, 2012). Exemplos são os genes *PVRL1* e *IRF6* os quais são responsáveis por causar a síndrome da fissura lábio/palato e displasia ectodérmica, e de van der Woude, respectivamente. Estudos têm demonstrado que esses mesmos genes também contribuem na etiologia das fissuras isoladas ou não sindrômicas (KOHLI; KOHLI, 2012). Essas mutações presentes nos genes relacionados à fissura sindrômica podem contribuir aproximadamente em até 10% para as fissuras não sindrômicas, visto que podem compartilhar de alguns fatores genéticos comuns, dessa forma poderão conduzir para melhor entendimento das variações genéticas em novos genes candidatos ainda desconhecidos, bem como as suas implicações nas vias de sinalização e interações entre os mesmos (VIEIRA, 2003; STANIER; MOORE, 2004; VIEIRA, 2008).

Um grande número de genes e *loci* candidatos, não só os relacionados à etiologia das fissuras sindrômicas, já foram estudados e relacionados ou não às fissuras de lábio e/ou palato não sindrômicas em diferentes populações (VAN DEN BOOGAARD et al., 2000; JEZEWSKI et al., 2003; SLAYTON et al., 2003; LETRA et

al., 2012; PARANAÍBA et al., 2013). A seleção desses genes candidatos para os estudos é direcionada aos genes que possam se expressar no lábio e/ou palato em desenvolvimento, por intermédio dos estudos com modelos animais quando genes específicos são nocauteados, situação em que a função do gene é anulada, e como consequência os animais manifestam clinicamente esses fenótipos (KOUSKOURA et al., 2011).

A etiologia das fissuras labiopalatinas é considerada complexa e ainda carece de esclarecimentos. Apesar de mutações em genes candidatos terem sido identificadas numa determinada porcentagem de casos indicando um risco das fissuras associado aos fatores genéticos, ressalta-se também a existência da influência ambiental na etiologia dessa malformação, com maior atenção para ingestão de álcool, tabagismo e dieta (BEATY et al., 2011; KOHLI; KOHLI, 2012).

Em relação à interferência dos fatores teratogênicos na ocorrência das fissuras, considera-se como período crítico, aquele que compreende a fase embrionária e início do período fetal, levando-se em conta conjuntamente a dose e o tempo de exposição ao teratógeno (GORLIN; COHEN JÚNIOR; HENNEKAM, 2001).

Estudos de prevalência mostram que o tabagismo materno, representa um fator de risco importante, uma vez que mães fumantes apresentam maiores chances de ter um filho com fissura (WYSZYNSKI; BEATY, 1996). A relação entre tabagismo maternal e fissuras também é considerada relevante quando o tabagismo está associado a um quadro genético positivo com a constatação de genótipos predisponentes, dessa forma a relação entre esses dois fatores concomitantemente pode representar maior significância (KOHLI; KOHLI, 2012). Recentemente, foram descobertas possíveis interações entre exposições maternas ao tabagismo, consumo de álcool, suplementação vitamínica e diferentes genótipos no gene *TGFA* para o fenótipo de fissura em humanos (SULL et al., 2009). Também foi relatada a possibilidade de interações entre o tabagismo maternal em conjunto com o gene *MSX1* no aumento do risco das fissuras (MURRAY, 2002). Em relação à exposição ao álcool, estudos moleculares também evidenciam que o consumo deste aumenta o risco de fissuras quando a predisposição genética está presente (BEATY et al., 2011).

As interações gene-gene e gene-ambiente podem desempenhar um papel determinante na ocorrência desta patologia (WYSZYNSKI; BEATY, 1996;

JUGESSUR et al., 2003; BEATY et al., 2011), dessa forma, estudos epidemiológicos e moleculares podem auxiliar na compreensão de influências específicas, dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e estabelecimento das fissuras (JEZEWSKI et al., 2003; BEATY et al., 2011).

1.2 AGENESIAS DENTÁRIAS EM PACIENTES COM FISSURAS LABIOPALATINAS

1.2.1 Na área da fissura

Em relação à cavidade bucal, as anomalias dentárias são mais prevalentes em indivíduos que apresentam fissuras labiopalatinas do que na população em geral (SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 2000; EERENS et al., 2001; STAHL; GRABOWSKI; WIGGER, 2006; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008), dentre elas as variações de número, tamanho e forma são comumente encontradas nesses indivíduos (RANTA, 1986; TSAI et al., 1998; RIBEIRO et al., 2003; VICHI; FRANCHI, 2005; STAHL; GRABOWSKI; WIGGER, 2006). A agenesia do incisivo lateral permanente na área da fissura tem sido encontrada com frequência para as fissuras de lábio e ou palato, com porcentagem em torno de 30% para as fissuras de lábio unilaterais (SUZUKI et al., 1992) e de 39,1% a 49,8% para fissuras completas de lábio e palato unilaterais (RIBEIRO et al., 2003; BARTZELA et al., 2013; YATABE et al., 2013), prevalência esta, muito superior a encontrada para incisivos laterais contralaterais à fenda nesse mesmo tipo de fissura a qual varia em torno de 8,7% a 10,9% (RIBEIRO et al., 2003; BARTZELA et al., 2013), e também superior a encontrada para a população em geral de 1,7% a 4,1% para incisivos laterais superiores (POLDER et al., 2004; SHOKRI et al., 2014). Ainda para esse mesmo tipo de fissura, os incisivos laterais, quando presentes, podem apresentar maior frequência à distal da fissura geralmente com formato conóide (RIBEIRO et al., 2003) em torno de 46%, à mesial em 1,5% ou em ambos os segmentos em 0,7%, sendo o segundo dente considerado como supranumerário (TSAI et al., 1998). Além disso, foi observado que a incidência de supranumerários tende a decrescer, enquanto a ocorrência da agenesia a aumentar conforme a complexidade da fissura (DAMANTE; SOUZA FREITAS; MORAES, 1973; RANTA, 1986). Ainda em

concordância com a importância do mesênquima na formação dentária na região da fenda, autores observaram um menor número de agenesias e maior número de supranumerários na área da fenda na primeira dentição o que poderia ser explicado por uma maior insuficiência mesenquimal na dentição permanente (TSAI et al., 1998).

Muitas hipóteses têm sido levantadas acerca das agenesias dos incisivos laterais na área da fissura as quais incluem fatores genéticos e locais (SEO et al., 2013), como a ocorrência destas por suprimento sanguíneo inadequado congênito, ou secundário às cirurgias reabilitadoras a qual parece ter menor relevância (VICHÍ; FRANCHI, 1995) ou deficiência no mesênquima nos processos faciais e efeito direto da fissura nos tecidos relacionados ao desenvolvimento dentário (VICHÍ; FRANCHI, 1995; TSAI et al., 1998; SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 2000).

A formação do germe dentário na área da fissura provavelmente pode ser influenciada pelos mesmos fatores que levam à ocorrência desta, pois embriologicamente ocorrem em condições têmporo-espaciais semelhantes (TSAI et al., 1998). Até o 37º dia (sexta semana) de gestação, já é possível distinguir o espessamento do epitélio dentário na borda inferior dos processos maxilares e nasais mediais se originando de forma independente (TEN CATE, 2001), porém somente alguns dias após a fusão dos processos é que ocorre a fusão do epitélio dentário (TEN CATE, 2001; HOVORAKOVA et al., 2006) que ao proliferar, origina os botões dentários, que progridem para as fases de capuz e sino durante a odontogênese (TEN CATE, 2001).

Diante da suposta origem dupla do incisivo lateral, alguns autores acreditam que dependendo do grau de deficiência do mesênquima tanto dos processos nasais mediais quanto dos maxilares, poderia ser explicado o aumento da frequência tanto das agenesias quanto dos laterais microdentos e supranumerários nessa região (TSAI et al., 1998; HOVORAKOVA et al., 2006; YATABE et al., 2013). Assim, uma deficiência mesenquimal mais severa de ambos os processos, poderia ocasionar fissuras mais extensas, assim como a agenesia do incisivo lateral. Por outro lado, esse dente poderia estar presente e localizado à distal ou mesial, e possivelmente até em ambos os processos, dependendo da localização da formação dos componentes dentários, em fissuras de menor extensão diante de uma insuficiência

tecidual menos severa (DAMANTE; SOUZA FREITAS; MORAES, 1973; TSAI et al., 1998; HOVORAKOVA et al., 2006).

1.2.2 Fora da área da fissura

A agenesia dentária se apresenta em maior prevalência em indivíduos com fissuras, tanto na área da fissura com ausência dos laterais (TSAI et al., 1998; BARTZELA et al., 2013), quanto fora desta com ausência dos pré-molares superiores (RANTA, 1986; SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 2000; RIBEIRO et al., 2003; MENEZES; VIEIRA, 2008). Essas anomalias dentárias fora da região da fenda, independente do elemento dentário acometido, ocorrem com maior frequência para as fissuras completas de lábio e palato, do que para as isoladas de lábio ou de palato (RANTA, 1986; SLAYTON et al., 2003), com prevalência em torno de 20% a 36% para as unilaterais (RIBEIRO et al., 2003; BARTZELA et al., 2013). Nos casos de fissuras de lábio e palato, depois dos incisivos laterais na área da fissura, dentre os dentes mais acometidos fora dessa região, estão os segundos pré-molares superiores com uma prevalência de 7,5% a 32,3%, seguidos dos incisivos laterais superiores contralaterais à fenda com prevalência de 3,1% a 10,4% e dos segundos pré-molares inferiores com prevalência de 0,4% a 10,8% (RANTA, 1986; SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 2000). Na população em geral, a agenesia se apresenta em torno de 1,5% para os segundos pré-molares superiores, 1,7% a 4,1% para incisivos laterais superiores e 3% para segundos pré-molares inferiores (POLDER et al., 2004; SHOKRI et al., 2014).

Considerando todos os tipos de fissura, 66% a 77% dos pacientes são acometidos pelas agenesias, excluindo os terceiros molares (SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 2000; AL JAMAL; HAZZA'A; RAWASHDEH, 2010), sendo que em aproximadamente 26% a 30% estão presentes fora dessa região da fenda (EERENS et al., 2001; SLAYTON et al., 2003; LETRA et al., 2007), observando os segundos pré-molares com maiores percentuais quando comparados aos outros dentes, com prevalência em torno de 20% a 30% (RANTA, 1986; SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 1999, 2000).

Em um estudo realizado por Shapira, Lubit e Kuftinec (1999) com todos os tipos de fissura, foi observado que estes mesmos dentes foram três vezes mais ausentes na maxila do que na mandíbula, e nas fissuras unilaterais a agenesia ocorreu em maior número no lado da fissura tanto na maxila quanto na mandíbula. Essa assimetria também foi observada com maior frequência para indivíduos com fissuras assim como seus irmãos em relação a indivíduos sem fissura (EERENS et al., 2001).

Ao analisar os dados referentes a esses vários estudos, é possível observar que a agenesia fora da área da fissura apresenta prevalência significativamente maior do que na população em geral, além da frequência desta aumentar com a gravidade da fissura, sugerindo uma etiologia genética em comum (SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 1999; EERENS et al., 2001; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008). No estudo realizado por Eerens et al. (2001), foi sugerido que fatores genéticos poderiam estar relacionados com a ocorrência das agenesias e fissuras, visto que a prevalência de agenesia fora da área da fissura para indivíduos com fissuras (27%) e seus irmãos (sem fissura) (11%), foi significativamente maior do que para o grupo de indivíduos controle (3,6%).

O fator etiológico das agenesias dentárias tem sido atribuído em grande parte dos estudos, confirmado por trabalhos com famílias e gêmeos, às variações genéticas (VASTARDIS, 2000). Estudos moleculares têm demonstrado associação positiva entre diversos genes, dentre eles o *MSX1*, *PAX9* (VAN DEN BOOGAARD et al., 2000, 2012), *AXIN2* (MOSTOWSKA; BIEDZIAK; JAGODZINSKI, 2006; CALLAHAN et al., 2009), e as agenesias dentárias isoladas. Ressaltando que esses mesmos genes foram considerados previamente como candidatos à fissura labiopalatina (JEZEWSKI et al., 2003; LETRA et al., 2012).

Estudos com modelos animais têm demonstrado que centenas de genes, dentre eles o *Msx1* e o *Pax9*, podem estar envolvidos e regulando a odontogênese, e assim como para a ocorrência das fissuras sindrômicas e/ou isoladas possivelmente a função alterada de alguns genes que desempenham papel determinante nessas malformações, poderia também estar relacionada à etiologia das agenesias dentárias (VIEIRA, 2003; VIEIRA, 2008; BOEIRA JUNIOR; ECHEVIGARRE, 2012a).

No sentido de avaliar esse componente genético na etiologia das agenesias dentárias, Arte et al. (2001) avaliaram a hereditariedade desse fenótipo em famílias finlandesas em três gerações a partir de 11 indivíduos, sem fissura, para avaliar a possível contribuição do fator genético ao fenótipo de agenesia de incisivos e pré-molares. Os autores concluíram que as agenesias apresentam origem genética com um padrão de herança autossômica dominante, e que os indivíduos afetados assim como seus familiares se apresentam mais predispostos ao acometimento de outras anomalias dentárias.

Em um estudo realizado por Slayton et al. (2003), no qual compararam os padrões de agenesia em indivíduos com todos os tipos de fissuras labiopalatinas, os autores propuseram ainda determinar se variações genéticas nos genes *MSX1*, *TGFB3* e *PAX9* teriam associação com os grupos constituídos no estudo com indivíduos com fissura e agenesia na área e fora da área da fenda, realizando comparação com dois grupos controle, constituídos de indivíduos com fissura sem agenesia e indivíduos sem fissura e sem agenesia. Os autores encontraram associação positiva de variações nos genes *MSX1* e *TGFB3* em sujeitos com fissura e agenesia fora da área da fenda quando esses indivíduos foram comparados aos controles sem fissura. No entanto, no estudo dessa população específica, não encontraram associações significativas nesses genes em indivíduos com agenesia fora da área da fissura quando comparados com indivíduos agrupados como controle, com fissura e sem agenesia, contudo discutem que esse grupo com fissura sem agenesia não seria o controle ideal para comparação. Diante desses resultados encontrados, os autores sugerem ainda que diferentes genes poderiam ser responsáveis por diferentes padrões de agenesia nos diferentes grupos dentários.

Dessa forma, são necessários estudos clínico-moleculares para investigar se a ausência dentária fora da área da fissura estaria relacionada com a mesma, (EERENS et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003), pois tem sido levantada a hipótese de que esta poderia ter uma etiologia genética comum às fissuras (EERENS et al., 2001; SLAYTON et al., 2003; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008).

1.3 GENÉTICA NO DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL E DENTÁRIO

Segundo Kouskoura et al. (2011), o desenvolvimento embrionário craniofacial e dentário, se apresenta como um evento complexo guiado por uma cascata de eventos moleculares. Desta forma, alterações genéticas e fatores ambientais separadamente ou em conjunto poderiam ser responsáveis por desestabilizar toda a sinalização de eventos esperados e assim resultar na manifestação das fissuras e agenesias que são comumente encontradas na população.

Apesar de terem sido identificados alguns genes envolvidos nesse processo de formação craniofacial através de estudos em modelos animais modificados geneticamente (estudos com animais *knockouts*) (PRESCOTT; WINTER; MALCOLM, 2001), ainda não foram totalmente desvendadas, as vias de sinalização moleculares as quais compreendem uma variedade de eventos celulares envolvendo sinalizações inter e intracelulares e que são responsáveis por controlar as interações epitélio-mesenquimais envolvidas no desenvolvimento facial e dentário (PRESCOTT; WINTER; MALCOLM, 2001; KOUSKOURA et al., 2011; BOEIRA JUNIOR; ECHEVIGARREY, 2012a). Dessa forma, não só a função alterada de genes que possuem envolvimento direto sobre a formação craniofacial, mas também aqueles que através da influência de fatores ambientais poderiam estar propensos à desordem ou inibição no controle desses eventos, provavelmente estariam relacionados com as malformações craniofaciais (PRESCOTT; WINTER; MALCOLM, 2001; BEATY et al., 2011; KOUSKOURA et al., 2011). No entanto, ainda permanece o desafio de desvendar a complexa interação destes processos durante o desenvolvimento dessas patologias e descobrir quais são os possíveis genes candidatos (LIDRAL; MORENO, 2005; KOUSKOURA et al., 2011; BOEIRA JUNIOR; ECHEVIGARREY, 2012a; MARAZITA, 2012).

1.3.1 O Gene *MSX1*

O gene *MSX1* está localizado no cromossomo 4, e têm sido relacionado com as fissuras labiopalatinas e agenesias dentárias não sindrômicas (SATOKATA;

MAAS, 1994; VAN DEN BOOGAARD et al., 2000; BOEIRA JUNIOR; ECHEVIGARREY, 2012a). É um fator de transcrição que se expressa no mesênquima dentário nos estágios iniciais da formação, e da face em desenvolvimento (ALAPPAT; ZHANG; CHEN, 2003; BOEIRA JUNIOR; ECHEVIGARREY, 2012a) se expressando na região dos processos nasais (NAKATOMI et al., 2010) e na região anterior do palato secundário (ALAPPAT; ZHANG; CHEN, 2003), cuja deficiência de proliferação do mesênquima nessa área específica, mesmo com a horizontalização dos processos palatinos, poderia prejudicar a fusão dos mesmos devido a escassez de tecido mesenquimal (SATOKATA; MAAS, 1994).

Mutações no gene *MSX1* têm sido encontradas em aproximadamente 2% dos casos de fissura de lábio e/ou palato (JEZEWSKI et al., 2003), e em 3% dos casos de agenesias dentárias não sindrômicas (VAN DEN BOOGAARD et al., 2012), demonstrando em estudos populacionais a participação desse gene tanto na etiologia das fissuras (JEZEWSKI et al., 2003) como na das agenesias dentárias (VAN DEN BOOGAARD et al., 2012) principalmente dos primeiros e segundos pré-molares (VASTARDIS et al., 1996; KIM, 2006).

Estudos com modelos animais utilizando animais modificados geneticamente, incluindo alterações no gene *Msx1*, manifestaram os fenótipos de fissura de palato e agenesia dentária. A inativação desse gene em camundongos causou, entre outras alterações, a interrupção do desenvolvimento dentário no estágio de botão e malformação do palato secundário (SATOKATA; MAAS, 1994). No estudo realizado por Nakatomi et al. (2010) observou-se também uma importante interação entre os genes *Msx1* e *Pax9* no desenvolvimento do lábio superior e do palato. Enquanto a ausência do *Pax9* causou ausência dos processos palatinos secundários, a ausência do gene *Msx1* causou encurtamento da pré-maxila determinado pela ausência dos processos nasais com fissura de lábio. Segundo esses autores, nos germes dentários esses genes se expressam independentemente, porém de forma sinérgica e a inativação dos dois genes poderia ocasionar a oligodontia.

Jezewski et al. (2003) verificaram por meio de um estudo de sequenciamento genético que a ocorrência de mutações no gene *MSX1* em pacientes com fissura de lábio e/ou palato não sindrômicas em uma amostra

composta por diversas raças foi de 2%, sendo que esses dados reforçam que mutações no gene *MSX1* estão associadas ao fenótipo fissura labiopalatina. Já no estudo realizado por Van den Boogaard et al. (2012) utilizando também o método de sequenciamento, encontraram mutações no gene *MSX1* as quais estavam presentes em 3% dos pacientes com agenesia dentária não sindrômica.

Em estudo realizado em uma família investigando o fenótipo agenesia dentária isolada, Vastardis et al. (1996) encontraram uma mutação missense no gene *MSX1* em indivíduos afetados pela agenesia de segundos pré-molares e terceiros molares e em alguns indivíduos afetados pela agenesia de primeiros pré-molares superiores e primeiros molares inferiores.

Evidências acerca da etiologia genética de ambos os fenótipos, fissura e agenesia, relacionada ao gene *MSX1* foram comprovadas por estudos que constatarem mutações genéticas em indivíduos com o fenótipo das agenesias dentárias (VASTARDIS et al., 1996) e/ou fissuras labiopalatinas (VAN DEN BOOGAARD et al., 2000). Sendo que para alguns autores, que investigaram famílias, a agenesia dentária poderia ser considerada uma alteração com padrão de herança autossômica dominante, ou seja, um fenótipo que apresenta um padrão esperado de ocorrência dentro da mesma família (VASTARDIS et al., 1996; ARTE et al., 2001). Porém, esse padrão de hereditariedade não foi observado para as fissuras labiopalatinas, visto que em uma porcentagem inferior de familiares ocorreu novamente a manifestação desta e quando ocorreu, se manifestou com grande variabilidade no fenótipo. Diferenças no genótipo e ambientais poderiam ser uma provável explicação para a manifestação ou não da fissura em famílias com presença da agenesia dentária (VAN DEN BOOGAARD et al., 2000).

Em estudo realizado em uma família holandesa, na qual os fenótipos analisados foram agenesias e/ou a fissura labiopalatina, foi encontrada uma mutação nonsense no gene *MSX1* e esta foi associada com agenesia dentária e/ou vários tipos de fissuras (VAN DEN BOOGAARD et al., 2000). Por outro lado, Nieminen et al. (1995), não encontraram mutações associadas ao gene *MSX1* ao investigar cinco famílias finlandesas com agenesia dentária isolada não sindrômica. Diante desse resultado, os autores então sugeriram que mutações nesse gene poderiam ser encontradas nos casos em que a agenesia estivesse associada às

fissuras labiopalatinas ou outras anomalias craniofaciais, já que estudos em camundongos revelaram essa associação de fenótipos.

Estudos posteriores indicaram que casos com a presença de fissura e de fissura acompanhada de agenesia fora desta área estiveram associados com variantes no gene *MSX1* (SLAYTON et al., 2003). No estudo realizado por Modesto et al. (2006), os resultados demonstraram que a variante *6C>T foi mais frequente em indivíduos com fissura isolada, enquanto que em indivíduos com fissura e agenesia a variante 101C>G foi mais frequente, o que levou a reforçar que os estudos deveriam analisar essas características de formas separadas.

Não só o *MSX1*, mas diversos genes candidatos têm sido analisados não só pelo método de sequenciamento, triando mutações, mas também por meio da investigação de polimorfismos genéticos (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*). São considerados SNPs as variações de alelos no mesmo *locus* gênico presentes na sequência de DNA com frequência maior que 1% na população (NUSSBAUM; WILLARD; MCINEES, 2008), os quais podem estar presentes em indivíduos caracterizados como normais do ponto de vista biológico (KORNMAN et al., 1997). Por meio da análise das frequências desses polimorfismos em indivíduos com os fenótipos a serem estudados, é possível investigar a possibilidade de que algumas dessas variantes polimórficas possam estar associadas a uma predisposição individual para essas alterações do desenvolvimento craniofacial e dentário (PRESCOTT; WINTER; MALCOLM, 2001; MARAZITA; NEISWANGER, 2002; RAHIMOV; JUGESSUR; MURRAY, 2012). Nessa linha investigativa, diversos estudos têm encontrado associação de diversos polimorfismos em diferentes genes com as fissuras e agenesias isoladas ou em associação (SLAYTON et al., 2003; MODESTO et al., 2006; ANTUNES et al., 2012; ANTUNES et al., 2013; PARANAÍBA et al., 2013; RAFIGHDOOST et al., 2013; VIEIRA et al., 2013).

Especificamente para o polimorfismo investigado neste trabalho (rs12532 no gene *MSX1*), em uma população iraniana foi encontrada associação entre todos os tipos de fissura e esse polimorfismo. Especificamente para as fissuras de lábio e palato foi encontrada associação entre os genótipos AG (OR= 2,8) e GG (OR= 8,4), sendo que os autores consideraram que a presença de um alelo G polimórfico (OR= 2,7) nesse *locus* gênico representaria um fator de risco para as fissuras (RAFIGHDOOST et al., 2013).

Em outro estudo realizado com uma população chinesa, Huang et al. (2011) não encontraram associação entre esse polimorfismo específico (rs12532 no gene *MSX1*) e o fenótipo das fissuras em geral, não encontrando diferença estatística na distribuição da frequência alélica e genotípica entre indivíduos com e sem fissura. Da mesma forma, no estudo conduzido por Cardoso et al. (2013), com uma amostra de indivíduos concentrados na região nordeste brasileira envolvendo vários tipos de fissura comparados a um grupo controle sem fissura, também não encontraram associação entre as fissuras não sindrômicas e seis polimorfismos no gene *MSX1* dentre eles o rs12532.

Vieira et al. (2013) encontraram associação positiva entre esse polimorfismo em questão com agenesia de pré-molares na região sudeste brasileira. Por outro lado, Paixão-Côrtes et al. (2011) não encontraram associação significativa das agenesias dentárias isoladas ao realizar comparação com indivíduos controle para essa mesma variante na região sul do Brasil, porém esses autores mencionam que esses resultados deveriam ser interpretados com cautela e deveriam ser confirmados com amostras populacionais maiores.

O estudo coreano realizado por Seo et al. (2013) demonstrou que o polimorfismo rs12532 no gene *MSX1* poderia contribuir para as agenesias dentárias em indivíduos com fissuras e os autores mencionaram a necessidade de investigar a distribuição dos genótipos em indivíduos sem fissura com e sem a presença das agenesias para verificar com maior precisão, o papel deste polimorfismo em questão nas agenesias.

De acordo com o exposto, o gene *MSX1* possui ligação com a formação craniofacial e dentária, sendo considerado um dos genes candidatos associados a esses dois fenótipos. Considerando que em indivíduos com fissura constata-se clinicamente uma maior prevalência de agenesias dentárias, tem sido proposto que essas anomalias dentárias poderiam ser consideradas como uma extensão desse fenótipo, bem como um indicador clínico adicional para as fissuras orofaciais, sugerindo que essas características poderiam compartilhar um quadro etiológico genético comum (EERENS et al., 2001; SLAYTON et al., 2003; VIEIRA, 2003; STAHL; GRABOWSKI; WIGGER, 2006; WEINBERG et al., 2006; LETRA, 2007; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008; ANTUNES et al., 2013). Porém, diante da etiologia complexa e multifatorial destas duas características, e diante da

diversidade de manifestações fenotípicas distintas, não tem sido possível esclarecer quais são os fatores envolvidos na etiologia desses fenótipos e muitos resultados permanecem controversos (TERWILLIGER; GÖRING, 2000; RAO, 2001; VIEIRA, 2003; WEINBERG et al., 2006; LETRA et al., 2007; RAHIMOV; JUGESSUR; MURRAY, 2012).

A literatura tem mencionado tanto semelhanças (VIEIRA et al., 2008b) quanto diferenças genéticas entre fissuras isoladas e fissuras acompanhadas das anomalias dentárias (MODESTO et al., 2006; VIEIRA et al., 2008a), dessa forma, uma descrição mais minuciosa das características clínicas dos indivíduos afetados tem sido apontada como fundamental e como um meio de aprimorar futuras investigações para detecção dos fatores etiológicos presentes com maior precisão, que poderia não ser possível na análise de grupos menos específicos (TERWILLIGER; GÖRING, 2000; RAO, 2001; VIEIRA, 2003; WEINBERG et al., 2006; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008; VIEIRA et al., 2008a; VIEIRA et al., 2008b; ANTUNES et al., 2013; WEN; LU, 2013). Nesse sentido, para fins de investigações genéticas tem sido considerada imprescindível a descrição dos fenótipos odontológicos agregados à ocorrência da fenda para melhor descrição do fenótipo individual (VIEIRA, 2003; WEINBERG et al., 2006; STAHL; GRABOWSKI; WIGGER, 2006; LETRA, 2007; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008; VIEIRA et al., 2008a; VIEIRA et al., 2008b; ANTUNES et al., 2013).

Dessa forma, para melhor compreender essa heterogeneidade fenotípica, justifica-se investigar a associação desse polimorfismo no gene *MSX1* (rs12532) e os fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária, isolados ou em associação, com a finalidade de averiguar se esse polimorfismo estaria associado a essas duas características, considerando que ainda não existem trabalhos na literatura investigando na população brasileira a associação para essa variante polimórfica quando ambos os fenótipos, fissura labiopalatina e agenesia dentária, estão presentes.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a associação entre o polimorfismo (rs12532) no gene *MSX1* e os fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária não sindrômicas isolados e em associação.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP) (CAAE- 09715512.3.0000.5441, Anexo A).

3.1 CASUÍSTICA

Fizeram parte deste estudo caso-controle, 222 indivíduos de ambos os sexos divididos em quatro grupos, apresentando os fenótipos agenesia dentária e fissura labiopalatina isoladamente ou em associação. Os grupos definidos foram: grupo 1 – indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia dentária; grupo 2 - indivíduos com fissura labiopalatina sem agenesia dentária; grupo 3 – indivíduos somente com agenesia dentária sem fissura labiopalatina; grupo 4 - controle, sem fissura e sem agenesia.

Grupo 1 – Fenótipo fissura labiopalatina e agenesia dentária associados

Composto por 54 indivíduos regularmente matriculados no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-USP), com fissura completa de lábio e palato unilateral não-sindrômica, que apresentassem agenesia de pré-molares. Esse grupo foi composto por indivíduos que compareceram para consultas de rotina ao HRAC-USP, confirmando o diagnóstico de fissura completa de lábio e palato unilateral não-sindrômica e o fenótipo agenesia os quais foram avaliados por meio de documentações radiográficas, laudos integrantes no prontuário, através de triagem prévia (Figura 1). Inicialmente, na análise da agenesia foram excluídos os indivíduos que apresentassem agenesias de dentes na área da fissura. No entanto, caso fosse mantido esse critério não haveria possibilidade de recrutar o número mínimo de pacientes estabelecido para esse grupo. Então, o critério de inclusão foi ampliado para o fenótipo de agenesia, sendo que os indivíduos recrutados deveriam apresentar ausência de pelo menos um dente pré-molar independentemente de ter agenesia na área da fissura.

Fonte: Arquivos do HRAC/USP

Figura 1 - Radiografia panorâmica ilustrando as características da fissura completa de lábio e palato unilateral e agenesia do dente pré-molar

Grupo 2 – Fenótipo fissura labiopalatina isolada

Composto por 57 indivíduos regularmente matriculados no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-USP), somente com fissura completa de lábio e palato unilateral não-sindrômica, sem nenhuma agenesia dentária. Esse grupo foi composto por indivíduos que compareceram para consultas de rotina ao HRAC-USP, confirmando a presença de todos os dentes e o diagnóstico de fissura unilateral completa não-sindrômica. Essas características foram verificadas por meio de documentações radiografias e laudos através de triagem prévia (Figura 2).

Fonte: Arquivos do HRAC/USP

Figura 2 - Radiografia panorâmica ilustrando a fissura completa de lábio e palato unilateral sem a presença de agenesia

Grupo 3 – Fenótipo agenesia dentária isolada

Composto por 56 indivíduos sem fissura labiopalatina e com agenesia somente de pré-molares. Esse grupo foi constituído por voluntários selecionados entre os estudantes de Graduação e Pós-Graduação dos cursos de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB-USP e Pós-Graduação do HRAC-USP, e por familiares desses alunos que apresentassem agenesia; pacientes dos cursos de especialização em Ortodontia da Sociedade de Promoção do Fissurado Lábio-Palatal (PROFIS) e da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP). Todas as agenesias foram constatadas clínica e radiograficamente (radiografias pré-existent), sendo que os familiares dos alunos de Pós-Graduação foram diagnosticados por estes (Figura 3).

Fonte: Arquivo pessoal de indivíduo participante do grupo 3 cedido para publicação.

Figura 3 - Radiografia panorâmica ilustrando agenesia do dente pré-molar sem a presença da fissura

Grupo 4 – Controle

Composto por 55 indivíduos sem fissura labiopalatina e sem agenesias dentárias, alunos dos cursos de Pós-Graduação na área da Odontologia do HRAC-USP, sendo realizado diagnóstico clínico.

3.2 CRITÉRIOS APLICADOS NO ESTUDO

3.2.1 Critérios de inclusão

Foi considerado como critério de inclusão para os grupos 1 e 2 a presença de fissura labiopalatina não sindrômica classificada como fissura completa de lábio e palato unilateral não-sindrômica, diagnóstico este confirmado por meio de análise do prontuário dos pacientes na data em que compareceram para a consulta de rotina no HRAC. Além disso, a presença de agenesia dentária de pré-molares para os grupos 1 e 3 foi considerada, independentemente do quadrante, em pacientes acima de 10 anos, pois estes poderiam apresentar um desenvolvimento mais atrasado e ainda não estarem aparentes radiograficamente na dentadura decídua (RAVIN; NIELSEN, 1977). Essas radiografias foram avaliadas de forma longitudinal em idades distintas, principalmente para o grupo com fissura, pelo fato das extrações serem comuns durante o protocolo de tratamento. A presença ou ausência de dentes na área da fissura seguiu os critérios de Damante, Souza Freitas e Moraes (1973), esses autores consideraram o incisivo lateral presente quando esteve localizado à mesial ou à distal da fissura.

3.2.2 Critérios de exclusão

Para todos os grupos, foram excluídos os indivíduos que apresentassem hipótese diagnóstica ou confirmação de síndromes. Na análise do fenótipo agenesia dentária, foram excluídos os indivíduos que apresentassem ausência de mais de quatro dentes, uma vez que poderia ser característica de alguma síndrome (MOSTOWSKA; KOBIELAK; TRZECIAK, 2003). Os terceiros molares não foram considerados por serem dentes muito instáveis na dentição humana.

A todos os indivíduos selecionados em todos os grupos propostos de acordo com os critérios acima descritos e convidados a participar do estudo, foi explicado detalhadamente o objetivo do trabalho com leitura minuciosa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE. Os voluntários e/ou responsáveis legais, que aceitaram participar assinaram o TCLE (Anexo B).

3.3 TRIAGEM E SELEÇÃO DOS GRUPOS AMOSTRAIS

Para a seleção de indivíduos para os grupos 1 e 2 (ambos os grupos envolvendo o fenótipo fissura labiopalatina), foi realizada uma triagem prévia inicial por meio de listagem fornecida (pelo Centro de Processamento de Dados - CPD-HRAC) dos pacientes acima de 10 anos de idade com fissura completa de lábio e palato unilateral e que estivessem em tratamento no período de 2013 a 2014. Assim, através dessa listagem foram analisadas 627 documentações radiográficas pré-existentes pertencentes ao arquivo radiográfico do HRAC-USP, incluindo as radiografias ortopantomográficas (panorâmicas) e radiografias periapicais da área da fissura.

Na primeira fase da triagem para seleção da amostra a ser convidada a fazer parte do estudo, foram analisadas 258 documentações radiográficas, (nenhuma foi excluída), seguindo os critérios descritos acima para cada grupo. Destes 258 somente 16 indivíduos apresentaram somente agenesia de pré-molares constatada a presença de ambos os incisivos laterais e puderam ser convidados a compor o grupo 1. Para o grupo 2, composto por indivíduos que apresentassem somente a fissura labiopalatina com a presença de todos os dentes, das 258 radiografias foram selecionados 60 indivíduos. Como o grupo 1 proposto no delineamento do estudo ainda não havia sido completado houve a necessidade de uma segunda etapa de triagem, na qual devido às dificuldades encontradas em número restrito de pacientes para compor o grupo optou-se por ampliar o fenótipo nesse grupo 1 para que fosse possível recrutar o número mínimo de indivíduos proposto no tempo previsto para finalização do estudo. Assim, nesta segunda fase da triagem não foram excluídos do grupo 1 os indivíduos que apresentassem agenesia na área da fissura desde que para fazer parte do grupo apresentassem agenesia de pelo menos um pré-molar.

Desta forma, na segunda etapa da triagem foram analisadas 369 documentações, sendo que inicialmente nessa segunda etapa foram excluídas as documentações em que foram constatadas agenesias na área da fissura na tentativa de ainda priorizar indivíduos com agenesia de pré-molar isolada e em vista da permanência da dificuldade de obtenção de amostra foram considerados aqueles que apresentassem agenesia na área da fissura também. Desta forma, foram triados mais 47 pacientes, sendo que 20 apresentavam agenesia somente de pré-molares e 27 apresentavam agenesia de pré-molares e também de incisivo lateral na área da fenda.

Posteriormente, na ocasião em que os indivíduos compareceram em data agendada para o retorno de consulta odontológica de rotina ao HRAC-USP, junto ao convite de participação, foram analisados os prontuários para que fosse possível confirmar pela ficha de diagnóstico, presente nos prontuários, o tipo de fissura e a condição de ausência de síndromes.

Para a seleção de indivíduos do grupo 3 foram avaliadas 314 documentações radiográficas de pacientes em tratamento ortodôntico na PROFIS no qual foram triados 6 pacientes. Foram selecionados 24 pacientes voluntários na clínica de Ortodontia da FOB-USP, diagnosticados clínica e radiograficamente. E para completar a amostra 28 indivíduos utilizaram os kits de auto-coleta de saliva da Oragene (DNA Genotek, Canadá), pois foram recrutados fora da cidade de Bauru, esses kits foram encaminhados através dos alunos de Pós-Graduação de Odontologia da FOB-USP, para seus familiares juntamente com instruções para coleta apresentados pelo fabricante e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estes dentistas realizaram diagnóstico clínico e radiográfico (pré-existente) das agenesias.

Os 56 voluntários do grupo 4 foram triados por meio de avaliação clínica.

Indivíduos voluntários de todos os grupos eram provenientes de diversas regiões do Brasil.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Coleta de saliva

Os voluntários foram orientados a permanecer sem ingerir alimentos, bebidas ou escovar os dentes por no mínimo meia hora antes da coleta de saliva. Foi instruído que o voluntário estimulasse sua própria salivação com coleta em um tubo tipo Falcon graduado de 15ml estéril e identificado até que fosse atingido o volume de 5ml de saliva não estimulada (WALTRICK-ZAMBUZZI et al., 2012). Este, por sua vez, foi acondicionado em gelo picado para ser transportado até o Laboratório de Farmacologia e Genética, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP. As amostras depois de aliquotadas em tubos de 1,5ml foram armazenadas em freezer a -20°C, até o momento da extração de DNA.

Alguns voluntários do grupo 3 que utilizaram o kit para auto-coleta de saliva Oragene.DNA OG-510 (DNA Genotek, Canadá), foram orientados a seguir as instruções de coleta recomendadas pelo fabricante, as quais foram idênticas a coleta realizada em tubo Falcon porém até a marcação de 2ml com posterior orientação de homogeneização da saliva com o líquido conservante do kit agitando essa mistura por 5 segundos, e estes foram mantidos e conservados em temperatura ambiente, seguindo instruções do fabricante, sendo posteriormente armazenadas em freezer a -20°C.

3.4.2 Extração do DNA

Depois de descongeladas, as amostras dos grupos 1, 2, 4 e as amostras do grupo 3 coletadas em Bauru, em tubos tipo Falcon foram submetidas ao protocolo para extração de DNA, utilizando o Acetato de Amônio e precipitação com isopropanol (AIDAR; LINE, 2007; WALTRICK-ZAMBUZZI et al., 2012), conforme protocolo descrito detalhadamente abaixo. As amostras do grupo 3, coletadas em outras cidades, por meio de utilização do Kit para auto-coleta de saliva Oragene.DNA (OG-510) (DNA Genotek, Canadá), foram submetidas ao protocolo de extração de DNA (SAHOTA; BROOKS; TISCHFIELD, 2007), seguindo as instruções do fabricante.

3.4.2.1 Protocolo de extração de DNA utilizando acetato de amônio

Após o descongelamento total das amostras de saliva, cada tubo contendo 1,5ml de saliva foi centrifugado por 5 minutos (10000g) para sedimentação do *pellet* de células. O *pellet* foi re-suspenso em 1ml de tampão de extração (Tris-HCl 10Mm, pH 7.8; EDTA 5Mm; SDS 0,55%) e 5µl de proteinase K à 20mg/ml (Qiagen, Alemanha). As amostras foram agitadas e posteriormente incubadas em banho-maria a 56°C *overnight* e então submetidas a processos de precipitação utilizando-se 500µl de solução de acetato de amônio a 10M. Em seguida, todos os tubos foram: agitados manualmente por 3 minutos para precipitação de restos celulares; centrifugadas por 15 minutos (15000rpm), e então foi transferido 500µl do sobrenadante para novos tubos de 2,5ml e adicionado 540µl de álcool isopropílico

gelado no qual foi possível observar o DNA condensado com aspecto de “nuvem”. Após agitação em vórtex, as amostras foram armazenadas em geladeira, *overnight*, para precipitação do DNA. Então, todas as amostras foram centrifugadas por 20 minutos (10000g) e então foi descartado o sobrenadante e adicionado 1ml de álcool 70% gelado. As amostras foram centrifugadas mais uma vez por 5 minutos (10000g), e após descarte do sobrenadante os tubos descansaram de 4 a 5 horas para evaporação do excesso de álcool. Após a evaporação, o *pellet* foi re-suspenso em 50µl de água ultrapura e as amostras foram congeladas à -20°C até momento da quantificação do DNA em espectrofotômetro.

3.4.3 Quantificação e qualificação do DNA

A análise da concentração e pureza do DNA foi obtida por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) (Figura 4) utilizando 2µl do material extraído. A concentração do DNA foi medida em comprimentos de onda de 260nm e a pureza e qualidade numa razão de comprimentos de onda de 260nm/280nm. Os valores ideais considerados para a qualidade do DNA deveriam estar entre 1,7 a 2,0. Ao final da análise as amostras foram diluídas de modo que todas estivessem com concentração de DNA a 20ng/µl.

Figura 4 - Espectrofotômetro (NanoDrop 1000) utilizado para avaliar a pureza e concentração do DNA extraído

3.4.5 Genotipagem

A análise dos genótipos do polimorfismo escolhido foi realizada por meio da técnica de PCR em Tempo Real, essas reações foram realizadas em um termociclador Viia 7 (Applied Biosystems, Estados Unidos) (Figura 5), através do método *TaqMan* utilizando ensaios *TaqMan* SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Estados Unidos) pré-padronizados e validados experimentalmente, seguindo as instruções do fabricante. Esta técnica possibilita a análise dos alelos variantes dos SNPs, utilizando além do Genotyping Master Mix (mix com todos os reagentes necessários para a reação da PCR), os *primers* específicos para esse segmento do DNA a ser analisado e dois tipos de sondas específicas marcadas com fluoróforos distintos (VIC e FAM) para cada um dos alelos possíveis, alelo ancestral ou alelo polimórfico, possibilitando a distinção alélica.

Os *primers* são específicos para as regiões adjacentes ao sítio polimórfico e as sondas hibridizam no segmento de DNA, por complementariedade, de acordo com os alelos presentes. No processo de amplificação do segmento delimitado pelo *primer*, a sonda é degradada pela enzima *Taq* DNA polimerase separando o fluoróforo da molécula *quencher* (a qual absorve fluorescência), e essa separação resulta no aumento da intensidade de fluorescência em forma exponencial a qual é captada pelo equipamento (Viia 7, Applied Biosystems, Estados Unidos) a cada ciclo de PCR (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Os experimentos foram realizados em duplicata em placas de 384 poços (Catálogo 4309849, Applied Biosystems, Estados Unidos). Para a reação, foi utilizado um produto final de 5µL contendo 2 µl da amostra diluída a 20ng/µl (40ng/reação), 2,5µl do *TaqMan Genotyping Master Mix*, 0,125µl do ensaio pré-desenhado *TaqMan* (Applied Biosystems, Estados Unidos), e água ultrapura q.s.p. Foi utilizado o ensaio de genotipagem pré-desenhado padronizado, com número de catálogo C_26933394_10 para *MSX1/rs12532*, e o *Master Mix* número de catálogo 4371355 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

As condições de ciclagem para a realização da PCR em Tempo real no equipamento obedeceram ao seguinte padrão: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos em seguida 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto. Foram utilizados controles negativos que consistiu na realização da reação

sem a presença do DNA para conferir as possibilidades de contaminações dos reagentes com DNA.

Figura 5 - Termociclador utilizado para a reação da PCR em Tempo Real (Viia 7)

As amostras submetidas à reação de PCR em Tempo Real foram posteriormente analisadas no Software Viia 7 (versão 1.1, Applied Biosystems, Estados Unidos) o qual forneceu os relatórios com os resultados dos genótipos (Figura 6).

Figura 6 - Exemplos de genótipos heterozigotos e homozigotos obtidos pelo método *TaqMan* para o polimorfismo rs12532 (*MSX1*). **A)** Exemplo de uma amostra homozigota para a sonda VIC. **B)** Representação de uma amostra homozigota para a sonda FAM. **C)** Exemplo de uma amostra heterozigota - dois tipos de sonda estão representados VIC e FAM

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados no programa Excel 8.0 e para os cálculos foi utilizado o programa Sigma Plot for Windows 12.0. As comparações entre frequências dos genótipos e alelos foram realizadas através do teste do qui-quadrado (χ^2) e *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95% (IC). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram analisados 222 indivíduos para esse estudo, sendo 167 indivíduos representando os casos apresentando os fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária, isolados ou em associação, e 55 indivíduos controle. Toda a caracterização da população estudada está descrita na Tabela 1. A amostra desse estudo foi composta de forma não semelhante para indivíduos do gênero feminino e masculino nos diversos grupos, com prevalência maior para o sexo masculino nos grupos 1 e 2, cujo fenótipo envolvia a fissura labiopalatina e maior para o sexo feminino nos grupos 3 e 4, respectivamente o grupo do fenótipo de agenesia isolada e controle. No grupo com fissura a mesma ocorreu predominantemente no lado esquerdo. A agenesia de segundos pré-molares superiores foi a mais prevalente nos indivíduos com fissura (grupo 1) e os segundos pré-molares inferiores os dentes com maior ocorrência de agenesia nos indivíduos sem fissura (grupo 3). No grupo 1, 21 indivíduos (38,9%) apresentaram agenesia na área da fissura além da agenesia de pré-molar e 33 (61,1%) não tiveram agenesia na área da fenda. Quanto à etnia, os caucasianos foram predominantes quando comparados a outras etnias, no entanto não é possível a afirmação precisa sobre esta, pois não foi realizada essa investigação, na população brasileira ocorre uma elevada taxa de miscigenação racial, o que inviabiliza a análise dos dados levando em conta a etnia dos indivíduos estudados.

Tabela 1 - Características da população estudada para o gene *MSX1* (n=222)

Gênero (%)	G1 (n=54)	G2 (n=57)	G3 (n=56)	G4 (n=55)	Total
Feminino	21 (38,9%)	21 (36,8%)	40 (71,4%)	38 (69,1%)	120 (54%)
Masculino	33 (61,1%)	36 (63,2%)	16 (28,6%)	17 (30,9%)	102 (45,9%)
FCLPUE	36 (66,7%)	37 (64,9%)	-	-	73 (65,8%)
FCLPUD	18 33,3%	20 35,1%	-	-	38 (34,2%)
Média de idade* (anos)	18,2 (± 5)	16,8 (± 5,5)	25,7 (± 11)	26,3 (± 4,8)	21,7 (± 8,2)

* Idade média em anos ± desvio padrão.

FCLPUE: Fissura completa de lábio e palato unilateral esquerda; **FCLPUD**: Fissura completa de lábio e palato unilateral direita.

4.2 RESULTADOS DA GENOTIPAGEM

Considerando as possibilidades nesse *locus* gênico no gene *MSX1* (rs12532), o alelo A é considerado como ancestral e o alelo G considerado com alelo polimórfico, sendo possível sua manifestação em duplicidade, quando chamado de homozigoto polimórfico (GG) e quando ocorre associado ao alelo ancestral (A), situação em que o indivíduo é chamado de heterozigoto polimórfico (AG).

Foram comparados os resultados dos grupos caso (G1, G2, G3) ao controle (G4) separadamente. Na comparação do G1 (presença dos fenótipos fissura e agenesia associadas) ao controle (G4) foi observada significância estatística de associação entre a frequência dos alelos para o polimorfismo rs12532 do gene *MSX1*, nesse comparativo o alelo G ocorreu em 39,8% dos indivíduos do grupo caso (G1) ($p=0,049$; OR=1,85; IC 95%= 1,04-3,28). Porém para os genótipos AG+GG, foi observada somente uma tendência para associação ($p=0,069$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação da distribuição dos alelos e genótipos do gene *MSX1* (rs12532) entre indivíduos com fissura com agenesia e controle

Genótipo	com fissura com agenesia G1 (n=54)		sem fissura sem agenesia G4 (n=55)		p	OR	CI
	N	%	n	%			
Homozigoto ancestral (AA)	22	40,7%	33	60,0%	-	-	-
Heterozigoto (AG)	21	38,9%	15	27,3%	0,134	2,10	0,89-4,94
Homozigoto mutado (GG)	11	20,4%	7	12,7%	0,197	2,36	0,79-7,01
Heterozigoto (AG) + Homozigoto mutado (GG)	32	59,3%	22	40,0%	0,069	2,18	1,02- 4,69
Alelos							
A	65	60,2%	81	73,6%	0,049*	1,85	1,04-3,28
G	43	39,8%	29	26,4%			

* Teste Qui-quadrado; $p \leq 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa.

Na comparação do G2 (presença do fenótipo fissura isolada) ao controle (G4), não houve significância para a distribuição dos genótipos AG ($p=0,096$) e GG ($p=0,471$), nem para as frequências dos alelos ($p=0,123$). Porém foi observada uma tendência de associação para genótipos AG+GG ($p=0,08$) (Tabela 3). Essa tendência relacionada ao genótipo AG + GG pode ser confirmada pelo percentual

total de heterozigotos e homozigotos polimórficos no grupo com fissura (AG+GG = 57,9%) que foi 44% maior do que no controle (AG+GG = 40%).

Tabela 3 - Comparação da distribuição dos alelos e genótipos do gene *MSX1* (rs12532) entre indivíduos com fissura isolada e controle

Genótipo	com fissura isolada G2 (n=57)		sem fissura sem agenesia G4 (n=55)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (AA)	24	42,1%	33	60,0%	-	-	-
Heterozigoto (AG)	24	42,1%	15	27,3%	0,096	2,20	0,96-5,06
Homozigoto mutado (GG)	9	15,8%	7	12,7%	0,471	1,77	0,58-5,41
Heterozigoto (AG) + Homozigoto mutado (GG)	33	57,9%	22	40,0%	0,088	2,06	0,97-4,38
Alelos							
A	72	63,2%	81	73,6%	0,123	1,75	0,98-3,12
G	42	36,8%	29	26,4%			

* Teste Qui-quadrado; $p \leq 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa.

Na comparação do grupo 3 (fenótipo de agenesia isolada) ao controle (G4) foi possível constatar diferença estatisticamente significativa para a associação do genótipo AG ($p=0,038$; OR=2,57; IC 95%=1,13-5,82) ao fenótipo agenesia isolada, sendo que este genótipo (AG) esteve presente em 50% dos indivíduos desse grupo. Porém não foi encontrada significância para os alelos ($p=0,425$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação da distribuição dos alelos e genótipos do gene *MSX1* (rs12532) entre indivíduos com agenesia isolada e controle

Genótipo	com agenesia isolada G3 (n=56)		sem fissura sem agenesia G4 (n=55)		p*	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (AA)	24	42,9%	33	60,0%	-	-	-
Heterozigoto (AG)	28	50,0%	15	27,3%	0,038*	2,57	1,13-5,82
Homozigoto mutado (GG)	4	7,1%	7	12,7%	0,984	0,79	0,21-2,99
Heterozigoto (AG) + Homozigoto mutado (GG)	32	57,1%	22	40,0%	0,106	2,00	0,94-4,26
Alelos							
A	76	67,9%	81	73,6%	0,425	1,32	0,74-2,36
G	36	32,1%	29	26,4%			

* Teste Qui-quadrado; $p \leq 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa.

5 DISCUSSÃO

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

Por se tratar de uma alteração que envolve a face e a cavidade bucal, as fissuras estão frequentemente associadas às alterações dentárias (SATOKATA; MAAS, 1994; NAKATOMI et al., 2010). A mais comum é a agenesia dentária, e essa ocorrência é significativamente maior mesmo fora da área da fissura sendo que a prevalência da agenesia aumenta com a complexidade da fenda (RANTA, 1986; SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 1999; EERENS et al., 2001; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008). Dessa forma, tem sido proposto que essas anomalias dentárias poderiam ser consideradas como uma extensão desse fenótipo, bem como um indicador clínico adicional para as fissuras orofaciais, sugerindo que essas características poderiam compartilhar um quadro etiológico genético comum (EERENS et al., 2001; SLAYTON et al., 2003; STAHL; GRABOWSKI; WIGGER, 2006; WEINBERG et al., 2006; LETRA, 2007; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008; ANTUNES et al., 2013).

A literatura tem observado semelhanças (VIEIRA et al., 2008b) e diferenças genéticas entre fissuras isoladas e fissuras acompanhadas das anomalias dentárias em diferentes *loci* (MODESTO et al., 2006; VIEIRA et al., 2008a). Diante desses achados, o detalhamento dos fenótipos odontológicos agregados à ocorrência da fenda tem sido sugerido como uma forma de aperfeiçoar o delineamento dos estudos (VIEIRA, 2003; WEINBERG et al., 2006; LETRA, 2007; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008; VIEIRA et al., 2008a; VIEIRA et al., 2008b; ANTUNES et al., 2013). Porém, a maioria dos estudos realizados para o fenótipo fissura labiopalatina, não tem mencionado essa caracterização odontológica dos sujeitos na seleção dos grupos amostrais.

No presente estudo, foram definidos para a investigação dois fenótipos clinicamente relacionados, principalmente em se tratando de indivíduos com fissura, que são as fissuras labiopalatinas e as agenesias dentárias. Assim, foram estabelecidos três grupos casos constituídos de indivíduos que apresentassem esses fenótipos isoladamente e em associação, na tentativa de contemplar todas as

possibilidades relacionadas à manifestação dessas duas alterações do desenvolvimento (ANTUNES, 2012). E ainda atendendo a sugestão do artigo publicado por Seo et al. (2013) que mencionam a necessidade de estudos caso–controle prevendo grupos com essas características isoladas e em associação para tentar entender o impacto do polimorfismo em cada fenótipo.

A seleção dos grupos foi realizada sem a estratificação das amostras, pois geralmente após essa seleção estratificada, os estudos se deparam com amostras reduzidas as quais poderiam interferir na precisão para detecção dos resultados de associação também reduzida (WEN; LU, 2013), e que tem sido considerada como uma limitação para os estudos (ANTUNES et al., 2013; SEO et al., 2013).

Desta forma, foram constituídos os grupos caso 1, 2 e 3 respectivamente apresentando os fenótipos em questão, fissura completa de lábio e palato unilateral e agenesia dentária fora da área da fissura associados no grupo 1, isoladamente o fenótipo fissura completa de lábio e palato unilateral no grupo 2 e o fenótipo agenesia dentária de pré-molares no grupo 3.

Evidências sugerem a existência de diferenças genéticas entre os tipos de fissuras (CARINCI et al., 2007; MARAZITA et al., 2009). Dessa forma, um único tipo, as completas de lábio e palato unilaterais, foi escolhido por ser o mais prevalente (SILVA FILHO; SOUZA FREITAS, 2007; YAÑEZ-VICO et al., 2012) e mais associado às agenesias dentárias (LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008). Além disso, a agenesia de pré-molares foi escolhida por ser a mais prevalente fora da área da fissura, sugerindo um possível quadro etiológico comum (RANTA, 1986; SHAPIRA; LUBIT; KUFTINEC, 2000; LETRA et al., 2007; MENEZES; VIEIRA, 2008), e por ser mais prevalente também em indivíduos sem fissura (POLDER et al., 2004). Previamente foi observada a associação do polimorfismo a ser analisado especificamente com os dentes pré-molares (VIEIRA et al., 2013) e a seleção de um único tipo de dente também se torna relevante ao considerar que fatores genéticos distintos poderiam estar relacionados com a agenesia de grupos de dentes específicos (VIEIRA, 2003; VIEIRA et al., 2013), além de evitar a estratificação da amostra. A agenesia de dentes na área da fenda não foi considerada para tentar minimizar as diferenças dos fatores etiológicos envolvidos nas agenesias de incisivos laterais nessa área, em que um provável fator adicional para as agenesias

nessa área seria a simples presença do defeito anatômico segmentando a maxila (VASTARDIS, 2000; MODESTO et al., 2006).

Quanto a caracterização da amostra para idade e distribuição entre os gêneros foram observadas algumas diferenças entre os grupos, pelo fato da amostra ter sido selecionada por conveniência devido à acessibilidade aos indivíduos que compareceram para consulta de rotina ao HRAC para os grupos caso 1 e 2, e a disponibilidade em participar, para os grupos 3 e controle, não sendo desta forma considerados o pareamento para idade e gênero no momento da inclusão dos sujeitos nos grupos (LETRA, 2007; MAROTTI et al., 2008; KUCHLER, 2010).

Com relação à distribuição dos gêneros, os grupos com fissura apresentaram prevalência maior para o gênero masculino, em torno de 60%, em concordância com a literatura a qual menciona a prevalência em torno de 60% a 80% para o gênero masculino para as fissuras completas de lábio e palato unilaterais (FRASER, 1970; YAÑEZ-VICO et al., 2012). Nos Grupos 3 e 4 houve predominância do sexo feminino, o que vai de encontro com estudo de meta-análise realizado por Polder et al. (2004) os quais mencionaram que o sexo feminino foi 1,4 vezes mais suscetível a desenvolver agenesias. A lateralidade da fissura foi outra variável que apresentou maior prevalência para o lado esquerdo (65,8%) quando comparado ao lado direito (34,2%), o que vai de encontro com dados da literatura a qual reporta a ocorrência em torno de dois terços da amostra neste mesmo lado (FRASER, 1970; SILVA FILHO; SOUZA FREITAS, 2007; OLIVEIRA; CAPELOZZA; CARVALHO, 1996). Quanto às agenesias no grupo de pré-molares, nos indivíduos com fissura foi observada maior prevalência para os segundos pré-molares superiores o que está de acordo com o trabalho de Ribeiro et al. (2003) quando analisou os dentes acometidos pela agenesia fora da área da fenda. Esses dados foram inversos aos encontrados para os indivíduos sem fissura os quais apresentaram mais agenesia de segundos pré-molares inferiores do que superiores assim como relatado em artigo de meta-análise (POLDER et al., 2004).

5.2 ANÁLISE MOLECULAR

Diversos trabalhos publicados na literatura internacional têm relatado associação genética positiva entre esses fenótipos escolhidos para o presente estudo, isolados ou em associação, e variações no gene *MSX1* (VAN DEN BOOGAARD et al., 2000; JEZEWSKI et al., 2003; SLAYTON et al., 2003; PAIXÃO-CÔRTEZ et al., 2011; VAN DEN BOOGAARD et al., 2012; SEO et al., 2013), pois a expressão desse gene tem sido descrita em estudos com modelos animais no desenvolvimento embrionário durante a formação do lábio, palato e nos estágios iniciais da formação dentária (SATOKATA; MAAS, 1994; NAKATOMI et al., 2010).

Alguns autores atribuem esses fenótipos em parte às variantes alélicas e para isso foram realizados estudos identificando algumas dessas variações genéticas na sequência do DNA (JUGESSUR et al., 2009; ZHANG; BEATY; RUCZINSKI, 2012). Dentre as variações que ocorrem na sequência do DNA, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é o tipo de modificação genética que ocorre com maior frequência no genoma humano (NUSSBAUM; WILLARD; MCINEES, 2008) e esses polimorfismos no gene *MSX1* têm sido amplamente estudados em diversas populações.

Desse modo, seria esperado que variações na sequência do *MSX1* poderiam influenciar na expressão do gene e consequentemente na formação facial e dentária (BOEIRA JUNIOR; ECHEVIGARRE, 2012a; MA et al., 2014). Nessa linha, muitos estudos têm investigado qual seria o papel do gene *MSX1* na etiologia das fissuras labiopalatinas não sindrômicas e das agenesias dentárias em populações de diferentes origens étnicas. No entanto, os resultados ainda são controversos e variam muito de acordo com a população estudada (HUANG et al., 2011; PAIXÃO-CÔRTEZ et al., 2011; CARDOSO et al., 2013; RAFIGHDOOST et al., 2013; VIEIRA et al., 2013).

Nesse estudo foi analisado o polimorfismo rs12532 no gene *MSX1* buscando a sua associação aos fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária em ocorrência isolada e em associação. Esse polimorfismo (rs12532 no gene *MSX1*) está localizado na região 3'UTR (*untranslated region*) que corresponde a uma região importante, pois no estudo realizado por Ma et al. (2014), na China, com a finalidade de analisar as consequências funcionais dessa variação na sequência, indicou que

esse polimorfismo (rs12532) pode alterar a habilidade de ligação de micro-RNA nessa região específica do DNA, interferindo assim na expressão do gene *MSX1*. Havendo realmente modificação na expressão do gene *MSX1* poderiam se manifestar os fenótipos relacionados a alterações no desenvolvimento facial e provavelmente dentário em que o gene apresenta participação importante durante o período embrionário, dentre elas as fissuras e as agenesias dentárias.

Na literatura são escassos os trabalhos investigando grupos constituídos de indivíduos com os mesmos fenótipos analisados neste trabalho em um mesmo estudo. Essa associação genética para ambos os fenótipos já foi descrita em outras regiões do gene *MSX1* na população holandesa por Van den Boogaard et al. (2000), que ao investigarem uma família através do método de sequenciamento, encontraram uma mutação nonsense no gene *MSX1* que esteve presente em indivíduos com agenesia dentária e/ou vários tipos de fissuras. Outros polimorfismos no gene *MSX1* também foram associados a sujeitos apresentando fissuras acompanhadas ou não das agenesias fora da área da fenda (SLAYTON et al., 2003). Ressaltando que apesar do polimorfismo no gene *MSX1* estudado por Slayton et al. (2003) ser diferente, os autores selecionaram para o estudo indivíduos com agenesia fora da área da fissura, contudo incluíram sujeitos com agenesias na área da fenda também, e no presente estudo, a agenesia nessa área da fenda foi um critério de exclusão sendo avaliados indivíduos com fissura isolada sem nenhuma agenesia. Esse critério se deve ao fato de que, apesar da agenesia nessa área específica apresentar etiologia controversa, não estaria descartada a hipótese de que diferentes resultados pudessem ser obtidos em decorrência da agenesia na área da fissura (SEO et al., 2013). Modesto et al. (2006) ao selecionarem indivíduos com fissura com e sem agenesia fora da área da fissura, comparados com indivíduos sem fissura, e ao analisarem variantes no gene *MSX1*, relataram que o polimorfismo *6C-T foi mais frequente em indivíduos com fissura isolada enquanto que o polimorfismo 101C>G ocorreu com maior frequência em indivíduos com fissura com agenesia, o que levou a reforçar que estudos deveriam analisar essas características de formas separadas.

Em relação ao grupo constituído de indivíduos com os fenótipos fissura e agenesia associados (grupo 1), o estudo que avaliou esse mesmo rs12532 em grupo semelhante com fissura e agenesia fora da área da fenda, realizado na Coreia

em 2013, contudo sem avaliar um grupo controle sem fissura, encontrou associação desse polimorfismo rs12532 no gene *MSX1* com agenesia em indivíduos com fissura, demonstrando alto percentual (81%) para a frequência genotípica AG+GG no grupo de indivíduos com fissura e agenesia em outros locais fora da área da fenda. Ressaltando que os autores reforçam a associação do genótipo AG associado ao risco das agenesias dentárias em indivíduos com fissura (SEO et al., 2013). No presente estudo, nesse grupo 1 em que os fenótipos ocorreram concomitantemente, quando comparados ao grupo controle, foram encontradas diferenças estatísticas de associação para a presença do alelo G. Além disso, a frequência dos genótipos AG+GG foi de 59,3%, inferior à encontrada no estudo coreano (SEO et al., 2013) que foi de 81%, contudo com tendência a associação significativa ($p=0,06$) ao grupo.

Avaliando os resultados encontrados para o grupo apresentando somente o fenótipo fissura labiopalatina isolada, que constitui o grupo 2 do presente trabalho, não foram encontradas diferenças estatísticas para a distribuição das frequências nem para os genótipos nem para os alelos, não encontrando associação desse polimorfismo com a ocorrência das fissuras isoladas, contudo foi constatada uma tendência de associação para o genótipo AG+GG ($p=0,08$). Esses dados encontrados neste estudo corroboram com os achados de Cardoso et al. (2013) que não encontraram associação desse mesmo polimorfismo com as fissuras em população brasileira especificamente da região nordeste. Porém, em nosso estudo, o grupo amostral foi composto por indivíduos que necessariamente apresentassem fissura completa de lábio e palato unilateral, investigando somente um tipo de fissura sem estratificação da amostra, e todos os dentes presentes, isolando o fenótipo fissura para avaliar sua associação ao polimorfismo em estudo sem a interferência da característica odontológica que poderia ser um fator adicional de risco, e essas características detalhadas não têm sido mencionadas com frequência na seleção de grupos amostrais pela literatura.

A literatura apresenta controvérsias e diferenças de resultados em relação à associação desse polimorfismo e o fenótipo fissura, comprovando ou não o aumento do risco associado a esse polimorfismo em questão e o fenótipo, principalmente considerando-se as diferentes populações estudadas nos diferentes continentes. Assim como no presente estudo avaliando uma população brasileira, alguns

pesquisadores investigando população da China, populações chilena e coreana não encontraram associação desse polimorfismo (rs12532) no gene *MSX1* com as fissuras (SUAZO et al., 2010; HUANG et al., 2011; KIM et al., 2013). Por outro lado, diferentemente dos nossos resultados, outros autores investigando a população chinesa e iraniana encontraram associação positiva dos genótipos polimórficos AG e ou GG aumentando o risco para as fissuras (RAFIGHDOOST et al., 2013; MA et al., 2014). Nesse sentido, ressalta-se a importância da definição das características odontológicas em sujeitos com fissura, pois a literatura tem mencionado a relevância da descrição de características fenotípicas de forma detalhada, pois foram observadas diferenças genéticas entre fissuras isoladas e fissuras acompanhadas das anomalias dentárias em outros *loci* (MODESTO et al., 2006; VIEIRA et al., 2008a), além disso, foi relatada a existência de associação desse polimorfismo no gene *MSX1* (rs12532) com as agenesias em indivíduos com fissura (SEO et al., 2013) e também com a agenesia dentária isolada (VIEIRA et al., 2013). Ainda, tem sido mencionado que a seleção de indivíduos com características odontológicas não detalhadas poderia diminuir a habilidade de detecção de associações, em relação a um grupo com características específicas (WEINBERG et al., 2006; VIEIRA et al., 2008a). Dessa forma, essas controvérsias e limitações provavelmente poderiam ser atribuídas também à presença adicional de fenótipos odontológicos agregados à ocorrência da fenda a qual não tem sido considerada na seleção de grupos amostrais com fissura e que hipoteticamente caso contassem com muitos indivíduos com agenesias não diagnosticadas, poderia talvez contribuir para resultados significativos, e esta diferença estatística poderia estar relacionada à presença do fenótipo agenesia.

Por fim o fenótipo agenesia dentária isolada tem sido repetidamente relacionado a alterações no gene *MSX1*, contudo a maioria desses trabalhos que avaliaram esse fenótipo analisaram mutações patogênicas e outros polimorfismos nesse mesmo gene (VASTARDIS et al., 1996; ARTE et al., 2001; PAIXÃO-CÔRTEZ et al., 2011; BOEIRA JUNIOR; ECHEVERRIGARY, 2012b). Mas estes achados também são controversos, pois Van den Boogaard et al. (2012) encontraram mutações em outros *loci* no gene *MSX1* as quais estavam presentes em 3% dos pacientes com as agenesias isoladas. Por outro lado, Nieminen et al. (1995) não

encontraram mutações associadas ao gene *MSX1* ao investigar por meio de sequenciamento, famílias finlandesas com agenesia dentária não síndrômica.

Para o grupo 3 deste estudo constituído pelos indivíduos que apresentavam agenesias dentárias isoladas não síndrômicas foi constatada diferença estatística significativa para a distribuição na frequência genotípica especificamente para o genótipo AG ($p=0,03$). Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Vieira et al. (2013), investigando 93 SNPs em 18 genes, incluindo esse mesmo polimorfismo no gene *MSX1* (rs12532) em uma amostra de indivíduos brasileiros provenientes da região sudeste, ressaltando que na característica, os autores relatam que essa associação positiva encontrada entre a presença do polimorfismo e o fenótipo foi muito significativa quando o indivíduo apresentava especificamente a agenesia de pré-molar, assim como também outros polimorfismos em outros genes foram associados a outros tipos de dentes. Nessa publicação, os autores sugerem uma associação entre esse polimorfismo (rs12532) no gene *MSX1* e a agenesia dentária isolada não síndrômica na população brasileira, reforçando que pelas agenesias apresentarem etiologia complexa, provavelmente para se manifestarem muitos genes podem estar associados e a contribuição das variações em cada um desses genes isoladamente pode ser considerada sutil.

Entretanto esses nossos achados para o grupo 3, com agenesia isolada, são diferentes dos resultados encontrados por Paixão-Côrtes et al. (2011) em um estudo caso-controle em que também avaliaram indivíduos brasileiros, contudo provenientes da região sul e não encontraram associação desse polimorfismo (rs12532) no gene *MSX1* com as agenesias dentárias. No entanto, mencionaram que esses resultados deveriam ser considerados com cautela diante do tamanho pequeno da amostra utilizada. Esta controvérsia entre os estudos poderia também ser devido a diferenças quanto à seleção da amostra e rigor quanto ao tipo de dentes com agenesia a ser incluído no estudo (VIEIRA, 2003; PAIXÃO-CÔRTEES et al., 2011; VIEIRA et al., 2013), além disso, devido às diferenças étnicas de uma região para outra (RISCH, 2000; ALTMÜLLER et al., 2001; VIEIRA et al., 2013).

No geral, as discrepâncias entre os resultados e limitações observadas na literatura podem ser atribuídas à complexidade da etiologia dos dois fenótipos estudados, as fissuras e as agenesias dentárias, as quais são determinadas pela interação de fatores genéticos e ambientais em populações com origens étnicas

distintas (MOSSEY; LITTLE, 2002; LIDRAL; MORENO, 2005; HUANG et al., 2011; ANTUNES et al., 2013; CARDOSO et al., 2013; RAFIGHDOOST et al., 2013; VIEIRA et al., 2013) e essas diferenças entre as populações torna difícil a reprodução de resultados (LIDRAL; MORENO, 2005; JUESSUR et al., 2009; LETRA et al., 2012; CARDOSO et al., 2013). Além disso, os diferentes tipos de desenho e abordagens metodológicas utilizadas pelos estudos (CARDOSO et al., 2013; VIEIRA et al., 2013), o número amostral (ALTMÜLLER et al., 2001; ANTUNES et al., 2013; WEN; LU, 2013), e a variabilidade das manifestações desses fenótipos (ALTMÜLLER et al., 2001; WEINBERG et al., 2006; RAHIMOV; JUGESSUR; MURRAY, 2012; WEN; LU, 2013) também tem sido apontados como fatores limitantes nos estudos.

Avaliando o conjunto de resultados encontrados no presente estudo é possível afirmar que esse polimorfismo no gene *MSX1* (rs12532) estatisticamente sugere associação ao fenótipo agenesia dentária nessa população brasileira estudada. Isto porque as diferenças estatísticas ocorreram somente nos grupos nos quais a agenesia dentária fazia parte do fenótipo (grupos 1 e 3). No grupo 1 de indivíduos com fissura e agenesia o polimorfismo foi associado a presença do alelo G e no grupo 3 apresentando agenesia como fenótipo isolado foi associado ao genótipo AG. Contudo, com relação às fissuras, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística, deve-se ressaltar a diferença na frequência percentual dos genótipos polimórficos AG+GG que ocorreu no grupo 2 - fenótipo de fissura isolada (57,9%) comparado ao grupo controle (40%), demonstrando uma tendência de associação desses genótipos referentes ao polimorfismo em questão também com a ocorrência das fissuras labiopalatinas, mas que precisa ser confirmada com uma amostra maior.

A presença de um fenótipo não indica necessariamente que iremos encontrar associação com genótipos em vista da etiologia multifatorial de ambos, devido à existência da possibilidade de interações com outros genes ou com fatores ambientais os quais não foram analisados no presente estudo (JUESSUR et al., 2009; BEATY et al., 2011). Determinados fatores ambientais podem aumentar ou diminuir o risco da manifestação dos fenótipos juntamente com a suscetibilidade individual de fatores genéticos específicos (BEATY et al., 2011; RAHIMOV; JUGESSUR; MURRAY, 2012).

Os grupos deste estudo foram compostos por indivíduos de várias regiões brasileiras e seria importante apontar como limitação do estudo a dificuldade em estabelecer a origem étnica dos indivíduos devido à miscigenação racial no Brasil, sendo a população brasileira considerada uma das mais heterogêneas, não sendo possível conhecer a verdadeira ancestralidade pelas características físicas dos indivíduos (ALVES-SILVA et al., 2000; PARRA et al., 2003). Estudos cuja seleção das amostras foram realizadas a partir de uma única origem étnica foram sugeridos como ideais no que diz respeito à busca por variações genéticas em patologias complexas (ALTMÜLLER et al., 2001) contudo, no Brasil não é possível isolar essa miscigenação na constituição de um grupo amostral. Pelo fato desse tipo de estudo ser vulnerável a pequenas diferenças nas distribuições alélicas as quais variam em diferentes populações (RISCH, 2000; PRESCOTT; WINTER; MALCOLM, 2001), essa miscigenação seria um fator de interferência nas investigações de associações entre polimorfismos de genes candidatos e os fenótipos estudados, devido a uma possível influência na distribuição dessas frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos (ALTMÜLLER et al., 2001; MARAZITA; NEISWANGER, 2002; KUCHLER, 2010; CLARKE et al., 2011). Porém, seria necessário e viável realizar estudos futuros constituídos de grupos amostrais maiores o que aumentaria o poder estatístico dos resultados e reduziria erros de interpretação (RAO, 2001; MARAZITA; NEISWANGER, 2002; LETRA, 2007; VIEIRA, 2012; SEO et al., 2013), principalmente no que diz respeito à confirmação ou não da associação desse polimorfismo (rs12532 no gene *MSX1*) com o fenótipo fissura labiopalatina.

A partir dos dados desse estudo é razoável dizer que o polimorfismo no gene *MSX1* (rs12532) pode ser considerado como um fator adicional de risco para a ocorrência das agenesias dentárias e para a ocorrência destas em pacientes com fissura. Até porque as variantes polimórficas representam apenas um pequeno incremento no risco para esses fenótipos com contribuições, as quais podem ser consideradas modestas (VIEIRA et al., 2013). Essa contribuição em conjunto com as de outras variantes poderia talvez explicar a causa destes fenótipos que são considerados complexos (JUGESSUR et al., 2009; VIEIRA et al., 2013). Evidências da interação gene-gene entre o *MSX1* e *PAX9* têm sido relatada na literatura na etiologia das agenesias (VIEIRA et al., 2004), assim como a interação entre o *MSX1* e *TGFA* na etiologia das fissuras (JUGESSUR et al., 2003).

Dessa forma, investigações semelhantes analisando outras variantes polimórficas em genes envolvidos na embriologia craniofacial e dentária, realizando a análise com descrição clínica detalhada e com amostras maiores são necessárias para esclarecer o papel do fator genético no desenvolvimento desses fenótipos. Esse conhecimento poderia contribuir para o esclarecimento da etiologia das fissuras e/ou agenesias e dessa forma seria possível elucidar o diagnóstico e avançar especialmente nas medidas preventivas e também nas terapêuticas, assim como na identificação de variantes genéticas que fossem comuns a essas características promovendo a oportunidade para descobrir aquelas que aumentam a suscetibilidade às fissuras, ajudando também no aconselhamento genético.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base na amostra estudada e nos resultados obtidos foi possível concluir que:

- o polimorfismo rs12532 no gene *MSX1* esteve associado aos indivíduos com agenesia e com fissura completa de lábio e palato unilateral;
- o polimorfismo rs12532 no gene *MSX1* esteve associado aos indivíduos com agenesias dentárias de pré-molares isoladas;
- dessa forma é sugerido que esse polimorfismo exerce um papel na suscetibilidade das agenesias na população brasileira, tanto isoladas quanto associadas às fissuras, no entanto outros estudos são necessários para averiguar a contribuição desse polimorfismo para as fissuras labiopalatinas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocolo for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18(2):148-52.
- Al Jamal GA, Hazza'a AM, Rawashdeh MA. Prevalence of dental anomalies in a population of cleft lip and palate patients. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010;47:413-20.
- Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res*. 2003;13(6):429-42.
- Altmüller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet*. 2001;69(5):936-50.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000;67(2):444-61.
- Antunes LS. Estudo de associação entre fissuras labiopalatinas e os genes TGFB3 e BMP4. Niterói: Faculdade de Medicina. Universidade Federal Fluminense; 2012.
- Antunes LS, Kuchler EC, Tannure PN, Lotsch PF, Costa M de C, Gouvêa CV, et al. TGFB3 and BMP4 polymorphism are associated with isolated tooth agenesis. *Acta Odontol Scand*. 2012;70(3):202-6.
- Antunes LS, Kuchler EC, Tannure PN, Costa MC, Gouvêa CV, Olej B, et al. BMP4 Polymorphism is associated with nonsyndromic oral cleft in a Brazilian population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2013;50(6):633-8.
- Arte S, Nieminen P, Apajalahti S, Haavikko K, Thesleff I, Pirinen S. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. *J Dent Res*. 2001;80(5):1445-50.
- Bartzela TN, Carels CE, Bronkhorst EM, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth agenesis patterns in unilateral cleft lip and palate in humans. *Arch Oral Biol*. 2013;58(6):596-602.
- Beaty TH, Ruczinski I, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Hetmanski JB, et al. Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of nonsyndromic cleft palate. *Genet Epidemiol*. 2011;35(6):469-78.
- Boeira Junior BR, Echeverrigaray S. Dentistry and molecular biology: a promising field for tooth agenesis management. *Tohoku J Exp Med*. 2012a;226(4):243-49.
- Boeira Junior BR, Echeverrigaray S. Polymorphism in the MSX1 gene in a family with upper lateral incisor agenesis. *Arch Oral Biol*. 2012b;57(10):1423-8.

Callahan N, Modesto A, Meira R, Seymen F, Patir A, Vieira AR. Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms and tooth agenesis. *Arch Oral Biol*. 2009;54(1):45-9.

Cardoso ML, Bezerra JF, Oliveira GH, Soares CD, Oliveira SR, et al. MSX1 gene polymorphisms in non-syndromic cleft lip and/or palate. *Oral Dis*. 2013;19(5):507-12.

Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007;71(10):1509-19.

Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc*. 2011;6(2):121-33.

Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarová MM. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet*. 1998;79(1):42-7.

Damante JH, Souza Freitas JA, Moraes N. Anomalias de número na área da fissura em portadores de mal formação congênitas de lábio palatais. *Estomatol Cult*. 1973;7(1):88-97.

Deshmukh PK, Deshmukh K, Mangalgi A, Patil S, Hugar D, Kodangal SF. Van der woude syndrome with short review of the literature. *Case Rep Dent*. 2014;1-6.

Diewert VM, Shiota K. Morphological observations in normal primary palate and cleft lip embryos in the Kyoto collection. *Teratology*. 1990;41(6):663-77.

Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Genetics*. 2011;12:167-78.

Eerens K, Vlietinck R, Heidbüchel K, Van Olmen A, Derom C, Willems G, et al. Hypodontia and tooth formation in groups of children with cleft, siblings without cleft, and nonrelated controls. *Cleft Palate Craniofac J*. 2001;38(4):374-8.

Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate. Copenhagen: Arnold Busck; 1942 apud Fraser FC. The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Gent*. 1970;22(3):336-52.

Fraser FC. The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Gent*. 1970;22(3):336-52.

Garib DG, Silva Filho OG, Janson G, Pinto JHN. Etiologia das más oclusões: perspectivas clínicas. Parte III: fissuras labiopalatinas. *Rev Clín Ortodon Dental Press*. 2010;9(4):30-6.

- Gorlin RJ, Cohen Júnior MM, Hennekam RCM. Orofacial clefting syndromes: general aspects. In: Syndromes of head and neck. 4. ed. New York: Oxford University Press; 2001. p. 693-69.
- Grosen D, Bille C, Petersen I, Skytthe A, Hjelmberg Jv, Pedersen JK, et al. Risk of oral clefts in twins. *Epidemiology*. 2011;22(3):313-9.
- Hovorakova M, Lesol H, Peterkova R, Peterka MJ. Origin of the deciduous upper lateral incisor and its clinical aspects. *Dent Res*. 2006;85(2):167-71.
- Huang YQ, Ma J, Ma M, Deng Y, Li YD, Ren HW, et al. Association between MSX1 variants and oral clefts in Han Chinese in western China. *DNA Cell Biol*. 2011;30(12):1057-61.
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, et al. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2003;40(6):399-407.
- Jones MC. Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients. *Cleft Palate J*. 1988;25(1):16-20.
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox A, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, et al. Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol*. 2003;24(3):230-9.
- Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, et al. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PLoS One*. 2009;4(4):e5385.
- Kim JW, Simmer JP, Lin BP, Hu JC. Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res*. 2006;85(3):267-71.
- Kim NY, Kim YH, Park JW, Baek SH. Association between MSX1 SNPs and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Korean population. *J Korean Med Sci*. 2013;28(4):522-6.
- Kohli SS, Kolhi VS. A comprehensive review of genetic basis of cleft lip and palate. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(1):64-72.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997;24(1):72-7.
- Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2011;121(7-8):636-46.

- Kuchler EC. Associação entre as fissuras labiopalatais e os genes AXIN2 e IRF6 [tese]. Niterói: Faculdade de Medicina. Faculdade Federal Fluminense; 2010.
- Letra A. Anomalias dentárias como extensão fenotípica das fissuras orais: estudos moleculares de genes e regiões candidatas [tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo; 2007.
- Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res*. 2007;86:986-91.
- Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009;85(2):169-73.
- Letra A, Bjork B, Cooper ME, Szabo-Rogers H, Deleyiannis FW, Field LL, et al. Association of AXIN2 with non-syndromic oral clefts in multiple populations. *J Dent Res*. 2012;91(5):473-8.
- Lidral AC, Moreno LM. Progress toward discerning the genetics of cleft lip. *Curr Opin Pediatr*. 2005;17(6):731-9.
- Ma L, Xu M, Li D, Han Y, Wang Z, Yuan H, et al. A miRNA-binding-site SNP of MSX1 is Associated with NSOC Susceptibility. *J Dent Res*. 2014;93(6):559-64.
- Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13:263-83.
- Marazita ML, Neiswanger K. Association Studies. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft lip and Palate: from origin to treatment*. New York: Oxford University Press; 2002.
- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, et al. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered*. 2009;68(3):151-70.
- Marotti J, Galhardo APM, Furuyama RJ, Pigozzo MN, Campos TN, Laganá DC. Amostragem em pesquisa clínica: tamanho da amostra. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo*. 2008;20(2):186-94.
- Menezes R, Vieira AR. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008;45(4):414-9.
- Modesto A, Moreno LM, Krahn K, King S, Lidral AC. MSX1 and orofacial clefting with and without tooth agenesis. *J Dent Res*. 2006;85(6):542-6.
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Mossey PA. The heritability of malocclusion: Part 1- Genetics, principles and terminology. *Br J Orthod.* 1999;26(2):103-13.

Mossey PA, Little J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft lip and Palate: from origin to treatment.* New York: Oxford University Press; 2002.

Mostowska A, Kobiela A, Trzeciak WH. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of MSX1 and PAX9 reflect their role in patterning human dentition. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(5):365-70.

Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski PP. Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis. *J Hum Genet.* 2006;51(3):262-6.

Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 2002;61(4):248-56.

Nakatomi M, Wang XP, Key D, Lund JJ, Turbe-Doan A, Kist R, et al. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol.* 2010;340(2):438-49.

Nieminen P, Arte S, Pirinen S, Peltonen L, Thesleff I. Gene defect in hypodontia: exclusion of MSX1 and MSX2 as candidate genes. *Hum Genet.* 1995;96(3):305-8.

Novais CM, Pires-Alves M. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia. Ciência & Desenvolvimento.* 2004;33:10-3.

Nussbaum RL, Willard HF, McInnes RR. Variações genéticas em populações: mutação e polimorfismo. In: Thompson & Thompson *Genética médica.* 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 181-208.

Oliveira DBF, Capelozza ALA, Carvalho IMM. Alterações de desenvolvimento dentário em fissurados. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1996;6:50(1):83-6.

Paixão-Côrtes VR, Braga T, Salzano FM, Mundstock K, Mundstock CA, Bortolini MC. PAX9 and MSX1 transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. *Arch Oral Biol.* 2011;56(4):337-44.

Palomino H, Guzmán E, Blanci R. [Familial recurrence of non syndromic cleft lip with or without cleft palate in Chilean populations]. *Rev Med Chil.* 2000;128(3):286-93.

Paranaíba LM, de Aquino SN, Bufalino A, Martelli-Júnior H, Graner E, Brito LA, et al. Contribution of polymorphisms in genes associated with craniofacial development to the risk of nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(3):e414-20.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):177-82.

Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. *Ann Hum Genet*. 2001;65(Pt6):505-15.

Rafighdoost H, Hashemi M, Narouei A, Eskinadri-Nasab E, Dashti-Khavidaki G, Taheri M, et al. Association between CDH1 and MSX1 gene polymorphisms and the risk of nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in a southeast Iranian population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2013;50(5):98-104.

Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J*. 2012;49(1):73-91.

Ranta R. A review of tooth formation in children with cleft lip/palate. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1986;90(1):11-8.

Rao DC. Genetic dissection of complex traits: an overview. *Adv Genet*. 2001;42:13-34.

Ravin JJ, Nielsen HG. A longitudinal radiographic study of the mineralization of 2nd premolars. *Scand J Dent Res*. 1977;85(4):232-6.

Ribeiro LL, Neves LT, Costa B, Gomide MR. Dental anomalies of the permanent lateral incisors and prevalence of hypodontia outside the cleft area in complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2003;40(2):172-5.

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*. 2000;405(6788):847-56.

Sahota A, Brooks AI, Tischfield JA. Preparing DNA from saliva for genotyping. *CSH Protoc*; 2007.

Satokata I, Maas R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development [comments]. *Nat Genet*. 1994;6:348-56.

Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1853-9.

Seo YJ, Park JW, Kim YH, Baek SH. Associations between the risk of tooth agenesis and single-nucleotide polymorphisms of MSX1 and PAX9 genes in nonsyndromic cleft patients. *Angle Orthod*. 2013;83(6):1036-42.

Shapira Y, Lubit E, Kuflinec MM. Congenitally missing second premolars in cleft lip and cleft palate children. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999;115(4):396-400.

Shapira Y, Lubit E, Kuftinec MM. Hypodontia in children with various types of clefts. *Angle Orthod.* 2000;70(1):16-21.

Shaw GM, Lammer EJ. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *J Pediatr.* 1999;134(3):298-303.

Shokri A, Poorolajal J, Khajeh S, Faramazi F, Kahnjamouei HM. Prevalence of dental anomalies among 7- to 35-year-old people in Hamadan, Iran in 2012-2013 as observed using panoramic radiographs. *Imaging Sci Dent.* 2014;44(1):7-13.

Silva Filho OG, Souza Freitas JA. Caracterização morfológica e origem embriológica. In: Trindade IEK, Silva Filho OG, coordenadores. *Fissuras labiopalatinas: uma abordagem interdisciplinar.* São Paulo: Santos Editora; 2007.

Silva Filho OG, Freitas JAS, Ozawa TO, Trindade-Suedam IK. Fissuras labiopalatinas: fundamentos terapêuticos instituídos no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC) da USP, em Bauru. In: Mélega JM, Viterbo F, Mendes FH, organizadores. *Cirurgia plástica: os princípios e a atualidade.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 285-304.

Slayton RL, Williams L, Murray L, Wheeler JC, Lidral AC, Nishimura CJ. Genetic association studies of cleft lip and /or palate with hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate Craniofac J.* 2003;40(3):274-9.

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.* 2006;43(4):457-65.

Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet.* 2004;13(1):R73-81.

Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Parent-of-origin effects for MSX1 in a Chilean population with nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(8):2011-6.

Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, Wu T, Fallin MD, Ingersoll RG, et al. Evidence that TGFA influences risk to cleft lip with/without cleft palate through unconventional genetic mechanisms. *Hum Genet.* 2009;126(3):385-94.

Suzuki A, Watanabe M, Nakano M, Takahama Y. Maxillary lateral incisors of subjects with cleft lip and/or palate: Part 2. *Cleft Palate Craniofac J.* 1992;29(4):380-4.

Ten Cate R. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2001.

Terwilliger JD, Göring HH. Gene mapping in the 20 th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol.* 2000;72(1):63-132.

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 Craniofac J*. 1998;35:154-60.

van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet*. 2000;24(4):342-3.

van den Boogaard MJ, Créton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, et al. Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *J Med Genet*. 2012;49(5):327-31.

Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discover view for understanding dental anomalies. *Am J Dentofacial Orthop*. 2000;117(6):650-6.

Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX 1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet*. 1996;13:417-21.

Vichi M, Franchi L. Abnormalities of the maxillary incisors in children with cleft lip and palate. *ASDC J Dent Child*. 1995;62(6):412-7.

Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res*. 2003;82(3):162-5.

Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res*. 2008;87(2):119-25.

Vieira AR. Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate. *Front Oral Biol*. 2012;16:19-31.

Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res*. 2004;83(9):723-7.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A*. 2008a;146A(11):1406-13.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for cleft. *Genet Med*. 2008b;10(9):688-74.

Vieira AR, D'Souza RN, Mues G, Deeley K, Hsin HY, Küchler EC, et al. Candidate gene studies in hypodontia suggest role for FGF3. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2013;14(6):405-10.

Waltrick-Zambuzzi MR, Vieira TCS, Romanos HF, Macedo EE, Granjeiro JM, Kuchler EC. Avaliação do rendimento, pureza e integridade do DNA genômico em diferentes protocolos de coleta de células bucais. *Int J Dent*. 2012;11(1):12-8.

Watkins SE, Meyer RE, Strauss RP, Aylsworth AS. Classification, epidemiology, and genetics of orofacial clefts. *Clin Plast Surg*. 2014;41(2):149-63.

Weinberg SM, Neiswanger K, Martin RA, Mooney MP, Kane AA, Wenger SL et al. The Pittsburgh Oral-Facial Cleft study: expanding the cleft phenotype. Background and justification. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006;43(1):7-20.

Wen Y, Lu Q. A multiclass likelihood ratio approach for genetic risk prediction allowing for phenotypic heterogeneity. *Genet Epidemiol*. 2013;37(7):715-25.

World Health Organization. Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies: Geneva: WHO; 2002.

Wyszynski DF, Beaty TH. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology*. 1996;53(5):309-17.

Yáñez-Vico RM, Iglesias-Linares A, Gómez-Mendo I, Torres-Lagares D, González-Moles MÁ, Gutierrez-Pérez JL et al. A descriptive epidemiologic study of cleft lip and palate in Spain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;114(5S):S1-4.

Yatabe MS, Garib DG, Janson G, Poletto RS, Ozawa TO. Is the presence of Simonart's band in patients with complete unilateral cleft lip and palate associated with the prevalence of missing maxillary lateral incisors? *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;144(5):649-53.

Zhang TX, Beaty TH, Ruczinski I. Candidate pathway based analysis for cleft lip with or without cleft palate. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2012;11(2).

ANEXOS

ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da agenesia dentária familiar e fissura labiopalatina e sua relação com polimorfismos nos genes IRF6, MSX1, PAX9, TGFA, WNT10A, AXIN2

Pesquisador: Melissa Lancia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 09715512.3.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 232.325

Data da Relatoria: 26/03/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Mestrado, intitulado "Investigação da agenesia dentária familiar e fissura labiopalatina e sua relação com polimorfismos nos genes IRF6, MSX1, PAX9, TGFA, WNT10A, AXIN2", de autoria de Melissa Lancia, sob orientação da Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves e co-orientação da Profa. Dra. Daniela Gamba Garib e da Dra. Rita de Cássia Moura Carvalho Lauris.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Realizar investigação da agenesia dentária e fissura labiopalatina e sua relação com os genes IRF6, MSX1, PAX9, TGFA, WNT10A e AXIN2.

Objetivo específico: Investigar polimorfismos nos genes IRF6, MSX1, PAX9, TGFA, WNT10A e AXIN2, candidatos à agenesia dentária e fissuras labiopalatinas em pacientes e, quando possível, em seus familiares com e sem fissura labiopalatina e agenesia dentária.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Pode-se afirmar que os riscos são próximos de zero, pois a pesquisa envolve coleta de saliva e utilização de informações de dados de prontuário e radiografias pré existentes.

Benefícios: Constituem uma importante contribuição ao conhecimento das condições do polimorfismo genético como fator contribuinte da etiologia e nas características das populações com anomalias dentárias e fissuras labiopalatinas.

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA

CEP: 17.012-900

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: uep_projeto@centrinho.usp.br

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto contemplará uma amostra de 200 indivíduos, divididos em 4 grupos (50 indivíduos com fissura e agenesia dentária; 50 indivíduos somente com fissura; 50 indivíduos somente com agenesia dentária e 50 indivíduos sem fissura e sem agenesia dentária), com o objetivo principal de investigar agenesia dentária e fissura labiopalatina e sua relação com os genes IRF6, MSX1, PAX9, TGFA, WNT10A e AXIN2.

Para tanto, será feita a coleta de saliva dos pacientes selecionados pela mestrandia, de acordo com os critérios pré-estabelecidos, no Setor Odontológico do HRAC/USP. Os indivíduos selecionados e seus familiares, em primeiro grau, passarão pela coleta de saliva, após o aceite e assinatura do TCLE, durante consultas de rotina no HRAC/USP. Os indivíduos voluntários, pertencentes aos grupos 3 e 4, também assinarão o TCLE, após aceitação de fazerem parte do estudo. O material coletado será devidamente acondicionado no Laboratório da Disciplina de Farmacologia e Biologia Molecular, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP, onde será realizada a extração de DNA e, posteriormente, a análise molecular por PCR em tempo real. O recurso financeiro será solicitado à FAPESP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos necessários foram apresentados e encontram-se adequados.

Recomendações:

Em relação ao item 4 da lista de pendências, sabe-se que, clinicamente, não se é possível confirmar se a presente característica clínica (seja ela uma fissura labiopalatina, ou uma agenesia dentária ou, ainda, a presença de ambas as características) possa fazer parte da síndrome de van der Woude. Por outro lado, torna-se inviável a análise do gene IRF6, o que não faz parte dos objetivos do presente trabalho. Portanto, fica aqui a sugestão de se excluir os casos de recorrência familiar de fissura labiopalatina, reduzindo, assim a probabilidade de contaminação da amostra.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores responderam e esclareceram todos os itens solicitados por esse Comitê, acrescentando, devidamente, as alterações no corpo do projeto. Dessa forma, não deixaram dúvidas quanto às questões éticas do trabalho.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Colegiado acatou o parecer do relator em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-900
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: uep_projeto@centrinho.usp.br

Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador fica responsável pela entrega na Seção de Apoio a Pesquisa do SVAPEPE dos relatórios semestrais e final.

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

BAURU, 28 de Março de 2013

Assinador por:
Marcia Ribeiro Gomide
(Coordenador)

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** uep_projeto@centrinho.usp.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, responsável pelo paciente _____, após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa: Investigação da agenesia dentária familiar e fissura labiopalatina e sua relação com polimorfismos nos genes *IRF6*, *MSX1*, *PAX9*, *TGFA*, *WNT10A*, *AXIN2*, realizada por: Melissa Lancia nº do Conselho: 5393401, sob orientação do Dr(a): Lucimara Teixeira das Neves, nº do Conselho: 50962, **que tem como objetivo: Analisar, por meio da coleta de saliva, os genes *IRF6*, *MSX1*, *PAX9*, *TGFA*, *WNT10A*, *AXIN2* contido nas células da saliva, que caso apresente alguma mutação ou alteração pode estar relacionado com a ocorrência da fissura e ausência congênita dos dentes. A coleta da saliva será realizada uma única vez e por não ser um procedimento invasivo não causa riscos em potencial para a pessoa que aceitar fazer parte do estudo.**

"Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8421".

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 10 do Código de Ética Odontológico).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de 201____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa
ou responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

* CAMPO A SER PREENCHIDO PELO REPRESENTANTE LEGAL DO MENOR OU INCAPAZ.

Nome do Pesquisador Responsável: Melissa Lancia
Endereço Institucional (Rua, Nº): Alameda Otávio Pinheiro Brizolla 9-70
Departamento de Farmacologia
Cidade: Bauru Estado: SP CEP: 17100-000
Telefone: (014) 3235 8282 E-mail: melissalancia@usp.br

ANEXO C - Formulário de Permissão para uso de registros para fins científicos

**Formulário de Permissão para uso de registros para fins científicos
(fotografias, radiografias, tomografias e respectivos laudos odontológicos e médicos, vídeo
imagens, amostra de voz, registros clínicos, imagens de órgãos e espécimes para pesquisa,
fins didáticos e publicação de artigos científicos)**

Eu, _____, brasileiro, residente no endereço _____, na cidade de _____ - _____, RG Nº _____, permito à(s) Dra(s) Melissa Lancia e Lucimara Teixeira das Neves o uso e publicação de meus registros **(fotográficos, radiografias, tomografias e respectivos laudos odontológicos e médicos, vídeo imagens, amostra de voz, registros clínicos, imagens de órgãos e espécimes) para pesquisa, fins didáticos e publicação de artigos científicos**. Estou ciente de que não serei remunerado(a) pelo uso desses registros.

Entendo que poderei ser reconhecido(a) por terceiros e que as minhas documentações clínicas poderão ser publicadas na internet e serem acessadas pelo público em geral, embora haja sigilo quanto às informações pessoais. Os profissionais citados acima e/ou os responsáveis pelo uso das imagens não poderão ser responsabilizados pela eventual utilização inadequada das mesmas.

Estou ciente de que, caso não aceite assinar este termo, receberei dos profissionais citados acima a mesma qualidade de atendimento e tratamento.

_____, _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura: _____

Nome do Paciente: _____

Em caso de paciente menor de 18 anos:

Eu, _____, responsável legal pelo paciente _____, permito o uso de suas imagens para fins científicos, de acordo com as condições expressas acima, que foram explicadas de forma clara.

Assinatura do responsável pelo paciente: _____

Nome do responsável pelo paciente: _____

Aprovação do CEP ____/____/2013.

ANEXO D

Prezada Senhora Coordenadora,

Bauru, 14 de maio de 2014.

Solicitamos ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC –USP que o projeto aprovado em 28/03/2013 (CAAE: 09715512.3.0000.5441). intitulado : **“Investigação da agenesia dentária familiar e fissura labiopalatina e sua relação com polimorfismos nos genes IRF6, MSX1, PAX9, TGFA, WNT10A, AXIN2”** de autoria de Melissa Lancia (aluna de mestrado) e da Profa Dra. Lucimara Teixeira das Neves (orientadora), cadastrado/apresentado neste Comitê como dissertação de mestrado da aluna Melissa Lancia seja classificado/considerado a partir de agora como **Projeto Temático** uma vez que devido aos prazos da aluna para a defesa da dissertação e também a restrição orçamentária do orientador o mesmo foi realizado parcialmente. Até o momento, para defesa de dissertação da aluna, conforme será apresentado em relatório parcial a ser entregue a este Comitê em julho de 2014, foi realizada somente a genotipagem no gene MSX1(rs 12532) e por esse motivo o título utilizado para a dissertação será: “Estudo de associação entre polimorfismo genético e os fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária não síndrômicas”. Ressalta-se que o projeto na íntegra da proposta inicial continuará a ser executado, por um período de mais 36 meses, em linha de pesquisa e sob a orientação/coordenação da Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves envolvendo para a sua continuação mais dois alunos de mestrado e um outro de doutorado a serem definidos pela orientadora Coordenadora do estudo.

Nesta oportunidade aproveito para reiterar a V. Exa.meus protestos de elevada estima e consideração.

Atenciosamente

Prof. Dra. Lucimara T. das Neves
Orientadora e Coordenadora do projeto

Melissa Lancia
Melissa Lancia

Aluna de mestrado do programa de pós-graduação em Ciências da Reabilitação do HRAC-USP

EXma Sra.
CD Silvia Maria Graziadei
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa CEP – HRAC/USP