UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

JOSÉ FRANCISCO MATEO CASTILLO

Investigação de variantes genéticas nos genes *AXIN2* e *RUNX2* nas fissuras orofaciais não sindrômicas associadas à agenesia dentária

BAURU

2019

JOSÉ FRANCISCO MATEO CASTILLO

Investigação de variantes genéticas nos genes *AXIN2* e *RUNX2* nas fissuras orofaciais não sindrômicas associadas à agenesia dentária

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

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lucimara Teixeira das Neves

BAURU

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

R. Silvio Marchione, 3-20
Caixa Postal: 1501
17012-900 - Bauru – SP – Brasil
Telefone: (14) 3235-8000

Prof. Dr. Vahan Agopyan – Reitor da USP

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos – Superintendente do HRAC /USP

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta Tese.

José Francisco Mateo Castillo

Bauru, ____ de _____ de _____.

Mateo Castillo, José Francisco

Investigação de variantes genéticas nos genes *AXIN2* e
RUNX2 nas fissuras orofaciais não sindrômicas associadas à
agenesia dentária /José Francisco Mateo Castillo. Bauru, 2019.
102p.; il.; 31cm.

Tese (Doutorado-Área de concentração: Fissuras
Orofaciais e Anomalias Relacionadas) – Hospital de
Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São
Paulo.

Orientador: Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves

Descritores: Agenesia dentária; Etiologia; Fissura de
Lábio; Fissura Palatina; Polimorfismos genéticos; Palatina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

José Francisco Mateo Castillo

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

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas

Aprovado em: 19/08/2019

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lidiane de Castro Pinto

Instituição: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais/USP

Profa. Dra. Cláudia Ramos Pinheiro

Instituição: Centro de Pós-graduação em Odontologia (CPO-UNINGÁ)

Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf

Instituição: Universidade Sagrado Coração

Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves. (Orientadora)

Instituição Hospital de Anomalias Craniofaciais/Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Fukushiro

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP

Data de depósito da dissertação junto à SPG: 10/07/2019

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese...

A Deus:

Por ser minha força, meu guia e provedor de tudo o que preciso nessa vida.

A minha família e amigos:

Por ser o motor que motiva todos os meus dias, por me apoiar em todos momentos e circunstâncias.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: **Maria Adelfa Castillo e Antonio Mateo**, por ter me dado a vida e tudo o que sou hoje. Não há palavras para lhes agradecer tudo o que fazem por mim.

A todos meus irmãos: Porque além de irmãos são meus melhores amigos e ponto de apoio. De forma particular a **Fernelis e Oscar Mateo** por serem meu apoio a todo momento.

A todos meus amigos: que sem fazer menção em particular, lhes expresso toda a gratidão por serem minha segunda família e estarem comigo quando mais precisei. Especialmente **Otávio Rodrigues de Lara, Barbara Camilo Rosa e Carolina Maia Silva** pelo apoio, ajuda, e pela força durante todos os momentos do desenvolvimento deste estudo. Obrigado por serem indispensáveis nas diferentes etapas deste trabalho, tenho certeza que sem sua ajuda isto não seria possível.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora **Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves**: por me acolher e depositar sua confiança em mim desde o primeiro dia, sempre com um sorriso e boa vontade.

Aos meus professores e amigos: **Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama, Profa. Dra. Lidiane Castro Pinto, Profa. Dra. Claudia Ramos Pinheiros, Prof. Dr. Tulio Olano Dextre**, por toda a força proporcionada ao longo deste caminho e ser um exemplo a seguir, também pela grande amizade, ajuda e apoio em todo momento.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP. Especialmente a **Thiago Jose Dionísio**: por sua disponibilidade e ajuda no laboratório e por dividir seus conhecimentos sempre com muita alegria.

Aos meus colegas da pós-graduação: por ser parte deste caminho. De forma particular à **Thais Garbieri, à Maria Carolina de Moraes Pereira, Thaís Bernardes de Queiroz e à Gabriela Moraes Oliveira**. Obrigado pela parceria e amizade ao longo da nossa trajetória na pós-graduação.

Aos colegas do setor de **Endodontia HRAC/USP**: os residentes pelo convívio ao longo desta trajetória, a responsável do Setor **Profa. Dra. Lidiane Castro Pinto** obrigado pela ajuda, paciência e dispor parte do espaço físico do seu trabalho para a coleta e desenvolvimento deste trabalho. A auxiliar **Ivone Macedo**, obrigado pelo carinho, disponibilidade e sua vontade sempre em me ajudar durante a coleta da pesquisa, sem sua ajuda não seria possível.

A todos os **Voluntários** que aceitaram participar do estudo, eternamente grato por sua colaboração.

AGRADECIMENTOS PARTICULARES E INSTITUCIONAIS

Ao **Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais e a Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo**. É uma imensa honra poder me formar neste grande centro de estudo.

À Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP e sua Presidente **Profa. Dra. Ana Paula Fukushiro**. E às funcionárias da secretaria da pós-graduação **Lucy Honda Higashi, Maria José Bento e Ana Regina Angelo**: por toda a ajuda fornecida e o auxílio constante.

Às Professoras da banca examinadora, composta por **Profa. Dra. Lidiane Castro Pinto, Profa. Dra. Claudia Ramos Pinheiros, Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf**, pelo esforço exercido, assim como também considerações pertinentes para a melhora deste estudo, Muito Obrigado.

À Chefe Técnica - Divisão de Odontologia - HRAC-USP **Profa. Dra. Rita de Cássia Moura Carvalho Lauris**: pelas facilidades e disponibilidade fornecidas durante as diferentes etapas da pesquisa.

Aos funcionários da seção de arquivos, agendamento e recepção do **HRAC-USP**, especialmente: **Sandrinha, Flavio, Celia, Rodrigo, Jonatan** por me ajudarem com todos os dados necessários para o desenvolvimento deste estudo.

À equipe de profissionais da UEP: **Rosemeire Ap. G. Botelho, Flavia Cintra, Tatiana Alonso, Rafael Mattos de Deus**; obrigado por estar sempre prontos para me auxiliar.

À **CAPES** pelo apoio financeiro recebido.

Por fim agradeço, sem fazer menção, a todos que me ajudaram e colaboraram para que este sonho seja realidade.

Muito obrigado.

*A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes
que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.*

Charles Chaplin.

RESUMO

Mateo-Castillo. Investigação de variantes genéticas nos genes *AXIN2* e *RUNX2* nas fissuras orofaciais não sindrômicas associadas à agenesia dentária [Tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2019.

A fissura labiopalatina representa a anomalia craniofacial mais comum nos seres humanos, constituindo um conjunto de deformidades congênitas caracterizadas pela deficiência ou falha de fusão dos processos faciais. A agenesia dentária é a anomalia do desenvolvimento dentário mais prevalente na dentição humana, definida como a ausência de qualquer germe dentário na área do dente correspondente. Tanto as fissuras labiopalatinas como a agenesia dentária são fenótipos derivados de alterações do desenvolvimento no período embrionário. A literatura relata que variações genéticas em inúmeros genes, dentre eles o *AXIN2* e *RUNX2*, podem ter um papel importante na formação craniofacial e dentária, e assim, esses genes podem estar envolvidos na etiologia destes fenótipos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar possíveis associações entre polimorfismos (rs2240307 e rs11655966) no gene *AXIN2* e (rs1934328) no gene *RUNX2* com esses fenótipos combinados. Foram selecionados para o estudo 303 indivíduos divididos em 3 grupos: Grupo I: 101 indivíduos com fissura completa de lábio e palato, não sindrômica associada a agenesia dentária; Grupo II: 101 indivíduos com diagnóstico de fissura completa de lábio e palato não sindrômica que não apresentavam agenesia dentária e Grupo III: 101 indivíduos sem fissura labiopalatina ou malformações craniofaciais e sem presença do fenótipo agenesia dentária. Foram selecionadas para investigação 3 variantes polimórficas: (rs2240307 e rs11655966) no gene *AXIN2* e (rs1934328) no gene *RUNX2*, genotipadas por meio de ensaios inventoriados para discriminação alélica por PCR Real Time. Os resultados foram analisados usando o software SDS 1.7 (Applied Biosystems). As frequências alélicas e os resultados foram comparados entre os 3 grupos. Foi utilizado o teste de Qui-quadrado e o teste Exato de Fisher para cada marcador genético a fim de avaliar a significância das diferenças observadas nas frequências dos polimorfismos. Os resultados obtidos, a partir da população brasileira incluída neste estudo, sugerem que o polimorfismo rs1934328 no gene *RUNX2* possui um possível envolvimento na etiologia das agenesias dentárias associada à fissura

labiopalatina. O polimorfismo rs11655966 no gene *AXIN2* aparentemente não está associado aos fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária. O polimorfismo rs2240307 do gene *AXIN2* pode estar relacionado à ocorrência de fissura labiopalatina associado ou não à presença de agenesia dentária.

Palavras Chaves: Agenesia dentária; Etiologia; Fissura de Lábio; Fissura Palatina; Polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

Mateo-Castillo. Investigation of genetic variants in the genes *AXIN2* and *RUNX2* in non-syndromic orofacial clefts associated with tooth agenesis [Thesis]. Bauru: Hospital of Rehabilitation of Craniofacial Abnormalities. University of São Paulo; 2019.

The cleft lip and palate represents the most common craniofacial anomaly in humans, consisting of a collection of congenital deformities characterized by a deficiency or failure of fusion of facial processes. Tooth agenesis is the most prevalent development anomaly in the human dentition, defined as the absence of tooth germ in the location of the corresponding teeth. Both cleft lip and palate and dental agenesis are phenotypes derived from alterations in the development during the embryonic period and the literature reports that genetic variations in countless genes, among them the *AXIN2* and the *RUNX2*, may play an important role in the craniofacial and dental formation, and these may be related with the etiology of these phenotypes. Thus, the aim of this study will be to investigate possible associations between (rs2240307 and rs11655966) in the gene *AXIN2* and (rs1934328) in the gene *RUNX2* with these phenotypes combined. 303 individuals will be selected divided into 3 groups: Group 1: 101 individuals with non-syndromic complete cleft lip and palate associated with dental agenesis. Group 2: 101 individuals with diagnosis of non-syndromic complete cleft lip and palate without dental agenesis. Group 3: 101 Individuals either without cleft lip and palate or craniofacial malformations and without the presence of the dental agenesis phenotype. 3 polymorphic variants were selected for the investigation, (rs2240307 and rs11655966) in the gene *AXIN2* and (rs1934328) in the gene *RUNX2* to be genotyped by inventorization for allelic discrimination on PCR Real Time. The results will be analyzed utilizing the software SDS 1.7 (Applied Biosystems). The allelic frequencies and the results will be compared between the 3 groups. The Chi-Squared test will be used for each genetic marker in order to evaluate the significance of the differences observed in the frequencies of the polymorphisms. The results obtained from the population included in this study suggest that the polymorphism rs1934328 in the gene *RUNX2* has a possible relationship with tooth agenesis associated with cleft lip and palate. The polymorphism rs11655966 in the gene *AXIN2* is apparently not associated with the phenotypes of the cleft lip and palate and the tooth agenesis. The polymorphism

rs2240307 in the gene *AXIN2* could be related to the occurrence of cleft lip and palate associated or not with the presence of tooth agenesis.

Key words: Cleft Lip; Cleft Palate; Etiology; Polymorphism genetic; Tooth Agenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplo de uma amostra homozigota para a sonda VIC..... 44
- Figura 2.** Representação de uma amostra homozigota para a sonda FAM..... 45
- Figura 3.** Exemplo de uma amostra heterozigota, sendo observados os dois tipos de sonda, representados por VIC e FAM..... 45
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características dos genes <i>AXIN2</i> e <i>RUNX2</i> investigados no presente estudo.....	43
Tabela 2.	Distribuição por arcada dentária dos dentes acometidos pela agenesia dentária.....	50
Tabela 3.	Distribuição do número de indivíduos que apresentaram 1 ou mais dentes com agenesia dentária nos 101 casos avaliados com este fenótipo.....	50
Tabela 4.	Comparação do grupo I (FLP com AG) com o grupo II (FLP sem AG) para o rs1934328 no gene <i>RUNX2</i>	52
Tabela 5.	Comparação do grupo I (FLP com AG) com grupo III (Controle) para o rs1934328 no gene <i>RUNX2</i>	52
Tabela 6.	Comparação do grupo II (FLP sem AG) com o grupo III (Grupo Controle) para o rs1934328 no gene <i>RUNX2</i>	53
Tabela 7.	Comparação do grupo I + grupo II (FLP com e sem AG) com grupo III (Grupo Controle) para o rs1934328 no gene <i>RUNX2</i>	54
Tabela 8.	Comparação do grupo I (FLP com AG) com o grupo II (FLP sem AG) para o rs11655966 no gene <i>AXIN2</i>	54
Tabela 9.	Comparação do grupo I (FLP com AG) com grupo III (Controle) para o rs11655966 no gene <i>AXIN2</i>	55
Tabela 10.	Comparação do grupo II (FLP sem AG) com o grupo III (Grupo Controle) para o rs11655966 no gene <i>AXIN2</i>	56
Tabela 11.	Comparação do grupo I + grupo II (FLP com e sem AG) com grupo III (Grupo Controle) para o rs11655966 no gene <i>AXIN2</i>	56
Tabela 12.	Comparação do grupo I (FLP com AG) com o grupo II (FLP sem AG) para o rs2240307 no gene <i>AXIN2</i>	57

Tabela 13. Comparação do grupo I (FLP com AG) com grupo III (Controle) para o rs2240307 no gene <i>AXIN2</i>	57
Tabela 14. Comparação do grupo II (FLP sem AG) com o grupo III (Grupo Controle) para o rs2240307 no gene <i>AXIN2</i>	58
Tabela 15. Comparação do grupo I + grupo II (FLP com e sem AG) com grupo III (Grupo Controle) para o rs2240307 no gene <i>AXIN2</i>	58

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Agenesia Dentária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos
CPD	Centro de Processamento de Dados
CPO	Centro de Pós-graduação em Odontologia
CROSP	Conselho Regional Odontologia São Paulo
dbSNP	Do inglês: The Single Nucleotide Polymorphism Database
FLP	Fissuras labiopalatinas
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IC	Intervalo de Confiança
NV	Nascimentos Vivos
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNINGA	Centro Universitário Ingá
USP	Universidade de São Paulo
VWS	Síndrome de Van der Woude

LISTA DE SIMBOLOS

χ^2	Qui-quadrado
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
mL	Mililitro
ng/μL	Nanograma por Microlitro
nm	Nanômetro
xg	Unidade de rotação (Força G)
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Fissuras Labiopalatinas	19
1.2	Agenesia Dentária	21
1.3	Polimorfismos genéticos nos Genes <i>AXIN2</i> e <i>RUNX2</i>	23
1.4	O gene <i>AXIN2</i>	23
1.5	O gene <i>RUNX2</i>	25
2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	29
3	OBJETIVO GERAL	33
4	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Casuística	37
4.2	Seleção da amostra	38
4.3	Método da coleta de material biológico (saliva) para extração de DNA.....	39
4.4	Extração de DNA a partir de saliva	40
4.5	Quantificação do DNA extraído da saliva.....	42
4.6	Diluição das amostras de DNA para genotipagem	42
4.7	Análise Molecular.....	42
4.8	Genotipagem	43
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS.....	89

Introdução e Revisão da Literatura

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Fissuras Labiopalatinas

As fissuras labiopalatinas (FLP) são um conjunto de defeitos congênitos caracterizados pela deficiência ou falha de fusão dos processos faciais que ocorre na vida intrauterina (TRINDADE; SILVA FILHO, 2007; NEVES, 2009; FREITAS et al., 2012; DESHPANDE; GOUDY, 2019).

De acordo com a literatura, dentre o grupo das malformações craniofaciais, as FLP são o fenótipo mais comum na espécie humana, apresentando uma prevalência geral que varia de acordo com os diferentes grupos étnicos e distribuição geográfica. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; TRINDADE; SILVA FILHO, 2007; VOLPATO et al., 2015; RAFIGHDOOST et al., 2017). Numericamente, a prevalência aproximada nos diferentes grupos étnicos alcança uma média de 1/700 nascimentos vivos (NV) a nível mundial, sendo a população asiática a mais afetada, seguidos pela americana, brasileira e europeia com valores que oscilam entre 1/500 e 1/768 NV, e a população menos afetada é a população com descendência africana em que as fissuras afetam 1/2500 NV (GREENE, 1968; MURRAY, 2002; TRINDADE; SILVA FILHO, 2007; DIXON, 2011; VOLPATO et al., 2015; DESHPANDE; GOUDY, 2019).

De maneira geral, as FLP podem se apresentar de duas formas: como fissuras sindrômicas e como fissuras não sindrômicas. As fissuras sindrômicas ocorrem em 30-40% dos casos, e são classificadas nesse grupo quando ocorrem como um fenótipo dentro de um quadro de uma síndrome específica, geralmente com etiologia genética (exemplos são a Síndrome de Van der Woude, a Síndrome Velo-Cardiofacial, a Síndrome de Stikler, a Síndrome Opitz-G entre outras) (DESHPANDE; GOUDY, 2019). A Síndrome de Van der Woude (VWS) representa percentualmente a anomalia mendeliana mais comum na qual a fissura labiopalatina faz parte do fenótipo descrito da síndrome, alcançando uma prevalência aproximada de 2% dos casos gerais de fissuras (GORLIN; COHEN; HENNEKAM, 2001; LOS; BAINES; GUTTMANN-BAUMAN, 2017). A VWS possui um padrão de herança autossômica dominante com penetrância e expressividade variável (DESHMUKH et

al., 2014; LOS; BAINES; GUTTMANN-BAUMAN, 2017). A principal característica clínica da síndrome, são as fístulas paramedianas congênitas no lábio inferior, descritas inicialmente por Demarquay em (1845), sendo estas observadas em forma de depressões simétricas e comumente bilaterais em relação à linha média (VAN DER WOUDE, 1954; GORLIN, 2001; DESHMUKH et al., 2014). Outras características clínicas muito comuns nos casos de VWS e que são consideradas para o diagnóstico da síndrome são as fissuras labiopalatinas e as agenesias dentárias, sendo que as fissuras ocorrem em 80% dos casos e em menor frequência as agenesias dentárias em aproximadamente 20% a 40% dos casos (HERSH; VERDI, 1992; KONDO et al., 2002; VIEIRA AR, 2003; DESHMUKH et al., 2014). As fissuras não sindrômicas, são assim classificadas quando acontecem de forma isolada, como um fenótipo único, não associado a quadros de malformações múltiplas ou síndromes e por isso, na literatura, são também conhecidas como fissuras labiopalatinas isoladas (FREITAS et al., 2012; DESHMUKH et al., 2014; WU et al., 2015). No conjunto das fissuras que acometem o complexo orofacial, as fissuras isoladas representam o maior número quanto à prevalência, alcançando porcentagens que oscilam entre 60-70% dos casos, apresentando um padrão de herança multifatorial, onde existe a interação de fatores genéticos e ambientais ligados à sua etiologia (MURRAY, 1995; TRINDADE; SILVA FILHO, 2007; MOSSEY et al., 2009; PAVRI; FORREST, 2013; ROOSENBOOM et al., 2015).

Relatos sobre associação genética e recorrência familiar na etiologia das fissuras labiopalatinas não sindrômicas, sugerem que a cada 5 indivíduos que apresentam este fenótipo pelo menos um possui histórico positivo na família. (CARINCI et al., 2000; RILEY et al., 2007; VIEIRA, 2008).

Estudos de associação investigando variantes genéticas tentam explicar o componente genético na ocorrência das fissuras labiopalatinas não sindrômicas e alterações decorrentes desta malformação, já que é processo embrionário padrão, por meio de regulação molecular, que ocorrem inúmeros processos celulares, entre eles a proliferação da lâmina mesodérmica lateral reforçada pela migração das células da crista neural formando os arcos faríngeos que posteriormente irão participar da formação do terço médio da face.

Para o esclarecimento do papel dos fatores genéticos na ocorrência das FLP, têm sido investigados vários genes que estão relacionados aos processos de formação do lábio e palato e que podem estar interferindo em alguma das etapas dos processos celulares e moleculares (proliferação, diferenciação, adesão e apoptose) levando conseqüentemente à ocorrência da fissura (VIERA, 2008). Estudos apontam que aproximadamente 350 genes candidatos (isolados ou em associação) já foram associados à ocorrência das fissuras orofaciais síndrômicas e não síndrômicas, dentre os quais figuram: *IRF6*, *MMP3*, *MSX1*, *FGF*, *DLX1*, *DLX3*, *DLX4*, *RUNX2*, *PAX9*, *GREM1*, *PVRL1*, *TIMP2*, *TGFA*, *TGFB3*, *RARA*, *AXIN2*, *SOX9*, TGF β Family, entre vários outros (MURRAY, 1995; JUGESSUR et al., 2003; VIEIRA et al., 2003; SULL et al., 2008; SULL et al., 2009; KOHLI; KOHLI, 2012; MOSTOWSKA et al., 2012; SABÓIA et al., 2015; IBARRA-ACRE, 2015; LIU et al., 2015; WU et al., 2015; DE SOUZA et al., 2016; FUNATO; NAKAMURA, 2017; JIA et al., 2017; GOWANS et al., 2018; DESHPANDE; GOUDY, 2019).

1.2 Agenesia Dentária

Também conhecida como hipodontia ou oligodontia, a agenesia dentária é definida como ausência de qualquer tecido diferencialmente calcificado (apontando para o esmalte ou dentina) na área do dente correspondente, ou seja, a falta congênita de um ou mais dentes na dentadura permanente ou decídua (ANTONARAKIS; SURI, 2014). Este fenótipo odontológico deriva de um transtorno durante a odontogênese, onde a lâmina dentária, por razões ainda desconhecidas, não induz à formação do germe dentário; constituindo assim a anomalia de desenvolvimento dentário mais comum da dentição humana (GARIB et al., 2010; DE SMALEN et al., 2016).

Excluindo os terceiros molares, a prevalência de agenesia dentária na população geral em diferentes etnias, apresentam valores entre 3,2 até 15,9% aproximadamente (POLDER et al., 2004; AFIFY; ZAWAWI, 2012; MENINI et al., 2012; ANTONARAKIS; SURI, 2014; DE SMALEN et al., 2016).

A prevalência de agenesia dentária nos indivíduos com fissuras orofaciais não síndrômicas varia dependendo do tipo de fissura, alcançando percentagens de até

47,5% na população brasileira (PARANAIBA et al., 2013); sabe-se que nos casos em que a fissura afeta o rebordo alveolar a prevalência pode estar aumentada. O dente mais afetado corresponde ao incisivo lateral superior, na área de fissura ou na região contralateral, seguida dos segundos pré-molares superiores e inferiores (LOURENÇO RIBEIRO et al., 2003; TORTORA et al., 2008; CAMPORESI et al., 2010).

Apesar da agenesia dentária ser uma das alterações odontológicas mais comuns em humanos e apresentar uma prevalência considerável em algumas etnias, sua etiologia ainda permanece desconhecida em sua totalidade. Contudo, sabe-se que fatores genéticos e/ou ambientais podem significar agentes causais para este fenótipo. Da mesma forma que as fissuras orofaciais, a agenesia dentária também pode ocorrer de forma isolada ou não sindrômica, que é a mais comum, ou associada a alguma síndrome ou anomalia congênita conhecida, como citado anteriormente na Síndrome de Van der Woude, na qual os sujeitos apresentam com frequência no quadro clínico as fissuras labiopalatinas associadas às agenesias dentárias (KLEIN et al., 2013; CHHABRA et al., 2014; LIU et al., 2015; DE SMALEN et al., 2016).

Diversos fatores adicionais têm sido considerados para a ocorrência da agenesia do incisivo lateral em sujeitos com fissura, especialmente aquelas que ocorrem na região das fissuras. A proximidade da fissura poderia ser um deles, pois a presença do defeito pode determinar um aporte sanguíneo menor ou mesmo deficiência de tecido ectomesenquimal decorrente da ausência de fusão entre os processos faciais (TSAI et al., 1998; KIM et al., 2006; WU et al., 2011). Além destes fatores, a maior frequência de anomalias dentárias também tem sido explicada como consequência dos procedimentos cirúrgicos reparadores das fissuras (PARAINABA et al., 2013).

Dentre os fatores genéticos já pesquisados no contexto das agenesias dentárias, mutações nos genes *EDA*, *AXIN2*, *MSX1*, *PAX9*, *RUNX2*, *AXIN2*, *WNT10A*, *EDAR*, *EDARDD*, *NEMO*, *KRT17*, têm sido associadas a casos de agenesia dentária não sindrômica (LAMMI et al., 2004; GASS et al., 2009; SONG et al., 2009; MOLIN et al., 2015).

1.3 Polimorfismos genéticos nos Genes *AXIN2* e *RUNX2*

SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), também conhecidos como polimorfismos de nucleotídeo único, são o tipo mais comum de variação na sequência do DNA humano. Um SNP ocorre quando um único nucleotídeo é substituído no genoma humano, e para que receba essa nomenclatura precisa ocorrer com uma frequência de pelo menos 1% na população (AMAYA et al., 2013).

A ocorrência de SNPs pode interferir em inúmeros mecanismos moleculares, em especial no padrão de expressão de um gene (SIQUEIRA JR et al., 2009). Dessa forma, os SNPs são um tipo de variante genética que poderia acarretar uma resposta diferente influenciado pelo perfil genético do indivíduo, podendo contribuir como um fator importante para algumas patologias (MORSANI et al., 2011).

Existem milhões de polimorfismos no genoma humano, e assim vem crescendo exponencialmente o número de estudos genéticos na tentativa de associar os polimorfismos genéticos com a susceptibilidade ou a ocorrência de algumas patologias mais frequentes na população. Um dos métodos utilizados são os estudos genéticos de associação. Nesses estudos, ao invés de estudar famílias nas quais se observa a segregação de uma doença em particular, são estudadas amostras de indivíduos afetados e não afetados dentro de uma população, e por meio da frequência dos genótipos, na qual certos alelos estão presentes em cada um destes grupos, é testada a associação com a patologia em questão (COSTA et al., 2007).

Nessa linha, tanto para as fissuras como para as agenesias dentárias vários polimorfismos vêm sendo investigados e associados ou não à ocorrência desses fenótipos. Dentre os genes candidatos encontram-se o *AXIN2* e o *RUNX2*.

1.4 O gene *AXIN2*

O gene *AXIN2* é um inibidor que desenvolve um papel importante na regulação molecular da via *WNT*. Em conjunto com esta via de sinalização, este gene participa da transdução celular e se expressa no mesênquima dentário, nos

odontoblastos e ameloblastos (ZENG et al., 1997; LAMMI et al., 2004; NIEMINEN et al., 2009; WANG et al., 2011; WONG et al., 2014). Células-tronco presentes nas suturas cranianas possuem a capacidade de auto regeneração, expansão e diferenciação, demonstrando papel fundamental no desenvolvimento do osso do crânio, e essas células expressam alto nível de RNA mensageiro do gene *AXIN2*. Variações neste gene tem sido associadas a anomalias esqueléticas no crânio de seres humanos semelhantes à craniossinostose (MARUYAMA et al., 2017). Na literatura, outras patologias também tem sido relacionadas a mutações nesse gene, especificamente alguns tipos de cânceres em humanos, incluindo câncer de pele, ovário, gastrointestinal e fígado; enquanto outros tipos de mutações foram identificadas pela primeira vez em uma família finlandesa de quatro gerações que apresentava agenesia dentária familiar e predisposição ao câncer colorretal (LAMMI et al., 2004; SALAHSHOR; WOODGETT, 2005; PEDACE et al., 2011). Um estudo em humanos realizado por Lammi et al. (2004) descreveu oito mutações no gene *AXIN2* relacionadas diretamente com agenesia dentária e dentre estas mutações, duas estariam relacionadas a defeitos que levaram à agenesia dentária síndrômica e outras mutações poderiam estar associadas a um quadro de agenesia, displasia ectodérmica e síndrome neoplásica. O restante das mutações encontradas foram associadas ao fenótipo da agenesia dentária não síndrômica (LAMMI et al., 2004; MARVIN et al., 2011).

Posteriormente, mutações no *AXIN2* também foram relatadas em pacientes com agenesia dentária síndrômica e não síndrômica (BERGENDAL et al., 2011; MARVIN et al., 2011). Nesse contexto, o estudo de Tak et al. (2018) que avaliou a expressão normal do gene *AXIN2* durante o processo de formação do lábio superior em modelo animal (embriões de galinha) indicou que o *AXIN2* participa direta ou indiretamente da regulação da integridade das células epiteliais durante o desenvolvimento dos lábios (TAK et al., 2018).

Evidências de associação entre os SNPs no gene *AXIN2* e risco de ocorrência de fissuras labiopalatinas na população polonesa foram relatadas por Mostowska et al. (2012). Os pesquisadores também detectaram que um determinado polimorfismo intrônico (rs3923087) no gene *AXIN2* foi capaz de diminuir o risco de desenvolver esta anomalia em quase duas vezes. Similar ao estudo acima apresentado, uma investigação na população brasileira realizado por Araújo et al.

(2016) identificou o polimorfismo rs11655966 como uma variável que poderia contribuir para a etiologia das fissuras de lábio e palato não sindrômica. Além disso, outros estudos publicados, realizados com diferentes grupos étnicos, encontraram associação de variações polimórficas do gene *AXIN2* com fissuras orofaciais (LETRA et al., 2009; PHAN et al., 2016).

1.5 O gene *RUNX2*

O gene *RUNX2* codifica um fator de transcrição, relacionado ao domínio Runt e pertence à família *RUNX*. Os fatores de transcrição pertencentes a essa família são compostos de duas subunidades: subunidade alfa que é codificada pelos genes *RUNX1*, *RUNX2* e *RUNX3*, que se liga ao DNA por meio de um domínio de Runt, e a subunidade beta, codificada através do gene *CBFB* e esta não apresenta ligação direta com o DNA; contudo essa subunidade beta aumenta a afinidade da subunidade alfa ao DNA (OMIM *600211; COHEN, 2009). O gene *RUNX2* tem sido identificado associado à diferenciação osteoblástica e morfogênese dentária especificamente dos ameloblastos e odontoblastos em modelos animais e também como um fator determinante na migração celular e invasão vascular óssea; em adultos expressa-se na medula óssea, timo e órgãos linfoides periféricos (OMIM *600211; COHEN, 2009). Apresentou expressão em células de carcinoma de mama, câncer de próstata e também foi relacionado à calcificação vascular em lesões ateroscleróticas (COHEN, 2009). Variações genéticas envolvendo este gene têm sido encontradas em indivíduos com craniossinostoses (KOMORI et al., 1997; STEIN et al., 2000; ABERG et al., 2004; TERRY et al., 2004; COHEN, 2009; MEFFORD et al., 2010).

Casos de indivíduos com agenesia dentária associados a variantes genéticas no gene *RUNX2* foram relatados por Molin et al. (2015), estudo no qual os pesquisadores analisaram a agenesia em quatro indivíduos da mesma família (mãe e três filhos). A mãe apresentava agenesia dentária isolada e todos os três filhos avaliados apresentavam agenesia de vários dentes associados com outras anomalias dentárias e micrognatia. Adicionalmente dois dos filhos apresentavam craniossinostoses, fenótipo associado diretamente ao gene *RUNX2*. Nesta família a

mãe e um dos filhos apresentavam somente o fenótipo de agenesia dentária isolada sem a presença de craniossinostoses, e na investigação de variantes genéticas, todos os sujeitos investigados (mãe e filhos) apresentavam duplicação de parte do cromossomo 6, que inclui a região referente ao gene *RUNX2* independente da presença da craniossinostoses (MOLIN et al., 2015).

Com relação às fissuras labiopalatinas não sindrômicas, estudos envolvendo o gene *RUNX2* relatam resultados de susceptibilidade entre este gene e a ocorrência do fenótipo. Sull et al. (2008), realizaram um estudo de trios com indivíduos de quatro grupos étnicos diferentes e os resultados indicaram que os SNPs (rs910586, rs2819861 e rs1934328) no gene *RUNX2* poderiam influenciar no risco de desenvolver fissuras não sindrômicas (SULL et al., 2008). Seguindo o mesmo modelo de estudo, Jung et al. (2014) avaliaram polimorfismos do gene *RUNX2* em indivíduos originários da Coreia investigando possíveis associações deste gene à predisposição às fissuras labiopalatinas não sindrômicas. No referido estudo, somente o SNP rs1934328 apresentou associação significativa para a etiologia dos fenótipos da fissura de lábio e fissura de palato, determinando que nos trios examinados este polimorfismo poderia ter envolvimento com o fenótipo (JUNG et al., 2014).

Conforme exposto, alguns estudos têm investigado variantes genéticas nos genes *AXIN2* e *RUNX2*, analisando sujeitos com os fenótipos fissura labiopalatina ou agenesia dentária ocorrendo isoladamente. No entanto, essas variantes ainda não foram exploradas na presença da combinação desses dois fenótipos.

Desta forma, o presente estudo, baseado na análise das frequências dos polimorfismos (rs2240307 e rs11655966) no gene *AXIN2* e (rs1934328) no gene *RUNX2*, objetivou investigar possíveis associações dessas variantes genéticas com os fenótipos fissura labiopalatina não sindrômica e agenesia dentária, e seu possível envolvimento como fator de risco na etiologia desses dois fenótipos combinados.

Justificativa do Estudo

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Considerando que tanto as fissuras labiopalatinas como as agenesias dentárias são fenótipos com prevalências consideráveis na população mundial, e que com frequência ocorrem associados em sujeitos com fissuras e além disso têm sido levantadas hipóteses acerca do componente genético na etiologia de ambos os fenótipos, o presente estudo se propôs a investigar uma possível predisposição genética individual a estes fenótipos. Cabe ressaltar que na literatura existem poucos trabalhos desta natureza e que no HRAC-USP ainda não foram desenvolvidos estudos que investigassem os polimorfismos (rs2240307 e rs11655966) no gene *AXIN2* e (rs1934328) no gene *RUNX2* na presença dos fenótipos fissuras labiopalatinas e agenesia dentária combinados.

Objetivo

3 OBJETIVO GERAL

Investigar se existe associação dos polimorfismos (rs2240307 e rs11655966) no gene *AXIN2* e (rs1934328) no gene *RUNX2* com os fenótipos fissuras labiopalatinas não sindrômicas isoladas e fissura labiopalatina não sindrômica combinada à agenesia dentária.

Casuística, Material e Método

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado seguindo princípios éticos e jurídicos do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos (CEP) do Hospital de Anomalias Craniofaciais – Universidade de São Paulo (HRAC-USP). Parecer Consubstanciado do CEP no. 2.539.631 (ANEXO I).

4.1 Casuística

Trata-se de um estudo observacional prospectivo do tipo caso-controle, para o qual foram convidados a participar 303 indivíduos de ambos os sexos, a partir de 18 anos de idade, divididos em três grupos distintos de acordo com os critérios de elegibilidade descritos abaixo:

Grupo I (caso): composto por 101 sujeitos, regularmente matriculados no HRAC-USP, com diagnóstico de fissura de lábio e palato unilateral não síndrômica que apresentassem, também, agenesia dentária de algum dente, com exceção dos terceiros molares (FLP com AG). O diagnóstico de fissura labiopalatina não síndrômica e a presença de agenesia dentária foram confirmados por meio das informações dos prontuários, laudos fotográficos e radiografias panorâmicas pertencentes aos arquivos no HRAC-USP; todos dados foram anotados uma ficha de avaliação clínica (ANEXO II).

Grupo II (caso): composto por 101 indivíduos, regularmente matriculados no HRAC-USP, com diagnóstico de fissura de lábio e palato unilateral não síndrômica sem agenesia dentária (FLP sem AG). O diagnóstico para os fenótipos fissura labiopalatina não síndrômica e ausência de agenesia dentária foram confirmadas seguindo os mesmos critérios estabelecidos para o grupo I.

Grupo III (controle): este grupo reuniu 101 indivíduos sem fissura labiopalatina ou qualquer tipo de malformações craniofaciais e sem a presença do fenótipo agenesia dentária. Estes indivíduos foram recrutados na Clínica odontológica do curso de ortodontia e implantodontia do Centro de Pós-graduação em Odontologia

CPO-UNINGÁ e no departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo FOB-USP. A confirmação de ausência dos fenótipos foi realizada mediante avaliação clínica, informações no prontuário e análise de radiografias panorâmicas arquivadas nos referidos locais.

Foi explicado minuciosamente, a todos os indivíduos selecionados nos diferentes grupos deste estudo, o objetivo principal deste trabalho com leitura detalhada do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO III), o qual foi assinado pelo voluntário e os mesmos receberam uma via do mesmo documento assinado pelo pesquisador principal. Para a abordagem dos voluntários de pesquisa, os mesmos compareceram para as consultas de rotina ao HRAC-USP, FOB-USP e CPO-UNINGÁ.

4.2 Seleção da amostra

A triagem para a seleção inicial dos sujeitos com fissura labiopalatina não sindrômica (grupo I e II) foi realizada solicitando uma listagem ao Centro de Processamento de Dados (CPD) do HRAC-USP dos indivíduos com idade acima de 18 anos com diagnóstico de fissura de lábio e palato unilateral não sindrômica que estavam em tratamento no período entre os anos 2018 e 2019. Nesta listagem foi realizada a seleção inicial e já com os dados dos sujeitos foram solicitados os prontuários correspondentes a cada paciente e as radiografias panorâmicas já existentes no arquivo radiográfico do HRAC-USP. Nos retornos de comparecimento às consultas nas datas agendadas para os atendimentos de rotina nas diferentes especialidades clínicas do protocolo de tratamento do HRAC-USP, o paciente foi abordado e convidado a participar do estudo. Desta forma, a amostra foi composta por conveniência de acordo com os retornos dos pacientes previamente selecionados, na data em que eles compareceram para as consultas de rotina no período de coleta da pesquisa.

Para a triagem e seleção do grupo III (controle) foram analisados prontuários e radiografias panorâmicas dos pacientes do curso de ortodontia e implantodontia do Centro de Pós-graduação em Odontologia CPO-UNINGÁ, abordados durante retornos, controle e sequência de tratamentos; e, também, de alunos e funcionários

do departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo FOB-USP. Em ambos os locais, os sujeitos foram convidados a participar da pesquisa.

4.3 Método da coleta de material biológico (saliva) para extração de DNA

Os indivíduos selecionados e que aceitaram participar do estudo foram orientados a não ingerir alimentos e bebidas, assim como não escovar os dentes por no mínimo meia hora antes do horário da coleta da saliva. No momento da coleta foi entregue um tubo Falcon estéril de 50 mL identificado para cada indivíduo e cada voluntário foi instruído a estimular a salivação, expectorando a saliva no tubo até obter 5mL de saliva.

A saliva coletada foi transportada até o Laboratório de Genética e Farmacologia do departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP, dentro de um recipiente de isopor com gelo triturado. Uma vez no Laboratório, as amostras foram alíquotadas em tubos estéreis de microcentrífuga de 1,5 mL devidamente identificados. Todos os tubos foram imediatamente armazenados em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

A coleta de saliva para extração de DNA dos voluntários do grupo I e II foi realizada na clínica odontológica, no setor de Endodontia do HRAC-USP o qual possui duas salas privativas adequadas para tal coleta. Para os integrantes do grupo III (Controle) as amostras de saliva foram coletadas na clínica odontológica do CPO-UNINGÁ antes ou após seu atendimento de rotina e no caso dos alunos e funcionários voluntários do departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP, as coletas ocorreram nas dependências do referido departamento.

Tanto a triagem dos voluntários como a coleta da saliva dos mesmos foram realizadas pelo doutorando cirurgião-dentista José Francisco Mateo Castillo (Nº USP 8902143) e (CRO-SP 110491). Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Genética e Farmacologia do departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP sob a orientação da Profa. Dra. Lucimara Teixeira das

Neves (CRO-SP 50962) com auxílio do especialista de laboratório Thiago José Dionísio (Nº USP 4305995).

4.4 Extração de DNA a partir de saliva

Inicialmente, os tubos com as amostras de saliva foram descongelados em um recipiente de isopor com gelo até retornar à temperatura ambiente, posteriormente as amostras foram homogeneizadas em vórtex Heidolph (Merse® Artigos para Laboratórios, Campinas, SP, Brasil), durante 10 segundos em velocidade máxima. Para a extração do DNA genômico, as amostras foram submetidas ao protocolo estabelecido e adaptado pelo Laboratório de Genética e Farmacologia do departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP utilizando o kit de protocolo de extração de DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) pré-padronizados e validados, seguindo as instruções do fabricante.

Após a homogeneização, as amostras foram colocadas na minicentrífuga Strategene MicroCentrifuge Nanofuge, Hoefer Scientific Instruments (Tomy Tech U.S.A., INC. Palo Alto CA, USA) durante 5 segundos para remoção da saliva residual da tampa. Em seguida, as amostras foram centrifugadas utilizando a centrífuga HITACHI High-speed Micro Centrifuge CF16RN (Hitachi Koki Co., Ltd. Hitachinaka, Ibaraki, Japan) a 15.000 xg de velocidade, por 35 segundos a temperatura ambiente (20 °C). Posteriormente foi removido o sobrenadante com a pipeta calibrada em 1000 µL preservando no fundo do microtubo o pellet de células. Imediatamente foram adicionados 200 µL de Phosphate Buffered Saline (PBS - composto pelos reagentes Cloreto de Sódio NaCl, Fosfato de Sódio NaHPO₄ Fosfato de Sódio Monobásico NaH₂PO₄ + H₂O) e realizado vórtex em velocidade máxima por 10 segundos. Os tubos foram novamente centrifugados a 15.000 xg de velocidade, por 35 segundos a temperatura ambiente (20 °C), o sobrenadante das amostras foi removido com pipeta calibrada a 300 µL e os tubos contendo as amostras foram homogeneizados manualmente com pequenas batidas com a ponta do dedo na superfície externa inferior do tubo.

Na sequência foram adicionados aos microtubos 600 µL de Nuclei Lysis Solution, sendo misturada com a pipeta, calibrada em 600 µL, 20 vezes cada amostra; logo, foi adicionado 3 µL de RNase A Solution, este conteúdo foi misturado por inversão dos tubos 5 vezes cada. As amostras foram levadas para banho-maria por 25 minutos a 37 °C. A seguir os microtubos foram levados à minicentrífuga e deixados durante 5 minutos à temperatura ambiente. Logo após, foram acrescentados 200 µL de Protein Precipitation Solution e realizado vórtex em velocidade máxima por 20 segundos e imediatamente invertidos 2 vezes cada amostra e submergidos em um recipiente de isopor com gelo durante 5 minutos. Finalizado o tempo no gelo, as amostras foram levadas para a centrifuga programada a 15.000 xg de velocidade, por 4 minutos e 15 segundos a temperatura ambiente (20 °C).

O sobrenadante das amostras foi transferido com o auxílio da pipeta, calibrada em 800 µL para um novo microtubo de 1,5 mL, devidamente identificado, contendo 600 µL de 2-Propanol (EMPLURA®, Darmstadt, Alemanha), sendo as amostras misturadas por inversão, 20 vezes. Depois, foram levadas para a centrifuga programada a 15.000 xg de velocidade, por 1 minutos e 15 segundos a temperatura ambiente (20 °C). A seguir, o sobrenadante foi descartado vertendo os microtubos e, posteriormente, foi agregado 600 µL de álcool 70% e os microtubos foram invertidos por 15 vezes e novamente levados para a centrífuga a 15.000 xg de velocidade, por 1 minutos e 15 segundos à temperatura ambiente (20 °C). Logo após a retirada das amostras da centrifuga, o sobrenadante foi removido em duas etapas, a primeira com a pipeta calibrada em 650 µL e o restante no fundo do microtubo com a pipeta calibrada em 10 µL com o intuito de remover o máximo do líquido possível. Todos os microtubos foram deixados abertos sobre a bancada durante aproximadamente 25 minutos para a secagem total. Uma vez secos, foi adicionado 50 µL DNA Rehydration Solution e as amostras foram levadas para banho-maria a 65 °C por 1 hora. Durante este período, as amostras foram retiradas do banho e homogeneizadas, mexendo o fundo do microtubo com a ponta do dedo, a cada 15 minutos. Completada esta fase, as amostras foram colocadas na minicentrífuga durante 10 segundos para que o conteúdo presente na tampa descesse.

4.5 Quantificação do DNA extraído da saliva

A quantificação do DNA obtido de todas as amostras foi realizada por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) em comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Esse equipamento fornece duas medidas importantes: concentração e pureza do DNA. Os valores referentes à concentração foram expressos em ng/μL, e para a aferição realizada no espectrofotômetro foram necessários de 2 μL de cada amostra. Os valores referentes à qualidade foram expressos por meio da relação das absorbâncias em 260 nm e 280 nm.

4.6 Diluição das amostras de DNA para genotipagem

A quantidade inicial de DNA para Genotipagem foi padronizada em 50 ng/μL. Após a adequada diluição das amostras de DNA, estas foram armazenadas em geladeira a 4°C para, na sequência, serem utilizadas para as análises moleculares.

4.7 Análise Molecular

Seleção dos polimorfismos

Foram selecionados para a avaliação genética 3 polimorfismos (SNPs), divididos da seguinte forma: 2 no gene *AXIN2* (rs2240307 e rs11655966) e 1 no gene *RUNX2* (rs1934328). Número de identificação no catálogo: C__25471570_10, C__466526_20 e C__9020300_10 respectivamente.

Esses polimorfismos foram escolhidos de acordo com os estudos de Letra et al. (2009); Mostowska et al. (2012); De Araújo et al. (2016); Sull et al. (2008) e Jung et al. (2014), e a partir de informações obtidas da base de dados do National Center for Biotechnology Information dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.gov/SNP/>).

Seguindo as informações cadastradas na base de dados foram descritas na tabela 1 as possibilidades nos locus gênicos do gene *RUNX2* (rs1934328) e do gene

AXIN2 (rs2240307 e rs11655966) e foram considerados os alelos como ancestrais e polimórficos, além da posição do polimorfismo no cromossomo e sua posição na região de cada gene.

Tabela 1. Características dos genes *AXIN2* e *RUNX2* investigados no presente estudo

Gene	SNP ID	Posição da base	SNP função	AA*	AP*
<i>RUNX2</i>	rs1934328	Chr 6:45498016	INTRON	T	A
<i>AXIN2</i>	rs11655966	Chr 17:65533532	INTRON	T	A
<i>AXIN2</i>	rs2240307	Chr 17:65558189	SYNONYMOUS	A	G

* A/A = alelo ancestral

* A/P = alelo polimórfico

4.8 Genotipagem

A análise dos polimorfismos foi realizada por meio da técnica PCR em tempo real. As reações foram realizadas no termociclador Viia 7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), por meio do método TaqMan, utilizando ensaios TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) pré-padronizados e validados experimentalmente, seguindo as instruções do fabricante. Esta técnica possibilita a análise das variantes dos SNPs, utilizando além do TaqMan Genotyping MasterMix (mix com todos os reagentes necessários para a reação da PCR), os primers específicos 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 de cada amostra. 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.

Os experimentos foram realizados em duplicata, em placas de 384 poços (catálogo 4309849, Applied Biosystems, Estados Unidos). Para cada uma das reações, para cada SNP, foi utilizado um produto final de 5 µL contendo 2 µL amostra de DNA diluído a 50 ng/µL, 2,5 µL do TaqMan Genotyping Master Mix (número de catálogo 4371355, Applied Biosystems, Estados Unidos), 0,125 µL do

ensaio pré-desenhado por TaqMan (Applied Biosystems, Estados Unidos), e 0,375 μ L de água ultrapura q.s.p.

As condições de ciclagem para a realização da PCR em tempo real no equipamento seguiram o padrão: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos em seguida 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por um minuto. Foram utilizados controles negativos que consistiram na realização da reação sem a presença do DNA para conferir as possibilidades de contaminações dos reagentes.

As amostras foram submetidas à reação de PCR em tempo real e posteriormente analisadas no software Viia 7 (versão 1.1, Applied Biosystems, Estados Unidos) o qual forneceu os relatórios com os resultados dos genótipos de cada participante.

Figuras 1,2,3. Exemplos de genótipos heterozigotos e homozigotos obtidos pelo método TaqMan para o polimorfismo rs1934328 do gene *RUNX2*.

Figura 1. Exemplo de uma amostra homozigota para a sonda VIC.

Figura 2. Representação de uma amostra homozigota para a sonda FAM.

Figura 3. Exemplo de uma amostra heterozigota, sendo observados os dois tipos de sonda, representados por VIC e FAM.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados no programa Excel 8.0 e os cálculos foram realizados no programa Sigma Plot for Windows 12.0. As comparações entre frequências dos genótipos e alelos foram realizadas por meio dos testes do Qui-quadrado (X^2), teste Exato de Fisher e Odds Ratio com intervalo de confiança de 95% (IC). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

5 RESULTADOS

Caracterização da casuística

A população incluída neste estudo totalizou 303 indivíduos, sendo 151 do gênero feminino e 152 do gênero masculino. A idade média do grupo total foi de 25 anos e 6 meses, sendo de 26 anos e 5 meses para o gênero feminino e 24 anos e um mês para o masculino.

Um total de 202 indivíduos com fissura de lábio e palato unilateral foram avaliados. Em relação ao lado da fissura, 144 indivíduos (71,29%) apresentavam fissura de lábio e palato unilateral esquerdo e os outros 58 (28,71%) apresentavam fissura de lábio e palato unilateral direito. Especificamente de acordo com a distribuição nos grupos com fissuras, estes valores são: no grupo I (FLP com AG), 33 indivíduos apresentavam fissura do lado direito e 68 indivíduos do lado esquerdo; no grupo II (FLP sem AG), 25 indivíduos apresentavam fissura do lado direito e 76 indivíduos do lado esquerdo.

AGENESIA DENTÁRIA

Na população estudada (101 indivíduos) que apresentava o fenótipo agenesia dentária, o dente mais acometido foi o incisivo lateral superior esquerdo (dente 22), na sequência o incisivo lateral superior direito (dente 12), seguido pelo segundo pré-molar superior esquerdo (dente 25).

Tabela 2. Distribuição por arcada dentária dos dentes acometidos pela agenesia dentária.

<i>Arco Superior</i>	<i>Agnesia</i>	<i>Arco Superior</i>	<i>Agnesia</i>
<i>Direito</i>	<i>Dentária</i>	<i>Esquerdo</i>	<i>Dentária</i>
Dentes	Dentes atingidos	Dentes	Dentes atingidos
Dente 17	-	Dente 27	-
Dente 16	-	Dente 26	-
Dente 15	7	Dente 25	13
Dente 14	1	Dente 24	4
Dente 13	1	Dente 23	-
Dente 12	28	Dente 22	68
Dente 11	1	Dente 21	1
<i>Total no Arco Superior</i>		<i>Total no Arco Superior</i>	
<i>Direito</i>	38	<i>Esquerdo</i>	86
Dente 47	-	Dente 37	-
Dente 46	-	Dente 36	-
Dente 45	6	Dente 35	3
Dente 44	-	Dente 34	-
Dente 43	-	Dente 33	-
Dente 42	-	Dente 32	1
Dente 41	-	Dente 31	-
<i>Total no Arco Inferior</i>	6	<i>Total no Arco Inferior</i>	4
<i>Direito</i>		<i>Esquerdo</i>	
Total de Dentes			
Atingidos		134	

Tabela 3. Distribuição do número de indivíduos que apresentaram 1 ou mais dentes com agenesia dentária nos 101 casos avaliados com este fenótipo.

	1	2	3
	AGENESIA	AGENESIAS	AGENESIAS
	DENTÁRIA	DENTÁRIAS	DENTÁRIAS
No. de Indivíduos	72	25	4
	Sujeitos	Sujeitos	Sujeitos
Porcentagem	71,29%	24,75%	3,96%
%			

Na distribuição específica de cada indivíduo que apresentou um ou mais dentes com agenesia dentária, o dente mais afetado nos sujeitos com apenas um caso foi o incisivo lateral superior esquerdo (dente 22) (45 de um total de 72 indivíduos) seguido pelo dente incisivo lateral superior direito (dente 12) (20 casos de um total de 72 indivíduos). Entre os com 2 dentes com agenesia dentária, o dente

mais acometido foi o incisivo lateral superior esquerdo (dente 22) (19 casos de um total de 25 indivíduos), seguido pelo segundo pré-molar superior esquerdo e incisivo lateral superior direito (dente 25), ambos com 8 casos em 25 indivíduos. Nos sujeitos com 3 dentes com agenesia dentária, o dente mais acometido também foi o incisivo lateral superior esquerdo (dente 22) (4 casos do total de 4 indivíduos), seguido pelo primeiro pré-molar superior esquerdo (dente 24), segundo pré-molar superior esquerdo (dente 25), segundo pré-molar inferior esquerdo (dente 35) e segundo pré-molar inferior direito (45), todos com 2 casos em 25 indivíduos, respectivamente.

Análise Molecular – Genotipagem

Para a apresentação dos resultados da genotipagem na população incluída neste estudo os grupos foram comparados da seguinte maneira: grupo I (FLP com AG) com grupo II (FLP sem AG); grupo I (FLP com AG) com grupo III (Controle); grupo II (FLP sem AG) com grupo III (Controle) e grupo I + grupo II com o grupo III (Controle) para cada um dos polimorfismos (SNPs) investigados. Nas tabelas 4 a 15 são apresentados os resultados e comparações das frequências alélicas e genotípicas para cada polimorfismo em todos os grupos.

Todos os grupos foram testados e estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos.

Para o gene *RUNX2*, o rs1934328 nas comparações entre os grupos I (FLP com AG) com o grupo II (FLP sem AG) foi possível constatar que houve diferença estatisticamente significativa associada ao genótipo T/A ($p=0,014$) e aos genótipos T/A + A/A ($p=0,039$) (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação do grupo I (FLP com AG) com o grupo II (FLP sem AG) para o rs1934328 no gene *RUNX2*.

Genótipo	G I (n=101)		G II (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (T/T)	11	10,9	23	22,8	-	-	-
Heterozigoto (T/A)	68	67,3	49	48,5	0.014*	2,90	1,29 ± 6,50
Homozigoto mutado (A/A)	22	21,8	29	28,7	0.440	1,59	0,64 ± 3,93
Heterozigoto (T/A) + Homozigoto mutado (A/A)	90	89,1	78	77,2	0.039*	2,41	1,11 ± 5,26
Alelos							
T	90	44,6	95	47,0	0.690	1,10	0,74 ± 1,63
A	112	55,4	107	53,0			

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

Nas comparações entre o grupo I (FLP com AG) e o grupo III (controle), houve diferença estatisticamente significativa para os genótipos T/A ($p=0,004$), A/A ($p=0,023$) e T/A + A/A ($p=0,003$); também houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os alelos (T e A) com maior frequência para a presença do alelo A (polimórfico) em sujeitos do Grupo I (FLP com AG) ($p=0,037$) (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação do grupo I (FLP com AG) com grupo III (Controle) para o rs1934328 no gene *RUNX2*.

Genótipo	G I (n=101)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (T/T)	11	10,9	29	28,7	-	-	-
Heterozigoto (T/A)	68	67,3	54	53,5	0,004*	3,31	1,52 ± 7,25
Homozigoto mutado (A/A)	22	21,8	18	17,8	0,023*	3,22	1,27 ± 8,19
Heterozigoto (T/A) + Homozigoto mutado (A/A)	90	89,1	72	71,3	0,003*	3,29	1,54 ± 7,05
Alelos							
T	90	44,6	112	55,4	0,037*	1,54	1,05 ± 2,29
A	112	55,4	190	44,6			

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

Na tabela 6, são apresentadas as comparações do grupo I (FLP sem AG) com o grupo III (Controle) não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 6. Comparação do grupo II (FLP sem AG) com o grupo III (Grupo Controle) para o rs1934328 no gene *RUNX2*.

Genótipo	G II (n=101)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (T/T)	23	22,8	29	28,8	-	-	-
Heterozigoto (T/A)	49	48,5	54	53,5	0,823	1,14	0,59 ± 2,24
Homozigoto mutado (A/A)	29	28,7	18	17,3	0,124	2,03	0,91 ± 4,54
Heterozigoto (T/A) + Homozigoto mutado (A/A)	78	77,2	72	71,3	0,421	1,37	0,72 ± 2,56
Alelos							
T	95	47,0	112	55,4	0,111	1,40	0,95 ± 2,07
A	107	53,0	90	44,6			

Já nas comparações entre o grupo I somado ao grupo II (sujeitos com FLP com e sem AG) com o grupo III (indivíduos sem FLP e sem AG), houve diferença estatisticamente significativa para os genótipos A/A ($p=0,027$) e T/A + A/A ($p=0,024$); sendo também constatada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os alelos (T e A) com maior frequência para a presença do alelo A (polimórfico) em sujeitos dos grupos I somado ao grupo II (sujeitos com FLP com e sem AG) ($p=0,031$) (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação do grupo I + grupo II (FLP com e sem AG) com grupo III (Grupo Controle) para o rs1934328 no gene *RUNX2*.

Genótipo	G I + G II (n=202)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (T/T)	34	16,8	29	28,7	-	-	-
Heterozigoto (T/A)	117	59,9	54	53,5	0,058	1,85	1,02 ± 3,34
Homozigoto mutado (A/A)	51	25,3	18	17,8	0,027*	2,42	1,16 ± 5,02
Heterozigoto (T/A) + Homozigoto mutado (A/A)	168	83,2	72	71,3	0,024*	1,99	1,13 ± 3,51
Alelos							
T	185	45,8	112	55,4	0,031*	1,47	1,05 ± 2,07
A	219	54,2	90	44,6			

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

Para o gene *AXIN2*, o rs11655966 nas comparações entre os grupos I (FLP com A/G) e grupo II (FLP sem AG) foi possível constatar que houve diferença estatisticamente significativa para o genótipo T/A e para o somatório dos genótipos T/A e A/A, no grupo II (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação do grupo I (FLP com AG) com o grupo II (FLP sem AG) para o rs11655966 no gene *AXIN2*.

Genótipo	G I (n=101)		G II (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (T/T)	17	16,8	8	7,9	-	-	-
Heterozigoto (T/A)	39	38,6	47	46,5	0,04*	0,39	0,15 ± 1,00
Homozigoto mutado (A/A)	45	44,6	46	45,6	0,09	0,46	0,18 ± 1,17
Heterozigoto (T/A) + Homozigoto mutado (A/A)	84	83,2	93	92,1	0,05*	0,42	0,17 ± 1,04
Alelos							
T	73	36,1	63	31,2	0,29	0,80	0,52 ± 1,21
A	129	63,9	139	68,8			

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

Nas comparações das frequências entre o grupo I (FLP com AG) e o grupo III (controle), houve diferença estatisticamente significativa tanto para o genótipo T/A como para o genótipo A/A, assim como para a presença do alelo A, com frequência estatisticamente superior no grupo controle (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação do grupo I (FLP com AG) com grupo III (Controle) para o rs11655966 no gene *AXIN2*.

Genótipo	G I (n=101)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (T/T)	17	16,8	6	5,9	-	-	-
Heterozigoto (T/A)	39	38,6	43	42,6	0,02*	0,32	0,11 ± 0,89
Homozigoto mutado (A/A)	45	44,6	52	51,5	0,01*	0,30	0,11 ± 0,84
Heterozigoto (T/A) + Homozigoto mutado (A/A)	84	83,2	95	94,1	0,01*	0,31	0,11 ± 0,82
Alelos							
T	73	36,1	55	27,2	0,05*	0,66	0,43 ± 1,00
A	129	63,9	147	72,8			

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

Nas tabelas 10 e 11, são apresentadas as comparações do grupo II (FLP sem AG) com o grupo III (Controle) e do grupo I somado ao grupo II (sujeitos com FLP com e sem AG) com o grupo III (indivíduos sem FLP e sem AG) respectivamente, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significativa entre as frequências dos genótipos e alelos nos comparativos entre os grupos.

Tabela 10. Comparação do grupo II (FLP sem AG) com o grupo III (Grupo Controle) para o rs11655966 no gene *AXIN2*.

Genótipo	G II (n=101)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (T/T)	8	7,9	6	5,9	-	-	-
Heterozigoto (T/A)	47	46,5	43	42,6	0,73	1,22	0,39 ± 3,80
Homozigoto mutado (A/A)	46	45,6	52	51,5	0,47	0,66	0,21 ± 2,05
Heterozigoto (T/A) + Homozigoto mutado (A/A)	93	92,1	95	94,1	0,57	0,73	0,24 ± 2,19
Alelos							
T	63	31,2	55	27,2	0,38	0,82	0,53 ± 1,26
A	139	68,8	147	72,8			

Tabela 11. Comparação do grupo I + grupo II (FLP com e sem AG) com grupo III (Grupo Controle) para o rs11655966 no gene *AXIN2*.

Genótipo	G I + G II (n=202)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (T/T)	25	12,4	6	5,9	-	-	-
Heterozigoto (T/A)	86	42,6	43	42,6	0,12	0,48	0,18 ± 1,25
Homozigoto mutado (A/A)	91	45,0	52	51,5	0,06	0,42	0,16 ± 1,09
Heterozigoto (T/A) + Homozigoto mutado (A/A)	177	87,6	95	94,1	0,08	0,44	0,17 ± 1,12
Alelos							
T	136	33,7	55	27,2	0,10	0,73	0,50 ± 1,07
A	268	66,3	147	72,8			

Para o gene *AXIN2*, o rs2240307 nas comparações entre os grupos I (FLP com AG) com o grupo II (FLP sem AG), não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 12). Nas comparações entre o grupo I (FLP com AG) com o grupo III (controle), houve diferença estatisticamente significativa no genótipo G/A ($p=0,029$) (Tabela 13). Na tabela 14, são apresentadas as comparações do grupo II (FLP sem AG) com o grupo III (Controle) em que foi possível constatar que houve diferença estatisticamente significativa associada ao genótipo A/G ($p=0,007$) e aos

genótipos A/G + G/G ($p=0,035$). Já nas comparações dos grupos I somado ao grupo II (sujeitos com FLP com e sem AG) com o grupo III (indivíduos sem FLP e sem AG), houve diferença estatisticamente significativa para o genótipo A/G ($p=0,006$) e os genótipos A/G + G/G ($p=0,037$) (Tabela 15).

Tabela 12. Comparação do grupo I (FLP com AG) com o grupo II (FLP sem AG) para o rs2240307 no gene AXIN2.

Genótipo	G I (n=101)		G II (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (A/A)	94	93,1	93	92,1	-		
Heterozigoto (A/G)	6	5,9	8	7,9	0,797	0,74	$0,25 \pm 2,22$
Homozigoto mutado (G/G)	1	1,0	0	0,0	1,000	2,97	$0,12 \pm 73,80$
Heterozigoto (A/G) + Homozigoto mutado (G/G)	7	6,9	8	7,9	1,000	0,87	$0,30 \pm 2,48$
Alelos							
A	194	96	194	96	0,799	1,00	$0,37 \pm 2,72$
G	8	4	8	4			

Tabela 13. Comparação do grupo I (FLP com AG) com grupo III (Controle) para o rs2240307 no gene AXIN2.

Genótipo	G I (n=101)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (A/A)	94	93,1	100	99,0	-	-	-
Heterozigoto (A/G)	6	5,9	0	0,0	0,029*	13,82	$0,77 \pm 248,80$
Homozigoto mutado (G/G)	1	1,0	1	1,0	1,000	1,06	$0,07 \pm 17,25$
Heterozigoto (A/G) + Homozigoto mutado (G/G)	7	6,9	1	1,0	0,065	7,45	$0,90 \pm 61,68$
Alelos							
A	194	96	200	99	0,109	0,24	$0,05 \pm 1,16$
G	8	4	2	1			

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

Tabela 14. Comparação do grupo II (FLP sem AG) com o grupo III (Grupo Controle) para o rs2240307 no gene *AXIN2*.

Genótipo	G II (n=101)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (A/A)	93	92,1	100	99,0	-	-	-
Heterozigoto (A/G)	8	7,9	0	0,0	0,007*	18,27	1,04 ± 321,01
Homozigoto mutado (G/G)	0	0,0	1	1,0	1,000	0,36	0,01 ± 8,91
Heterozigoto (A/G) + Homozigoto mutado (G/G)	8	7,9	1	1,0	0,035*	8,60	1,06 ± 70,10
Alelos							
A	194	96	200	99	0,109	0,24	0,05 ± 1,16
G	8	4	2	1			

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

Tabela 15. Comparação do grupo I + grupo II (FLP com e sem AG) com grupo III (Grupo Controle) para o rs2240307 no gene *AXIN2*.

Genótipo	G I + G II (n=202)		G III (n=101)		p	OR	CI
	n	%	n	%			
Homozigoto ancestral (A/A)	187	92,6	100	99,0	-	-	-
Heterozigoto (A/G)	14	6,9	0	0,0	0,006*	15,54	0,92 ± 263,30
Homozigoto mutado (G/G)	1	0,5	1	1,0	1,000	0,53	0,03 ± 8,64
Heterozigoto (A/G) + Homozigoto mutado (G/G)	15	7,4	1	1,0	0,037*	8,02	1,04 ± 61,61
Alelos							
A	388	96	200	99	0,076	0,24	0,06 ± 1,07
G	16	4	2	1			

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

Discussão

6 DISCUSSÃO

Apesar das fissuras labiopalatinas serem a anomalia congênita mais prevalente nos seres humanos, mesmo nos casos isolados, os fatores etiológicos conhecidos na atualidade não são suficientes para explicar a origem específica de cada tipo de fissura em particular. Para tal fim, um grande número de estudos dedicam-se a investigar as possíveis causas associadas à dita patologia, sendo as mais destacadas os fatores genéticos, ambientais, nutricionais e vitamínicos; pelo que é considerada uma doença multifatorial (FREITAS et al., 2012; LESLIE et al., 2016). No mesmo contexto, a agenesia dentária também é considerada uma das alterações de desenvolvimento mais comum em humanos, sendo descrita como uma falha durante a odontogênese, por causas desconhecidas, apresentando os fatores genéticos dentro das possibilidades relacionadas à sua etiologia (GARIB et al., 2009; GARIB et al., 2010; DE SMALEN et al., 2016).

Ambos fenótipos, tanto a fissura como a agenesia dentária, podem ocorrer de forma isolada (não sindrômica) ou associadas a alguma síndrome em particular, e por esse motivo também têm sido consideradas anomalias com características similares.

Os fenótipos investigados nesta população incluída no presente estudo, foram selecionados a partir de estudos que relatam evidências de associações entre a FLP e à agenesia dentária, ambas anomalias que se originam durante o desenvolvimento embrionário podendo ser associadas ao mesmo fator etiológico (VIEIRA, 2003; PARANAIBA et al., 2013).

Assim, para compor a amostra do presente estudo foram selecionados sujeitos que apresentaram esses dois fenótipos, FLP associada à agenesia dentária e um grupo distinto de sujeitos com fissura em sua forma isolada sem associação à agenesia dentária. Assim, foram incluídos 101 indivíduos com diagnóstico confirmado de FLP e presença de um ou mais casos de agenesia dentária confirmada (excluindo os terceiros molares), 101 sujeitos com FLP sem AG (presença de todos os dentes, excluindo o terceiro molar) e finalmente 101 indivíduos sem FLP (nem histórico de fissura na família) e sem AG.

Para a comparação dos fenótipos investigados neste estudo, foram selecionados um terço exato da população total com FLP com AG, e dentre estes indivíduos o dente mais afetado por essa anomalia dentária foi o incisivo lateral superior esquerdo (dente 22). Estes dados correspondem aos presentes na literatura que apontam o dente incisivo lateral superior como o mais afetado pela agenesia dentária na população geral, seguido pelo segundo pré-molar inferior (POLDER et al., 2004; ANTONARAKIS; SURI, 2014; VIEIRA et al., 2004). Em indivíduos com fissura, os estudos também relatam que o dente mais ausente é o incisivo lateral superior, na área de fissura ou na região contralateral, seguido dos segundos pré-molares superiores e inferiores (LOURENÇO RIBEIRO et al., 2003; TORTORA et al., 2008; CAMPORESI et al., 2010). Nossos dados corroboram com os desses autores pois, na sequência o segundo e terceiro dentes mais afetados na população estudada foram o incisivo lateral superior direito (dente 12) e o segundo pré-molar superior esquerdo (dente 25), respectivamente.

A prevalência de agenesia dentária é muito variável nos indivíduos com fissuras labiopalatinas e, dependendo do tipo de fissura, pode alcançar porcentagens de até 66,7%. Relacionando esses dados com o dente mais afetado pelo fenótipo alguns autores acreditam que dentes na área da fissura poderiam ser mais ausentes em vista de que essa região apresenta várias alterações no desenvolvimento, podendo interferir na odontogênese do elemento dentário, o que grande controvérsia, pois pesquisas analisando dentes fora da área da fissura ou mesmo com tipos de fissuras que não tem comprometimento com o rebordo alveolar, como por exemplo a fissura de palato isolada, apresentam de igual maneira prevalências elevadas de agenesia dentária ao ser comparada com a população geral (sem fissuras e nem histórico na família) (POLDER et al., 2004; AL JAMAL; HAZZA'A; RAWASHDEH, 2010; AFIFY; ZAWAWI, 2012; MENINI et al., 2012; ANTONARAKIS; SURI, 2014; DE SMALEN et al., 2016; NEVES, 2019).

Avaliando o aspecto genético envolvido nos fenótipos em questão, em relação a ocorrência das FLP, em diferentes populações, tem sido demonstrada a participação de variantes em inúmeros genes candidatos que potencialmente poderiam definir essa predisposição genética individual, dentre eles figuram os genes: *IRF6*, *CRISPLD2*, *JARID2*, *TCEB3*, *MSX1*, *SPRY1*, *SHH*, *VAX1*, *TBX10*, *WNT11*, *PRSS35*, *TFAP2A*, *PAX9*, *KIF7*, *AXIN2*, *DLX1*, *MMP3*, *TBX1*, *BMP4*, *DVL2*,

CDH1, *RUNX2*, entre outros (SULL et al., 2008; LETRA et al., 2009; LETRA et al., 2012; LIANG et al., 2012; MOSTOWSKA et al., 2012; ANTUNES et al., 2013; PARANAIBA et al., 2013; JUNG et al., 2014; SABOIA et al., 2015; DE ARAÚJO et al., 2016; YUE et al., 2016; LI et al., 2017; MACHADO et al., 2017; MESSETTI et al., 2017; MACHADO et al., 2018; NEVES, 2019). Nessa mesma linha, há constatações de que variantes em alguns dos genes anteriormente mencionados também se encontram relacionadas à ocorrência de agenesias dentárias em indivíduos com e sem fissura labiopalatina (LETRA et al., 2009; SABOIA et al., 2015; NEVES, 2019).

Dentre os genes que têm sido considerados candidatos para ambos os fenótipos, FLP e AG, encontram-se o *AXIN2* e o *RUNX2*.

Em nossos resultados para o rs1934328 no gene *RUNX2* foi possível constatar diferença estatisticamente significativa associada ao genótipo T/A e para a associação dos genótipos T/A + A/A quando foram realizadas as comparações entre o grupo I sujeitos com FLP com AG e o grupo II sujeitos com FLP sem AG, com frequência superior para o grupo fissura com agenesia. Na sequência, foi evidenciada diferença estatisticamente significativa quando comparados o grupo I sujeitos com FLP com AG com o grupo III indivíduos controle, para os genótipos T/A, A/A e T/A + A/A. Da mesma forma, foi notada diferença estatisticamente significativa para as frequências alélicas A no grupo I (FLP com AG) comparado ao grupo III (Controle); analisando a porcentagem da frequência do alelo mutado A no grupo com FLP com AG pode ser constatado que ocorreu em 55,4% e dito resultado é aproximado à frequência na população geral presente na base de Ensembl que no momento foi de 57%. Ainda nos resultados do SPN rs1934328 no gene *RUNX2*, quando realizadas as comparações entre os dados dos grupo I junto ao grupo II (FLP com AG + FLP sem AG) com a Grupo Controle, foi evidenciado novamente diferença significativa tanto para o genótipo A/A como para a T/A + A/A e para o alelo A polimórfico.

Na interpretação dos resultados do polimorfismo rs1934328 obtidos no nosso estudo, é evidente que o fenótipo agenesia dentária quando presente faz com que a diferença significativa seja notável. Esse importante dado é confirmado na comparação do grupo II sujeitos com FLP sem AG com o grupo III indivíduos sem

fissuras e sem agenesia dentária onde não foi constatada diferença estatisticamente significativa nas frequências dos genótipos estudados.

No contexto desse resultado, é importante destacar o estudo de Jung et al. (2014) em que foram avaliadas famílias coreanas somente com fissuras labial e labiopalatina e observada associação significativa do fenótipo à presença da variante rs1934328, atribuindo possível envolvimento desse polimorfismo no gene *RUNX2* com a etiologia das fissuras. Contudo, os autores do estudo coreano, assim como a maioria dos estudos publicados envolvendo outras variantes em outros genes, não consideram a descrição detalhada do fenótipo bucal dos sujeitos com fissura, considerando, de forma limitada, somente a presença da fissura. Essa pode ser uma explicação para as divergências de resultados encontradas no presente estudo quando comparados aos resultados encontrados por Jung et al. (2014).

Esse tipo de detalhamento dos outros fenótipos bucais é importante, uma vez que permite compreender com mais precisão a real dimensão da associação da variante ao fenótipo específico, minimizando a possibilidade de associações falso positivas. Assim, um diferencial do presente estudo, que deve ser destacado, foi ter investigado sujeitos com fissura isolada e compará-los a indivíduos com a combinação do fenótipo fissura e agenesia dentária. Esse grau de detalhamento permitiu constatar que a variante, no caso do rs1934328 no gene *RUNX2*, na população brasileira investigada no presente estudo foi associado ao risco de agenesia dentária combinada à fissura e não ao risco específico de fissura labiopalatina.

Vários estudos apontam que diferentes tipos de variantes genéticas no gene *RUNX2*, como duplicações, deleções e mutações do tipo missense entre outras, tem sido associadas a anomalias esqueléticas do complexo craniofacial; destacando entre essas, as anomalias dentárias, as craniossinostose, a displasia cleidocraniana, a hipoplasia maxilar e a braquidactilia (CHEN et al., 2014; JUNG et al., 2014; MOLIN et al., 2015; JARUGA et al., 2016). Uma vez que as fissuras e agenesias dentárias são anomalias de formação no período embrionário, faz sentido investigar esses fenótipos em associação ou isolados já que genes candidatos testados em diferentes estudos relatam a ocorrência destes fenótipos em conjunto (PHAN et al., 2016). Os resultados obtidos após a genotipagem do polimorfismo rs1934328 no

gene *RUNX2* na população brasileira incluída neste estudo confirmam a importância de avaliar os fenótipos fissuras labiopalatinas e agenesias dentárias separados e em associação para entender as variantes genéticas presente nestes sujeitos, assim como concretizar as frequências com que essas variações ocorrem nos indivíduos afetados pelos fenótipos ao serem confrontados com a população geral controle, sem fissuras, anomalias dentárias ou outras alterações congênitas.

Com relação aos resultados das variantes polimórficas no gene *AXIN2*, na literatura existem relatos que descrevem interações deste gene tanto para a ocorrência das FLP não sindrômicas como também para as agenesias dentárias, inclusive associadas a ambos os fenótipos em diferentes populações (LETRA et al., 2009; MENEZES et al., 2009; DE ARAUJO et al., 2016; YUE et al., 2016; MACHADO et al., 2017). Nos resultados referentes ao SNP rs11655966 do *AXIN2*, no presente estudo foi possível observar diferença estatisticamente significativa ao comparar o grupo I sujeitos com FLP com AG e o grupo II sujeitos com FLP sem AG relacionadas ao genótipo T/A e para a associação dos genótipos T/A + A/A; o grupo com fissura mas sem agenesia dentária foi predominante nos valores de frequências observados. Na sequência, ao comparar o grupo I que apresentava ambos os fenótipos alvos deste estudo com o grupo controle houve diferença estatisticamente significativa, com predomínio de frequência para o grupo controle nos genótipos T/A, A/A e na somatória de T/A + A/A; também para a comparação dos alelos T e A separadamente, o grupo controle apresentou valores estatisticamente significativos. Estes achados apontam que o polimorfismo investigado, nesta população brasileira avaliada, possivelmente não apresenta associação com os fenótipos FLP e AG. Provavelmente em uma amostra maior esses achados poderiam ser confirmados, pois estudos genéticos com maior número de sujeitos investigados poderiam ter resultados mais precisos.

Nossos resultados discordam dos publicados por Araújo et al. (2016), os quais investigaram inúmeros SNPs em vários genes, entre ele o rs11655966 no gene *AXIN2*, em sujeitos com FLP na população brasileira, de diferentes regiões do país, apontando que essa variante polimórfica estaria associada à etiologia das fissuras. Essa divergência de resultados pode ser interpretada devido ao fato de que no presente estudo houve um critério fechado para a seleção de sujeitos com um tipo específico de FLP (fissura completa de lábio e palato unilateral) a ser avaliado.

Com isso aumentamos também o critério para compreender polimorfismos e genes específicos envolvidos na etiologia de cada tipo de fissura. O estudo de Araújo et al. (2016), incluiu na amostra sujeitos com todos os tipos de fissura e dependendo do percentual de estratificação para cada tipo de fissura, esse pode ter sido o fator que levou a associação desse polimorfismo à etiologia das fissuras, mas os autores não especificam o risco para um tipo específico de fissura. Esse é um outro ponto importante que tem sido levantado na literatura mundial, pois uma vez que grupos distintos de genes participam da formação do lábio e da palatogênese, possivelmente grupos distintos de variantes genéticas predisponham ao risco para os diferentes tipos de fissura. No entanto é compreensível que muitos estudos ainda avaliem as variantes genéticas na etiologia da fissura de forma ampla e não de acordo com os tipos morfológicos do defeito, pois muitas vezes é difícil constituir uma amostra viável estatisticamente considerando grupos específicos de fissura.

Em nossos resultados, ao analisar as frequências dos alelos T (27,2%) e A (72,8%) do grupo controle incluído neste estudo, podemos constatar valores aproximados aos dados na população europeia presentes na base de dados Ensembl (<https://www.ensembl.org>, com acesso em 25 junho 2019 (ANEXO IV) sendo que na referida base as frequências são de 29% para T e 71% para A. Nessa comparação de frequências pode-se inferir que esses valores de frequência podem ter sido encontrados pois grande parte da população brasileira é descendente de europeus, o que pode também predominar no grupo amostral (controle) incluídos neste estudo. Mas é necessário frisar que em nosso estudo não realizamos a investigação de ancestralidade dos grupos casos e controle estudados, por isso não foi possível apresentar essa confirmação.

Nas comparações dos grupos II FLP sem AG com o grupo controle e a somatória dos grupos com FLP com e sem AG também com o grupo III controle não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos grupos; o que sugere que o polimorfismo rs11655966 no gene *AXIN2* não esteja associado aos fenótipos em questão. No contexto desses achados, a presença da variante poderia ser interpretada como um fator protetor para a ocorrência da agenesia dentária, pois ambos os grupos com frequências estatisticamente superiores desse SNP não apresentavam o fenótipo agenesia dentária.

Uma outra variante (rs7224837) no mesmo gene *AXIN2* apresentou um provável papel no risco de desenvolvimento de fissuras orofaciais na população europeia e em não asiáticos (LETRA et al., 2012). No presente estudo, além dos dados obtidos para o polimorfismo rs11655966 no gene *AXIN2*, também investigamos o SPN rs2240307 em que foi constatada diferença estatisticamente significativa nas comparações do grupo I (FLP com AG) e o grupo controle apenas no genótipo A/G; este mesmo resultado, no mesmo genótipo pôde ser observado na comparação do grupo II (FLP sem AG) ao grupo controle e também para os genótipos A/G + G/G. Diferença significativa foi observada também quando foram somados o grupo I + o grupo II e comparados com o grupo III (controle), tanto para o genótipo A/G como na associação dos fenótipos A/G + G/G. Nestas comparações é possível constatar que quando comparados os grupos com a presença do fenótipo fissura labiopalatina com o grupo controle, sem fissura, fica evidente a associação de genótipo específico para o grupo afetado pela fissura, independentemente da presença do fenótipo agenesia, pois não houve diferença significativa quando comparados os grupos com fissura com e sem agenesia dentária. Estes achados podem levar a inferir que o polimorfismo rs2240307 do gene *AXIN2* pode estar relacionado à ocorrência da fissura nos indivíduos brasileiros incluídos neste estudo. Nossos resultados concordam com os obtidos por Han et al. (2014) em um grupo de sujeitos de etnia chinesa, os quais apontam suscetibilidade do mesmo SNP na ocorrência da fissura.

Quando observada a frequência dos alelos A e G do polimorfismo rs2240307 do gene *AXIN2* na base de dados Ensembl (<https://www.ensembl.org>, com acesso em 25 junho 2019 (ANEXO V), na população europeia as frequências são de A (99%) e G (1%) apontando que uma característica desse SNP é apresentar uma frequência baixa. Os resultados do grupo controle incluído no presente estudo foram percentualmente idênticos A (99%) e G (1%) aos resultados presentes na base de dados Ensembl, sendo considerado um polimorfismo raro nesta população. Esta comparação é realizada em vista de que a maioria dos indivíduos incluídos no grupo controle, e também a maioria dos brasileiros da região onde foi realizada a coleta das amostras possuem descendência europeia. É importante ressaltar que os dados presentes na base de dados Ensembl são usados como grupo controle para o comparativo em alguns estudos, contudo não é possível saber e diferenciar os

fenótipos específicos dos sujeitos que foram genotipados para compor as casuísticas publicadas na base de dados, podendo ser facilmente encontradas diferenças destes dados, quando estudadas amostras de indivíduos com características fenotípicas identificadas e separadas no momento da análise dos dados.

No geral, vários estudos têm investigado polimorfismos no gene *AXIN2*, em diferentes populações, e ele tem sido relacionado não somente à etiologia das FLP, mas também de diferentes patologias como alguns tipos de câncer, além das anomalias dentárias. Na literatura é possível constatar a inter-relação de modificações genéticas neste gene associadas à FLP-AG-Câncer em alguns casos analisados em associação ou individualmente, como foi constatado por Letra et al. (2009) em indivíduos brasileiros, em que foram avaliados os SNPs rs7591, rs11867417 e rs2240308, mostrando relação das variações genéticas no gene *AXIN2* que podem ser marcadores na ocorrência de alguns tipos de fissuras, agenesia dentária e câncer gástrico. Na mesma linha de investigação Lammi et al. (2004), levantou o gene *AXIN2* como possível participante do desenvolvimento do câncer colorretal hereditário e sugeriu que o fenótipo agenesia dentária poderia ser um indicador de suscetibilidade a este tipo de câncer na população finlandesa. Resultados similares foram relatados por Yue et al. (2016), os quais apontaram que famílias chinesas com histórico familiar de agenesias dentárias e mutações no gene *AXIN2* possuem susceptibilidade aumentada para a ocorrência de câncer. Em relação aos fenótipos isolados, o rs3923087 no gene *AXIN2* foi investigado em famílias polonesas com FLP não síndrômica, sendo constatado que essa variante polimórfica apresentou diferença significativa ao ser confrontada com sujeitos da mesma população sem a presença do fenótipo (MOSTOWSKA et al., 2012). E para a agenesia dentária isolada, Wong et al. (2014) sugerem que a variante rs145353986 no gene *AXIN2* tem importante relação com a ausência dentária congênita não síndrômica na população chinesa e que além disso esse gene é um potencial marcador para o risco de agenesia dentária.

É evidente que o fenótipo agenesia dentária pode estar associado a outras patologias, inclusive algumas não circunscritas ao complexo craniofacial, ressaltando a importância da detecção desta anomalia e consequentemente o que a presença desse fenótipo pode representar no diagnóstico de outras patologias de

aparecimento tardio. Na literatura, são escassos os trabalhos que investigam as agenesias dentárias como forma de detalhamento fenotípico frente a casos de FLP, e o mais crítico, não considerando as agenesias dentárias na investigação dos aspectos genéticos relacionados ao risco de um fenótipo ou do outro, ou ainda da combinação de ambos. Apesar de a população incluída na presente investigação ser uma amostra numericamente pequena comparada com a ideal para estudos genéticos com detalhamento de frequências genotípicas, a população incluída foi uma amostra criteriosamente selecionada com confirmação dos fenótipos investigados.

Os nossos achados destacam a participação das variantes polimórficas nos genes *AXIN2* (rs2240307) e *RUNX2* (rs1934328) na ausência congênita de elementos dentários cursando com o fenótipo da fissura labiopalatina, concordando com os dados obtidos por Jarvinen et al. (2018), o qual ressalta que em humanos os genes *AXIN2* e *RUNX2* modulam o nível de sinalização mesenquimal da via Wnt β -Catenina, e mutações nestes genes podem inibir a formação dentária.

O único polimorfismo associado ao risco de fissura labiopalatina na presença ou não de agenesia dentária foi o rs2240307 no gene *AXIN2*. Futuros estudos com casuística maior e envolvendo a investigação de outras variantes nesses genes, assim como o sinergismo entre elas, são necessários para confirmar e dimensionar o envolvimento dos genes *AXIN2* e *RUNX2* no risco de fissuras labiopalatinas cursando ou não com agenesias dentárias.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da população brasileira incluída neste estudo sugerem que:

O polimorfismo rs1934328 no gene *RUNX2* possui um possível envolvimento na etiologia das agenesias dentárias cursando com fissura labiopalatina.

O polimorfismo rs11655966 no gene *AXIN2* aparentemente não está associado aos fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária.

O polimorfismo rs2240307 do gene *AXIN2* pode estar relacionado à ocorrência de fissura labiopalatina cursando ou não com agenesia dentária.

Referencias Bibliográficas

REFERÊNCIAS

1. ABERG, T et al. Phenotypic changes in dentition of Runx2 homozygote-null mutant mice. **J Histochem Cytochem**, v. 52, n. 1, p. 131-139, 2004.
 2. AFIFY, A.R; ZAWAWI, K.H. The prevalence of dental anomalies in the Western region of saudi arabia. **ISRN Dent**, v. 2012, p. 1-5, 2012.
 3. AL JAMAL, G.A; HAZZA'A, A.M; RAWASHDEH, M.A. Prevalence of dental anomalies in a population of cleft lip and palate patients. **Cleft Palate Craniofac J**. v. 47, n. 4, p. 413-420, 2010.
 4. AMAYA, M.P et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. **Int Endod J**, v. 46, n. 1, p. 71-78, 2013.
 5. ANTONARAKIS, G.S; SURI, S. Prevalence and patterns of permanent tooth agenesis in patients with nonsyndromic Pierre Robin sequence. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 145, n. 4, p. 452-460, 2014.
 6. ANTUNES, L.S et al. BMP4 Polymorphism is Associated With Nonsyndromic Oral Cleft in a Brazilian Population. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 50, n. 6, p. 633-638, 2013.
 7. BERGENDAL, B et al. Isolated oligodontia associated with mutations in *EDARADD*, *AXIN2*, *MSX1*, and *PAX9* genes. **Am J Med Genet A**, v. 155, n. 7, p. 1616-1622, 2011.
 8. CAMPORESI, M et al. Maxillary dental anomalies in children with cleft lip and palate: a controlled study. **International journal of paediatric dentistry**, v. 20, n. 6, p. 442-450, 2010 .
 9. CARINCI, F et al. Genetics of nonsyndromic cleft lip and palate: a review of international studies and data regarding the Italian population. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 37, n. 1, p. 33-40, 2000.
 10. CHEN, T et al. A novel small deletion mutation in RUNX2 gene in one Chinese family with cleidocranial dysplasia. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 5, p. 2490, 2014.
-

11. CHHABRA, N; GOSWAMI, M; CHHABRA, A. Genetic basis of dental agenesis-molecular genetics patterning clinical dentistry. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 19, n. 2, p. e112, 2014.
 12. COHEN JR, M. Perspectives on RUNX genes: an update. **Am J Med Genet A**, v. 149, n. 12, p. 2629-2646, 2009.
 13. COSTA, A.P.P et al. Estudo de Polimorfismos de DNA Associados aos Distúrbios do Desenvolvimento. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v.7, n.1, p.112-131, 2007.
 14. ARAÚJO, T.K et al. A multicentric association study between 39 genes and nonsyndromic cleft lip and palate in a Brazilian population. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 44, n. 1, p. 16-20, 2016.
 15. DE SMALEN, A et al. Permanent tooth agenesis in non-syndromic Robin sequence and cleft palate: prevalence and patterns. **Clin Oral Investig**, v. 21, n. 7, p. 2273-2281, 2017.
 16. DE SOUZA, L.T et al. Study of IRF6 and 8q24 region in non-syndromic oral clefts in the Brazilian population. **Oral Dis**, v. 22, n. 3, p. 241-245, 2016.
 17. DESHMUKH, P.K et al. Van der woude syndrome with short review of the literature. **Case Rep Dent**, v. 2014, p. 1-6, 2014.
 18. DESHPANDE, A.S; GOUDY, S.L. Cellular and molecular mechanisms of cleft palate development. **Laryngoscope Investig Otolaryngol**, v. 4, n. 1, p. 160-164, 2019.
 19. DIXON, M.J et al. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. **Nat Rev Genet**. v. 12, n. 3, p. 167, 2011.
 20. FREITAS, J.A et al. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP)-Part 1: overall aspects. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 2, p. 268-281, 2012.
 21. FUNATO, N; NAKAMURA, M. Identification of shared and unique gene families associated with oral clefts. **Int J Oral Sci**, v. 9, n. 2, p. 104, 2017.
 22. GASS, J.K et al. Steatocystoma multiplex, oligodontia and partial persistent primary dentition associated with a novel keratin 17 mutation. **Br J Dermatol**, v. 161, n. 6, p. 1396-1398, 2009.
-

-
23. GARIB, D.G; PECK, S; GOMES, S.C. Increased occurrence of dental anomalies associated with second-premolar agenesis. **Angle Orthod**, v. 79, n. 3, p. 436-441, 2009.
 24. GARIB, D.G et al. Agenesis of maxillary lateral incisors and associated dental anomalies. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 137, n. 6, p. 732. e1-732. e6, 2010.
 25. GREENE, J.C. Epidemiologic research--1964-1967. **J Am Dent Assoc**, v. 76, n. 6, p. 1350-1356, 1968.
 26. GORLIN, R; COHEN, M; HENNEKAM, R. Orofacial clefting syndromes. In: BOBROW, M; HARPER, P; SCRIVER, C. **Syndromes of the head and neck**. New York: Oxford University Press, 2001, pp. 850–860
 27. GOWANS, L.J.J et al. Novel GREM1 Variations in Sub-Saharan African Patients With Cleft Lip and/or Cleft Palate. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 55, n. 5, p. 736-742, 2018.
 28. HAN, Y et al. The axis inhibition protein 2 polymorphisms and non-syndromic orofacial clefts susceptibility in a Chinese Han population. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 7, p. 554-560, 2014.
 29. HERSH, J.H; VERDI, G.D. Natal teeth in monozygotic twins with Van der Woude syndrome. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 29, n. 3, p. 279-281, 1992.
 30. HONG, E.P; PARK, J.W. Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. **Genomics Inform**, v. 10, n. 2, p. 117, 2012.
 31. IBARRA-ARCE, A. IRF6 polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip. **Meta Gene** 4, v. 4, p. 8-16, 2015.
 32. JARUGA, A et al. Cleidocranial dysplasia and RUNX2-clinical phenotype-genotype correlation. **Clin Genet**, v. 90, n. 5, p. 393-402, 2016.
 33. JÄRVINEN, E et al. Mesenchymal Wnt/ β -catenin signaling limits tooth number. **Development**, v. 145, n. 4, p. 1-12, 2018.
 34. JIA, Z.L et al. Rs12941170 at SOX9 gene associated with orofacial clefts in Chinese. **Arch Oral Biol**, v. 76, p. 14-19, 2017.
-

35. JUGESSUR, A et al. Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. **Genet Epidemiol**, v. 24, n. 3, p. 230-239, 2003.
 36. JUNG, S.H et al. Investigation of Parental Transmission of RUNX2 Single Nucleotide Polymorphism and Its Association With Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Palate. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 51, n. 2, p. 234-239, 2014.
 37. KIM, N.Y; BAEK, S.H. Cleft sidedness and congenitally missing or malformed permanent maxillary lateral incisors in Korean patients with unilateral cleft lip and palate. **Am. j. orthod. dentofacial orthop**, v. 130, n. 6, p. 752-758, 2006.
 38. KLEIN, O.D et al. Developmental disorders of the dentition: An update. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. 2013. p. 318-332.
 39. KOHLI, S.S; KOLHI, V.S. A comprehensive review of genetic basis of cleft lip and palate. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 16, n. 1, p. 64, 2012.
 40. KOMORI, T et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 755-764, 1997.
 41. KONDO, S et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. **Nat Genet**, v. 32, n. 2, p. 285, 2002.
 42. LAMMI, L et al. Mutations in *AXIN2* cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. **Am J Hum Genet**, v. 74, n. 5, p. 1043-1050, 2004.
 43. LESLIE, E.J et al. A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13. **Hum Mol Genet**, v. 25, n. 13, p. 2862-2872, 2016.
 44. LETRA, A et al. *AXIN2* and *CDH1* polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 85, n. 2, p. 169-173, 2009.
 45. LETRA, A et al. Association of *AXIN2* with non-syndromic oral clefts in multiple populations. **J Dent Res**, v. 91, n. 5, p. 473-478, 2012.
 46. LI, C et al. Modulating Wnt Signaling Rescues Palate Morphogenesis in Pax9 Mutant Mice. **J Dent Res**, v. 96, n. 11, p. 1273-1281, 2017.
-

-
47. LIANG, J et al. Novel nonsense mutation in MSX1 causes tooth agenesis with cleft lip in a Chinese family. **Eur J Oral Sci**, v. 120, n. 4, p. 278-282, 2012.
 48. LIU, Y.P et al. Identification of susceptibility genes in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate using whole-exome sequencing. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 20, n. 6, p. e763, 2015.
 49. LOS, E; BAINES, H; GUTTMANN-BAUMAN, I. Concurrent Van der Woude syndrome and Turner syndrome: A case report. **SAGE Open Med Case Rep**, v. 5, p. 2050313X16687916, 2017.
 50. LOURENÇO RIBEIRO, L et al. Dental anomalies of the permanent lateral incisors and prevalence of tooth agenesis outside the cleft area in complete unilateral cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 40, n. 2, p. 172-175, 2003.
 51. MACHADO, R.A et al. Clinical relevance of breast and gastric cancer-associated polymorphisms as potential susceptibility markers for oral clefts in the Brazilian population. **BMC Med Genet**, v. 18, n. 1, p. 39, 2017.
 52. MACHADO, R.A et al. Potential genetic markers for nonsyndromic oral clefts in the Brazilian population: A systematic review and meta-analysis. **Birth Defects Res**, v. 110, n. 10, p. 827-839, 2018.
 53. MARUYAMA, T et al. Rap1b is an effector of *AXIN2* regulating crosstalk of signaling pathways during skeletal development. **J Bone Miner Res**, v. 32, n. 9, p. 1816-1828, 2017.
 54. MARVIN, M.I et al. *AXIN2*-associated autosomal dominant ectodermal dysplasia and neoplastic syndrome. **Am J Med Genet A**, v. 155, n. 4, p. 898-902, 2011.
 55. MEFFORD, H.C et al. Copy number variation analysis in single-suture craniosynostosis: multiple rare variants including *RUNX2* duplication in two cousins with metopic craniosynostosis. **Am J Med Genet A**, v. 152, n. 9, p. 2203-2210, 2010.
 56. MENEZES, R et al. *AXIS* inhibition protein 2 orofacial clefts and a family history of cancer. **J Am Dent Assoc**, v. 140, n. 1, p. 80-84, 2009.
 57. MENEZES R, VIEIRA AR. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. **Cleft Palate Craniofac J**, v.45, n.4, p.414-419, 2008.
-

58. MENINI, A.A.S et al. Estudo radiográfico da prevalência de anomalias dentárias por meio de radiografias panorâmicas em diferentes faixas etárias. **Rev. odontol. Univ. Cid. São Paulo (Online)**, v. 24, n. 3, 2012.
 59. MESSETTI, A.C et al. Brazilian multicenter study of association between polymorphisms in CRISPLD2 and JARID2 and non-syndromic oral clefts. **J Oral Pathol Med**, v. 46, n. 3, p. 232-239, 2017.
 60. MOLIN, A et al. Patients with isolated oligo/hypodontia caused by RUNX2 duplication. **Am J Med Genet A**, v. 167, n. 6, p. 1386-1390, 2015.
 61. MORSANI, J.M et al. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. **J Endod**, v. 37, n. 4, p. 455-459, 2011.
 62. MOSSEY, P.A et al. Cleft lip and palate. **Lancet**, v. 374, n. 9703, p. 1773-1785, 2009.
 63. MOSTOWSKA, A et al. Association of *DVL2* and *AXIN2* gene polymorphisms with cleft lip with or without cleft palate in a Polish population. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 94, n. 11, p. 943-950, 2012.
 64. MURRAY, J.C. Face Facts: Genes, Environment and Clefts. **Am J Hum Genet**, v. 57, n. 2, p. 227, 1995.
 65. MURRAY, J.C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. **Clin Genet**, v. 61, n. 4, p. 248-256, 2002.
 66. NEVES, L.T. **Triagem de mutação no éxon 3 do gene *IRF6* em indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia dentária: padronização de protocolo para seqüenciamento de DNA genômico a partir de saliva.** 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
 67. NIEMINEN, P. Genetic basis of tooth agenesis. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 312, n. 4, p. 320-342, 2009.
 68. OMIM *600211: Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: National Center for Biotechnology Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/?term=runx2> Acesso em: 20 abril 2017.
 69. PHAN, M et al. Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms? **Hum Genet**, v. 135, n. 12, p. 1299-1327, 2016.
-

-
70. PARANAÍBA, L.M.R et al. Prevalence of Dental Anomalies in Patients With Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in a Brazilian Population. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 50, n. 4, p. 400-405, 2013.
 71. PAVRI, S; FORREST, C.R. Demographics of orofacial clefts in Canada from 2002 to 2008. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 50, n. 2, p. 224-230, 2013.
 72. PEDACE, L et al. *AXIN2* germline mutations are rare in familial melanoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 50, n. 5, p. 370-373, 2011.
 73. POLDER, B.J et al. Ameta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 32, n. 3, p. 217-226, 2004.
 74. RAFIGHDOOST, H et al. Association of single nucleotide polymorphisms in *AXIN2*, *BMP4*, and *IRF6* with Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in a sample of the southeast Iranian population. **J Appl Oral Sci**, v. 25, n. 6, p. 650-656, 2017.
 75. RILEY B.M et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, n. 11, p. 4512-4517, 2007.
 76. ROOSENBOOM, J et al. Review: Facial endophenotypes in non-syndromic orofacial clefting. **B-ent**, v. 11, n. 3, p. 173-182, 2015.
 77. SABÓIA, T.M et al. *DLX1* and *MMP3* contribute to oral clefts with and without positive family history of cancer. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 2, p. 223-228, 2015.
 78. SALAHSHOR, S; WOODGETT, J.R. The links between axin and carcinogenesis. **J Clin Pathol**, v. 58, n. 3, p. 225-236, 2005.
 79. SIQUEIRA JR, J.F et al. Relationship between Fcgamma receptor and interleukin-1 gene polymorphisms and post-treatment apical periodontitis. **J Endod**, v. 35, n. 9, p. 1186-1192, 2009.
 80. SONG, S et al. *EDA* gene mutations underlie non-syndromic oligodontia. **J Dent Res**, v. 88, n. 2, p. 126-131, 2009.
 81. STEIN, G.S et al. A preliminary gene map for the Van der Woude syndrome critical region derived from 900 kb of genomic sequence at 1q32-q41. **Genome Res**, v. 10, n. 1, p. 81-94, 2000.
-

82. SULL, J.W et al. Differential parental transmission of markers in *RUNX2* among cleft case-parent trios from four populations. **Genet Epidemiol**, v. 32, n. 6, p. 505-512, 2008.
 83. SULL, J.W et al. Evidence that TGFA influences risk to cleft lip with/without cleft palate through unconventional genetic mechanisms. **Hum Genet**, v. 126, n. 3, p. 385-394, 2009.
 84. TAK, H.J et al. Axin2 overexpression promotes the early epithelial disintegration and fusion of facial prominences during avian lip development. **Dev Genes Evol**, v. 228, n. 5, p. 197-211, 2018.
 85. TERRY, A et al. Conservation and expression of an alternative 3⁰ exon of *RUNX2* encoding a novel proline-rich C-terminal domain. **Gene**, v. 336, n. 1, p. 115-125, 2004.
 86. TORTORA, C et al. Prevalence of abnormalities in dental structure, position, and eruption pattern in a population of unilateral and bilateral cleft lip and palate patients. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 45, n. 2, p. 154-162, 2008.
 87. TRINDADE, I.E.K; SILVA FILHO, O.G. **Fissuras Labiopalatinas – Uma abordagem interdisciplinar**. São Paulo: Ed. Santos, 2007. p. 337.
 88. TSAI, T.P et al. Distribution patterns of primary and rmanent dentition in children with unilateral complete cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 35, n. 2, p. 154-160, 1998.
 89. VAN DER WOUDE, A. Fistula labii inferioris congenita and its association with cleft lip and palate. **Am J Hum Genet**, v. 6, n. 2, p. 244, 1954.
 90. VIEIRA, A.R. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. **J Dent Res**, v. 82, n. 3, p. 162-165, 2003.
 91. VIEIRA, A.R et al. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. **J Dent Res**, v. 82, n. 4, p. 289-292, 2003.
 92. VIEIRA, A.R. Unraveling human cleft lip and palate research. **J Dent Res**, v. 87, n. 2, p. 119-125, 2008.
 93. VOLPATO, L.E et al. Cleft lip and palate: Associated genetic and environmental factors. **Sci J Dent**, v. 2. n. 2, p.19-25, 2015.
-

-
94. WANG J et al. Sequence analysis of PAX9, MSX1 and *AXIN2* genes in a Chinese oligodontia family. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 10, p. 1027-1034, 2011.
 95. WONG, S et al. Association between *AXIN2* polymorphism and oligodontia. **Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 46, n. 2, p. 269-273, 2014.
 96. WONG, S et al. Novel missense mutations in the *AXIN2* gene associated with non-syndromic oligodontia. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 3, p. 349-353, 2014.
 97. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies**: Geneva: World Health Organization, 2002.
 98. WU, T.T et al. Characteristics and distribution of dental anomalies in patients with cleft. **Chang Gung Med. J**, v. 34, n. 3, p. 306-314, 2011.
 99. WU, D et al. DLX4 is associated with orofacial clefting and abnormal jaw development. **Hum Mol Genet**, v. 24, n. 15, p. 4340-4352, 2015.
 100. YUE, H et al. Functional analysis of a novel missense mutation in *AXIN2* associated with non-syndromic tooth agenesis. **Eur J Oral Sci**, v. 124, n. 3, p. 228-233, 2016.
 101. ZENG, L. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 181-192, 1997.
-

Anexos

ANEXO I

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de variantes genéticas nos genes AXIN2 e RUNX2 nas fissuras orofaciais não síndrômicas associadas à agenesia dentária

Pesquisador: Jose Francisco Mateo Castillo

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 80927917.1.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.539.631

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa de doutorado de autoria de José Francisco Mateo Castillo sob orientação e responsabilidade da Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves com a colaboração de Maria Carolina de Moraes Pereira.

Serão incluídos 2100 indivíduos de ambos os sexos, a partir de 10 anos de idade, divididos em três grupos distintos: Grupo I: 700 sujeitos com diagnóstico de fissura de lábio e palato unilateral não síndrômica que apresente também agenesia dentária de algum dente com exceção dos terceiros molares (regularmente matriculados no HRAC-USP); Grupo II: 700 indivíduos com diagnóstico de fissura de lábio e palato unilateral não síndrômica que não apresentem agenesia dentária (regularmente matriculados no HRAC-USP) e Grupo III (controle): 700 indivíduos sem fissura labiopalatina não síndrômica ou malformações craniofaciais e sem presença do fenótipo agenesia dentária (recrutados na Clínica Odontológica do curso de ortodontia e implantodontia do Centro de Pós-graduação em Odontologia CPO-UNINGA). Para os grupos I e II, o diagnóstico de fissura labiopalatina não síndrômica e a presença de agenesia dentária serão confirmados por meio das informações dos prontuários, laudos fotográficos e radiografias panorâmicas pertencentes aos arquivos no HRAC-USP e, para o grupo III, a confirmação de ausência dos fenótipos será realizada mediante avaliação clínica, informações no prontuário e análise de

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20

Bairro: Vila Nova Cidade Universitária

CEP: 17.012-900

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 2.539.631

radiografias panorâmicas arquivadas no CPO-UNINGA. Para a composição da amostra, os indivíduos serão abordados quando comparecerem às consultas de rotina ao HRAC e ao CPO UNINGA. Após a coleta de saliva para extração de DNA dos voluntários dos grupos I, II e III essas amostras serão transportadas ao Laboratório de Farmacologia e Genética, do Departamento de Ciência Biológicas da FOB-USP e todos os procedimentos laboratoriais serão realizados sob a orientação da Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves e do técnico do laboratório Thiago José Dionísio. Serão investigadas 3 variantes polimórficas: (rs2240308 e rs7591) no gene AXIN2 e (rs1934328) no gene RUNX2 através de PCR Real Time. Os resultados serão analisados usando o software SDS 1.7 (Applied Biosystems). As frequências alélicas e os resultados serão comparados entre os 3 grupos. Será utilizado o teste de Qui-quadrado para cada marcador genético a fim de avaliar a significância das diferenças observadas nas frequências dos polimorfismos.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar possíveis associações entre os polimorfismos (rs2240308 e rs7591) no gene AXIN2 e (rs1934328) no gene RUNX2 com os fenótipos fissuras labiopalatinas não sindrômicas e agenesia dentária combinados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Segundo os pesquisadores, "O presente estudo pode ser considerado de risco mínimo para os indivíduos selecionados para fazer parte do mesmo, já que a metodologia que será implementada é baseada especificamente na coleta de material biológico (saliva) a qual propriamente dita não apresenta risco considerável para o participante; porém a abordagem do indivíduo pode causar certo constrangimento ou desconforto. Para isto o pesquisador responsável e a equipe de pesquisa receberão um treinamento para saber a melhor forma de abordar o indivíduo. Cabe ressaltar que todos os indivíduos serão abordados para o convite em participar da pesquisa em um ambiente privado em uma sala fechada e neste local será realizada a coleta da saliva, caso o participante aceite fazer parte da pesquisa, podendo recusar ou retirar seu consentimento em qualquer etapa da pesquisa sem que exista nenhum prejuízo. Sobre o tempo para realizar a coleta e o preenchimento do TCLE, o indivíduo será convidado somente nos horários entre as consultas tomando em consideração a prioridade dos horários de agendamento do indivíduo, não tendo risco de comprometer ou atrasar o horário das consultas agendadas no hospital (HRAC).".

Benefícios: Os autores destacam que "No presente estudo, os benefícios para os participantes

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
Bairro: Vila Nova Cidade Universitária **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 2.539.631

estão direcionados a comunidade para possíveis condutas preventivas e informativas sobre a possível detecção da existência de variantes polimórficas nos genes estudados, para desta forma, conhecer possíveis causas genéticas na etiologia dos fenótipos investigados neste estudo. Ressaltando que compreender o aspecto genético das anomalias congênitas investigadas neste estudo podem contribuir com a prevenção de futuros casos."

Assim, o projeto tem maior possibilidade de trazer benefícios, do que de causar danos, sendo, portanto, eticamente adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional prospectivo do tipo caso-controle com informações bem fundamentadas e explanação clara. Apresenta mérito científico e os procedimentos a serem realizados não ferem nenhuma norma ética que torne a pesquisa inviável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos abaixo foram adequadamente apresentados:

- Carta de encaminhamento
- Formulário HRAC
- Folha de Rosto da Plataforma Brasil
- Termo de Compromisso de Manuseio de Informações
- Termo de Permissão para uso de Registros para Fins Científicos
- Termo de Compromisso de Tornar Públicos os Resultados da Pesquisa e Destinação de Materiais ou Dados Coletados
- Termo de Compromisso do Pesquisador Responsável
- Termo de Aquiescência do Departamento de Ciências Biológicas da FOB-Bauru e do Centro de Pós-graduação em Odontologia Bauru (CPO).

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as pendências, os pesquisadores realizaram as adequações no cronograma de pesquisa, prevendo o início da seleção da amostra para 02/04/2018 e coleta de material biológico a partir de 24/04/2018 e acrescentaram, na Metodologia, o termo ANOS, ao se referirem à idade

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
Bairro: Vila Nova Cidade Universitária **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 2.539.631

dos participantes da pesquisa.

Após todos os ajustes realizados pelos pesquisadores, não há infrações éticas que impossibilite o início da pesquisa. Portanto, sugiro parecer APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa Aprovado Ad Referendum pela Coordenadora do CEP-HRAC-USP.

O pesquisador deve atentar que o projeto de pesquisa aprovado por este CEP refere-se ao protocolo submetido para avaliação. Portanto, conforme a Resolução CNS 466/12, o pesquisador é responsável por "desenvolver o projeto conforme delineado", se caso houver alterações nesse projeto, este CEP deverá ser comunicado em emenda via Plataforma Brasil, para nova avaliação.

Cabe ao pesquisador notificar via Plataforma Brasil o relatório final para avaliação. Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos e/ou outros Termos obrigatórios assinados pelos participantes da pesquisa deverão ser entregues ao CEP. Os relatórios semestrais devem ser notificados quando solicitados no parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1040935.pdf	06/03/2018 13:55:57		Aceito
Outros	OFICIOSPENDENCIAS.PDF	06/03/2018 12:01:41	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO2PENDENCIAS.pdf	06/03/2018 12:00:30	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Outros	OFICRESPOSTAPENDENCIASJAN2018.pdf	24/01/2018 13:36:28	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETORESPOSTASAPENDENCIAS.pdf	24/01/2018 13:34:18	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECONTROLEPENDENCIAS.pdf	24/01/2018 13:32:08	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEGRUPOCASOPENDENCIAS.pdf	24/01/2018 13:31:38	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
 Bairro: Vila Nova Cidade Universitária CEP: 17.012-900
 UF: SP Município: BAURU
 Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: cephrac@usp.br

Continuação do Parecer: 2.539.631

Outros	Checklist_Mateo.docx	08/12/2017 17:06:40	Rosemeire Aparecida Gimenes Botelho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOcompleto.pdf	08/12/2017 11:02:21	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMCONSENTCASOCONTROLE.pdf	08/12/2017 11:01:03	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMCONSENTGRUPOCASO.pdf	08/12/2017 11:00:00	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Outros	Jose_manuseio_inf.pdf	08/12/2017 10:53:09	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Outros	Jose_tomar_pub.pdf	08/12/2017 10:52:31	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Outros	Jose_pesq_resp.pdf	08/12/2017 10:52:04	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Outros	Jose_aquiesc_CPO.pdf	08/12/2017 10:51:11	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Outros	Jose_aquiesc_FOB.pdf	08/12/2017 10:50:43	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Outros	Jose_Form_HRAC.pdf	08/12/2017 10:49:36	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Outros	Jose_carta_enc.pdf	08/12/2017 10:48:56	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito
Folha de Rosto	Jose_Plat_Brasil.pdf	08/12/2017 10:47:41	Jose Francisco Mateo Castillo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 12 de Março de 2018

Assinado por:
Renata Paciello Yamashita
(Coordenador)

Endereço: Rua Silvio Marchione, 3-20
Bairro: Vila Nova Cidade Universitária **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** cephrac@usp.br

ANEXO II

Ficha de avaliação clínica

Nome: _____ No. Prontuário: _____

RG: _____ Idade: _____ Sexo: M/ F

Fissura Transforame Unilateral: Direita ____ Esquerda ____

Tem Radiografia Panorâmica? ____ Data da realização ____/____/____

Agenesia Dentária:

Observação:

ANEXO III

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais,
Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
GRUPO CASO

O presente documento contém informações referentes a pesquisa intitulada **“Investigação de variantes genéticas nos genes *AXIN2* e *RUNX2* nas fissuras orofaciais não sindrômicas associadas à agenesia dentária”**, a qual será executada no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho) com a colaboração do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru ambas instituições Universidade de São Paulo campus Bauru, SP. A pesquisa será realizada pelo Cirurgião Dentista e doutorando José Francisco Mateo Castillo, CRO-SP 110491, colaboração da Biomédica e mestranda Maria Carolina de Moraes Pereira CRBM-30769 sob a supervisão da Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves CRO-SP 50962.

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar desta pesquisa que tem como objetivo: investigar se possíveis alterações em alguns dos seus genes chamados *AXIN2* e *RUNX2* tem relação com fenda de lábio e palato (céu de boca) e ausência congênita de dentes (agenesia dentária). E isso será realizado analisando no laboratório parte do seu DNA. Vários outros pesquisadores no mundo todo têm estudado vários genes para tentar entender se pequenas variações neles poderiam estar relacionadas com o fato da fissura labiopalatina ou da ausência de dentes acontecer. Esses genes que nós escolhemos para estudar, nós já sabemos que fazem parte e participam na formação do dente e na formação da face e do palato, por esse motivo nós os escolhemos. Caso você aceite fazer parte desse estudo, para analisarmos o seu DNA, será necessário somente a coleta de aproximadamente 5 ml de sua saliva, pois na saliva estão presentes células que normalmente descamam de nossa boca e no interior dessas células se encontra o DNA. Essa coleta demora mais ou menos 5 ou 10 minutos e será realizada na clínica odontológica, no setor de Endodontia do Centrinho, onde existem duas salas privativas adequadas para tal abordagem, durante os períodos de espera entre os horários de agendamento das consultas de rotina sem atrasar ou atrapalhar o seu atendimento. Depois de coletarmos a sua saliva, essa será analisada no Laboratório de Farmacologia e Genética do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pelo pesquisador José Francisco Mateo Castillo. Após análise e se necessário repetição dos testes de laboratório, todo material biológico utilizado será devidamente descartado. É importante destacar

Rubricas:
Participante da pesquisa:
Pesquisador Responsável:

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo
Rua Sílvio Marchione, 3-20 Vila Universitária - CEP: 17.012-900 Bauru - SP
Fone/FAX: 3235-8434 e-mail: secpghrac@usp.br
[http:// www.hrac.usp.br](http://www.hrac.usp.br)

Term_Consent_V2.0

Página 1 de 3

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo

que em qualquer momento durante a pesquisa você poderá solicitar a o descarte das amostras de saliva ainda não processadas, mediante formalização da sua desistência de participar do estudo, valendo a partir da data desta manifestação.

Os benefícios previstos desta pesquisa estão direcionados a comunidade científica para possíveis condutas preventivas e informativas sobre a possível descoberta da existência de variações nos genes estudados, para desta forma, conhecer possíveis causas do desenvolvimento de fendas de lábio e palato e agenesia dentária, podendo contribuir com a prevenção de futuros casos. Os riscos relacionados com a participação da pesquisa podem ser considerados mínimos já que a coleta da saliva é um método não invasivo, simples, indolor e que não apresenta risco considerável para o participante; porém a abordagem do indivíduo pode causar certo constrangimento ou desconforto, para minimizar tais riscos a abordagem e a coleta da saliva serão orientadas e realizadas por profissionais com prévio treinamento.

Fica claro que você poderá recusar-se a participar da pesquisa ou retirar seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em qualquer fase desta pesquisa sem nenhum prejuízo. Todos os dados obtidos para a finalidade de pesquisa serão mantidos em sigilo e a sua privacidade está garantida durante todas as fases da pesquisa. Os riscos relacionados às possíveis quebras de sigilo e confidencialidade dessa pesquisa são mínimos, visto que os resultados só serão coletivamente publicados ao final da pesquisa, sem a identificação pessoal de ninguém. Os dados genéticos obtidos neste estudo serão tratados de forma confidencial e não serão repassados a terceiros (como, por exemplo: seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros). Como mecanismo de proteção desses dados, na planilha de dados e resultados, cada participante da pesquisa não será identificado pelo nome e sim por uma numeração. Se você desejar saber os resultados obtidos nesta investigação sobre as análises genéticas do seu DNA, esses dados poderão ser informados a você, mediante a sua solicitação. Frente aos resultados, você poderá ser aconselhado do ponto de vista genético e, se necessário, também poderá ser encaminhado para acompanhamento clínico.

Caso você considere que tenham ocorrido eventuais danos relacionados a sua participação nesta pesquisa, será garantido o direito a assistência e conduta integral para reparar esses possíveis danos.

Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido rubricada e assinada, igualmente válida. A participação nesse estudo é **voluntária** e contribuirá para o avanço

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo
Rua Sílvio Marchione, 3-20 Vila Universitária - CEP: 17.012-900 Bauru - SP
Fone/FAX: 3235-8434 e-mail: secpghrac@usp.br
[http:// www.hrac.usp.br](http://www.hrac.usp.br)

Term_Consent_V2.0

Página 2 de 3

Rubricas:
Participante da pesquisa:
Pesquisador Responsável:

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais,
Universidade de São Paulo

do conhecimento. Você não terá nenhum gasto específico com sua participação na pesquisa e **não receberá qualquer tipo de benefício financeiro.**

Diante qualquer dúvida você terá garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer assunto relacionado com a pesquisa podendo entrar em contato com qualquer dos membros da equipe de pesquisa por meio dos telefones: 3226-6111 (Sala Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves), (14) 99836-8175 José Francisco Mateo Castillo e (14) 98808-9041 Maria Carolina de Moraes Pereira ou via email: mateoj@usp.br e, para denúncias e/ou reclamações entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa-HRAC-USP, à Rua Sílvio Marchione, 3-20 - Vila Universitária - CEP 17012-900 - Bauru/SP, de segunda à sexta-feira das 8 às 18 h, ou pelo telefone (14) 3235-8421, e-mail: cephrac@usp.br

Agradecemos sua participação, e nos colocamos a disposição para qualquer informação que seja necessária.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, Eu _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura das informações neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, concordo em participar da pesquisa e assino este documento em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

José Francisco Mateo Castillo
Assinatura do Pesquisador Responsável

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) GRUPO CONTROLE

O presente documento contém informações referentes a pesquisa intitulada "**Investigação de variantes genéticas nos genes *AXIN2* e *RUNX2* nas fissuras orofaciais não sindrômicas associadas à agenesia dentária**", a qual será executada no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho) com a colaboração do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru ambas instituições Universidade de São Paulo campus Bauru, SP. A pesquisa será realizada pelo Cirurgião Dentista e doutorando José Francisco Mateo Castillo, CRO-SP 110491, colaboração da Biomédica e mestrandia Maria Carolina de Moraes Pereira CRBM-30769 sob a supervisão da Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves CRO-SP 50962.

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar desta pesquisa que tem como objetivo: investigar se possíveis alterações em alguns dos seus genes chamados *AXIN2* e *RUNX2* tem relação com fenda de lábio e palato (céu de boca) e ausência congênita de dentes (agenesia dentária). E isso será realizado analisando no laboratório parte do seu DNA. Vários outros pesquisadores no mundo todo têm estudado vários genes para tentar entender se pequenas variações neles poderiam estar relacionadas com o fato da fissura labiopalatina ou da ausência de dentes acontecer. Esses genes que nós escolhemos para estudar, nós já sabemos que fazem parte e participam na formação do dente e na formação da face e do palato, por esse motivo nós os escolhemos. Caso você aceite fazer parte desse estudo, para analisarmos o seu DNA, será necessário somente a coleta de aproximadamente 5 ml de sua saliva, pois na saliva estão presentes células que normalmente descamam de nossa boca e no interior dessas células se encontra o DNA. Essa coleta demora mais ou menos 5 ou 10 minutos e em uma sala privada da Clínica Odontológica do Centro de Pós-graduação em Odontologia (CPO-UNINGA) durante os períodos de espera entre os horários de agendamento das consultas de rotina sem atrasar ou atrapalhar o atendimento. Após a coleta da saliva serão realizados testes de laboratório pelo pesquisador José Francisco Mateo Castillo no Laboratório de Farmacologia e Genética do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Após análise e se necessário repetição dos testes de laboratório, todo material

Rubricas:
Participante da pesquisa:
Pesquisador Responsável:

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo
Rua Sílvio Marchione, 3-20 Vila Universitária - CEP: 17.012-900 Bauru - SP
Fone/FAX: 3235-8434 e-mail: secpghrac@usp.br
[http:// www.hrac.usp.br](http://www.hrac.usp.br)

Term_Consent_V2.0

Página 1 de 3

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo

biológico utilizado será devidamente descartado. É importante destacar que em qualquer momento durante a pesquisa você poderá solicitar o descarte das amostras de saliva ainda não processadas, mediante formalização da sua desistência de participar do estudo, valendo a partir da data desta manifestação.

Os benefícios previstos desta pesquisa estão direcionados a comunidade científica para possíveis condutas preventivas e informativas sobre a possível descoberta da existência de variações nos genes estudados, para desta forma, conhecer possíveis causas do desenvolvimento de fendas de lábio e palato e agenesia dentária, podendo contribuir com a prevenção de futuros casos. Os riscos relacionados com a participação da pesquisa podem ser considerados mínimos já que a coleta da saliva é um método não invasivo, simples, indolor e que não apresenta risco considerável para o participante; porém a abordagem do indivíduo pode causar certo constrangimento ou desconforto, para minimizar tais riscos a abordagem e a coleta da saliva serão orientadas e realizadas por profissionais com prévio treinamento.

Fica claro que você poderá recusar-se a participar da pesquisa ou retirar seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em qualquer fase desta pesquisa sem nenhum prejuízo. Todos os dados obtidos para a finalidade de pesquisa serão mantidos em sigilo e a sua privacidade está garantida durante todas as fases da pesquisa. Os riscos relacionados às possíveis quebras de sigilo e confidencialidade dessa pesquisa são mínimos, visto que os resultados só serão coletivamente publicados ao final da pesquisa, sem a identificação pessoal de ninguém. Os dados genéticos obtidos neste estudo serão tratados de forma confidencial e não serão repassados a terceiros (como, por exemplo: seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros). Como mecanismo de proteção desses dados, na planilha de dados e resultados, cada participante da pesquisa não será identificado pelo nome e sim por uma numeração. Se você desejar saber os resultados obtidos nesta investigação sobre as análises genéticas do seu DNA, esses dados poderão ser informados a você, mediante a sua solicitação. Frente aos resultados, você poderá ser aconselhado do ponto de vista genético e, se necessário, também poderá ser encaminhado para acompanhamento clínico.

Caso você considere que tenham ocorrido eventuais danos relacionados a sua participação nesta pesquisa, será garantido o direito a assistência e conduta integral para reparar esses possíveis danos.

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo
Rua Sílvio Marchione, 3-20 Vila Universitária - CEP: 17.012-900 Bauru - SP
Fone/FAX: 3235-8434 e-mail: secpghrac@usp.br
[http:// www.hrac.usp.br](http://www.hrac.usp.br)

Term_Consent_V2.0

Página 2 de 3

Rubricas:
Participante da pesquisa:
Pesquisador Responsável:

Divisão Odontológica; Setor de Endodontia. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo

Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido rubricada e assinada, igualmente válida. A participação nesse estudo é **voluntária** e contribuirá para o avanço do conhecimento. Você não terá nenhum gasto específico com sua participação na pesquisa e **não receberá qualquer tipo de benefício financeiro**.

Diante qualquer dúvida você terá garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer assunto relacionado com a pesquisa podendo entrar em contato com qualquer dos membros da equipe de pesquisa por meio dos telefones: 3226-6111 (Sala Profa. Dra. Lucimara Teixeira das Neves), (14) 99836-8175 José Francisco Mateo Castillo e (14) 98808-9041 Maria Carolina de Moraes Pereira ou via email: mateoj@usp.br e, para denúncias e/ou reclamações entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa-HRAC-USP, à Rua Silvio Marchione, 3-20 - Vila Universitária - CEP 17012-900 - Bauru/SP, de segunda à sexta-feira das 8 às 18 h, ou pelo telefone (14) 3235-8421, e-mail: cephrac@usp.br

Agradecemos sua participação, e nos colocamos a disposição para qualquer informação que seja necessária.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, Eu _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura das informações neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, concordo em participar da pesquisa e assino este documento em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

José Francisco Mateo Castillo
Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO IV

Figura 4. Imagem da base de dados Ensembl (<https://www.ensembl.org>, com acesso em 25 junho 2019, mostrando as percentagens da presença do polimorfismo rs11655966 do gene *AXIN2* nas diferentes populações.

ANEXO V

Figura 5. Imagem da base de dados Ensembl (<https://www.ensembl.org>, com acesso em 25 junho 2019, mostrando as percentagens da presença do polimorfismo rs2240307 do gene *AXIN2* nas diferentes populações.