

Universidade Federal Fluminense
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas

ERIKA CALVANO KUCHLER

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS FISSURAS LABIOPALATAIS
E OS GENES *AXIN2* E *IRF6***

NITERÓI

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ERIKA CALVANO KUCHLER

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS FISSURAS LABIOPALATAIS
E OS GENES *AXIN2* E *IRF6***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Orientador: Prof Dr. Alexandre Rezende Vieira

NITERÓI

2010

ERIKA CALVANO KUCHLER

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS FISSURAS LABIOPALATAIS E OS
GENES *AXIN2* E *IRF6***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Ciências Médicas

Aprovado em _____ de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. JOSÉ MAURO GRANJEIRO – Orientador
UFF

Prof. Dr. WILLIAN ZAMBUZZI
UFF

Prof. Dr. JOSÉ CALASANS
UFF

Profa. Dra. FERNANDA VOLPE DE ABREU
UFF

Profa. Dra. PATRÍCIA DE ANDRADE RISSO
UFRJ

Prof. Dr. MARCELO DE CASTRO COSTA
UFRJ

Niterói

2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todas as famílias que participaram e colaboraram pra que esse trabalho se tornasse Possível. Com carinho especial a todas as crianças.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus amigos, meus orientadores.....

Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, meu querido amigo, meu orientador... Um exemplo admirável de dedicação à pesquisa. Me recebeu tão generosamente e incentivou ao longo do meu curso. Sem você, nada disso seria possível.. Obrigada pela gratificante oportunidade de trabalhar com você.

Ao Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira, a quem devoto a minha mais sincera admiração. Agradeço pelo seu apoio ao longo de todos esses anos e pelos nossos momentos divertidos.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Castro Costa, agradeço pela sua amizade leal em todos esses anos e por você ter sido a primeira pessoa a acreditar em mim. Sem você eu não teria dado o primeiro passo.

AGRADECIMENTOS

À **Vida**, por ter me proporcionado essa experiência única.

À **minha mãe Helena e ao meu pai Joaquim**, que me apoiaram nesse difícil caminho que eu escolhi, respeitando minhas decisões e ideais. Por entenderem que nem sempre nossas realizações vêm pelos caminhos mais fáceis.

Ao **meu irmão Patrick e minha cunhada Sofia** pela cumplicidade, amizade leal e generosidade.

À minha amiga **Patrícia Tannure**, por estar ao meu lado por todo esse percurso e por compartilharmos nossas dificuldades, entusiasmos e ideais.

Às amigas **Priscila Falagan e Lidia Amorim**, por nos receberem generosamente nesse mundo novo da biologia molecular.

À **Lívia Antunes e ao Leonardo Antunes**, que são grandes amigos, que me acompanham ao longo destes anos e me ajudam nas horas mais difíceis.

Aos amigos que receberam na USP, com carinho especial à **Kati** que muito me ensinou.

Às minhas alunas/amigas **Talíria, Helena, Ticiane, Christiane e Andrea** pela oportunidade de aprender juntas e por nossos momentos divertidos.

Aos **amigos da UPC**, por nossa prazerosa convivência diária.

À **minha amiga Patrícia Rizzo**, por ter estado ao meu lado durante todo esse tempo. Obrigada pelo carinho e amizade!

À **Ariadne Letra**, por toda ajuda e colaboração nesse projeto.

À equipe do programa de pós-graduação, em especial à professora **Solange e a Dina**.

À todos os amigos da UFRJ, minha primeira casa, em especial ao **Rafael e Tatiana Kelly** por todos esses anos de trabalho.

Aos funcionários do **Hospital Nossa Senhora do Loreto** pela colaboração.

À **Capes**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À **todos** àqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

**“Dê seu primeiro passo com fé,
não é necessário que veja todo caminho,
só dê seu primeiro passo.”**

Martin Luther King

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL NORMAL.....	19
2.2. FISSURA LABIAL COM OU SEM FISSURA PALATINA.....	22
2.3. EPIDEMIOLOGIA DAS FISSURAS LABIOPALATINAS.....	24
2.4. ASSOCIAÇÃO ENTRE FL/P E AGENESIAS DENTÁRIAS.....	24
2.5. DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO E SUBFENÓTIPO.....	25
2.6. ETIOLOGIA DA FISSURA LABIOPALATAL.....	26
3.HIPÓTESE.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1. UNIVERSO AMOSTRAL.....	34
5.2. DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO E SUBFENÓTIPO.....	35
5.3 INFORMAÇÕES DA ANAMNESE.....	35
5.4. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	36
5.5 EXTRAÇÃO DE DNA.....	36
5.6 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E DA PUREZA DO DNA.....	37
5.7. GENOTIPAGEM.....	38
5.8. ANÁLISE DOS DADOS.....	40
6. RESULTADOS.....	41

6.1. CARATERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	41
6.2. ESTUDOS GENÉTICOS DE ASSOCIAÇÃO COM FL/P.....	45
7. DISCUSSÃO.....	52
7.1 DESENHO DO ESTUDO E AMOSTRA.....	52
7.2. ANÁLISE MOLECULAR.....	55
7.3. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	60
7.4. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
8. CONCLUSÃO.....	63
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
10. ANEXOS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
°C	Grau Celsius
CDH1	Do inglês, <i>cadherin 1</i>
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FL	Fissura de lábio
FL±P	Fissura de lábio com ou sem fissura de palato
FL/P	Fissura de lábio e/ou palato
FP	Fissura de Palato
g	Gravidade
HCl	Ácido Clorídrico
HMNSL	Hospital Municipal Nossa Senhora do Loreto
IC	Intervalo de confiança
IRF6	Do inglês, <i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
LHX8	Do inglês, <i>LIM homeobox 8</i>
MMP3	Do inglês, <i>Matrix metalloproteinase 3</i>
M	Molar
MSX1	Do inglês, <i>Muscle segment homeobox 1</i>
MSX2	Do inglês, <i>Muscle segment homeobox 2</i>
OR	Do inglês, <i>Odds Ratio</i>
PAX9	Do inglês, <i>Paired box gene 9</i>
PTCH	Do inglês, <i>Patched homolog 1(Drosophila)</i>
PTTPO	Programa de Treinamento Teórico-Prático em Odontopediatria
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>

rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SVW	Síndrome de Van der Woud
TE	Tampão de Extração
TGFA	Do inglês, <i>Transforming growth factor alfa</i>
TGF β 3	Do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i>
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WNT	Do inglês, <i>wingless-type MMTV integration site family</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento Craniofacial de um embrião.	23
Figura 2: Fissuras Labiais. Fissura labial unilateral e fissura labial bilateral sem o acometimento do alvéolo dentário (imagens superiores). Fissura labial unilateral e fissura labial bilateral com o acometimento do alvéolo dentário (imagens inferiores).	24
Figura 3: Fissura Labiopalatal unilateral e Fissura Labiopalatal bilateral (respectivamente).	25
Figura 4: Fissura palatal completa (acometendo duro e o palato mole) e fissura palatal incompleta (acometendo apenas o palato mole), respectivamente.	25
Figura 5: Espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) utilizado para avaliar concentração e pureza do DNA extraído.	39
Figura 6: Equipamento de PCR em tempo-Real (Stratagene Mx3005P).	39
Figura 7: Exemplos de homozigotos e heterozigotos pelo método Taqman.	40
Figura 8: Resultados obtidos pelo método Taqman para o polimorfismo rs642961 (<i>IRF6</i>). Indivíduos Homozigotos para cada alelo estão representados nas cores vermelha e azul e os indivíduos heterozigotos estão representados pela cor verde.	41
Figura 9: Freqüência relativa dos tipos de fissuras.	43

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Condições experimentais para as reações realizadas.	42
Tabela 2: Características da população estudada.	44
Tabela 3. Características do grupo de portadores de FL/P.	45
Tabela 4: Tipo de câncer nas famílias dos indivíduos no grupo caso e no grupo controle.	46
Tabela 5: Resultados da associação do gene AXIN2 (marcador rs2240308) com os fenótipos e subfenótipos da FL/P.	48
Tabela 6: Resultados da associação do gene AXIN2 (marcador rs740026) com os fenótipos e subfenótipos da FL/P.	51
Tabela 7: Resultados da associação do gene IRF6 com os fenótipos e subfenótipos da FL/P.	53
Tabela 8: Estudos realizados com o gene IRF6 polimorfismo (rs642961) em diferentes grupos de diferentes origens étnicas.	61

RESUMO

A fissura de lábio e/ou palato (FL/P) é a anomalia craniofacial mais comum nos seres humanos. A etiologia é multifatorial e diversos fatores ambientais e genes foram associados à essa anomalia. Alguns estudos consideram a FL/P como parte de um fenótipo mais amplo, onde características adicionais, como outras alterações do desenvolvimento craniofacial, poderiam ser usadas como marcadores clínicos para investigações genéticas da FL/P. Os genes *AXIN2* e *IRF6* estão entre os genes candidatos à FL/P, devido à importante função que exercem durante o desenvolvimento craniofacial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre os polimorfismos nos genes *AXIN2* e *IRF6* com os fenótipos e subfenótipos de FL/P. Para tanto, duzentos e quarenta e seis indivíduos portadores de FL/P e 227 indivíduos (controles) não relacionados e sem história positiva de FL/P na família foram examinados. Amostras de saliva foram coletadas como fonte de DNA genômico. Um total de 3 polimorfismos, 2 no gene *AXIN2* e 1 no gene *IRF6* foram estudados através de PCR em tempo real pelo método Taqman. O cálculo da razão de chances e os testes do qui-quadrado ou exato de Fisher foram usados nas análises estatísticas. Os polimorfismos em *AXIN2* demonstraram associação com determinados subfenótipos da FL/P. Não houve associação entre os alelos e genótipos de *IRF6* com FL/P. Estes resultados sugerem que *AXIN2* está envolvido na etiologia de subgrupos específicos de FL/P.

Palavras-chave: Anomalias Craniofaciais, etiologia, polimorfismo genético.

ABSTRACT

Cleft lip and/or palate (CL/P) is the most common craniofacial anomaly in humans. The etiology is multifactorial and several genes and environmental factors are associated with this anomaly. Some studies consider the CL/P as part of a wide phenotype, in which additional features, such as others developmental craniofacial alterations, could be used as a clinical marker for genetic studies of CL/P. *AXIN2* and *IRF6* are among the candidates genes for CL/P, due to the important function of these genes during the development. The aim of this study was to evaluate the association between polymorphisms in genes *AXIN2* and *IRF6*, and CL/P phenotypes and subphenotypes. Two hundred and forty-six individuals with CL/P and 227 (control) unrelated individuals, without a positive history of CL/P in the family were examined. Saliva samples were collected as a source of genomic DNA. A total of 3 polymorphisms, 2 in *AXIN2* and 1 in *IRF6* were studied by real time PCR, Taqman method. The Odds Ratio and chi-square or Fisher exact test were performed for statistical analyses. The *AXIN2* polymorphisms were associated with specific subphenotypes of CL/P, for statistical analyses. There was not association between the alleles and genotypes of *IRF6* and CL/P. These results suggest that *AXIN2* is involved in the etiology of specific subgroups of CL/P.

Key words: Craniofaial anomalies, etiology, genetic polimorphisms

1.INTRODUÇÃO

As anomalias congênitas ocorrem em cerca de 5% dos nascidos vivos e representam a segunda causa de mortalidade infantil no Brasil (datasus). Dentre as malformações congênitas, as fissuras labiopalatais (FL/P) destacam-se por representarem as anomalias craniofaciais mais comuns nos seres humanos. A incidência da FL/P varia de 1/500 até 1/2500 nascidos vivos, dependendo da região geográfica e da etnia (Murray, 1995; 2002). A FL/P pode estar associada a mais de 300 síndromes, contudo, 70% dos casos de FL/P são considerados alterações isoladas (Schutte e Murray, 1999).

Os pacientes portadores de FL/P apresentam comprometimento psicológico, estético, alterações na fala e no posicionamento dentário. Além disso, pequenas malformações adicionais são características frequentes na FL/P isolada. Dentre as anomalias, destacam-se as agenesias dentárias, que são aproximadamente cinco vezes mais frequentes em indivíduos portadores de FL/P do que na população em geral (Kuchler *et al.*, 2010) e podem ser consideradas como parte do fenótipo da FL/P (Letra *et al.*, 2007; Vieira, 2008).

Diversos genes e *loci* candidatos foram associados a FL/P isolada em diferentes estudos e populações. A etiologia multifatorial complexa da FL/P justifica a diversidade de resultados apresentados na literatura, onde inúmeros fatores ambientais e genes, atuando isoladamente ou em conjunto estão envolvidos com a sua etiologia (Murray, 2002; Vieira, 2008).

Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que diversos fatores ambientais, durante a gestação, como o fumo (Chung *et al.*, 2000; Leite e Koifman, 2009) e o álcool (Leite e Koifman, 2009; Zarante *et al.*, 2009) estão associados ao desenvolvimento da FL/P.

Por outro lado, estudos genéticos demonstraram que genes envolvidos na tumorigênese e no desenvolvimento embrionário estão associados com a

FL/P (Letra *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2009). Dentre os quais, cita-se o gene *AXIN2* (AXIS inibidor de proteína 2) que desempenha um papel fundamental durante a morfogênese craniofacial (Kerrigan *et al.*, 1998) e, além disto, mutação neste gene foi associada ao câncer colorectal e à agenesia dentária (Lammi *et al.*, 2004).

Foi sugerido que um polimorfismo no gene *IRF6* poderia ser responsável por 12% de todos os casos de FL/P (Zuccherro *et al.*, 2004), após mutações nesse gene terem sido relacionadas com Síndrome de Van der Woud (SVW). Desde então, diversos estudos em várias populações têm replicado estes resultados e novas investigações sobre outras variações em *IRF6* foram desenvolvidas (Wu, *et al.*, ; Blanton, *et al.*, 2005; Ghassibe, *et al.*, 2005; Scapoli, *et al.*, 2005; Vieira, *et al.*, 2007; Jugessur, *et al.*, 2008; Rahimov, *et al.*, 2008).

Além da diversidade de genes, outro problema dos estudos genéticos recentes pode ser atribuído à dificuldade na definição de um fenótipo mais detalhado da FL/P. A classificação precisa dos indivíduos afetados torna-se imprescindível em um traço genético complexo como a FL/P (Letra, *et al.*, 2007). Desta forma, o presente estudo tem como objetivo de analisar a relação entre os fenótipos e subfenótipos da FL/P e as variações nos genes *AXIN2* e *IRF6*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL NORMAL

As características morfológicas definidas pelo processo de crescimento e desenvolvimento craniofacial são dependentes dos componentes genéticos e dos componentes ambientais. O desenvolvimento da face compreende uma cascata de eventos complexos controlados durante o desenvolvimento embrionário, regulados através de genes, nos quais os fatores de transcrição podem ser traduzidos em proteínas estruturais, regulatórias, ou enzimáticas (Werb, *et al.*, 1992). Para uma melhor compreensão do mecanismo que leva às fissuras labiopalatais, é importante que se entenda o desenvolvimento normal das estruturas envolvidas nestas alterações, através da descrição das principais etapas da formação craniofacial embriológica.

Aproximadamente na quarta semana de vida intra-uterina, células originadas da crista neural cranial migram sob a forma de células mesênquimais para os processos embrionários craniofaciais durante o fechamento do tubo neural. Por sua vez, os seguimentos da crista neural migram para os arcos branquiais em desenvolvimento para se tornarem precursores de cartilagem, osso, músculo e tecido conjuntivo do complexo craniofacial (Cobourne, 2004).

Uma série de eventos então se inicia para induzir a formação das cinco proeminências faciais (frontonasal, maxilares e mandibulares bilateralmente), onde a diferenciação, crescimento e possível fusão destas proeminências darão origem à face humana (Cobourne, 2004).

2.1.1 Desenvolvimento do Palato Primário

O palato primário consiste na porção da face que separa as cavidades oral e nasal. Ele compreende parte dos processos nasais mediais e laterais do processo frontonasal e parte dos processos maxilares que contribuem para separação das cavidades nasal e oral (Diewert e Wang, 1992).

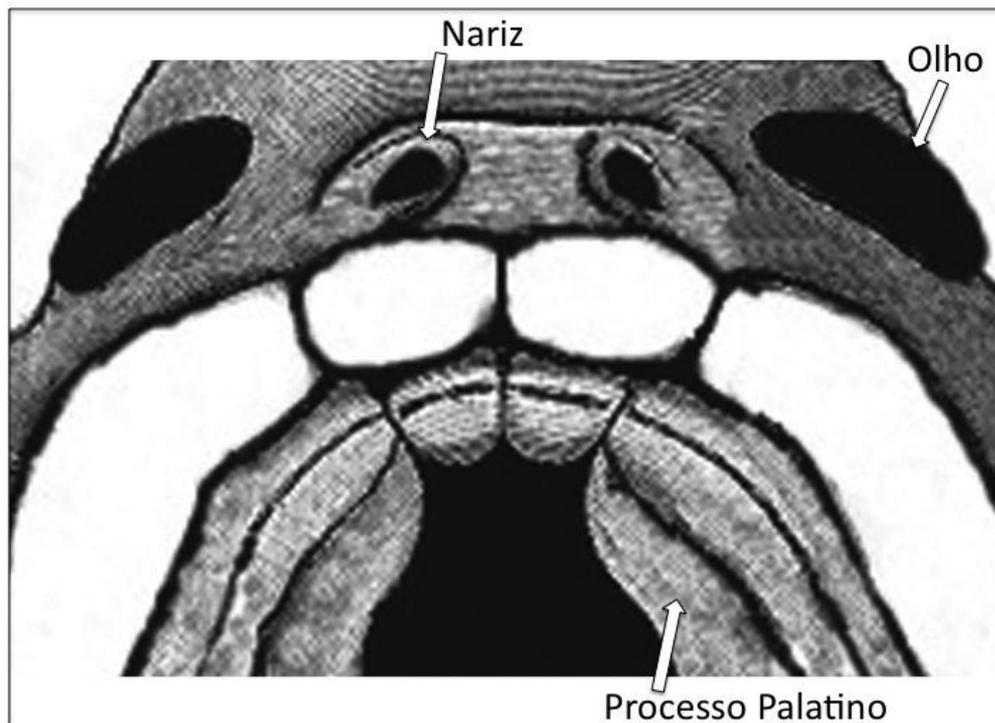
Nesta fase da palatogênese, encontram-se envolvidos inúmeros eventos moleculares e celulares rigidamente controlados. As alterações físicas e biomecânicas associadas ao crescimento e desenvolvimento craniofacial, nos seres humanos, devem ocorrer especificamente durante a quinta e sétima semana de vida intra-uterina . O palato primário inicialmente se forma ao redor das narinas através da rápida proliferação do epitélio lateral e do mesênquima subjacente (Diewert e Wang, 1992).

Em embriões humanos e em modelos animais, conforme ocorre o crescimento das proeminências faciais e ao redor da narina para formar a região pré-maxilar, o crescimento do cérebro e dos componentes craniofaciais alteram a morfologia facial podendo afetar o período, a localização e a extensão do contato entre as proeminências faciais. Ao mesmo tempo o cérebro se eleva, a região nasal medial se estreita e a maxila cresce sagitalmente para encontrar as proeminências nasais mediais e laterais. Então o lábio superior se forma através da fusão das proeminências nasais mediais projetadas a partir da proeminência frontonasal (Diewert e Lozanoff, 1993).

Esta fusão requer um coordenado crescimento das proeminências faciais com a apoptose e/ou diferenciação do epitélio que forma a ponte nasal transitória entre os processos maxilares e frontonasal (Diewert e Wang, 1992).

2.1.2 Desenvolvimento do Palato Secundário

O palato secundário compreende as partes do primórdio facial posterior ao palato primário e inclui dois processos palatinos que se projetam medialmente a partir dos processos maxilares (Diewert e Wang, 1992). O fechamento e fusão do palato secundário requerem a completa interação dos movimentos dos processos palatinos. A figura 1 representa a formação de um embrião nessa fase onde pode-se observar as estruturas craniofaciais em desenvolvimento.



Küchler, E.C.; Costa, M.C.; Vieira, A.R. 2009

Figura 1: Desenvolvimento Craniofacial de um embrião.

Durante a oitava semana de vida intra-uterina, os processos palatinos mudam de uma posição vertical, ao lado da língua, se elevando e assumindo uma posição horizontal para se encontrarem em uma linha média através de desmossomos, formando a bainha epitelial medial que desaparece progressivamente, permitindo a confluência do mesenquima de ambos os processos palatinos. O desaparecimento da bainha medial é um fator importante para a fusão e ossificação dos processos palatinos, que vai do palato secundário até a pré-maxila, durante a oitava semana de vida intra-uterina (Diewert e Wang, 1992; Diewert e Lozanoff, 1993).

Distúrbios em qualquer estágio da palatogênese (crescimento inadequado dos processos palatinos, alterações na elevação dos processos, falhas na fusão, alteração no desaparecimento da bainha epitelial medial, ou ruptura pós-fusão têm sido sugeridos como possíveis causas da fissura de palato (Ferguson, 1987; 1988).

2.2. FISSURA LABIAL COM OU SEM FISSURA PALATINA

As fissuras labiopalatais podem acometer somente o lábio (com ou sem envolvimento do alvéolo dentário) ou somente o palato. Mas na maioria dos casos as fissuras acometem todas essas estruturas concomitantemente (Murray, 2002). Quando as fissuras estão restritas ao palato mole, é caracterizado como fissura incompleta. Além disso, as fissuras podem ser unilaterais ou bilaterais.

Os diferentes tipos de fissuras possuem diferentes origens embriológicas, à saber (Moore, 2005):

- 1) Fissuras de Lábio Isolado (FL): As fissuras do lábio resultam de um desenvolvimento imperfeito do palato embrionário primário.

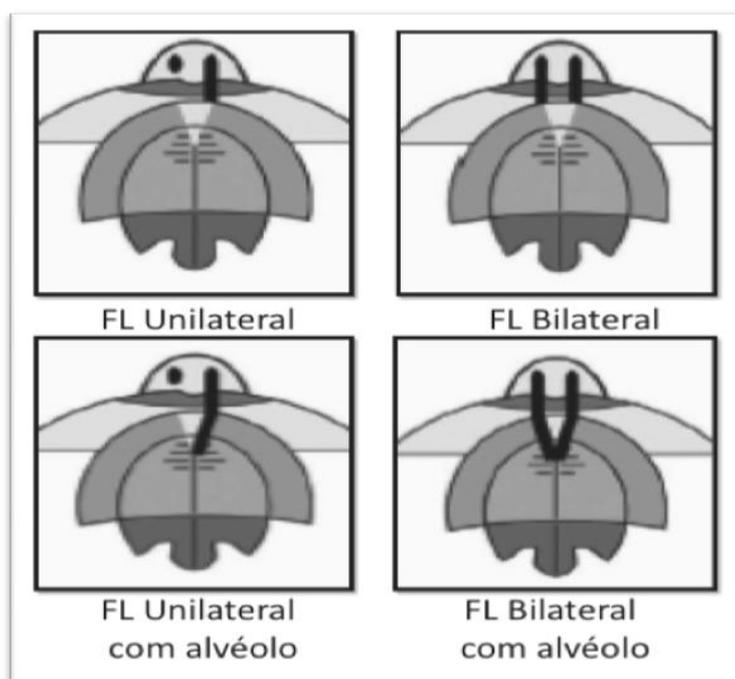


Figura 2: Fissuras Labiais. Fissura labial unilateral e fissura labial bilateral sem o acometimento do alvéolo dentário (imagens superiores). Fissura labial unilateral e fissura labial bilateral com o acometimento do alvéolo dentário (imagens inferiores).

- 2) Fissuras de Lábio com Palato (FLP)- Quando as fissuras labiais se estabelecem, frequentemente, a deformação do desenvolvimento facial impede o contato das cristas palatinas, quando elas giram para a posição horizontal, de tal forma que as fissuras do palato primário são frequentemente acompanhadas pelas do palato secundário (duro e mole).

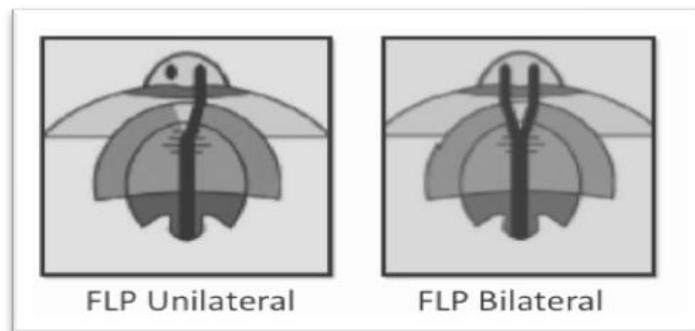


Figura 3: Fissura Labiopalatal unilateral e Fissura Labiopalatal bilateral (respectivamente).

- 3) Fissuras de Palato Isolado (FP): Podem resultar de falhas das cristas palatinas de se contatarem por causa de uma falha no crescimento ou de um distúrbio no mecanismo de elevação das cristas; falha das cristas em se fundirem após o contato ter sido estabelecido devido ao fato do epitélio de revestimento não se romper ou não ser reabsorvido; ruptura após ter ocorrido a fusão das cristas; fusão e consolidação defeituosa do mesênquima das cristas palatinas.

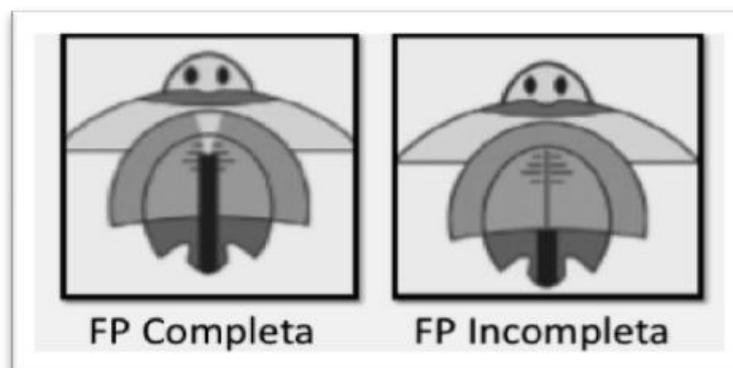


Figura 4: Fissura palatal completa (acometendo os palatos duro e o mole) e fissura palatal incompleta (acometendo apenas o palato mole), respectivamente.

2.3. EPIDEMIOLOGIA DAS FISSURAS LABIOPALATINAS

A FL/P é uma das anomalias mais comuns nos seres humanos, cuja incidência pode variar entre 1:500 a 1:2500 nascimentos. A incidência varia de acordo com a localização geográfica, etnia e condição socioeconômica da população estudada (Murray, 2002). Como pode ser observado nos seguintes exemplos: em índios americanos a incidência é de 3,6:1000, em japoneses é de 2,1:1000, em chineses 1,4:1000 e em caucasianos 0,7-1,3:1000; contudo a frequência entre os negros de 0,3:1000 é menor (Gorlin, 2001).

Como abordado anteriormente, as FL/P são divididas em três grupos principais: fissura labial isolada (FL), fissura labial com fissura palatina (também denominada fissura lábiopalatina (FLP) e fissura palatina isolada (FP). Estudos familiares sugerem que a FL e FLP são malformações genéticas distintas da FP (Natsume, 1987). A incidência relatada para FL e FLP varia de 1:500 a 1:1000 nascimentos dependendo da população. Para FP a incidência relatada é menor, de 1:2500 nascimentos. Em geral, os indivíduos de descendência asiática ou de índios americanos apresentam maior incidência enquanto indivíduos de descendência africana apresentam incidências menores, quando comparados a indivíduos caucasianos (Natsume, 1987).

2.4. ASSOCIAÇÃO ENTRE FL/P E AGENESIAS DENTÁRIAS

Os eventos mais críticos na formação dos dentes, lábios e palato ocorrem quase que concomitantemente. Muitos genes envolvidos no desenvolvimento destes órgãos são os mesmos. O epitélio odontogênico, sobre os processos maxilares e mandibulares, pode ser detectado no início da quinta semana de vida intra-uterina; a FL/P parece ocorrer entre a quarta e a sétima semana. Distúrbios nos processos de proliferação, diferenciação celular e apoptose ocorrido por anormalidades ambientais e/ou genéticas podem predispor às FL/P e às anomalias dentárias (Letra, Menezes *et al.*, 2007).

As alterações do desenvolvimento dentário são anomalias freqüentes em pacientes portadores de FL/P. A prevalência dessas alterações, fora da região da fissura, é mais comum nos pacientes com FL/P quando comparados com a população em geral (Letra, *et al.*, 2007) e em alguns casos a agenesia dentária e a FL/P fazem parte do mesmo componente genético (Vieira, 2003; Vieira, *et al.*, 2007; Vieira, 2008). Estudos recentes relataram uma associação entre *MSX1*, *TGFA*, *PAX9*, *FGFR1* e *IRF6*, genes previamente relacionados à FL/P, com agenesias dentárias isoladas (ausência congênita de um ou mais dentes) (Vieira, *et al.*, 2004; Vieira, *et al.*, 2007). Sabe-se ainda que a presença de anomalias dentárias pode representar um marcador clínico adicional para fissuras orais, uma vez que ambas as condições seriam parte do mesmo componente genético (Vieira, 2003; Letra *et al.*, 2007).

Dentre as anomalias do desenvolvimento dentário, as agenesias destacam-se por serem as mais frequentemente observadas nos portadores de FL/P (Slayton *et al.*, 2003; Letra *et al.*, 2007). Em alguns casos as agenesias de incisivos laterais na região contra-lateral à fissura podem representar formas incompletas de fissuras bilaterais de lábio. Além disso, genes que contribuem para a lateralidade da fissura poderiam resultar em fenótipos alternados para anomalias dentárias (Letra *et al.*, 2007).

2.5. DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO E SUBFENÓTIPO

A identificação da etiologia genética de uma determinada condição começa com a identificação do fenótipo. A maioria dos estudos genéticos refere-se aos fenótipos das fissuras como: FL; FLP e FP. No entanto, diferenças na etiologia ou epidemiologia de tais alterações podem permanecer obscuras devido à alta variabilidade do fenótipo. Evidências recentes demonstraram que o fenótipo das FL/P pode ser mais complexo do que se presume, podendo ser caracterizado por uma variedade de marcadores clínicos associados, os quais auxiliariam numa busca mais precisa da etiologia genética dessas anomalias (Vieira, 2003; Letra, *et al.*, 2007). Neste contexto, a descrição detalhada das características clínicas das fissuras (lado e

gravidade) e as alterações do desenvolvimento craniofacial associadas às fissuras (tipos de anomalias dentárias, grupamento dentário afetado e número de elementos dentários envolvidos) permitem a identificação de subfenótipos, o que possibilita uma análise das diferentes alterações fenotípicas (subfenótipos) associadas aos resultados moleculares.

2.6. ETIOLOGIA DA FISSURA LABIOPALATAL

2.6.1. Fatores Ambientais

A etiologia das FL/P é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais (Murray, 1995). Dentre os fatores ambientais destacam-se o déficit nutricional, uso de inseticidas, consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo durante a gestação (Murray, 2002). Observou-se ainda um efeito teratogênico potencial no uso de certas drogas, como antibióticos e antiinflamatórios.

Em uma meta-análise realizada com 24 estudos foi observado um aumento no risco para FL/P de 1,34 (IC 95%=1,25-1,44) e de 1,22 (IC 95%=1,10-1,35) para FP respectivamente, devido ao tabagismo materno durante a gestação. Os autores caracterizaram a associação como leve, porém, estatisticamente significativa (Little, 2004).

Estudos anteriores sobre a possível associação entre o consumo de álcool durante a gestação e os riscos FL/P têm sido inconsistentes. Lorente et al. (2000) identificou um risco aumentado para FP, mas não para FLP, entre as mães que ingeriram álcool durante o primeiro trimestre da gravidez. Este aumento no risco, no entanto, não foi relacionado a quantidade ingerida. Por outro lado, Spilson *et. al.* (2001) constataram que o uso de álcool durante a gravidez entre foi ligeiramente mais frequente no grupo portador de FL/P do que entre o grupo controle.

2.6.2. Genes Candidatos e Polimorfismo Genético

A maioria das anomalias craniofaciais não possuem características monogênicas. Normalmente apresentam penetrância incompleta, isto é, ausência de expressão fenotípica em uma porcentagem de indivíduos que apresentam um dado genótipo. A variação na penetrância pode ser ocasionada por vários motivos, em especial pela interação do gene em questão com outros genes e pela influência ambiental.

Genes candidatos as FL/P foram sugeridos através de estudos da embriogênese (palatogênese) de modelos animais (Young *et al.*, 2000), alterações cromossômicas e estudos de ligação com famílias (Murray, 2002).

Os polimorfismos de um único nucleotídeo, também conhecidos como SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), são formas variantes da seqüência de DNA que podem estar presentes nos indivíduos de uma mesma população dentro de um espectro biologicamente normal. Referem-se à existência de dois ou mais alelos em um dado *locus*, com uma freqüência alélica maior do que 1% na população (Kornman *et al.*, 1997).

Genes que potencialmente representam um papel na etiologia de uma determinada alteração de desenvolvimento, alteração no quadro fisiológico ou patológico são determinados como candidatos a esta alteração. A hipótese de que a forma variante pode estar associada à função alterada de um gene e possa estar envolvido com a ocorrência da FL/P pode ser analisado através das freqüências desses polimorfismos.

2.6.3. Estudos genéticos das Fissuras Labiopalatais

Inúmeros estudos têm demonstrado a relação entre variações genéticas e a presença de FL/P, dentre elas, destacam-se: *PAX9* (Ichikawa, *et al.*, 2006); *TGFA* (Lidral, *et al.*, 1997), 1989), *TGFB3* (Lidral, *et al.*, 1997; Ichikawa, Watanabe *et al.*, 2006), *MSX1* (Lidral, *et al.*, 1997; Suzuki, *et al.*, 2004), *FGFs* (Menezes, *et al.*, 2008), *MMP3* (Letra *et al.*, 2007), *WNT3* (Menezes 2010), *IRF6* (Zuccherro *et al.*, 2004; Blanton *et al.*, 2005), *AXIN2* e *CDH1* (Letra *et al.*, 2008).

2.6.3.a. *AXIN2* (Axis inhibition 2)

A proteína *AXIN2* atua no desenvolvimento embriológico e organogênese desempenhando um papel fundamental na regulação e estabilidade de beta-catenina, na via de sinalização de Wnt. As Wnts são proteínas sinalizadoras, que atuam em um complexo sistema de comunicação que coordena as atividades e funções celulares (regulando o crescimento celular, motilidade e diferenciação), influenciando assim em múltiplos processos no desenvolvimento (Giles *et al.*, 2003).

O gene *AXIN2* está localizado no cromossomo 17q24. Mutações em *AXIN2* foram relacionadas com câncer colorectal (Lammi *et al.*, 2004). Um estudo demonstrou que em uma família finlandesa, agenesias dentárias (oligodontia) e câncer colorectal segregavam em um padrão de herança dominante por 4 gerações (Lammi *et al.*, 2004).

Além disso, polimorfismos no gene *AXIN2* têm sido associados a diversas condições. Dentre elas destacam-se: câncer de mama (Wang *et al.*, 2008); câncer pulmonar (Kanzaki *et al.*, 2006), câncer de ovário (Notaridou, Quaye *et al.*), agenesia dentária (Callahan *et al.*, 2009) e FL/P com e sem agenesias dentárias (Letra *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2009).

Em um estudo recente com famílias caucasianas que apresentavam membros portadores de FL/P, foi observado um risco aumentado de suscetibilidade ao câncer nessas famílias, quando comparadas com famílias controles, isto é, sem indivíduos portadores de FL/P. As associações foram mais comuns com os seguintes tumores: câncer de cólon ($p=0,0009$); câncer de cérebro ($p=0,003$), leucemia ($p=0,005$), câncer de mama ($p=0,009$), câncer de próstata ($p=0,01$), câncer de pele ($p=0,01$), câncer de pulmão ($p=0,02$) e câncer de fígado ($p=0,02$). Nas famílias em que segregavam a FL/P, foi realizada a genotipagem de *AXIN2* e foi observou-se um desequilíbrio de transmissão (Menezes *et al.*, 2009).

O marcador (rs2240308) é caracterizado por uma mudança na codificação do gene *AXIN2* (P50S: prolina para serina na posição 50). Este polimorfismo foi associado à FL/P (Letra *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2009) e a

agenesia dentária (Callahan *et al.*, 2009).

Os estudos com modelos animais têm demonstrado que Wnt é essencial para um adequado desenvolvimento craniofacial (Logan e Nusse, 2004) e que mutações em *Wnt* resultam em FL/P (Juriloff *et al.*, 2006).

A confirmação de que supostos genes poderiam predispor a um aumento da susceptibilidade a defeitos craniofaciais pode ajudar a entender o desenvolvimento molecular dos lábios, do palato, da maxila e dos dentes, além de possibilitar uma maior precisão na determinação do risco de ocorrência de alguns desses defeitos (Vieira e Orioli, 2001).

Neste contexto, polimorfismos no gene *AXIN2* são candidatos ao estudo da etiologia da FL/P.

2.6.3.b. *IRF6* (Interferon Regulatory Factor)

Diversas das síndromes apresentam FL/P como parte do seu quadro fenotípico. Assim, síndromes que envolvam FL/P podem servir de modelos para o estudo da etiologia das formas mais comuns, isto é, a FL/P isolada (Vieira, 2008). A síndrome de Van der Woude (SVW) tem sido considerada um modelo interessante, pois os defeitos relacionados a ela estão confinados às estruturas craniofaciais. Esta síndrome caracteriza-se pela presença de fenda labial ou palatina e sulcos (duas fossetas) características no lábio inferior e, frequentemente, a agenesia dentária também é observada (Kondo *et al.*, 2002).

A SVW é uma condição autossômica dominante que afeta 1 em cada 100-200 mil indivíduos. Aproximadamente, 1 a 2% dos indivíduos com FL/P são portadores dessa síndrome e a única característica que os distingue são as fossetas no lábio inferior (Kondo *et al.*, 2002). A SVW pode ser causada por mutações em *IRF6* (Matsuzawa *et al.*, 2004; Paranaíba *et al.*, 2008). Análises de ligação confirmaram este *locus* cromossômico como o sítio do gene para a doença (Schutte e Murray, 1999).

Os interferons são citocinas que foram originalmente descobertas no contexto de resposta imune contra infecções virais, mas também regulam o

crescimento celular e a diferenciação (De Maeyer-Guignard, Marcucci *et al.*, 1988). A proteína IRF6 pertence a uma família de nove fatores de transcrição que apresentam um domínio de ligação com o DNA altamente conservado e um domínio de ligação com proteínas pouco conservado (Kondo *et al.*, 2002). A maioria dos IRFs regula a expressão de interferon após uma infecção viral (Taniguchi *et al.*, 2001), entretanto a função do IRF6 ainda é desconhecida.

Análises de expressão desse gene em camundongos demonstraram elevados níveis de RNA mensageiro do *Irf6*, ao longo do bordo mediano dos processos palatinos durante a fusão do palato, nos germes dentários, folículos capilares e pele, sugerindo que a haploinsuficiência do IRF6 é o mecanismo que causa os distúrbios no desenvolvimento orofacial (Kondo *et al.*, 2002).

A partir de um estudo baseado em um par de gêmeos monozigóticos discordantes para o fenótipo da SVW e pais não afetados pela condição, foram identificadas mutações em *IRF6* como envolvidas com a SVW. A hipótese de que uma diferença na seqüência genômica entre os gêmeos poderia ser resultante de uma mutação somática encontrada somente no indivíduo afetado levou a identificação da mutação no exon 4 do *IRF6* do gêmeo afetado, a qual não estava presente no irmão não afetado ou nos pais (Kondo *et al.*, 2002).

Outras mutações em *IRF6* foram posteriormente identificadas em 45 famílias não-aparentadas afetadas pela Síndrome de Van der Woude e em outras 13 portadoras da síndrome do Popliteal Pterigium (Kondo *et al.*, 2002).

Além disso, variações no gene *IRF6* têm sido associadas à FL/P em diversas populações (Zuccherro *et al.*, 2004; Blanton *et al.*, 2005; Ghassibe *et al.*, 2005; Scapoli *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007) e às agenesias dentárias isoladas (Vieira *et al.*, 2007; Vieira, Seymen *et al.*, 2008).

Portanto, baseando-se no padrão de expressão do *IRF6* e nas características fenotípicas da SVW, e nos resultados obtidos em outras populações, esse gene é um candidato interessante para FL/P isolada (Vieira, 2008).

Desta forma, a confirmação do envolvimento de *IRF6* com FL/P na população brasileira é deve ser considerada de suma importância para uma

avaliação mais precisa dos genes candidatos à esta anomalia e seus subfenótipos.

3. HIPÓTESE

Polimorfismos nos genes *AXIN2* e *IRF6* estão envolvidos com a etiologia da FL/P e seus subfenótipos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a associação entre variações genéticas de genes expressos no desenvolvimento craniofacial e FL/P.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os subfenótipos de FL/P na população estudada;
- Verificar a existência de associação entre polimorfismos nos genes *AXIN2* e *IRF6* com a FL/P e seus subfenótipos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. UNIVERSO AMOSTRAL

A amostra foi constituída de 473 indivíduos divididos em dois grupos: casos (portadores de FL/P) e controles (indivíduos não relacionados, com ausência de FL/P e ausência de história familiar).

A amostra do grupo de casos foi constituída de 246 indivíduos portadores de FL/P atendidos no Hospital Municipal Nossa Senhora do Loreto (HMNSL), na cidade do Rio de Janeiro.

A amostra do grupo controle foi constituído de funcionários e pacientes atendidos no Programa de Treinamento-Teórico Prático em Odontopediatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro (PTTPO/UFRJ).

Ambas as Instituições estão localizadas na mesma região do município do Rio de Janeiro.

Para todos os indivíduos foram preenchidas fichas com anamnese e exame clínico (Anexo 3) para avaliação dos seguintes parâmetros: Dados clínicos (alterações faciais e dentárias), dados sobre o histórico de saúde dos pacientes e familiares e dados ambientais dos pacientes e seus familiares.

De acordo com o critério de exclusão deste estudo, os pacientes portadores de alguma síndrome não foram incluídos nem no grupo caso e nem no grupo controle. Além disso, pacientes portadores anomalia dentária não foram incluídos no grupo controle.

Todos os pacientes e seus responsáveis foram informados sobre o projeto de pesquisa e incluídos no mesmo após ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

5.2. DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO E SUBFENÓTIPO

A determinação do tipo de fissura foi baseada no exame clínico e confirmada com a descrição existente no prontuário clínico do hospital.

O tipo de fissura foi determinado de acordo com a lateralidade (esquerdo, direito e bilateral), como completa (quando acometia o palato duro e o palato mole) e incompleta (quando acometia apenas o palato mole).

A classificação usada, quanto aos tipos de fissura, está descrita abaixo:

- Fissura de lábio (com ou sem envolvimento do alvéolo dentário)- FL;
- Fissura labiopalatal- FLP;
- Fissura de palato isolada- FP
- Fissura de lábio com ou sem fissura de palato (excluindo a FP)- FL±P.
- Fissura de lábio e/ou palato (todos os tipos de fissuras)- FL/P

A presença de agenesia dentária foi considerada quando pelo menos um dente permanente estava congenitamente ausente (excluindo os terceiros molares). Agenesias dentárias dentro da região da fissura não foram consideradas (incisivos centrais, incisivos laterais e caninos), porque a ausência desses dentes pode ser decorrente de uma alteração da área afetada ou das cirurgias reparadoras (queiloplastia, rinoplastia e palatoplastia) que normalmente ocorrem nessa região. Desta forma, agenesias dentárias adjacentes à área de fissura (incisivo central superior, incisivo lateral superior e canino superior) não foram consideradas neste estudo.

5.3 INFORMAÇÕES DA ANAMNESE

Foram avaliados, por meio de questionário, os dados ambientais relacionados à FL/P, como: história positiva de FL/P na família; idade do paciente; história positiva de diagnóstico de câncer no paciente ou em algum

familiar de primeiro ou segundo grau de parentesco; história de tabagismo e/ou uso de substâncias alcoólicas (materna) durante a gestação e uso de medicamentos e/ou substâncias teratogênicas durante a gestação.

5.4. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de saliva foram coletadas de todos os indivíduos como fonte de DNA genômico seguindo protocolos previamente publicados (Trevilatto e Line, 2000).

Os pacientes realizaram um bochecho com 5mL de solução salina durante 1 minuto, após o qual todo o volume do bochecho foi acondicionado em tubos para centrífuga de 15 mL (Corning Inc., Corning, NY, EUA).

Cada tubo contendo a coleta de células foi então centrifugado a 550 g durante 10 minutos para sedimentação do *pellet* de células. O *pellet* foi ressuspenso em 1mL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM, pH 7.8; EDTA 5mM; SDS 0.5%). Posteriormente, o material biológico foi transferido para um tubo *ependorf* de 1,5mL e então congelado a -20° C até o momento da extração do DNA.

5.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Previamente à extração do DNA, as amostras foram descongeladas e incubadas com 100ng/mL [4µL de Proteinase K (Fungal, Invitrogen Laboratories, Cat nº25530-015) à 25mg/mL] em banho-maria a 56° C overnight e então submetidas a processos de precipitação utilizando-se 400µL de solução de acetato de amônio a 10M.

A seguir, todos os tubos foram: agitados manualmente por 5 minutos; centrifugados por 15 minutos (12000 rpm) e o sobrenadante dividido em dois tubos *ependorf* de 700µL do sobrenadante. Então o mesmo volume de álcool isopropílico gelado (700µL) foi adicionado em cada espécime e agitado vigorosamente.

Todas as alíquotas que foram centrifugadas por 20 minutos com 12000rpm à 40°C (Centrífuga Eppendorf 5403).

O sobrenadante foi descartado e 1mL de etanol 70% gelado foi adicionado. Os tubos foram novamente centrifugado por 15 minutos com 12000rpm à 40°C (Centrífuga Eppendorf 5403).

Após a evaporação do álcool, o pellet de DNA foi ressuspenso em 50µL de TE e congelado a -20°C até o momento da quantificação do DNA e da genotipagem.

5.6 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE E DA PUREZA DO DNA

A concentração e a pureza do DNA foram determinados por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) (Figura 5) utilizando-se 2 µL do material extraído.

A concentração de DNA foi avaliada em um comprimento de onda de 260nm. A razão entre os valores obtidos nos comprimentos de onda 260nm e 280nm foi usada para estimar a pureza do DNA genômico. Somente as amostras de DNA com razão 260/280 acima de 1,7 foram incluídas neste estudo.



Figura 5: Espectrofotômetro (NanoDrop®2000c) utilizado para avaliar concentração e pureza do DNA extraído.

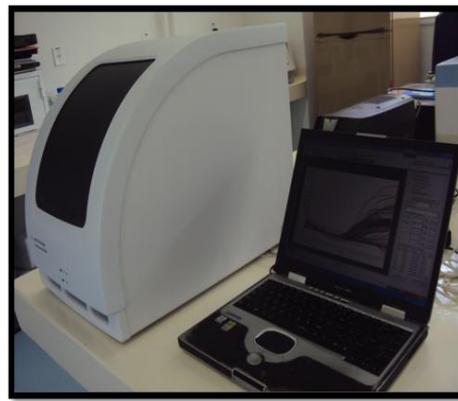


Figura 6: Equipamento de PCR em Tempo Real (Stratagene Mx3005P)

5.7. GENOTIPAGEM

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um termociclador (Stratagene Mx3005P) (Figura 6). O método utilizado para as reações foi o de Taqman (Ranade *et al.*, 2001), onde são utilizadas sondas específicas para a distinção alélica (sondas TaqMan). As curvas obtidas e o *plot* observado na obtenção dos genótipos de um determinado polimorfismo estão representados nas figuras 7 e 8.

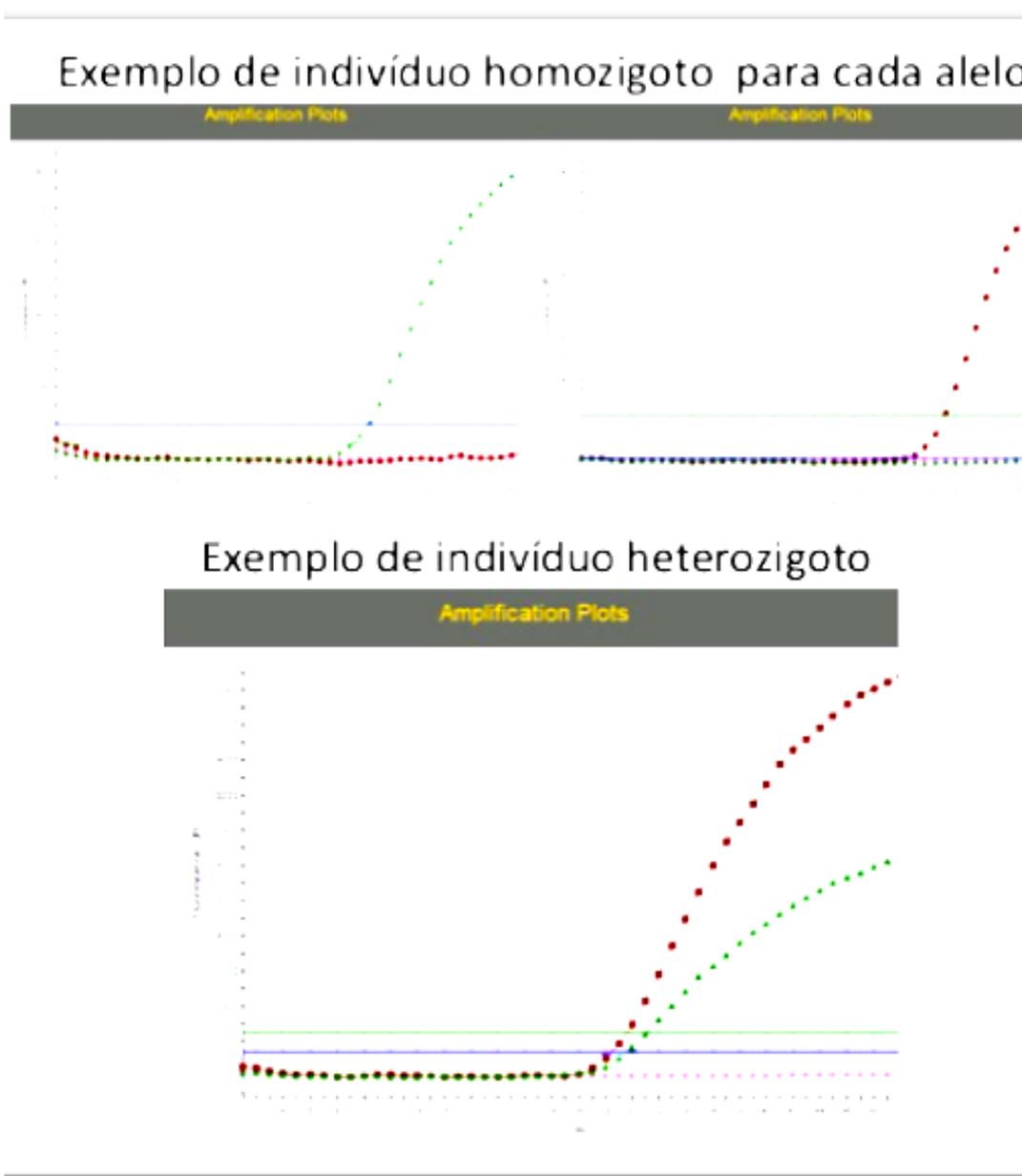


Figura 7: Exemplos de genótipos homocigotos e heterocigotos pelo método Taqman.

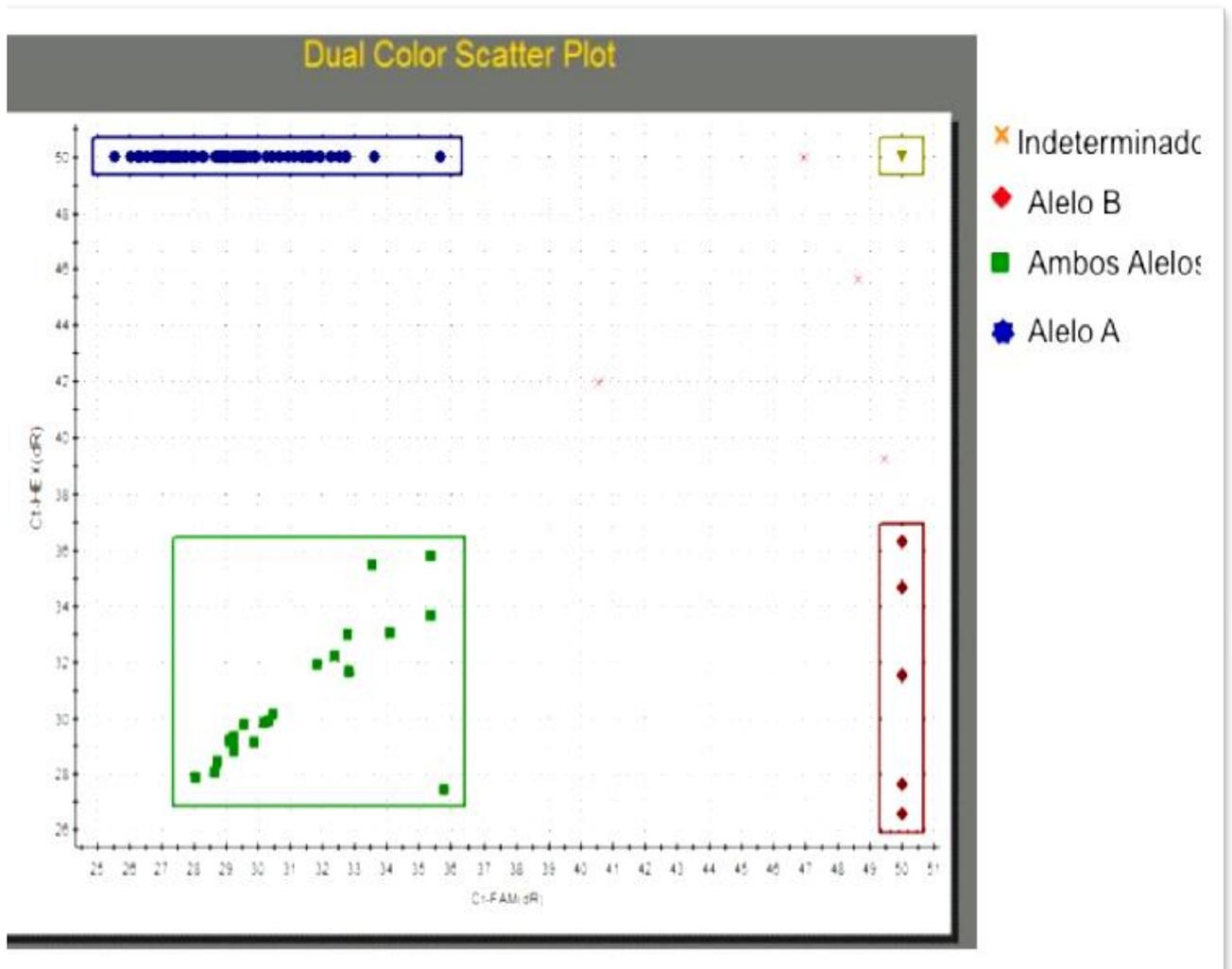


Figura 8: Resultados obtidos pelo método Taqman para o polimorfismo rs642961 (IRF6). Indivíduos Homozigotos para cada alelo estão representados nas cores vermelha e azul e os indivíduos heterozigotos estão representados pela cor verde.

A reação foi realizada contendo volume final de 3ul contendo 4ng de DNA/reação, 1,5ul de Taqman PCR master mix, 0,075 de SNP assay-by-Design (Applied Biosystems-Foster City, CA) e água deionizada q.s.p.

As informações adicionais sobre os polimorfismos estudados estão na tabela 1.

Tabela 1: Condições experimentais para as reações realizadas.

<i>GENE</i>	<i>SNP</i>	<i>TROCA DE BASE</i>	<i>CONDIÇÃO DE PCR</i>
AXIN2	rs2240308	G/A	95C° 10 min. (1 ciclo)
	rs740026	G/A	92C° 15 seg., 60C
IRF6	rs642961	G/A	1 min. (40 ciclos)

5.8. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram tabulados no Programa Excel 8.0 e analisados no programa Epi Info3.3.2. O grupo caso foi analisado como um grupo total e como subgrupos (subfenótipos). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado utilizando o teste do qui-quadrado. O cálculo da razão de chance e os testes do qui-quadrado e exato de Fisher foram usados em nível de significância de 0,05 para determinar se algum subgrupo de FL/P estava preferencialmente associado com os genótipos e alelos de cada gene.

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Duzentos e quarenta e seis indivíduos portadores de FL/P e 227 pacientes controles foram analisadas nesse estudo. Nenhum paciente/responsável relatou o uso ou a exposição à alguma substância potencialmente teratogênica como pesticidas e herbicidas.

A FLP foi o tipo de fissura mais comum, e foi diagnosticada em 172 indivíduos; seguida pela FL que foi diagnosticada em 42 indivíduos e a FP que foi diagnosticada em 32 indivíduos. A distribuição dos tipos de fissura encontra-se na Figura 9.

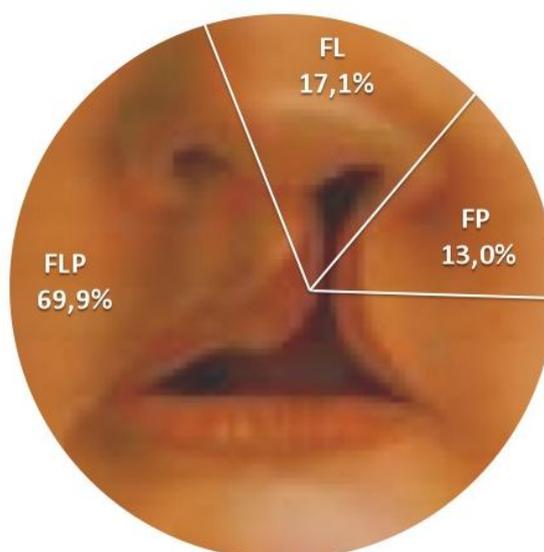


Figura 9: Frequência relativa dos tipos de fissuras.

A idade dos indivíduos portadores de FL/P variou de 1 a 60 anos de idade e a média foi de 17,9 anos com desvio padrão de 10,6 anos. Já no grupo caso a idade variou de 4 a 77 anos e a média de 18,3 anos com desvio padrão 16,3. Não houve diferença entre os grupos ($p=0,7$).

Tabela 2: Características da população estudada.

Características	Caso (n=246)		Controle (n=227)		p#
	FA	FR	FA	FR	
Gênero					
Feminino	115	46,7%	114	50,2%	0,45*
Masculino	131	53,3%	113	49,8%	
Etnia					
Caucasiano	151	61,1%	140	61,8%	0,93*
Negro	34	13,8%	29	12,7%	
Mulato	61	24,9%	58	25,4%	
História de tabagismo materno na gestação**					
Sim	45	18,3%	27	11,9%	0,06*
Não	201	81,7%	197	86,8%	
Não responderam	-	-	3	1,3%	
História de consumo materno de álcool na gestação**					
Sim	23	9,3%	18	7,9%	0,61*
Não	222	90,2%	205	90,3%	
Não responderam	1	0,5%	4	1,8%	
História Positiva de Câncer na Família**					
Sim	56	22,8%	65	28,6%	0,14*
Não	190	77,2%	162	71,4%	
FA- Frequência Absoluta; FR- Frequência Relativa #p-valor; *teste do Qui-quadrado; **teste do qui-quadrado; *** Apenas os que souberam responder foram incluídos na análise.					

No grupo portador de FL/P, 115 indivíduos eram do gênero feminino e 131 indivíduos eram do gênero masculino. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o tipo de fissura e o gênero. A FL±P afetou mais o gênero masculino enquanto a FP afetou mais o gênero feminino ($p < 0,0001$).

As frequências das fissuras unilaterais e das fissuras bilaterais foram diferentes no grupo com FL e no grupo com FLP. No grupo com FL as fissuras

unilaterais afetaram 90,4% dos indivíduos enquanto no grupo com FLP 66,3% dos indivíduos apresentavam fissuras unilaterais ($p=0,002$). A prevalência de agenesia dentária nos indivíduos portadores de FL/P foi de 15,4%($n=38$).

As características da amostra estratificadas pelos tipos de fissura estão na tabela 3.

Tabela 3. Características do grupo de portadores de FL/P.

Característica	FL (n=42; 17,1%)		FLP (n=172; 69,9%)		FP (n=32; 13,0%)	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR
Gênero						
Feminino	21	50%	67	39%	27	84,4%
Masculino	21	50%	105	61%	5	15,6%
Lado						
Bilateral	4	9,5%	58	33,7%	-	-
Esquerdo	24	57,1%	77	44,8%	-	-
direito	14	33,3%	37	21,5%	-	-
Agnesia dentária Associada						
Agnesia dentária	6	14,3%	26	15,1%	6	18,8%
Agnesia de incisivo*	2	4,8%	14	8,1%	3	9,4%
Agnesia de pré-molar	4	9,5%	14	8,1%	2	6,3%
Histórico Familiar						
História de FLP	11	26,2%	44	25,6%	4	12,5%
História de câncer	10	23,8%	36	20,9%	10	31,3%
Fumo**	3	7,1%	35	20,3%	7	21,9%
Álcool **	6	14,3%	14	8,1%	3	9,7%

FA- Frequência Absoluta; FR- Frequência Relativa
***Incisivos laterais superiores; **História de consumo materno durante a gestação**

Fumo durante a gestação esteve envolvido com o aumento do risco pra FL/P apenas no grupo portador de FLP ($p=0,02$; OR=1,86; IC 95% 1,04-3,34).

O tipo de câncer mais comum foi o câncer de mama seguido pelo câncer de útero. Nenhum dos grupos apresentou risco aumentado pra nenhum tipo de câncer. Nenhum dos indivíduos apresentou diagnóstico de câncer antes ou durante o estudo. A distribuição dos tipos de câncer nas famílias dos indivíduos estudados está demonstrada na tabela 4.

Tabela 4: Tipo de câncer nas famílias dos indivíduos no grupo caso e no grupo controle.

Tipo de câncer	Caso		Controle		OR(95% IC)*
	FA	FR	FA	FR	
Cabeça e pescoço	2	0,8%	2	0,9%	0,92(0,12-6,60)
Estomago	1	0,4%	7	3,1%	0,12(0,01-1,05)
Fígado	1	0,4%	6	2,6%	0,15(0,02-1,25)
Garganta	4	1,6%	2	0,9%	1,85(0,33-10,2)
Intestino	1	0,4%	6	2,6%	0,15(0,02-1,25)
Leucemia	2	0,8%	1	0,4%	1,85(0,16-20,5)
Mama	14	5,7%	8	3,5%	1,65(0,68-4,01)
Pâncreas	1	0,4%	2	0,9%	0,45(0,04-5,09)
Pele	4	1,6%	3	1,3%	1,23(0,27-5,57)
Próstata	4	1,6%	3	1,3%	1,23(0,27-5,57)
Pulmão	3	1,2%	8	3,5%	0,33(0,08-1,29)
Rins	2	0,8%	1	0,4%	1,85(0,16-20,5)
Útero	6	2,4%	9	4,0%	0,60(0,21-1,72)
Outros**	-	-	5	2,2%	-
Não Sabe	15	6,1%	9	4,0%	-

FA- Frequência Absoluta; FR- Frequência Relativa
***OR-Odds Ratio (Razão de Chance); IC-Intervalo de Confiança.**
****Outros representam: Baço, bexiga, faringe, laringe e ovário.**

6.2. ESTUDOS GENÉTICOS DE ASSOCIAÇÃO COM FL/P

Todos os genes analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

6.2.1. *AXIN2* (rs2240308)

A distribuição dos genótipos foi similar entre o grupo caso (todos os tipos de fissura) e o grupo controle. O genótipo AA foi encontrado em 12,2% (n=29) do grupo caso e em 14,2% (n=31) do grupo controle. O genótipo AG foi encontrado em 51,1% (n=121) do grupo caso e em 48,4% (n=106) do grupo controle. O genótipo GG foi encontrado em 36,7% (n=87) do grupo caso e em 37,4% (n=82) do grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,78$).

A frequência dos alelos também foi similar em ambos os grupos ($p=0,85$). A distribuição dos alelos e genótipos pelos tipos (fenótipos) e subfenótipos de FL/P estão apresentados na tabela 5.

Determinados subfenótipos de FL/P demonstraram estar associados com *AXIN2*. No grupo de pacientes que apresentavam FL/P associada com algum tipo de agenesia dentária (quando comparado com grupo controle), o alelo A esteve associado com um aumento do risco pra esse subfenótipo ($p=0,03$; OR=1,9; IC 95%= 1,1-3,2). Neste grupo, o genótipo AA estava presente em 27% dos indivíduos (OR=2,6; IC=1,0-6,7). Ainda no grupo de pacientes com FL/P associada com agenesia dentária, foi possível observar que quando o dente ausente era pelo menos 1 incisivo lateral superior, o genótipo AA esteve presente em 33% dos casos ($p=0,04$; OR=2,2; IC 95%=1,1-4,7).

Tabela 5: Associação do gene AXIN2 (marcador rs2240308) com os fenótipos e subfenótipos da FL/P.

Grupos	Alelos n(%)			Genótipos n(%)		
	AXIN2 (marcador rs2240308)					
	A	G	P*	AA+AG	GG	P*
Controle	168(38,3%)	270(61,7%)	-	137(62,6%)	82(37,4%)	-
Fenótipo						
FL/P	179(37,8%)	295(62,2%)	0,85	150(63,3%)	87(36,7%)	0,87
FL	32(39,1%)	50 (60,9%)	0,90	28(68,3%)	13(31,7%)	0,48
FLP	127(38,2%)	205(61,8%)	0,97	104(62,7%)	62(37,3%)	0,98
FP	20(33,3%)	40(66,7%)	0,86	18(60,0%)	12(40,0%)	0,91
Subfenótipo						
FL±P Bilateral	36(30,5%)	82(69,5%)	0,11	30(50,9%)	29(49,1%)	0,10
FL±P Esquerda	84(42,4%)	114(57,6%)	0,33	72(72,7%)	27(27,3%)	0,07
FL±P Direita	40(39,2%)	62(60,8%)	0,80	42(60,8%)	20(39,2%)	0,45
Agenesia [#]	40(54,0%)	34(46,0%)	0,01	30(81,1%)	7(18,9%)	0,03
Agenesia de incisivo [#]	21(41,7%)	15(58,3%)	0,02	15(83,3%)	3(16,7%)	0,08
Agenesia de pré- molar [#]	18(45%)	22(55%)	0,40	14(70,0%)	6(30,0%)	0,50

O grupo controle foi usado como referencia; *p-valor; teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi usado; [#]Representam casos de FL/P associado.

Quando avaliado o grupo FL±P, (isto é, excluindo as fissuras de palato), associadas com agenesia dentária, o alelo A esteve presente em 56,3% dos casos e esteve significativamente envolvido com o risco pra este subfenótipo ($p=0,006$; $OR=2,1$; $IC\ 95\%=1,2-3,6$). Na distribuição do fenótipo, pode-se observar que o genótipo AA em 31,3% ($n=10$), o genótipo AG em 50% ($n=16$) e o genótipo GG em 18,8% ($n=6$) dos pacientes. Houve diferença entre a frequência nos genótipos deste grupo, quando comparados ao grupo controle ($p=0,02$).

No grupo de indivíduos que relataram tabagismo materno durante gestação, não houve diferença estatística entre os grupos caso e controle na distribuição dos alelos ($p=0,72$), nem na distribuição dos genótipos ($p=0,78$).

Indivíduos com FL/P e com história positiva de FL/P na família não apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo controle pra distribuição do alelo e do genótipo ($p=0,49$ e $p=0,40$; respectivamente).

Indivíduos com FL/P e com história de câncer na família não apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo controle pra distribuição do alelo e do genótipo ($p=0,66$ e $p=0,57$; respectivamente). Quando comparados pacientes com e sem história de câncer na família, também não foi observada diferença entre a frequência dos alelos e genótipos entre os grupos ($p=0,64$; $p=0,12$; respectivamente).

6.2.2. *AXIN2* (rs740026)

A distribuição dos alelos e a dos genótipos do gene *AXIN2* (rs740026) encontram-se na tabela 6. No grupo caso (todos os tipo de fissura) o genótipo AA foi encontrado em 3,8% (n=7); o genótipo AG em 53,8% (n=98) e o genótipo GG foi encontrado em 42,3% (n=77). No grupo controle, o genótipo AA foi encontrado em 4% (n=5); o genótipo AG em 56,3% (n=71) e o genótipo GG foi encontrado em 39,7% (n=50). Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p=0,89$).

No grupo de indivíduos com FL±P, (isto é, excluindo as fissuras de palato), que apresentavam alguma agenesia dentária associada o alelo A estava presente em 46,2% e apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle ($p=0,05$). O genótipo AA estava presente em 15,4% (n=4), o genótipo AG em 61,5% (n=16) e o genótipo GG em 23,1% (n=6) dos casos, apresentando diferença significativa comparado com o grupo controle ($p=0,002$).

No grupo de indivíduos que relataram tabagismo materno durante a gestação, não houve diferença significativa das frequências dos alelos e genótipos entre o grupo caso e o grupo controle ($p=0,90$, $p=0,78$; respectivamente).

Indivíduos com FL/P e história positiva de FL/P na família não apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo controle pra distribuição dos alelos e dos genótipos ($p=0,59$ e $p=0,43$; respectivamente).

Indivíduos com FL/P e história de câncer na família não apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo controle pra distribuição dos alelos e dos genótipos ($p=0,85$ e $p=0,97$; respectivamente). Quando comparados pacientes com e sem história de câncer na família, também não foi observada diferença entre a frequência dos alelos e dos genótipos entre os grupos ($p=0,79$; $p=0,72$; respectivamente).

Tabela 6: Associação do gene AXIN2 (marcador rs740026) com os fenótipos e subfenótipos da FL/P.

Grupos	Alelos n(%)			Genótipos n(%)		
	AXIN2 (marcador rs740026)					
	A	G	P*	AA+AG	GG	P*
Controles	81(32,1%)	171(67,9%)	-	76(60,3%)	50(39,7%)	-
Tipo de Fissura						
FL/P	112(30,8%)	252(69,2%)	0,71	105(57,7%)	77 (42,3%)	0,64
FL	22(31,4%)	48(68,6%)	0,90	19(54,3%)	16(45,7%)	0,52
FLP	78(31,4%)	170(68,6%)	0,86	74(59,7%)	50(40,3%)	0,78
FP	12(26,7%)	33(73,3%)	0,46	12(52,2%)	11(47,8%)	0,46
Subfenótipo						
FL±P Bilateral	21(24,4%)	65(75,6%)	0,17	21(48,8%)	22(51,2%)	0,18
FL±P Esquerda	54(36,5%)	94(63,5%)	0,37	49(66,2%)	25(33,8%)	0,40
FL±P Direita	25(53,9%)	61(46,1%)	0,59	23(53,5%)	20(46,5%)	0,43
Agenesia dentária [#]	26(43,3%)	34(56,7%)	0,10	26(76,5%)	89(23,5%)	0,08
Agenesia de incisivo [#]	10(41,7%)	14(58,3%)	0,34	8(66,7%)	4(33,3%)	0,66
Agenesia de pré- molar [#]	15(39,5%)	23(60,5%)	0,37	13(68,4%)	6(31,6%)	0,49

O grupo controle foi usado como referencia; *p-valor; teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi usado; [#]Representam casos de FL/P associado.

6.2.1. *IRF6* (rs642961)

O genótipo AA foi o menos freqüente tanto no grupo caso como no grupo controle. No grupo caso (todos os tipo de fissura) o genótipo AA foi encontrado em 3,8% (n=7); o genótipo AG em 21,5% (n=40) e o genótipo GG foi encontrado em 74,7% (n=139). No grupo controle, o genótipo AA foi encontrado em 3,8% (n=6); o genótipo AG em 25,5% (n=40) e o genótipo GG foi encontrado em 70,7% (n=111). Não houve diferença na distribuição dos genótipos ($p=0,46$).

O alelo A não aumentou o risco de apresentar FL/P (OR=1,16, IC 95%=0,77-1,75).

Indivíduos com FL/P e história positiva de FL/P na família não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle pra distribuição dos alelos e dos genótipos ($p=0,98$ e $p=0,75$; respectivamente).

A distribuição da frequência dos alelos e genótipos de *IRF6* pelos fenótipos e subfenótipos de FL/P estão na tabela 7.

Tabela 7: Associação do gene IRF6 com os fenótipos e subfenótipos da FL/P.

Grupos	Alelos n(%)			Genótipos n(%)		
	A	G	P*	AA+AG	GG	P*
Controles	52(16,6%)	262(83,4%)	-	46(29,3%)	111(70,7%)	-
Tipo de Fissura						
FL/P	54(14,5%)	318(85,5%)	0,46	47(25,2%)	139(74,7%)	0,40
FL	16(20,0%)	64(80,0%)	0,47	13(32,5%)	27(67,5%)	0,69
FLP	30(12,2%)	216(87,8%)	0,15	28(22,7%)	95(77,2%)	0,21
FP	8(17,4%)	38(82,6%)	0,88	6(26,0%)	17(73,8%)	0,75
Subfenótipo						
FL±P Bilateral	11(12,8%)	75(87,2%)	0,39	10(23,3%)	33(76,7%)	0,43
FL±P Esquerda	18(11,3%)	142(88,7%)	0,12	17(21,2%)	63(78,2%)	0,18
FL±P Direita	17(20,7%)	65(79,3%)	0,37	14(34,2%)	27(65,8%)	0,54
Agenesia dentária [#]	7(11,3%)	55(88,7%)	0,3	7(22,6%)	24(77,4%)	0,44
Agenesia de incisivo [#]	3(10,7%)	25(89,3%)	0,42	3(21,4%)	11(78,6%)	0,53
Agenesia de pré- molar [#]	4(11,8%)	30(88,2%)	0,47	4(23,5%)	13(76,5%)	0,61

O grupo controle foi usado como referencia; *p-valor; teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi usado; [#]Representam casos de FL/P associado.

7. DISCUSSÃO

7.1 DESENHO DO ESTUDO E AMOSTRA

Os estudos de associação são ferramentas para a identificação de variantes genéticas que predisõem à doenças complexas. O objetivo é verificar se um determinado genótipo ou alelo de um gene candidato está associado à alteração, permitindo a identificação de genes que podem estar envolvidos com o fenótipo em questão (Letra, 2007).

Esses estudos podem ser realizados testando famílias de indivíduos afetados ou testando indivíduos não relacionados entre si, como o realizado no presente trabalho, estes são denominados de caso-controle. Os estudos caso-controle são mais frequentemente utilizados por permitirem um recrutamento de mais indivíduos afetados, sem a necessidade de incluir seus familiares (Risch, 2000). Além disso, o custo do estudo é reduzido quando comparado com tríades de famílias de indivíduos afetados. Por outro lado os estudos casos-controles apresentam a desvantagem de serem baseadas na diferença entre a frequência dos alelos, influenciada pela heterogeneidade populacional (Letra, 2007).

A amostra do presente estudo foi realizada por acessibilidade (amostra por conveniência). Este tipo de amostragem não probabilística é destituída de qualquer rigor estatístico. O pesquisador seleciona os elementos a que tem acesso, admitindo que estes possam representar um universo. No entanto, a amostragem por conveniência é adequada e frequentemente utilizada para geração de idéias em pesquisas exploratórias (Marotti, 2008), como no caso da presente pesquisa onde a amostra foi composta por indivíduos portadores de FL/P e indivíduos controles sem histórico familiar de FL/P na família. Apesar do caso e do controle não terem sido pareados, as diferenças observadas entre os grupos quanto à idade, o gênero e a etnia não foram estatisticamente significantes. Por outro lado, ressalta-se que como a FL/P é uma alteração congênita, a idade dos indivíduos não exerce influencia sobre

os resultados moleculares.

A FL/P é uma alteração heterogênea tanto clínica quanto geneticamente. O termo “fissura labiopalatal” é comumente usado para duas entidades anatômicas semelhantes com etiologias consideradas distintas- fissura de lábio com ou sem a fissura de palato (FL±P) e a fissura de palato isolada (FP). No entanto, tem sido observado que estes dois tipos de fissuras, podem segregar nas mesmas famílias, sugerindo que em alguns casos, esses dois tipos de fissuras podem apresentar alguns componentes genéticos em comum (Koillinen *et al.*, 2005). Desta forma, a análise estatística foi realizada com o grupo total das fissuras, e com a estratificação da amostra pelos tipos de fissura.

A distribuição dos gêneros feminino e masculino demonstrou frequências semelhantes entre os grupos caso e controle. No entanto, quando a distribuição dos gêneros foi avaliada pelos tipos de fissura observou-se que FL±P foi mais frequente no gênero masculino, enquanto FP foi mais freqüente no feminino ($p < 0,0001$). Estes resultados já eram esperados e coincidem com os dados relatados na literatura (Carinci *et al.*, 2003; Martelli-Junior *et al.*, 2007). Assim como outras condições multifatoriais, a FL/P apresentam preferência por determinados gêneros.

As fissuras bilaterais afetaram significativamente mais a FLP do que a FL ($p = 0,002$). O que pode sugerir que existem fatores genéticos e/ou ambientais que controlam a lateralidade das fissuras e que estes genes podem ser diferencialmente expressos dependendo da gravidade da fissura.

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição ao tabaco durante a gestação está associada ao aumento do risco de gerar um bebe portador de FL/P. Uma meta-análise recente demonstrou que fumo materno durante a gestação é responsável por 20%-30% do aumento do risco pra FL/P, e esta variação foi dependente do tipo de fissura (Little, 2004). Neste estudo, o fumo materno durante a gestação, também foi associado à FLP.

Outro fator que já foi relacionado à FL/P é o consumo de álcool durante a gestação (Leite e Koifman, 2009; Zarante *et al.*, 2009). No entanto, como neste estudo, outros também não encontraram associação (Meyer *et al.*, 2003; Romitti *et al.*, 2007). Contudo, o contexto social e dietético relacionado com o consumo do álcool é variado e complexo e podem incluir fatores de confundimento como: fatores nutricionais, fumo e/ou uso de drogas (Mossey *et al.*, 2009).

Vale ainda ressaltar que o consumo de álcool e tabaco é mais crítico durante o primeiro trimestre de gestação onde os efeitos teratogênicos são maximizados, pois é o período em que ocorre a fusão dos maxilares. A maior limitação dos questionários realizados neste estudo é que ele nem sempre foi respondido pelas mães e também não foi específico apenas aos três primeiros meses de gestação. No entanto, pessoas que fumam e bebem tendem a consumir proporções semelhantes diariamente, o que sugere que nossos resultados não foram afetados pela ausência de especificação no intervalo de tempo.

Embora ainda não esteja comprovado, tem sido sugerido de que as crianças com malformações congênitas, incluindo a FL/P, apresentam um aumento da incidência de câncer (Bille *et al.*, 2005). Além disso, um estudo demonstrou que famílias de pacientes portadores de FL/P têm significativamente mais história de câncer do que nas famílias em que FL/P está ausente (Menezes *et al.*, 2009). O presente estudo não demonstrou associação entre FL/P e história de câncer na família, o que corrobora com os resultados de Steinwachs *et al.*, 2000.

A prevalência da agenesia dentária é significativamente maior em indivíduos portadores de FL/P , (tanto dentro quanto fora da região de fissura) (Kuchler *et al.*, ; Shapira *et al.*, 2000; Slayton *et al.*, 2003; Letra *et al.*, 2007; Menezes e Vieira, 2008). Os resultados do presente demonstrou que agenesia dentária foi uma alteração freqüente nessa população.

A ocorrência de FL/P e o desenvolvimento de agenesias dentárias tem uma forte relação embriológica em relação ao período do desenvolvimento e posição anatômica (Stahl *et al.*, 2006). Além disso, tem sido observado que

em alguns casos a agenesia dentária pode compartilhar um componente genético semelhante com ao da FL/P (Vieira, 2003; Vieira *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2007; Vieira, 2008). A relação entre agenesia dentária e FL/P é extremamente interessante, uma vez que refletem a etiologia das interações entre os mecanismos moleculares existente entre as duas anomalias. A compreensão da natureza envolvida nessa associação podem promover conhecimento científico para estudos adicionais, bem como auxiliar, futuramente, no aconselhamento genético (Letra *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm demonstrado que a FL/P pode representar diversos subgrupos, onde, estes subgrupos, podem apresentar um conjunto específico de genes envolvidos (Weinberg *et al.*, 2006). Recentemente, um estudo propôs que anomalias dentárias for a da área da fissura podem servir de marcador clínico para definir os subfenótipos da FL/P (Letra *et al.*, 2007). Desta forma, no presente estudo, optou-se por incluir as agenesias dentárias como marcadores clínicos para os estudos moleculares.

7.2. ANÁLISE MOLECULAR

7.2.1. Método de genotipagem

A genotipagem, do presente estudo foi realizada por meio do método Taqman, proposto por Ranade *et al.* 2001, que consiste na utilização de sondas fluorescentes alelo-específicas, que combinam as etapas de amplificação e detecção dos alelos em uma única etapa e elimina a necessidade de procedimentos adicionais para a determinação do genótipo.

A fluorescência é medida durante a reação de PCR e os genótipos inferidos à partir desses valores. Desta forma, o método Taqman elimina viés por erro de interpretação, pois os genótipos são gerados automaticamente sem interferência da análise humana. Esta é uma técnica dispendiosa devido a necessidade de se usar um equipamento especial com filtros para detecção de fluorescências em diferentes comprimentos de onda e do alto custo das

sondas fluorescentes. (Letra, 2007). Entretanto, a simplicidade da técnica, alta especificidade e confiabilidade dos resultados, fizeram com que o método Taqman se tornasse uma importante ferramenta para o estudo de associação de diversos genes com alterações e doenças complexas, como a FL/P.

7.2.2 AXIN2

O gene *AXIN2* atua como um regulador negativo da via de sinalização da *WNT*, que regula o desenvolvimento embriológico e a organogênese. As proteínas *WNT* atuam sobre células-alvo, ligando-se a receptores de membrana desencadeando uma complexa cascata de sinalização intracelular (Giles *et al.*, 2003).

A transdução dos sinais Wnt depende da fosforilação da proteína intracitoplasmática Dsh que, uma vez fosforilada, neutraliza o complexo de degradação da proteína B-catenina. Desta forma a presença de moléculas Wnt impede a fosforilação e a ubiquitinação da B-Catenina, o que leva ao acúmulo de B-catenina no citoplasma e é translocada para o núcleo das células, onde interage com fatores de transcrição (Gordon e Nusse, 2006). Assim, quando em excesso, os sinais de Wnt impedem que a B-catenina siga sua via natural de degradação por ubiquitinação, o que resulta no acúmulo desta proteína no núcleo das células e conseqüentemente, altera a transcrição de diversos genes, inclusive os que regulam a proliferação, a sobrevivência e a adesão celular (Seto e Bellen, 2004).

Há uma série de observações que sugerem o gene *AXIN2* como candidato para FL/P, principalmente através de seus efeitos sobre a via de sinalização *WNT*. Estudos com modelos animais demonstraram que mutações em Wnt resultam em FL/P (Juriloff e Harris, 2008).

Outra evidencia foi observada no estudo de Lammi *et al.* (2004) onde mutações no *AXIN2* segregavam com múltiplas agenesias dentárias e câncer colorretal em uma família. Este é um aspecto interessante, uma vez que a FL/P e as agenesias dentárias, muitas vezes, apresentam o mesmo componente genético. Além disto, também destaca-se que a associação encontrada para *AXIN2* nesse estudo ter sido apenas para os casos em que a

agenesia dentária estava associada a FL/P.

Em um estudo com famílias de pacientes portadores de agenesia dentária isolada, foi observada associação com *AXIN2*, principalmente nos casos em que pelo menos um incisivo estava envolvido (Callahan *et al.*, 2009). Neste estudo foi observado um padrão similar, no qual pacientes com FL/P e ausência de incisivo na região contralateral à fissura, demonstraram forte associação com *AXIN2*.

Variações em *AXIN2* também têm sido relatadas em associação com certos tipos de câncer (Giles *et al.*, 2003). Em um estudo recente, com famílias de pacientes portadores de FL/P, foi observado que estas famílias tinham um risco aumentado para diversos tipos de câncer. Além disso, foi observado desequilíbrio de transmissão do alelo polimórfico de *AXIN2* nessas famílias. Em outro estudo, Letra *et al.* (2008) observaram uma associação, entre alguns subtipos de FL/P e o *AXIN2*, contudo, os autores não tinham a informação sobre a história de câncer nesses pacientes. Assim, sugeriram que novos estudos investigando esse gene e observando a sua possível correlação com câncer deveriam ser realizados (Letra *et al.*, 2008). Neste sentido, o presente estudo não demonstrou associação entre a história de câncer e a FL/P.

7.2.3. *IRF6*

Alguns genes responsáveis por síndromes fornecem subsídios para a compreensão da etiologia de traços isolados. Pesquisas recentes identificaram mutações genéticas como responsáveis por formas sindrômicas de FL/P. Mutações em *TBX22* acarretaram em FP com anquiloglossia, mutação no gene *FGFR1* acarretou na síndrome de Kallmann (Dode *et al.*, 2003) e mutação e deleção no gene *IRF6* foi responsável pela SWV.

Embora diversos estudos tenham demonstrado que variantes em *IRF6* contribuem para a forma isolada de FL/P (Mostowska *et al.*, ; Pan, Ma *et al.*, ; Wu *et al.*, ; Zuccherro *et al.*, 2004; Blanton *et al.*, 2005; Ghassibe *et al.*, 2005; Scapoli *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007; Rahimov *et al.*, 2008; Birnbaum *et al.*,

2009) e agenesia dentária (Vieira *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2008), apenas alguns avaliaram o polimorfismo rs642961(G>A) (tabela 8).

Rahimov *et al.* 2008 foi o primeiro a identificar essa variante como relacionada a FL/P, na qual o alelo A foi significativamente mais transmitido em famílias de pacientes portadores de FL/P

Este polimorfismo, que está em um promotor do gene *IRF6*, localizado na região intergênica. Este polimorfismo foi sugerido como causa do rompimento do sítio de ligação de um fator de transcrição AP-2, este por sua vez, estaria alterando a expressão do gene *IRF6* e alterações nessa expressão estariam relacionadas com a suscetibilidade a doença (FL/P)

A tabela 8 apresenta estudos realizados com este polimorfismo.

Tabela 8: Estudos realizados com o gene IRF6 polimorfismo (rs642961) em diferentes grupos de diferentes origens étnicas.

Autor (ano)	População	Tipo de estudo-n	Associação	Considerações
Mostowska et al. 2010	Polonês	caso-controle 175 cases, 172 controles	sim	A presença do polimorfismo aumentava em 2 vezes o risco de apresentar FL/P .
Paranaíba et al. 2010	Brasileiro	caso-controle 228 casos, 126 controles	não	Observaram ausência do envolvimento desse polimorfismo com FL/P. Eles sugerem que a mistura da etnia da população brasileira pode ter contribuído para este resultado.
Pan et al. 2010	Chinês	caso-controle 134 casos, 115 controles	sim	Demonstraram que os polimorfismos rs642961 e rs2235371 em IRF6, em conjunto aumentavam o risco para FL/P, principalmente no grupo FLP.
Wu et al. 2010	Chinês	Famílias 326 trios	sim	Sugeriram que o gene influencia no risco de desenvolver FL/P, interagindo com suplementos vitamínicos, e fatores ambientais como o fumo.
Birnbaum et al. 2009	Europeu	caso-controle 460 cases, 952 controle	sim	Sugeriram que o fator protetor de outro polimorfismo em IRF6 (V274I) atua de forma independente do alelo do polimorfismo rs642961.
Rahimov et al, 2008	Europeus, Filipinos	caso-controle e Famílias 2203 casos, 2040 controles; 362 trios	sim	Demonstraram uma forte associação. O alelo A foi significativamente mais transmitido nas famílias com FL/P, principalmente nas com famílias com FL isolada.

É importante ressaltar que um dos aspectos essenciais do esforço de grupos de pesquisa sobre a etiologia da FL/P é replicar os resultados originais de estudos em diferentes populações. Os resultados do presente estudo corroboram com Paranaíba *et. al.* (2010) que constataram a ausência de envolvimento desta variante com FL/P em uma população do sudeste brasileiro. No presente estudo optou-se por incluir a agenesia dentária como um marcador clínico de FL/P com o objetivo de aumentar a sofisticação da descrição do fenótipo, no entanto, não foi observada associação com esses subfenótipos. Cabe ressaltar que tanto o estudo de Paranaíba *et. al.* (2010) e o presente estudo foram realizados numa população com alta mistura étnica, o que pode ter contribuído para esses resultados.

Zuccherro *et. al.* (2004), em um estudo de colaboração multi-nacional das famílias de pacientes portadores de FL/P, testou o polimorfismo V274I (rs2235371) do gene IRF6 em diferentes populações. Em uma população da América do Sul a associação entre FL/P e este polimorfismo não foi observada. No entanto, Vieira *et. al.* 2007, com os resultados desta mesma população, realizou uma análise estratificada pelo haplótipo mitocondrial, e observou que a associação estava relacionada a um pequeno subconjunto da população.

7.3. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo apresenta algumas limitações dentre elas, o tamanho da amostra. Devido à estratificação da amostra alguns subgrupos apresentaram um número reduzido de indivíduos, que podem ser insuficientes para a detecção de algumas associações, levando a uma interpretação inadequada dos resultados.

Um dos grandes problemas em estudos genéticos de traços complexos é reconhecer o quanto um resultado é significativo. Os resultados deste estudo foram avaliados estatisticamente pelo teste do qui-quadrado e o nível de significância foi estabelecido em 0,05. Este nível de significância está mais associado ao erro do tipo I (falso-positivo). Apesar disso, optou-se por não

usar a correção de Bonferroni, diminuindo assim a probabilidade de erro do tipo II (falso-negativo), uma vez que o objetivo deste estudo era investigar possíveis associações que pudessem revelar pistas para investigações futuras.

A miscigenação das populações é um dos fatores que exerce influencia na identificação de associação entre polimorfismos de genes candidatos e o fenótipo de FL/P. A população do Estado do Rio de Janeiro é uma das mais heterogêneas do mundo devido à ocorrência de cruzamentos étnicos entre pessoas de diferentes origens, tais como colonizadores europeus, escravos africanos e índios-americanos (Vieira *et al.*). De acordo com o censo de 2007, a população do estado do Rio de Janeiro era composta por 53,6% de caucasianos (descendente de europeus, principalmente portugueses), 45,9% afro-descendentes (33,6% de mulatos) e os demais 0,5% de descendente de índios.

7.4. PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento da Genética Humana está causando uma grande mobilização e gerando esforços de pesquisadores de vários países para investigar o conjunto dos genes humanos. Com a possibilidade de identificar os genes causadores das alterações craniofaciais somada aos avanços da engenharia genética, num futuro próximo pode ser possível o aconselhamento de casais (devido à probabilidade de ter genes de alto risco), antes da concepção. Além da possibilidade de resultar em terapias gênicas nos fetos, diminuindo ou eliminando o impacto psicológico e social, e melhorando a qualidade de vida dos pacientes portadores de anomalias craniofaciais e seus familiares.

Neste contexto, os estudos genéticos não devem visar apenas a identificação de novos genes/*loci* candidatos, mas também estudar a associação dos subtipos (subfenótipos) da FL/P com as variações genéticas de genes candidatos. A complexidade e a diversidade dos aspectos clínicos e

dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento craniofacial proporcionam inúmeras oportunidades para investigar a etiologia da FL/P, visando uma melhor compreensão do desenvolvimento embriológico e suas alterações.

8. CONCLUSÃO

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

- A agenesia dentária foi frequente e demonstrou ser um marcador clínico eficiente na análise dos subfenótipos nesta população.
- Os polimorfismos do gene *AXIN2* foram associados com subfenótipos de FL/P.
- O polimorfismo no gene *IRF6* não foi associado com FL/P nesta população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bille, C., Winther, J. F., Murray, J.C., Olsen J.C., Christesen, K. Cancer risk in persons with oral cleft--a population-based study of 8,093 cases. *Am J Epidemiol.* 2005; 161:1047-55.

Birnbaum, S., Ludwig, K. U. IRF6 gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci.* 2009; 117:766-9

Blanton, S. H., Cortez, A., Stal, S., Muliken, J. B., Finnel, R.H., Hecht, J.T. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2005;3:259-62

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

Carinci, F., Rullo, R. Orofacial cleft in Southern Italy. *Minerva Stomatol.* 2003; 427:432-3

Chung, K. C., Kowalski, C. P. Nunn, J.H., Gordon, P.H., Carter, N.E. Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105:485-91

Cobourne, M. T. The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod.* 2004;26:7-16

De Maeyer-Guignard, J., Marcucci F., De Maeyer, E. Identification by in situ hybridization of IFN-beta-producing murine macrophages obtained from high and low interferon producers. *Ann Inst Pasteur Virol.* 1988; 139:51-7

Diewert, V. M. e S. Lozanoff. Growth and morphogenesis of the human embryonic midface during primary palate formation analyzed in frontal sections. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1993; 13:162-83

Diewert, V. M. e K. Y. Wang. Recent advances in primary palate and midface morphogenesis research. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 4:111-30

Dode, C., Levilliers J., et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet.* 2003; 33:463-5.

Ferguson, M. W. Palate development: mechanisms and malformations. *Ir J Med Sci.* 1987; 156:309-15.

- Ferguson, M. W. Palate development. *Development*. 1988;103:41-60.
- Ghassibe, M., Bayet, B. Revencu, N., Verellen, D.C., Gillerot, Y., Vikkula, M. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13:1239-42.
- Giles, R. H., J. H. Van Es, Clevers, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1653:1-24.
- Gordon, M. D. e R. Nusse. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*. 2006; 281:429-33.
- Gorlin, R., J.; Cohen, M.,M. Syndromes of the head and neck. *New York: Oxford University Press*. 2001
- Ichikawa, E., A. Watanabe, *et al*. PAX9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet*. 2006; 51:38-46.
- Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM, *et al*. Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genet Epidemiol*. 2008; 32:413-24.
- Juriloff, D. M. e Harris M. J. . Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008; 82:.63-77.
- Juriloff, D. M., Harris, M. J. Wnt9b is the mutated gene involved in multifactorial nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in A/WySn mice, as confirmed by a genetic complementation test. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2006; 76:574-9.
- Kanzaki, H., Ouchida, M. Single nucleotide polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. *Int J Mol Med*. 2006; 18:279-84.
- Kerrigan, J. J., Mcgill, J. T. Davies, J.A., Andrews, L. Sandy, J.R. The role of cell adhesion molecules in craniofacial development. *J R Coll Surg Edinb*.1998; 43:223-9.
- Koillinen, H., Lahermo, P., Rautio J. Hukki, J. Kere, J. A genome-wide scan of non-syndromic cleft palate only (CPO) in Finnish multiplex families. *J Med Genet*. 2005; 42:177-84.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, *et al*. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2002;32:285-9.

Kornman, K. S., Crane, A., Wang H.Y., di Giovane, F.S., Pirk, F.W., Wilson, T.G., Duff, G.W.. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:72-7.

Kuchler, E., L. Motta, *Vieira, A.R.*, Granjeiro, J.M. Side of Dental Anomalies and Taurodontism as Potential Clinical Markers for Cleft Subphenotypes. *Cleft Palate Craniofac J*, in press, 2010

Kuchler, E. C., Risso, P. A., Modesto, A. Costa, M.C., *Vieira, A.R.* Studies of dental anomalies in a large group of school children. *Arch Oral Biol.* 2008;17:23-28.

Lammi, L., Arte, S. Somer, M. Thesleff, I., Pirinen, S., Nieminen, P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet.* 2004;74:1043-50.

Leite, I. C. e S. Koifman. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23:31-7.

Letra, A. Anomalias Dentárias como extensão fenotípica das fissuras orais: Estudos moleculares de genes e regiões candidatatas. Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007:322

Letra, A., Menezes R., Granjeiro, G.M., *Vieira A.R.* Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res.* 2007; 86:986-91.

Letra, A., Menezes R., Granjeiro, G.M., *Vieira A.R.* AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2008.

Letra, A., Silva, R. A., Menezes R., Granjeiro, G.M. MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: Association with MMP3 but not MMP1. *Arch Oral Biol*, 28. 2007.

Lidral, A. C., Murray, J.C. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997;34:1-6

Little, J. C., A.; Munger, R. Tobacco smoking and Oral Cleft: meta-analysis. *Bulletin of the World Health organization.* 2004; 82:213-17.

Logan, C. Y. e R. Nusse. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20:781-810.

Marotti, J. G., Apm; Furuyama, Rj; Pigozzo, Mn; Campos, Tn; Laganá, Dc. Amostragem em pesquisa clínica: Tamanho da amostra. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo.* 2008;20:186-194.

Martelli-Junior, H., Porto, L. V. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res.* 2007;21:314-7.

Matsuzawa N, Shimosato K, Natsume N, Niikawa N, Yoshiura K. Two missense mutations in the IRF6 gene in two Japanese families with Van der Woude syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98:414-7.

Menezes, R., Letra, A., Vieira, A.R. Studies of genes in the FGF signaling pathway and oral clefts with or without dental anomalies. *Am J Med Genet A.* 2008; 12:1614-7.

Menezes, R., Marazita, M. L., Letra, A., Vieira, A.R.. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc*, v.140, n.1, Jan, p.80-4. 2009.

Menezes, R. e A. R. Vieira. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate Craniofac J*, v.45, n.4, p.414-9. 2008.

Meyer, K. A., M. M. Werler, *et al.* Low maternal alcohol consumption during pregnancy and oral clefts in offspring: the Slone Birth Defects Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, v.67, n.7, p.509-14. 2003.

Ministério da Saúde. informações de Saúde. Estatísticas Vitais. 1979-2003. Disponível em: uRL:[http:// www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br). (28/09/2010).

Moore, L., K. Embriologia Clínica: Guanabara. 2005

Mossey, P. A., J. Little, *et al.* Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009; 37:1773-85.

Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88:538-45

Murray, J. C. Face facts: genes, environment, and clefts. *Am J Hum Genet.* 1995; 57:227-32.

Murray, J. C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.*2002; 61:248-56.

Natsume, N. Incidence of cleft lip and palate among Japanese newborns, 1982 to 1984. *Plast Reconstr Surg*, v.79, n.3, p.499-501. 1987.

Notaridou, M., Quaye, L. Common alleles in candidate susceptibility genes associated with risk and development of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2010;15.

Pan Y, Ma J, Zhang W, Du Y, Niu Y, Wang M, et al. IRF6 polymorphisms are associated with nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *Am J Med Genet A*. 2010; 10:2505-11

Paranaiba LM, Martelli-Junior H, Oliveira Swerts MS, Line SR, Coletta RD. Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med*. 2008; 22:507-11.

Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, et al. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet*. 2008; 40:1341-7.

Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res*. 2001; 11:1262-8.

Risch, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*. 2000; 15:847-56.

Romitti, P. A., Sun, L., Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *Am J Epidemiol*. 2007; 44:775-85.

Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet*. 2005; 76:180-3.

Schutte, B. C. e J. C. Murray. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet*. 1999; 8:1853-9.

Seto, E. S. e H. J. Bellen. The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol*. 2004; 14:45-53.

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

Slayton, R. L., Williams, L. Murray, J.C., Lidral, A.C. Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate Craniofac J*. 2003; 40:274-9.

Spilson, S. V., Kim, H. J., Chung K.C. Association between maternal diabetes mellitus and newborn oral cleft. *Ann Plast Surg*, v.47, n.5, p.477-81. 2001.

Stahl, F., Grabowski, R., Wigger K. Epidemiology of Hoffmeister's "genetically determined predisposition to disturbed development of the dentition" in patients with cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*, v.43, n.4, p.457-65. 2006.

Steinwachs, E. F., Amos, C. Stal, S. Hetcht, J.T. Nonsyndromic cleft lip and palate is not associated with cancer or other birth defects. *Am J Med Genet*, v.90, n.1, p.17-24. 2000.

Suzuki, Y., P. A. Jezewski, Machida, J., Watanabe, Y., Shi, M., *et al.* In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med.* 2004;6:117-25.

Taniguchi, T., K. Ogasawara, *et al.* IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:623-55.

Trevilatto, P. C. e S. R. Line. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000;198:6-9.

Vieira, A. R. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res.* 2003; 82:162-5.

Vieira, A. R. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87:119-25.

Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Orioli IM, Castilla EE. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *Am J Med Genet A.* 2007; 143:2075-8.

Vieira, A. R., Meira, R. Modesto, A., Murraru, J.C. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res.* 2004; 40:723-7.

Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A.* 2007; 143:538-45.

Vieira, A. R. e I. M. Orioli. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *ASDC J Dent Child*, v.68, n.4, p.272-9, 229. 2001.

Vieira, A. R., Pliss, L., Krumina, A., Baumanis, V., Lace, B. *et al.* Mitochondrial DNA origins of the Latvian clefting population. *Mitochondrion*, 12, 2007.

Vieira AR, Seymen F, Patir A, Menezes R. Evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and isolate tooth agenesis, in a Turkish population. *Arch Oral Biol.* 2008; 53:780-4.

Wang, X., E. L. Goode, Frederickeses, Z.S., Vierkant, R.A., *et al.* Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17:2101-8.

Weinberg, S. M., K. Neiswanger, *Martin, R.A., Mooney, M.P., et al.* The Pittsburgh Oral-Facial Cleft study: expanding the cleft phenotype. Background and justification. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006; 43:7-20.

Werb, Z., e Alexander, C. M. Expression and function of matrix metalloproteinases in development. *Matrix Suppl*, 1992; 1:337-43.

Wu T, Liang KY, Hetmanski JB, Ruczinski I, Fallin MD, Ingersoll RG, *et al.* Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Hum Genet.* 2010; 128:01-10.

Young, D. L., Schneider, R.A. Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11:304-17. .

Zarante, I., Lopez, M. A., Caro, A., Garcia-Reyes, J.C. Ospina, J.C., Impact and risk factors of craniofacial malformations in a Colombian population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2009; 19.

Zucchero TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, *et al.* Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med.* 2004; 351:769-80.

ANEXOS

ANEXO 1: Anamnese e Ficha Clínica

PRONTUÁRIO Nº: _____ BANCO DNA No.: _____

NOME DO PACIENTE: _____

ENDEREÇO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ ESTADO: _____

TEL: _____ DATA DE NASCIMENTO: _____ IDADE: _____

O PACIENTE É PORTADOR DE SÍNDROME? SIM NÃO QUAL? _____

ALGUÉM DA FAMÍLIA POSSUI FENDA LABIO-PALATINA? SIM NÃO

SE SIM, QUAL O GRAU DE PARENTESCO? _____

• **O PACIENTE POSSUI ALGUMA DAS DESORDENS ABAIXO?**

ESTÁ EM TRATAMENTO MÉDICO? SIM NÃO _____

TEM ALGUMA DOENÇA GRAVE? SIM NÃO _____

• **VOCÊ OU ALGUÉM DA SUA FAMÍLIA TEM OU JÁ TEVE CÂNCER?** SIM NÃO

QUEM? _____ TIPO: _____

• **PERGUNTAS SOBRE A GESTAÇÃO DA MÃE DO PACIENTE. DURANTE A GRAVIDEZ:**

FUMOU? SIM NÃO QUANTOS CIGARROS POR DIA? _____

USOU MEDICAMENTOS? SIM NÃO QUAL? _____

INGERIU BEBIDAS ALCOÓLICAS? SIM NÃO COM QUE FREQUÊNCIA? _____

EXAME CLÍNICO:

Etnia: ()caucasiana ()negra ()parda ()outras _____

TIPO DE FISSURA: _____ **LADO:** _____

LÍNGUA: ()Normal ()Fissurada ()Geográfica ()Anquiloglossia

Agnesia dentária? QUAL? _____

MAXILA		MANDÍBULA	
51/11	61/21	71/31	81/41
52/12	62/22	72/32	82/42
53/13	63/23	73/33	83/43
54/14	64/24	74/34	84/44
55/15	65/25	75/35	85/45
16	26	36	46
17	27	37	47

ANEXO 2:

Carta de informação ao sujeito da pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O presente estudo, que apresenta parceria com o Hospital Municipal Nossa Senhora do Loreto (HMNSL), tem como objetivo estabelecer uma base de dados epidemiológico e molecular para auxiliar em investigações genéticas da formação da fissura labial/palatina.

Procedimentos:

Os procedimentos a serem realizados, caso concorde em participar, constam de: Coleta de amostras de saliva através de bochecho (como fonte de material genético); Anamnese e exame bucal.

Estes procedimentos não apresentam desconfortos, riscos ou custos para os participantes da pesquisa.

Benefícios:

Não há benefício direto para o participante deste estudo. A sociedade deve se beneficiar da identificação de genéticas moleculares da fissura de lábio/palato. Este é um projeto de pesquisa, e não uma forma de tratamento ou diagnóstico. Com este trabalho, acreditamos que além dos riscos serem insignificantes, seus benefícios indiretos serão relevantes.

Confidência:

Sua amostra de DNA será armazenada pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense. Os participantes que desejarem poderão ter acesso aos dados da pesquisa em qualquer momento, ou mesmo ter suas informações pessoais removidas deste arquivo bastando para isso um contato com os pesquisadores Erika Calvano Kuchler ou Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, responsáveis por este projeto, pelo telefone (21) 2629 2324. Um registro de sua participação nesta pesquisa será mantido, mas de forma confidencial, através do uso de códigos numéricos e arquivos fechados. Os resultados, em sua totalidade, serão publicados em literatura científica especializada.

Participação voluntária:

Anexo 3:

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer nº 150A/2009

Rio de Janeiro, 27 de julho de 2009.

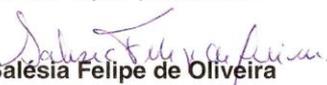
Sr(a) Pesquisador(a),

Informamos a V.Sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil - CEP SMSDC-RJ, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo discriminado:

<p>Coordenadora: Salésia Felipe de Oliveira</p> <p>Vice-Cordenadora: Suzana Alves da Silva</p> <p>Membros: Andréa Estevam de Amorim Alice de C. A. Vinhaes Bráulio dos Santos Júnior Carlos Alberto Pereira de Oliveira Elisete Casotti José M. Salame Jucema Fabrício Vieira Márcia Constância P. A. Gomes Maria Alice Gunzburger Mônica Amorim de Oliveira Nara Saraiva Pedro Paulo Magalhães Chrispim Rafael Aron Abitbol Rondineli Mendes da Silva Sandra Regina Victor</p> <p>Secretárias Executivas: Carla Costa Vianna Renata Guedes Ferreira</p>	<p>PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 113/09 CAAE: 0132.314.000-09</p> <p>TÍTULO: Estudo da etiopatogenia das fissuras labiopalatinas e genes expressos no desenvolvimento craniofacial.</p> <p>PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Patrícia Nivoloni Tannure.</p> <p>UNIDADE (S) ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: Hospital Municipal Nossa Senhora do Loreto.</p> <p>DATA DA APRECIÇÃO: 27/07/2009.</p> <p>PARECER: APROVADO.</p>
--	---

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII. 13.d., da Resolução CNS/MS Nº 196/96*).

Esclarecemos, ainda, com relação aos Protocolos, que o CEP/SMSDC deverá ser informado de fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador apresentar justificativa, caso o projeto venha a ser interrompido e/ou os resultados não sejam publicados.


Salésia Felipe de Oliveira
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil
Rua Afonso Cavalcanti, 455 sala 715 – Cidade Nova – Rio de Janeiro
CEP: 20211-901
E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br - Site: www.saude.rio.rj.gov.br/cep

FWA nº: 00010761
IRB nº: 00005577

ANEXO 4:

Artigo 1 Publicado: SIDE OF DENTAL ANOMALIES AND TAURODONTISM AS A POTENTIAL CLINICAL MARKERS FOR CLEFT SUBPHENOTYPE

QuickTime™ and a decompressor are needed to see this picture.

SIDE OF DENTAL ANOMALIES AND TAURODONTISM AS POTENTIAL
CLINICAL MARKERS FOR CLEFT SUBPHENOTYPES

Erika Calvano Küchler, DDS, MS¹

Luise Gomes da Motta DDS, MS, PhD²

Alexandre Rezende Vieira DDS, MS, PhD³

José Mauro Granjeiro DDS, MS, PhD^{*1}

¹ *Department of Cellular and Molecular Biology, Biology Institute, and Cell Therapy Center, Unit of clinical Research, Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil;* ² *Assistant Professor, Department of Dentistry and Dental Materials, School of Dentistry, Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil;* *Assistant Professor, Departments of Oral Biology and Pediatric Dentistry and Center for Craniofacial and Dental Genetics, School of Dental Medicine, Department of Human Genetics, Graduate School of Public Health, and Clinical and Translational Science Institute, University of Pittsburgh*

Key words: disturbances of craniofacial development, oral cleft, dental anomalies

Journal: Cleft Palate Craniofac J

*Corresponding author:

Corresponding author at: Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, Outeiro de São

João Baptista s/n, Centro, Niterói, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 2629 9255.

E-mail address: jmgranjeiro@gmail.com (J.M. Granjeiro)

Abstract:

Objective: The aim of this work was to investigate in more detail dental clinical aspects that could serve to define subphenotypes of oral clefts.

Design: Dental records of oral cleft subjects from a group of 168 cases were examined and 157 were included in this study. Type of oral cleft and dental phenotypes (tooth agenesis, supernumerary teeth, taurodontism, dental transposition and microdontia) outside the cleft area were investigated. Association of dental anomalies with preferential subtypes of cleft (subphenotype) was assessed.

Results: Seventy-four subjects presented at least one developmental dental anomaly. Tooth agenesis was the most common dental anomaly (28.6%), following by the taurodontism (15.2%). Supernumerary teeth were associated with cleft palate only ($p=0.05$). The absence of maxillary left lateral incisors was significantly associated with unilateral right cleft lip ($p=0.02$). Bilateral clefts were strongly associated with bilateral dental anomalies ($p=0.00001$). In the CLP group tooth agenesis were associated with dental transposition ($p=0.03$) and with supernumerary teeth ($p=0.009$). Subjects with oral clefts have a higher risk of tooth agenesis (OR=3.33; 95% C.I. 1.18-10.13) and taurodontism (OR=3.95; 95% C.I. 2.28-6.82) occurrences.

Conclusion: The preferential associations between specific cleft types with dental phenotypes suggest dental anomalies can be utilized as clinical markers to subphenotype isolated cleft lip and palate.

INTRODUCTION

Clefts involving the lip and/or palate (CL/P) or isolated clefts of the palates (CP) are major structural birth anomaly and occurring in about 1/700 live births. The variability is related to geographic origin and ethnicity. They are a complex phenotype and reflect a failure of developing embryonic facial and palatal processes (Murray et al., 1997; Murray, 2002).

The occurrence of CL/P and the development of tooth germs have a close embryological relationship in timing and anatomical position. The most critical events of teeth, lip and palate formation occur almost concurrently (Hovorakova et al., 2006).

Developmental dental alterations are more common in patients with cleft lip and palate than in the general population (Ranta, 1986; Tsai et al., 1998; Slayton et al., 2003, Williams et al., 2003), which suggests that, in some instances, congenital dental alterations and oral clefts may share the same genetic factors (Vieira, 2003; Vieira et al., 2004; Vieira et al., 2007; Vieira, 2008). Recently studies proposed that dental anomalies outside the cleft area could serve as additional clinical markers for the definition of cleft subphenotypes that could be used to study the etiology of this craniofacial anomaly (Letra et al., 2007; Menezes and Vieira, 2008).

The precise etiology and pathogenesis of oral clefts and the dental alterations remains largely unknown and the differing results of genetic studies have drawn interest in increasing the sophistication of the description of the phenotype of these traits. Therefore, the aim of this work was to investigate in detail dental clinical aspects to gain more insight into the etiology of CL/P based on developmental dental alteration.

METHODS

The case group consisted of 164 subjects born with oral clefts treated at the Treatment Center for Craniofacial Anomalies of the State of Rio de Janeiro (CTAC/RJ), Brazil. Subjects' ages varied from 5 to 51 years old (the average age was 20.2 years with a standard deviation of 11.5 years).

All pretreatment orthodontic records were analyzed. The archive consists of clinical records, study cast models and radiographs from the subjects. All observations were made by one single examiner (ECK) and all orthopantomograms were examined

using the same protocol (Küchler et al., 2008). Seven syndromic subjects were excluded and 157 subjects were included in this study.

Determination of the Cleft Phenotype

The determination of the cleft phenotype was based on the description present in the clinical files and confirmed through examination of the dental casts and radiographs. Cleft status was based on cleft completeness (comprised of primary and secondary palates entirely) or incompleteness, and on laterality (left, right, bilateral, and central in the cases of median clefts and cleft palate only).

Diagnostic Criteria for Dental Alterations

The inclusion criteria was that at least one permanent tooth was affected. We not included primary dentition. Only dental anomalies outside the cleft area were considered for cleft lip only (CL) and cleft lip and palate (CLP). For the cleft palate only (CP) subjects, all dental anomalies observed were considered. Dental anomalies adjacent to the cleft area (affecting maxillary central incisors, lateral incisors, or canines) were not included in this study because the absence of such teeth may be the consequence of developmental anomalies at the cleft site.

Determination of Developmental Dental Alteration Phenotype

- Tooth agenesis - was considered when at least one developmentally missing tooth was observed. Tooth agenesis was defined based on the age of the subjects and when initial tooth formation should be visible in the radiographs, according to this criterion, second premolar agenesis was only considered in cases older than 8 years of age. Missing third molars were not considered in this study.
- Supernumerary teeth – was defined as tooth that is additional to the normal series and can be found in almost any region of the dental arch. Supernumerary teeth was defined when initial tooth formation would be visible radiographically (Garvey et al., 1999).
- Taurodontism- was defined by the apical enlargement of the pulpar chamber and was recorded only for the more severe cases (hipertaurodontism) occurring in first and second molars (multiradicular teeth) (Durr et al., 1980).

- Tooth Transposition - was defined as a form of ectopic eruption where a tooth develops and erupts in the position normally occupied by another tooth (Ely et al., 2006).
- Small lateral incisor (Peg-shaped and Microdontia)- Peg-shaped incisors were registered when the incisal mesio-distal width of the tooth crown was narrower than the cervical, and microdontia when a tooth that is much smaller than its homolog (Backman and Wahlin, 2001).

Also, we stratified the anomalies (CL and CLP) according to their severity, considering CLP complete as severe and CL group plus CLP incomplete as mild form, to evaluate gender preference discrepancy.

Statistical Analysis

Expected frequencies of dental anomalies in the general population were derived from Kuchler et al., (2008b). The data was subsequently processed and analyzed using the Epi Info3.3.2 statistical software package. Odds ratio calculations and chi-square or Fisher's exact tests at a level of significance of 0.05 were used to determine if any dental anomalies were preferentially associated with oral clefts.

RESULTS

Of 157 subjects included in this study, 64 were female and 93 were males. Seventy-five males and 36 females had a complete CLP, 2 males and 3 females had an incomplete CLP, 13 males and 16 females had a CL, 1 male and 3 females had a complete CP, and 2 males and 6 females had an incomplete CP.

CL/P (table 1) were more common in males whereas CP were more common in females ($p=0.01$; OR= 4.9; 95% C.I. 1.1-24).

The most severe form of CL/P (CLP complete) was associated with males, whereas mild CL/P (CL plus CLP incomplete) were more common in females ($p=0.01$; OR= 2.6; 95% C.I. 1.1-6.2).

Seventy-four subjects presented at least one developmental dental anomaly. Forty-seven subjects presented alterations of number (tooth agenesis and/or supernumerary teeth) and 23 subjects presented dental shape alterations (taurodontism and microdontia). We did not find significant statistical differences based on the type

of cleft and the presence of dental anomalies ($p=0.7$). The most commonly dental anomaly was tooth agenesis, followed by taurodontism (Table 1).

In the 45 subjects with tooth agenesis, 3 had oligodontia (6 or more congenitally missing teeth excluding third molars), 13 had two missing teeth and 20 subjects just had one missing tooth. The mean number of congenitally missing teeth was 2.3 (standard deviation=2.6). Upper arch were more affected and 22 subjects had maxillary missing teeth, 11 subjects had mandibular missing teeth, and 11 subjects had tooth agenesis in both arches ($p=0.03$). Second premolar ($n=37$) and upper lateral incisor ($n=15$) were the most common tooth agenesis.

Regarding supernumerary teeth, maxillary arch were also more affected ($p=0.007$), 6 subjects had maxillary supernumerary teeth, and 2 subjects had supernumerary teeth in both arches. The mean number of supernumerary teeth was 1.37 (standard deviation=0.74).

Seven subjects presented mandibular taurodontism, 6 subjects presented maxillary taurodontism and 11 subjects presented taurodontism in both arch ($p=0.7$).

Table 2 reports the association of dental anomalies and position of clefting, considering unilateral (left or right) bilateral (left and right) or median cleft. Supernumerary teeth were associated with median cleft ($p=0.05$).

Bilateral clefts were strongly associated with bilateral dental anomalies ($p=0.00001$). In contrast, left and right unilateral clefts were not associated with unilateral left and right dental anomalies. The absence of maxillary left lateral incisors was significantly associated with unilateral right clefts ($p=0.02$).

Tooth agenesis were associated with supernumerary teeth ($p=0.03$) and dental transposition ($p=0.02$). And tooth agenesis were not associated with taurodontism ($p=0.3$) and microdontia ($p=0.9$). In the CLP group tooth agenesis were associated with dental transposition ($p=0.03$), and tooth agenesis were strongly associated with supernumerary teeth ($p=0.009$).

DISCUSSION

Here we analyzed developmental dental alterations in patients with oral clefts and our results raise interesting associations that could be used to study the etiology of this craniofacial anomaly.

Oral cleft is classified as a clinically and genetically heterogeneous condition and is a common term for two anatomically distinct etiologically features: cleft lip (CL) with or without cleft palate (CL/P), and cleft palate only (CP). CL/P and CP can occur as isolated trait, or as part of syndromes. However, oral cleft due to a known etiology comprise only a small portion of affected individuals with CL/P or CP; thus, a major current focus of our and a number of research groups is to understand the etiology and pathogenesis of the more common isolated/non syndromic forms of oral cleft.

To date, clefting genetic studies have defined the cleft phenotype as a qualitative trait (affected or unaffected). However, numerous lines of evidence suggest that CL/P and CP presented subgroups that could have specific genetic contributions. Recently, it has been proposed that dental anomalies outside the cleft area could serve as markers for the definition of cleft subphenotypes (Letra et al., 2007).

Previous reports have established that oral cleft presented a sexual dimorphism, cleft lip (with or without palate) is more common in males as well cleft palate only is prevalent in females (Carinci et al., 2003; Martelli-Junior et al., 2007). Our results were in agreement with previous reports, but also add that in the cleft lip (with or without palate) group different forms of clefting also presented gender preference and severe forms were more common in males.

Although dental anomalies presented gender prevalence discrepancies in non cleft population, in our clefts subjects we did not found statistical differences between gender and dental anomalies.

It is well established that almost all dental alterations of subjects born with oral clefts are significantly higher than the frequency found in the general population (Shapira et al., 2000; Slayton et al., 2003; Letra et al., 2007). Our study agreed with these previous reports and we also observed preferential associations of specific dental anomalies with each cleft type.

Tooth agenesis is the most clearly recognized dental abnormality in humans. The frequency of tooth agenesis (both in and outside the cleft region) is significantly increased in persons with clefts compared with the control population (Slayton et al., 2003; Letra et al., 2007; Tortora et al., 2008). Moreover, it has been shown that the number of affected teeth increases with the severity of the cleft phenotype (Ranta, 1988; Tsai et al., 1998; Shapira et al., 2000; Dewinter et al., 2003; Slayton et al., 2003).

Agenesis of permanent teeth ranges from 2.6% to 11.3%, with second premolars following by upper lateral incisors being predominantly affected (Larmour et al., 2005; Kuchler et al., 2008a; Kuchler et al., 2008b). In our study population the frequency of tooth agenesis was 28% and, second premolar was also the most affected teeth, reflecting the fact that different types of teeth have different genetic factors. Previous studies demonstrated that in some instances isolated forms of cleft and tooth agenesis with preferential missing premolar may belong to the same genetic spectrum (Vieira et al., 2007).

In our group, prevalence of upper lateral incisor agenesis outside cleft area was nine times higher than in general population (Kuchler et al., 2008a; Kuchler et al., 2008b). Indeed, the high prevalence of upper lateral incisor agenesis in patients with unilateral cleft in the contralateral cleft area may be a microform cleft (unsuccessful bilateral cleft) and could represent a subphenotype for oral cleft. The significant association between upper lateral incisor agenesis and right side of cleft raises interesting possibilities. Genes that contribute to laterality of the cleft may resulting in alternate phenotype for tooth agenesis and is different expressed depending on the particular cleft side. Following a similar pattern, bilateral CLP were significantly affected by bilateral forms of dental anomalies, this could reflect the possibility that genes that contribute to laterality of the cleft may contribute for the laterality of the dental anomalies also.

Supernumerary teeth develop in about 0.1% to 3.6% of the human population (Silva Meza, 2003; Arathi and Ashwini, 2005; Acikgoz et al., 2006). In our group study we found the prevalence of 6.9 % and we noticed borderline association between supernumerary teeth and median cleft (CP).

Here we showed an interestingly association between tooth agenesis and supernumerary teeth with preferential association in CLP group. Concomitant tooth agenesis and supernumerary teeth is very rare in the general population and there are no published estimated prevalence of this phenomenon (Bateman and Mossey, 2006; Kuchler et al., 2008b).

In this study we decide to include taurodontism as a subphenotype for oral clefts. We observed that the prevalence of taurodontism in oral cleft population were nine times more common than in our previous study in the general population (Kuchler et al., 2008a). However, we could not determine if taurodontism presented oral cleft subgroup preference.

Dental transposition is an uncommon developmental dental alteration with a genetic origin that has been associated with several dental anomalies (Peck et al., 1993; Peck et al., 2002; Ely et al., 2006) and with oral cleft (Letra et al., 2007). In our study, dental transposition was associated with tooth agenesis, but only in CLP subjects.

In conclusion, all these traits seem to occur with a higher frequency in patients with cleft lip, cleft palate, or both and presented preferential association. We suggest that all phenotypic features of oral cleft and associated dental anomalies to be taken into consideration in future genetic studies. When clinical and genetic results are combined, classifications of the different forms of craniofacial defects will be come more precise

REFERENCES

- Acikgoz A, Acikgoz G, Tunga U, Otan F. Characteristics and prevalence of non-syndrome multiple supernumerary teeth: a retrospective study. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006;35:185-90.
- Arathi R, Ashwini R. Supernumerary teeth: A case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2005;23:103-5.
- Backman B, Wahlin YB. Variations in number and morphology of permanent teeth in 7-year-old Swedish children. *Int J Paediatr Dent.* 2001;11:11-7.
- Bateman G, Mossey PA. Ectopia or concomitant hypohyperdontia? A case report. *J Orthod.* 2006;33:71-7.
- Carinci F, Rullo R, Laino G, Festa V, Mazzarella N, Morano D, et al. Orofacial cleft in Southern Italy. *Minerva Stomatol.* 2003;52:427-31, 32-3.
- Dewinter G, Quirynen M, Heidbuchel K, Verdonck A, Willems G, Carels C. Dental abnormalities, bone graft quality, and periodontal conditions in patients with unilateral cleft lip and palate at different phases of orthodontic treatment. *Cleft Palate Craniofac J.* 2003;40:343-50.
- Durr DP, Campos CA, Ayers CS. Clinical significance of taurodontism. *J Am Dent Assoc.* 1980;100:378-81.
- Ely NJ, Sherriff M, Cobourne MT. Dental transposition as a disorder of genetic origin. *Eur J Orthod.* 2006;28:145-51.
- Garvey MT, Barry HJ, Blake M. Supernumerary teeth--an overview of classification, diagnosis and management. *Journal (Canadian Dental Association).* 1999;65:612-6.

- Hovorakova M, Lesot H, Peterkova R, Peterka M. Origin of the deciduous upper lateral incisor and its clinical aspects. *J Dent Res*. 2006;85:167-71.
- Küchler EC, Risso PA, Costa MC, Modesto A, Vieira AR. Assessing the proposed association between tooth agenesis and taurodontism in 975 paediatric subjects. *Int J Paediatr Dent*. 2008a;18:231-4.
- Küchler EC, Risso PA, Costa MD, Modesto A, Vieira AR. Studies of dental anomalies in a large group of school children. *Arch Oral Biol*. 2008b;53:941-946
- Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, Stirrups DR. Hypodontia--a retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence Int*. 2005;36:263-70.
- Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res*. 2007;86:986-91.
- Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PR, Freitas AB, Della Coletta R. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Brazilian oral research*. 2007;2:314-7.
- Menezes R, Vieira AR. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008;45:414-9.
- Murray JC, Daack-Hirsch S, Buetow KH, Munger R, Espina L, Paglinawan N, et al. Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J*. 1997;34:7-10.
- Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 2002;61:248-56.
- Peck L, Peck S, Attia Y. Maxillary canine-first premolar transposition, associated dental anomalies and genetic basis. *Angle Orthod*. 1993;63:99-109.
- Peck S, Peck L, Kataja M. Concomitant occurrence of canine malposition and tooth agenesis: evidence of orofacial genetic fields. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2002;122:657-60.
- Ranta R. A review of tooth formation in children with cleft lip/palate. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1986;90:11-8.
- Ranta R. Numeric anomalies of teeth in concomitant hypodontia and hyperdontia. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1988;8:245-51.
- Shapira Y, Lubit E, Kuftinec MM. Hypodontia in children with various types of clefts. *Angle Orthod*. 2000;70:16-21.

Silva Meza R. Radiographic assessment of congenitally missing teeth in orthodontic patients. *Int J Paediatr Dent.* 2003;13:112-6.

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

Tortora C, Meazzini MC, Garattini G, Brusati R. 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.* 2008;45:154-62.

Tsai TP, Huang CS, Huang CC, See LC. Distribution patterns of primary and permanent dentition in children with unilateral complete cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 1998;35:154-60.

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

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

Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A.* 2007;143:538-45.

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

ANEXO 5:

Artigo 2: Variation in *IRF6* Is Not Associated with Oral Cleft and Tooth Agenesis in a Brazilian Population

Erika Calvano Küchler¹

Patricia Nivoloni Tannure²

Priscila Falagan-Lotsch¹

Lídia Maria Amorim³

Marcelo de Castro Costa²

Ariadne Letra⁵

Alexandre R. Vieira^{5,6,7,8}

José Mauro Granjeiro^{1,4#}

¹Unit of Clinical Research, Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil

²Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

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

⁴Directory of Programs National Institute of Metrology, Normalization and Industrial Quality (INMETRO), Duque de Caxias, RJ Brazil

⁵Department of Oral Biology and Center for Craniofacial and Dental Genetics;

⁶Department of Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, ⁷Department of Human Genetics, Graduate School of Public Health, and ⁸Clinical and Translational Science Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA;

Corresponding Author

José Mauro Granjeiro: jmgranjeiro@gmail.com

ABSTRACT

Objective: Oral clefts and tooth agenesis are common birth defects that result from genetic and environmental factors. Alterations in the interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene cause van der Woude syndrome, hence making *IRF6* a candidate gene for isolated forms of oral clefts and tooth agenesis. One single nucleotide polymorphism in *IRF6* associated with oral clefts has been suggested as functional (rs642961). Therefore, the aim of this study was to investigate the association of *IRF6* rs642961 with oral clefts and tooth agenesis in a population dataset from Brazil.

Methods: 186 subjects born with oral clefts (with and without tooth agenesis), 50 subjects with isolated tooth agenesis, and 157 healthy controls from Rio de Janeiro, Brazil, were studied. DNA samples were obtained from saliva and genotyping was performed using a TaqMan assay.

Results: The frequency of the less common allele (A) was 16.6% in the controls, 14.5% in the subjects born with clefts, and in 15% of the subjects with tooth agenesis and these differences were not statistically significant. A stratified analysis was performed and there was no association between subphenotypes of oral clefts and tooth agenesis and this *IRF6* polymorphism.

Conclusion: There was not association between oral clefts, tooth agenesis and *IRF6* rs642961, suggesting the possible role of *IRF6* in this population is through other variants in this gene.

Key words: Oral cleft, tooth agenesis, craniofacial development, Interferon Regulatory Factor

INTRODUCTION

Oral clefts are the most common congenital malformations worldwide in which the fusion of the tissue of the lip and/or palate did not occur properly during embryological development. It is occurring in about 1/1000 live births [1, 2]. This defect is considered a clinically and genetically heterogeneous condition that included cleft lip with or without cleft palate, and cleft palate only [1, 3].

Tooth agenesis is the congenital absence of one or more teeth and is the most common developmental anomaly of human dentition. The prevalence

of missing permanent teeth, vary from 2.6% to 11.3% [4]. Tooth agenesis is more common in subjects with oral cleft than in the general population [5, 6]. Tooth agenesis and oral cleft may lead masticatory, speech and esthetic dysfunctions with a variety of orthodontic and prosthetic problems[3]. In addition, oral cleft subjects often required orthognathic surgery to correct skeletal disharmony, establish facial harmony and optimal occlusal function [7]. These both congenital anomalies can occur as isolated trait, or as part of syndromes.

Van der Woude syndrome is one of the most common cleft syndromes, in which lower-lip pits, and occasional tooth agenesis are the only features distinguishing the disorder from non-syndromic oral cleft [8]. Mutations in interferon regulatory factor 6 (IRF6) cause Van der Woude syndrome [8-11]. Moreover, IRF6 contribute to non-syndromic oral clefts [12-22] and recently was extended to isolated tooth agenesis [23, 24].

The single nucleotide polymorphism (rs642961, G>A), in an IRF6 enhancer located in the intergenic region, was previously suggested to cause disruption of the binding site of a transcription factor AP-2, this in turn disrupts proper expression of the IRF6 gene. This common variation was directly related the risk of non-syndromic oral cleft [15].

Although the latest oral cleft research demonstrated an association between several variations in the IRF6 locus and oral cleft, in different populations, the contribution of the variant rs642961 in subtypes of oral cleft and tooth agenesis has not been well analyzed. Therefore, the aim of this study was to investigate the association of IRF6 in a group of non-syndromic oral cleft with and without tooth agenesis and in a group of subjects with isolated tooth agenesis in a Brazilian population.

METHODS

Subjects

The cleft group consisted of subjects receiving dental care at a public reference hospital of oral cleft rehabilitation in Rio de Janeiro, Brazil and none of the index cases were diagnosed with median cleft. Tooth agenesis group and control group consisted of unrelated subjects, with no history of oral cleft in

the family, recruited at Dental Clinic in Federal University of Rio de Janeiro. Both institutions are located in the northern part of the city of Rio de Janeiro.

All the participants or their parent or guardian if the patient was a minor provided informed consent. The study was approved by the local Research and Ethics Committee.

Determination of Cleft Subphenotype

The determination of the cleft type was based on the clinical examination and confirmed description present in the clinical files. Cleft status was based on cleft laterality (left, right, bilateral), on cleft completeness (comprised of primary and secondary palates entirely), and on the presence of tooth agenesis outside cleft area. The cleft types evaluated were: Cleft lip only (CL); Cleft palate only (CP), Cleft lip with palate (CLP) and Cleft lip with or without cleft palate (excludes cleft palate)- CL±P.

Diagnostic Criteria for Tooth Agenesis

Tooth agenesis was considered when at least one developmentally missing permanent tooth was observed (excluding third molars). All cases were clearly evident from the radiographic examination. Tooth agenesis was defined based on the age of the subjects and when initial tooth formation should be visible in the radiographs [25]. In CL with or without CP group only tooth agenesis outside the cleft area was considered. Dental anomalies adjacent to the cleft area (affecting maxillary central incisors, lateral incisors, or canines) were not included in this study because the absence of such teeth may be the consequence of developmental anomalies at the cleft site and surgery [6].

DNA Samples and Genotyping

Genomic DNA for molecular analysis was extracted from buccal cells by the previously reported method [26]. Genetic polymorphisms in the *IRF6* gene (rs642961) was genotyped by real-time polymerase chain reactions using the Taqman method [27] in an Agilent Technologies (Stratagene Mx3005P). Assays and reagents were supplied by Applied Biosystems (Foster City, CA).

Statistical Analysis

The data was subsequently processed and analyzed using the Epi Info3.3.2 statistical software package. Cases were analyzed not only as a total group, but also in two different groups (oral cleft and tooth agenesis). Odds

ratio calculations and chi-square or Fisher's exact tests at a level of significance of 0.05 were used to determine if any craniofacial anomalies subgroup (cleft phenotype, cleft subphenotype, positive family history for cleft, tooth agenesis subphenotype) were preferentially associated with IRF6 genotypes and alleles.

RESULTS

Table 1 and 2 summarized the results.

One hundred eighty six subjects with oral cleft were included. Oral cleft subjects' ages varied from 1 to 60 years old. Thirty-one (16.67%) subjects with oral cleft presented at least 1 tooth agenesis. Tooth agenesis was diagnosed in 12.5% of subjects with CL, in 18.7% of subjects with CLP and in 13% of subjects with CP. In the cleft group with tooth agenesis, premolar was the most common missing teeth (54.8%).

Fifty subjects with isolated tooth agenesis were included and the ages varied from 4 to 60 years old. Two subjects had 6 congenitally missing teeth, one had four congenitally missing teeth, 3 had three missing teeth, 20 had two missing teeth and the remaining 24 subjects just had one missing tooth. Upper lateral incisor was the most affected tooth (46%), followed by premolar (42%). One subject presented concomitant upper lateral incisor and premolar agenesis.

The SNP showed Hardy–Weinberg equilibrium. The AA genotype was the least common and was identified in 6 control subjects, 7 oral cleft subjects and in only 1 subject with tooth agenesis.

No statistically significant differences ($p=0.48$) in the frequency of genotype were observed between affected and unaffected group (oral cleft plus tooth agenesis *versus* controls). Allele A did not increased the risk for these craniofacial anomalies (oral cleft plus tooth agenesis) ($p=0.46$; OR=1.16, IC=0.77-1.75).

DISCUSSION

Non-syndromic oral cleft and tooth agenesis are complex polygenic diseases, and several modifying genes have been associated with their etiology [28, 29]. Some genes responsible for syndromes could provide

insights to understanding of more common isolated traits. Recent research has identified genetic mutations underlying syndromic forms of oral cleft. Mutations in TBX22 cause X-linked cleft palate with ankyloglossia [30]; in PVRL1, cleft lip and palate-ectodermal dysplasia syndrome [31]; in FGFR1, autosomal-dominant Kallmann syndrome [32]; and in IRF6 cause van der Woude syndrome [8]. Moreover, variation within IRF6 is a contributing factor to non-syndromic forms of oral cleft [12-14, 17-22] and isolate tooth agenesis [23, 24].

The occurrence of oral clefts and the development of tooth agenesis have a close embryological relationship in terms of timing, anatomical position [33] and, in some instances, these anomalies may share the same genetic background [14, 28, 29]. The relationship between cleft and tooth agenesis is interesting as it might reflect interactions between their etiologic mechanisms and may be able to provide insights for additional studies as well as aid in genetic counseling procedures [34]. In our cleft group, tooth agenesis outside cleft area was diagnosed in 16.67% of the subject. It was 3.5 times higher than the prevalence reported in the same unrelated population from Rio de Janeiro [35].

In the oral cleft group premolar was the most affected teeth. The relationship between premolar agenesis and oral cleft has been noted by others studies [5, 6, 36, 37]. Interestingly, the same variants in IRF6 gene that were associated with oral cleft were also associated with isolated tooth agenesis, with preferential missing premolar [23]. However, the specific nature of the relationship between premolar agenesis and oral cleft remains unclear.

Although innumerous studies have demonstrated that variants in IRF6 contribute to isolated oral cleft and tooth agenesis, just few reports has focused in the SNP (rs642961, G>A). Rahimov et al. 2008 first identified this variant as a contributor of oral cleft, in which the A allele was significantly overtransmitted in families with non-syndromic cleft. Table 3 summarized published studies about this polymorphic variant in different ethnic origin groups.

It is important to emphasize that the one essential aspect of the clefting research groups' effort is to replicate original findings by studies in different populations. Indeed, our finding were in agreement with Paranaiba et al (2010) that found a lack of involvement of this variant with oral cleft in a southeast Brazilian population[37]. Nevertheless, in our study we used the tooth agenesis

as a clinical marker for oral cleft aiming to increase the sophistication of the description of the phenotype of these traits.

Isolated tooth agenesis was associated with others variant in IRF6 in a Brazilian population [23]. In a Turkish population, linkage disequilibrium with the IRF6 locus was apparent for the marker rs642961 [24]. In this same Turkish population the results suggested a trend of association between certain palatine rugae patterns and this IRF6 variant [38].

Our study has some obvious limitations, a small sample size and a population with high ethnic admixture may be possible causes of bias in our results. These subjects were all from Rio de Janeiro, Brazil and represent a mixed ethnic population. According to the 2007 census, there were 11,714,000 people residing in the Metropolitan area of Rio de Janeiro. The population is comprised of a mix of Caucasians (European mainly Portuguese descent; 53.6%) and African descents (obviously of mixed European, 33.6% or not obviously mixed Africans, 12.3%). The remaining 0.5% of the population is Amerindian or Asian descents.

Zucchero et al (2004), in a multi-national collaborative study of families, tested other allelic variant in IRF6 in different populations. In a population of South America the association between oral cleft and IRF6 were not observed. However, the results of this same population, when the analysis was stratified by mitochondrial haplotype, reported that the association was related to a small subset of the population [14]. In our group, there was no difference in the frequency of genotypes and alleles in the different ethnic groups (data not show).

CONCLUSION

Our study reinforces the literature regarding the lack of association between oral cleft with/without tooth agenesis, isolated tooth agenesis with IRF6 rs642961 polymorphism in a Brazilian population.

The extensive surgical, dental alterations and speech involvement, as well as potential psychological sequelae, highlights the importance of elucidating the causes of these complex facial defects. Other genetics variant should be further explored in our population to help understand the heterogeneity underlying non-syndromic oral cleft and tooth agenesis.

- [1] Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 2002 Apr;61(4):248-56.
- [2] Murray JC, Daack-Hirsch S, Buetow KH, Munger R, Espina L, Paglinawan N, et al. Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997 Jan;34(1):7-10.
- [3] Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet.* 1999;8(10):1853-9.
- [4] Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, Stirrups DR. Hypodontia--a retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence Int.* 2005 Apr;36(4):263-70.
- [5] Larson M, Hellquist R, Jakobsson OP. Dental abnormalities and ectopic eruption in patients with isolated cleft palate. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1998 Jun;32(2):203-12.
- [6] Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *Journal of dental research.* 2007 Oct;86(10):986-91.
- [7] Ewing M, Ross RB. Soft tissue response to orthognathic surgery in persons with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 1993 May;30(3):320-7.
- [8] Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nature genetics.* 2002 Oct;32(2):285-9.
- [9] Paranaiba LM, Martelli-Junior H, Oliveira Swerts MS, Line SR, Coletta RD. Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *International journal of molecular medicine.* 2008 Oct;22(4):507-11.
- [10] Matsuzawa N, Shimozato K, Natsume N, Niikawa N, Yoshiura K. A novel missense mutation in Van der Woude syndrome: usefulness of fingernail DNA for genetic analysis. *Journal of dental research.* 2006 Dec;85(12):1143-6.
- [11] Matsuzawa N, Yoshiura K, Machida J, Nakamura T, Niimi T, Furukawa H, et al. Two missense mutations in the IRF6 gene in two Japanese families with Van der Woude syndrome. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2004 Oct;98(4):414-7.

- [12] Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population. *Birth defects research.* Jul;88(7):538-45.
- [13] Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19;351(8):769-80.
- [14] Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Orioli IM, Castilla EE. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *American journal of medical genetics.* 2007 Sep 1;143A(17):2075-8.
- [15] Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, et al. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nature genetics.* 2008 Nov;40(11):1341-7.
- [16] Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM, et al. Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genetic epidemiology.* 2008 Jul;32(5):413-24.
- [17] Pan Y, Ma J, Zhang W, Du Y, Niu Y, Wang M, et al. IRF6 polymorphisms are associated with nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *American journal of medical genetics.* Oct;152A(10):2505-11.
- [18] Wu T, Liang KY, Hetmanski JB, Ruczinski I, Fallin MD, Ingersoll RG, et al. Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Human genetics.* Oct;128(4):401-10.
- [19] Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, de Assis NA, Diaz-Lacava A, et al. IRF6 gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *European journal of oral sciences.* 2009 Dec;117(6):766-9.
- [20] Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *American journal of medical genetics.* 2005 Sep 1;137A(3):259-62.
- [21] Ghassibe M, Bayet B, Revencu N, Verellen-Dumoulin C, Gillerot Y, Vanwijck R, et al. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated

cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *Eur J Hum Genet.* 2005 Nov;13(11):1239-42.

[22] Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, et al. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *American journal of human genetics.* 2005 Jan;76(1):180-3.

[23] Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *American journal of medical genetics.* 2007 Mar 15;143(6):538-45.

[24] Vieira AR, Seymen F, Patir A, Menezes R. Evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and isolate tooth agenesis, in a Turkish population. *Archives of oral biology.* 2008 Aug;53(8):780-4.

[25] Moyers RE. Desenvolvimento da dentição e da oclusão. *MOYERS, RE.* 4ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1991:87-105.

[26] Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian dental journal.* 2007;18(2):148-52.

[27] Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 2001 Jul;11(7):1262-8.

[28] Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *Journal of dental research.* 2003 Mar;82(3):162-5.

[29] Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *Journal of dental research.* 2008 Feb;87(2):119-25.

[30] Braybrook C, Doudney K, Marcano AC, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA, et al. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nature genetics.* 2001 Oct;29(2):179-83.

[31] Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA, et al. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nature genetics.* 2000 Aug;25(4):427-30.

- [32] Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature genetics*. 2003 Apr;33(4):463-5.
- [33] Stahl F, Grabowski R, Wigger K. Epidemiology of Hoffmeister's "genetically determined predisposition to disturbed development of the dentition" in patients with cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006 Jul;43(4):457-65.
- [34] Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. *Birth defects research*. 2008 Aug 6.
- [35] Kuchler EC, Risso PA, Costa MD, Modesto A, Vieira AR. Studies of dental anomalies in a large group of school children. *Archives of oral biology*. 2008 May 17.
- [36] Kuchler E, Motta L, Vieira A, Granjeiro J. Side of Dental Anomalies and Taurodontism as Potential Clinical Markers for Cleft Subphenotypes. *Cleft Palate Craniofac J*. Apr 19.
- [37] Menezes R, Vieira AR. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008 Jul;45(4):414-9.
- [38] Murdoch AM, Patir A, Seymen F, Vieira AR. Studies of palatine rugae and interferon regulatory factor 6 variations in a group of families with sporadic hypodontia. *Journal of oral science*. 2009 Dec;51(4):521-6.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)