



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**LÍVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA**

Cirurgiã-dentista

**Avaliação de Polimorfismos Gênicos e Frequência de Anomalias Dentais em  
Pacientes com Fissura Labial e/ou Palatina Não-Sindrômica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Estomatopatologia na Área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

**PIRACICABA**

**- 2010 -**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

P212a	<p>Paranaíba, Lívia Maris Ribeiro. Avaliação de polimorfismos gênicos e frequência de anomalias dentais em pacientes com fissura labial e/ou palatina não-sindrômica / Lívia Maris Ribeiro Paranaíba. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Ricardo Della Coletta. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Anormalidades congênitas. 2. Fenda labial. 3. Anodontia. 4. Polimorfismo genético. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(eras/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Evaluation of polymorphisms and frequency of dental anomalies in patients with nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Congenital abnormalities. 2. Cleft lip. 3. Anodontia. 4. Genetic polymorphism

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Ricardo Della Coletta, Cleverton Roberto de Andrade, Edgard Graner, Marcelo Marcucci, Mário Sérgio Oliveira Swerts

Data da Defesa: 27-10-2010

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 27 de Outubro de 2010, considerou a candidata LÍVIA MARIS RIBEIRO PARANAÍBA aprovada.



---

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA



---

Prof. Dr. MARCELO MARCUCCI



---

Prof. Dr. CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE



---

Prof. Dr. EDGARD GRANER



---

Prof. Dr. MÁRIO SÉRGIO OLIVEIRA SWERTS

## **DEDICATÓRIA**

---

---

*Aos meus pais, **Darlene e Reinaldo (Nadico)**, pelos generosos ensinamentos de amor e caráter e pela confiança que sempre tiveram em mim, pelo apoio e incentivo para que eu sempre perseguisse os meus sonhos, por mais que significassem estarmos longe.*

*Ao meu irmão, **Breno**, à querida **Cida** e ao **Raphael**, símbolos de amor e união, por estarem sempre presentes mesmo quando ausentes.*

*A **Deus**, que me ajudou em todos os momentos, guiando meus passos, minha mente e meu coração.*

*Ao meu orientador, **Professor Dr. Ricardo Della Coletta**, por ter se revelado um verdadeiro Mestre, com sua postura sempre realista orientando e estimulando o exercício do pensamento científico e moral. Enfatizo meus sinceros votos de agradecimento pela oportunidade, orientação, compreensão, confiança e todos os ensinamentos transmitidos.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

---

Esta dissertação foi realizada com a participação e apoio de muitas pessoas e instituições dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**;

ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

aos Profs. Drs. **Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Expresso a minha admiração pela competência e seriedade com que realizam suas funções de ensino e pesquisa nesta instituição;

ao **Prof. Dr. Hercílio Martelli-Júnior** pelos preciosos ensinamentos científicos e de vida, pela confiança e oportunidade e, imensa generosidade. Serei sempre grata pelo suporte e compreensão, imprescindíveis para a adaptação em Alfenas e evolução dos trabalhos científicos desenvolvidos. A sua conduta sempre ética e otimista é um exemplo de vida e contagia todo o nosso ambiente de trabalho.

à **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado;

à Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, Minas Gerais, na pessoa do **Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts**, quem viabilizou este trabalho conjunto com a UNICAMP;

à participação do **Centro Pró-Sorriso de Alfenas (Centrinho)**, sem o qual este trabalho não seria possível;

aos verdadeiros companheiros de trabalho do Centrinho, **Julian, Elza, Edmilson** e todos os professores, em especial a **Prof. Dra. Letícia Monteiro de Barros**, pela amizade e companheirismo;

aos meus queridos amigos e companheiros de Laboratório, **Camila, Carolina Bitu, Débora, Fabiana, Elizabete, Lays, Luciana, Dr<sup>a</sup> Michelle Agostini, Manoela, Marco Antônio, Rose, Sibeles** pelo apoio, amizade e por terem tornado o laboratório de BioMol a minha segunda casa em Piracicaba.

especificamente, à pós-graduanda, **Andréia Bufalino**, pela grande colaboração, disponibilidade e parceria neste estudo;

aos pós-graduandos do curso de Estomatopatologia **Adriele, Ana Terezinha, Ana Carolina, Bruno, Felipe, Fernanda Basso, Fernanda Mariano, Marcondes, Marisol, Mariane, Marco Aurélio, Mário, Kátia, Renato, Rogério, Patrícia, Victor e Wilfredo**, pela convivência maravilhosa em Piracicaba;

a todos os pacientes, familiares e aos voluntários que se dispuseram, com tanto desprendimento e generosidade, a participar desta pesquisa;

a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu profundo agradecimento.

“Já perdoei erros quase imperdoáveis, tentei substituir pessoas insubstituíveis e esquecer pessoas inesquecíveis.

Já fiz coisas por impulso,  
Já me decepcionei com pessoas quando nunca pensei me decepcionar, mas também decepcionei alguém.

Já abracei pra proteger,  
Já dei risada quando não podia,  
Já fiz amigos eternos,  
Já amei e fui amado, mas também já fui rejeitado,  
Já fui amado e não soube amar.

Já gritei e pulei de tanta felicidade,  
Já vivi de amor e fiz juras eternas, mas "quebrei a cara" muitas vezes!  
Já chorei ouvindo música e vendo fotos,  
Já liguei só pra escutar uma voz,  
Já me apaixonei por um sorriso,

Já pensei que fosse morrer de tanta saudade e.....tive medo de perder alguém especial  
(e acabei perdendo)! Mas sobrevivi!

E ainda vivo!  
Não passo pela vida...  
e você também não deveria passar. Viva!!!

Bom mesmo é ir a luta com determinação,  
Abraçar a vida e viver com paixão,  
Perder com classe e vencer com ousadia,  
Porque o mundo pertence a quem se atreve

E  
A VIDA É MUITO  
para ser insignificante."

**Charles Chaplin**



## RESUMO

---

---

Fissuras do lábio e/ou palato (FL/P) representam a anomalia congênita mais comum em humanos. FL/P podem estar associadas a outras malformações, caracterizando uma síndrome, ou apresentar-se de forma isolada, recebendo a denominação não-sindrômica (FL/PNS). A etiologia das FL/PNS é complexa e envolve a participação de inúmeros genes, os quais estão sobre a influência de fatores ambientais. Alguns estudos demonstraram uma frequência elevada de anomalias dentais em pacientes com FL/PNS, sugerindo um defeito genético único para essas duas alterações. Os objetivos deste estudo foram: 1) verificar se polimorfismos nos genes responsáveis por síndromes que apresentam FL/P em seu espectro clínico, incluindo *TP63*, *MID1*, *PVRL1*, *RUNX2* e *TBX1*, podem contribuir para a etiologia das FL/PNS, e 2) determinar a frequência de anomalias dentais em pacientes com FL/PNS. Sete regiões polimórficas foram genotipadas por PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática) em amostras de DNA provenientes de 367 pacientes afetados por FL/PNS (grupo experimental) e de 413 indivíduos clinicamente normais (grupo controle). Para determinar a frequência de anomalias dentais em pacientes com FL/PNS, 296 pacientes com idade entre 12 e 30 anos, sem história de extração dental e tratamento ortodôntico prévio e que apresentavam documentação radiográfica foram avaliados. Dos 7 prováveis polimorfismos, apenas 3 foram confirmados em nossa população. Após correção para múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni, apenas o polimorfismo rs28649236 do gene *TBX1* demonstrou diferença significativa entre os grupos. O alelo G e os genótipos AG e GG ocorreram em uma frequência significativamente maior no grupo controle que no grupo experimental, e na presença do alelo G um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS foi observado ( $p=0,0002$ ; OR: 0,41; IC 95%: 0,25-0,67). Anomalias dentais foram identificadas em 57,7% ( $n=296$ ) dos pacientes com FL/PNS e pacientes com FL foram significativamente menos acometidos por anomalias dentais comparando-se

com pacientes com FP ou FLP ( $p=0,004$ ). Agenesia dental foi a mais frequentemente identificada entre os tipos de fissura, principalmente em pacientes com FLP e FP que em pacientes com FL ( $p=0,03$ ). O presente estudo demonstrou que o polimorfismo rs28649236 do gene *TBX1* apresenta um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS em uma população brasileira e que o risco de pacientes com FLP ou FP apresentar anomalias dentais é significativamente maior que o de pacientes com FL. Em adição, este estudo corrobora com evidências prévias que demonstraram a influência de genes responsáveis por síndromes contendo FL/P na etiopatogenia das FL/PNS.

Palavras-chave: Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica, Anomalias dentais, Síndromes com fissura labial e/ou palatina, Polimorfismo gênico.

## **ABSTRACT**

---

---

Cleft lip and/or cleft palate (CL/P) is the most common congenital anomaly in humans. CL/P may be associated with other malformations, featuring a syndrome, or present itself in an isolated form, denominated nonsyndromic (NSCL/P). NSCL/P etiology is complex and involves the participation of numerous genes, which are under the influence of environmental factors. Some recent studies have demonstrated a high frequency of dental anomalies in patients with NSCL/P, suggesting a common genetic defect for these two alterations. The objectives of this study were: 1) to verify whether polymorphic variants of genes responsible for syndromes that have CL/P in their clinical spectrum, including *TP63*, *MID1*, *PVRL1*, *TBX1* and *RUNX2*, may contribute to the etiology of NSCL/P, and 2) to determine the frequency of dental anomalies in patients with NSCL/P. Seven polymorphic regions were genotyped by PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction) in DNA samples from 367 patients affected by NSCL/P (experimental group) and 413 clinically normal subjects (control group). To determine the frequency of dental anomalies in patients with NSCL/P, 296 patients aged between 12 and 30 years without history of tooth extraction and orthodontic treatment and with radiographic documentation were evaluated. Out of 7 probable polymorphisms, only 3 were confirmed in our population. After correction for multiple comparisons by Bonferroni test, only rs28649236 *TBX1* polymorphism showed significant difference between groups. The allele G and the AG and GG genotypes occurred in a significantly higher frequency in controls than in the experimental group, and in the presence of the G allele a protective effect against NSCL/P was observed ( $p=0.0002$ ; OR: 0.41; 95% CI: 0.25-0.67). Dental anomalies were identified in 57.7% ( $n= 296$ ) of patients with NSCL/P and patients with CL were significantly less affected by dental anomalies compared with patients with CP or CLP ( $p=0.004$ ). Dental agenesis was the most frequently identified among the cleft types, especially in patients with CLP and ICP than in patients with FL ( $p=0.03$ ). The present study demonstrated that rs2864923

*TBX1* polymorphism has a protective effect in NSCL/P development in a Brazilian population, and patients with CLP or CP are frequently more affected by dental anomalies than patients with CL. In addition, this study corroborates with previous evidences demonstrating the influence of genes related to syndromes containing CL/P on etiopathogenesis of the NSCL/P.

Key words: Nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate, Dental anomalies, Syndromes with cleft lip and/or cleft palate, Polymorphism.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

---

Arg: Arginina

BMP4: *Bone morphogenetic protein 4* (gene da proteína 4 morfogenética dos ossos)

Cys: Cisteína

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico)

dNTPs: *Deoxynucleoside 5' triphosphate* (Desoxinucleotídeo trifosfato)

dTMP: Deoxitimidina monofosfato

dUMP: Deoxiuridina monofosfato

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EEC: *Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip/palate syndrome* (Síndrome da ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura lábio-palatina)

FGF: *Factor growth fibroblast* (gene do fator de crescimento de fibroblasto)

FL: Fissura labial

FLP: Fissura labial e palatina

FL/P: Fissura labial e/ou palatina

FL/PNS: Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica

FOXE1: *Forkhead box E1* (gene da família de fatores de transcrição tireoidianos)

FP: Fissura palatina

GABRB3: *Gamma-aminobutyric acid receptor, beta-3* (receptor ácido gama-aminobutírico, beta 3)

Gly: Glicina

IC: Intervalo de confiança

IRF6: *Interferon regulatory factor 6* (gene fator regulador de interferon 6)

JAG2: *Jagged 2* (gene dos ligantes de superfície celular para receptores transmembrânicos)

Leu: Leucina

Met: Metionina

MID1: *Midline 1* (gene relacionado com diferenciação e proliferação celular)

MSX: *Muscle Segment Homeobox* (gene da homeobox do segmento muscular)

MTHFD1: *Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1* (Metilenotetraidrofolato desidrogenase 1)

MTHFR: *5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase* (5,10-metilenotetraidrofolato redutase)

MTR: *5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase* (5-metiltetraidrofolato-homocisteina S-metiltransferase)

MYH9: *Myosin, heavy chain 9, nonmuscle* (gene da cadeia pesada da miosina não relacionada especificamente com tecidos musculares)

OD: *Optical density* (Densidade óptica)

OS: *Opitz syndrome* (Síndrome de Opitz)

OR: *Odds ratio*

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PCR-RFLP: *PCR-Reaction fragment length polymorfism* (PCR associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática)

Phe: Fenilalanina

PPS: *Popliteal pterygium syndrome* (Síndrome pterígio-poplíteo)

PTCH: *patched, drosophila, homolog gene* (homólogo humano do gene patched da drosófila)

PVRL: *Poliovirus receptor-like gene* (gene do receptor-Like de poliovirus)

RARA: *Retinoic acid receptor* (Receptor de ácido retinóico)

SAM: *sterile alpha motif* (motivo alfa-estéril)

Ser: Serina

SLC19A1: *Solute carrier family 19, member 1-* (membro 1 da família 19 de carreadores de soluto)

SUMO: *Small ubiquitin-like modifier 1* (modificador 1 de pequena proteínas ubiquitina-Like)

TBE: *Tris Borate EDTA buffer* (tampão Tris, ácido bórico e EDTA)

TBX1: *T-box transcription factor-1* (fator de Transcrição T-box 1)

TFAP2A: *Transcription factor AP-2 alpha* (activating enhancer binding protein 2 alpha) – fator de transcrição AP-2 *alpha* (acentuadora da atividade de ligação da proteína 2 *alpha*)

TGFA: *Transforming Growth Factor  $\alpha$*  (fator de Crescimento Transformante  $\alpha$ )

TGFB: *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (fator de Crescimento Transformante  $\beta$ )

Thr: Treonina

TP63: *Tumor protein p63* (gene que codifica para a proteína tumoral p63 homólogo da p53).

Tyr: Tirosina

Val: Valina

VWS: *van der Woude syndrome* (Síndrome de van der Woude)

## **SUMÁRIO**

---

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>5</b>
2.1. Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS)	5
2.2. Embriologia	7
2.3. Dados Epidemiológicos	8
2.4. FL/PNS e Anomalias Dentais	10
2.5. Etiologia	12
2.5.1. Fatores Ambientais	14
2.5.2. Fatores Genéticos	19
<b>3. PROPOSIÇÃO</b>	<b>33</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1. Aprovação do comitê de ética em pesquisa	35
4.2. População	35
4.2.1 Para Análise dos Polimorfismos Gênicos	35
4.2.2 Para Análise das Anomalias Dentais	35
4.3. Seleção dos Genes Candidatos e dos Polimorfismos Gênicos	37
4.4. Coleta das Amostras para Análise dos Polimorfismos	37
4.5. Isolamento do DNA	38



4.6. PRC-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase Associada à Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição Enzimática)	38
4.7. Análise Estatística	39
4.7.1. Para Análise dos Polimorfismos Gênicos	39
4.7.2. Para Análise das Alterações Dentais	40
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
5.1. Análise dos Polimorfismos Gênicos	43
5.1.1. Características Gerais dos Grupos	43
5.1.2. Frequência Alélica e Genotípica dos Polimorfismos	44
5.1.2.1 Polimorfismo rs7940667 no Gene <i>PVRL1</i>	45
5.1.2.2. Polimorfismo rs28649236 no Gene <i>TBX1</i>	46
5.1.2.3. Polimorfismo rs4819522 no Gene <i>TBX1</i>	48
5.1.3. Interações entre <i>PVRL1</i> e <i>TBX1</i> e o risco preditivo para FL/PNS	53
5.2. Anomalias Dentais em Pacientes com FL/PNS	55
5.2.1. Características dos Pacientes com FL/PNS	55
5.2.2. Frequência das Anomalias Dentais	56
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
6.1. Polimorfismos Gênicos e FL/PNS	65
6.2. Anomalias Dentais e FL/PNS	69
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>75</b>

**REFERÊNCIAS****ANEXOS**

**ANEXO I:** Certificado do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

As fissuras orofaciais estão entre as alterações congênitas mais prevalentes nos seres humanos (Gorlin *et al.*, 2001; Stanier & Moore, 2004; Jugessur *et al.*, 2009) e apresentam um importante impacto social e uma fonte de substancial morbidade e mortalidade mundial (Murray, 2002). Dentre as fissuras orofaciais, as fissuras labiais e/ou palatinas (FL/P) são as mais prevalentes, e em 70% dos indivíduos se apresentam como não-sindrômicas (FL/PNS), ou seja, sem malformações estruturais nos demais órgãos e sem alterações comportamentais e/ou cognitivas (Schutte & Murray, 1999; Gorlin *et al.*, 2001). Os demais 30% ocorrem por desordens mendelianas (autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X), cromossômicas, teratogênicas e condições esporádicas que incluem defeitos congênitos (Schutte & Murray, 1999; Thomas *et al.*, 2008).

A incidência das FL/PNS é de aproximadamente 1 em cada 500-2.000 nativos, variando de acordo com a localização geográfica, etnia/raça e condição sócioeconômica da população estudada (Bender, 2000). Na América do Sul, estudos encontraram uma incidência aproximada de 1,1 casos de FL/PNS para cada 1.000 crianças nascidas vivas (Vieira *et al.*, 2003). No Brasil, os estudos quanto à incidência de FL/PNS são escassos e variam consideravelmente. De acordo com os levantamentos brasileiros, a incidência de FL/PNS varia de 0,19 a 1,54 para cada 1.000 nascimentos (Loffredo *et al.*, 2001a; Martelli-Júnior *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009). Não se sabe se esta diferença epidemiológica é real ou associada a diferenças metodológicas.

As FL/P podem ser classificadas em 3 grupos, tendo como referência anatômica o forame incisivo: (1) fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), (2) fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP) e (3) fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP) (Spina *et al.*, 1972). Considerando o tipo de fissura, alguns estudos observaram uma maior frequência das FLPs (Menegotto & Salzano, 1991; Tolarova & Cervenka, 1998; Shapira *et al.*, 1999; Rajabian & Sherkat, 2000; Cooper *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2004; Martelli-Junior

*et al.*, 2006). No entanto, a frequência das FPs (Antoszewski & Kruk-Jeromin, 1997; Bellis & Wohlgemuth, 1999; Stoll *et al.*, 2000) ou das FLs (Nagem Filho *et al.*, 1968) pode ser maior que a das FLPs.

Mesmo representando uma alteração do desenvolvimento comum, a etiopatogenia das FL/PNS permanece obscura. Tal desconhecimento é provavelmente reflexo da vasta diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos na embriogênese facial com a participação de múltiplos genes e da influência de fatores ambientais (Carinci *et al.*, 2007; Vieira, 2008). Dentre os principais fatores de risco ambiental relacionados à etiologia das FL/PNS estão o uso de medicamentos (Zarante *et al.*, 2009), o consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo durante a gestação (Vieira, 2008; Zarante *et al.*, 2009; Leite & Koifman, 2009; Jia *et al.*, 2009), a dieta e a suplementação vitamínica materna, particularmente durante o primeiro trimestre de gestação (Johnson & Little, 2008). Atualmente, os principais estudos sobre a etiopatogenia das FL/PNS buscam determinar o papel das variantes polimórficas dos genes associados às vias de sinalização celular que participam da formação do lábio e/ou palato, bem como o papel dos fatores ambientais na modulação da expressão e função destes genes. Nos últimos anos foram identificados genes que quando mutados resultam em síndromes que contêm a FL/P em seu cenário clínico, abrindo a perspectiva de que polimorfismos nesses genes possam também contribuir para a etiologia das FL/PNS (Scapoli *et al.*, 2008, Shi *et al.*, 2009). Dentre esses genes, destacam-se o gene *TP63*, responsável pela síndrome da ectrodactilia, displasia ectodérmica e FL/P, *MID1*, o qual é responsável pela síndrome de Opitz, *PVRL1*, que causa a síndrome da displasia ectodérmica e FL/P, *RUNX2*, responsável pela displasia cleidocraniana e *TBX1*, responsável pela síndrome da deleção 22q11.2.

Estudos evidenciaram que as FL/PNS e a odontogênese apresentam semelhanças embriológicas em relação ao tempo de formação e à posição anatômica, e alguns estudos apontam para uma ligação entre essas estruturas e sugerem que as anomalias dentais podem representar um subfenótipo das FL/PNS (Peters *et al.*, 1998; Weinberg *et al.*, 2006; Letra *et al.*, 2007; Menezes &

Vieira, 2008). Uma frequência elevada de anomalias dentais foi relatada em pacientes com FL/PNS (Jordan *et al.*, 1966; Werner & Harris, 1989; Tsai *et al.*, 1998; Shapira *et al.*, 2000; Slayton *et al.*, 2003, Letra *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2008; Tereza *et al.*, 2009) e a gravidade das anomalias parece estar diretamente relacionada ao tipo de fissura (Slayton *et al.*, 2003; Vieira, 2003; Aizenbud *et al.*, 2005; Letra *et al.*, 2007; Menezes & Vieira, 2008). Entre os grupos de anomalias dentais, as de número, tamanho, forma e posição são as mais comuns em pacientes com FL/PNS (Tsai *et al.*, 1998; Shapira *et al.*, 2000, da Silva *et al.*, 2008).

No presente estudo, nós investigamos a distribuição alélica e genotípica de variantes polimórficas nos genes *TP63*, *MID1*, *PVRL1*, *RUNX2* e *TBX1* entre indivíduos normais e pacientes com FL/PNS e analisamos a frequência de anomalias dentais em pacientes com FL/PNS.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

---

### **2.1. Fissura Labial e/ou Palatina Não-sindrômica (FL/PNS)**

As FL/P são anomalias congênitas caracterizadas por regiões de descontinuidade no lábio e/ou palato, devido a ausência de fusão de um ou mais dos processos faciais embrionários. As FL/P podem ser restritas ao lábio superior (FL), restritas ao palato (FP) ou envolver as duas estruturas simultaneamente (FLP). As FL/P podem ser isoladas ou associadas a um universo de mais de 400 diferentes síndromes que têm a FL/P como uma característica fenotípica (Gorlin *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2008). Quando isoladas, a denominação FL/PNS é aplicada.

As FL/PNS apresentam um impacto significativo para a saúde pública em termos de despesas médicas e serviços relacionados, bem como um efeito social importante para os pacientes e seus familiares (Berk & Marazita, 2002; Mossey *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo de um paciente com FL/PNS até a vida adulta foi estimado em 100.000 mil dólares (Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov>). Crianças afetadas por FL/PNS podem necessitar de cuidados de uma equipe multiprofissional durante toda a vida em decorrência dos diversos problemas ocasionados pela malformação, com destaque para as dificuldades de alimentação, fonação e audição e alterações dentais, além da interferência social e psicológica que a deformidade em si acarreta. Pacientes com FL/PNS apresentam maior morbidade e mortalidade quando comparados a indivíduos sem fissura (Christensen *et al.*, 2004). Contribuindo para o aumento da mortalidade, destaca-se a maior ocorrência de distúrbios psiquiátricos e de neoplasias malignas nesses indivíduos (Christensen & Mortensen, 2002). Anormalidades estruturais, incluindo diminuição do volume cerebral e cerebelar e alterações na trajetória do desenvolvimento do cérebro, foram identificadas em associação às FL/PNS (Nopoulos *et al.*, 2007; Vieira, 2008). Marcucio e colaboradores (2005) demonstraram que defeitos na sinalização celular do prosencéfalo podem levar a grande variedade de

malformações craniofaciais, incluindo a FL/PNS. Em adição, Christensen & Mortensen (2002) demonstraram que pacientes fissurados apresentam um risco aumentado de hospitalização por distúrbios psiquiátricos. Então, distúrbios psiquiátricos podem ser interpretados sob a óptica de que a embriogênese do cérebro e da face estão intimamente relacionadas, e uma alteração no desenvolvimento facial pode direcionar um desenvolvimento anormal do cérebro (Nopoulos *et al.*, 2007).

Evidências epidemiológicas encontraram incidência significativamente maior de neoplasias malignas de mama e cérebro entre mulheres com FL/PNS e de pulmão entre homens com FL/PNS comparados com pacientes normais (Bille *et al.*, 2005). A explicação para tal fato não é conhecida, contudo é hipotetizado que a associação entre FL/PNS e neoplasia maligna reflita a origem comum para essas doenças, ou seja, os mesmos genes alterados podem agir tanto no desenvolvimento das fissuras quanto na gênese do tumor (Narod *et al.*, 1997; Nishi *et al.*, 2000, Taioli *et al.*, 2010). Suportando essa hipótese, destaca-se a identificação de mutações em caderina (*CDH1*), uma molécula de adesão celular expressa por células epiteliais, em 2 famílias, segregando-se membros com neoplasia maligna gástrica difusa e FL/PNS (Frebourg *et al.*, 2006). Além disso, Menezes e colaboradores (2009) identificaram que o gene *AXIN2*, o qual é associado com FL/PNS, quando mutado, aumenta a susceptibilidade para neoplasia maligna de cólon. Interessantemente, pais de crianças com FL/PNS também apresentam risco elevado para o desenvolvimento de neoplasias malignas, particularmente linfomas e leucemias (Zhu *et al.*, 2002).

Em geral, uma equipe multiprofissional necessária para melhor acompanhar e tratar pacientes com FL/PNS conta com cirurgiões plásticos, cirurgiões dentistas, fonoaudiologistas, psicólogos, nutricionistas, otorrinolaringologistas, pediatras, protesistas bucomaxilofacial, fisioterapeutas e geneticistas. No entanto, um protocolo padrão para o atendimento e reabilitação dos pacientes com FL/PNS ainda continua como motivo de preocupação em países desenvolvidos e

subdesenvolvidos por conta da ausência de sistematização entre os serviços especializados (WHO, 2002; Paranaíba *et al.*, 2009).

## **2.2. Embriologia**

O desenvolvimento do lábio e do palato envolve uma cascata de eventos de alta complexidade, coordenados pela interação de fatores de transcrição e sinalizadores moleculares juntamente com interações célula-célula e aquisição de polarização celular que são essenciais para o desenvolvimento normal da face durante a embriogênese (Stanier & Moore, 2004; Mossey *et al.*, 2009). As regiões do lábio e do palato são desenvolvidas a partir do palato primário e secundário. O palato primário contribui para a formação do lábio e a porção pré-maxilar da maxila. O palato secundário é o primórdio das partes dura e mole do palato (Mossey *et al.*, 2009).

As FL/P desenvolvem-se durante os estágios precoces da embriogênese, sendo as formações do lábio superior e do palato temporalmente diferentes. Durante a quarta semana de gestação, células da crista neural provenientes do tubo neural anterior migram para formar a primórdia facial. Dela surge o processo nasal medial e lateral que se fundem ao processo maxilar para formar a parte central do lábio superior, o palato primário e o nariz. O palato secundário começa a ser formado na sexta semana de gestação. Inicialmente, as placas palatinas do palato secundário aparecem como duas extensões no lado interno da maxila, ao longo da superfície lateral da língua. Na nona semana, ambas as placas palatinas sofrem uma rápida transformação horizontal, movendo-se sobre a língua e fusionando-se uma com a outra e com o septo nasal. Em seguida, o mesênquima palatino se diferencia em elementos musculares e ósseos que correlacionam com a posição do palato mole e duro, respectivamente. Na décima semana da embriogênese, os processos fusionados provenientes do palato primário e secundário e do septo nasal estão completos. Assim, o desenvolvimento do palato secundário em mamíferos divide o espaço oronasal em cavidades oral e nasal,



permitindo que a mastigação e a respiração sejam realizadas simultaneamente (Sperber, 2002).

Desta forma, alterações na fusão das proeminências maxilares e nasal média e/ou das placas palatinas resultam nas fissuras em suas respectivas áreas (Wong & Hägg, 2004; Carinci *et al.*, 2007; Pegelow *et al.*, 2008). FL/P aparece comumente como FL com ou sem FP ou FP isolada. Essa subdivisão é validada pela constatação de que, na maioria dos casos, FL com ou sem FP e FP isolada não segregam na mesma família (Mossey *et al.*, 2009). Adicionalmente, há evidências de que FP isolada comporta-se como uma entidade distinta geneticamente da FL e FLP (Fraser, 1970).

### **2.3. Dados Epidemiológicos**

Embora não seja conhecida a prevalência das FL/PNS em todas as regiões do mundo, os estudos disponíveis indicam que a malformação afeta aproximadamente 1 em cada 500 a 2.000 nativos, dependendo da origem geográfica, da etnicidade, do gênero e do padrão sócioeconômico da população estudada (Gorlin *et al.*, 2001; Mossey & Little, 2002; Murthy & Bhaskar, 2009). Considerando-se as diferentes etnias, a prevalência das FL/PNS é pequena entre africanos e descendentes de africanos, intermediária entre os caucasianos e alta entre as populações de ameríndios e asiáticos (Vieira *et al.*, 2002; Mossey & Little, 2002; Vieira *et al.*, 2008c). No entanto, a noção de que os asiáticos apresentam uma maior prevalência de FL/PNS foi contestada pela evidência de que muitas taxas de prevalência publicadas incluíram gestações com nascidos vivos e natimortos, e também, ausência de distinção entre as formas sindrômicas e não-sindrômicas de FL/P (Cooper *et al.*, 2006). A prevalência entre os latino-americanos é menor do que em americanos caucasianos, mas ainda é superior em afroamericanos (Murthy & Bhaskar, 2009).

Em geral, dados epidemiológicos provenientes de diversas populações mostram que as incidências das FL e FLP são maiores do que as das FP, e que o gênero masculino é mais afetado pelas FL/PNS do que o feminino, na ordem de

2:1 (revisado por Mossey & Little, 2002). FP apresenta uma prevalência de 1/1.500-2.000 nascidos vivos e apresenta uma relação de 0,73:1 entre homens e mulheres caucasianas (revisado por Murthy & Bhaskar, 2009). Ainda, considerando a lateralidade, o lado esquerdo é mais acometido do que o direito (2:1) (Lidral *et al.*, 2008; Murthy & Bhaskar, 2009).

Poucos são os estudos que analisaram a frequência das FL/PNS na população brasileira. Loffredo e colaboradores (2001a) realizaram um estudo durante um período de 20 anos no Hospital para Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (Centrinho), Bauru-SP, e revelaram uma prevalência de 0,19 casos de fissuras orofaciais para cada 1.000 nascidos vivos. Estudo posterior realizado nesse mesmo Centro encontrou uma maior frequência das FLP (37,1%), e os homens foram os mais afetados, embora tenha existido um predomínio de mulheres entre as FP isoladas (Freitas *et al.*, 2004). Nosso grupo tem participado de estudos que analisaram a prevalência de FL/PNS no Centro para Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas, Alfenas-MG. No primeiro estudo, concluído em 2006, levando em consideração o número de nascidos vivos com e sem FL/PNS na região sul do Estado de Minas Gerais, observou-se prevalência de 1,46 casos de FL/PNS para cada 1.000 nativos, com uma maior frequência em crianças caucasianas do gênero masculino (Martelli-Junior *et al.*, 2006). O segundo estudo observou maior frequência de FLP (39,68%), seguida por FL (38,09%) e FP (22,23%) (Martelli-Junior *et al.*, 2007). Esse estudo também demonstrou que a relação entre homens e mulheres foi de 1,3:1, sendo os homens 2,57 vezes mais atingidos por FLP do que as mulheres. As FL unilaterais foram mais frequentes que as bilaterais (Martelli-Junior *et al.*, 2007). Um estudo conduzido no município de Campos dos Goyatazes-RJ encontrou uma prevalência similar àquela observada no sul do estado de Minas Gerais, demonstrando uma incidência de 1,35 casos de FL/PNS para cada 1.000 nativos (Nunes *et al.*, 2007). Em um estudo recente, Rodrigues *et al.* (2009) relataram 5.764 novos casos de fissuras orofaciais em várias regiões

do Brasil e encontraram uma prevalência estimada de 0,36/1.000 casos em um período de 5 anos, com uma proporção de 1,6 homens para cada mulher.

Como mencionado anteriormente, as FL/P podem ser isoladas ou associadas a um universo de mais de 400 diferentes síndromes que têm a FL/P como uma característica fenotípica (Gorlin *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2008). A maioria dos estudos sugere que cerca de 70% dos casos de FL/P surgem na ausência de outras anomalias (FL/PNS) (Jugessur & Murray, 2005; Jugessur *et al.*, 2009; Mossey *et al.*, 2009). Uma subdivisão mais apurada foi recentemente proposta com base na presença ou ausência de outras características craniofaciais clínicas e subclínicas, visando auxiliar na definição do fenótipo e na busca da etiologia genética da condição (revisado por Weinberg *et al.*, 2006). Essa subfenotipagem se baseia na presença de anomalias dentais, alterações musculares, incluindo defeitos no músculo orbicular da boca, e anormalidades craniofaciais como alterações antropométricas do cérebro (Weinberg *et al.*, 2006; Marazita, 2007; Murthy & Bhaskar, 2009). Em adição, esses estudos propuseram uma avaliação dos parentes “não afetados” dos indivíduos com FL/PNS, visto que eles podem apresentar algumas características menores ou subclínicas. Dessa forma, tais indivíduos poderiam ser carreadores do alelo causador da doença sem apresentarem a FL/PNS (indivíduos portadores). Exemplificando tal situação, Neiswanger e colaboradores (2007) identificaram que parentes de indivíduos fissurados apresentaram 2 vezes mais descontinuidade no músculo orbicular oral superior do que indivíduos controle.

#### **2.4. FL/PNS e Anomalias Dentais**

Estudos demonstram que a odontogênese e a formação do lábio e do palato ocorrem em períodos espacial e temporalmente semelhantes, além de que muitos dos genes envolvidos nesses processos são os mesmos (Tonge, 1967; Schutte & Murray, 1999; Menezes *et al.*, 2008; Letra *et al.*, 2009; Nakatomi *et al.*, 2010). O epitélio odontogênico sob os processos maxilares e mandibulares pode ser detectado no início da quinta semana de vida intrauterina e as FL/P ocorrem

entre a quarta e sétima semana (Tonge, 1967). Reconhecendo que eventos como proliferação, diferenciação e apoptose definem essas estruturas, distúrbios nestes processos, por influências ambientais e/ou genéticas, podem predispor o desenvolvimento de anomalias dentais e FL/PNS.

Indivíduos com FL/PNS apresentam, consideravelmente, mais anomalias dentais quando comparados com pacientes normais, e a gravidade das anomalias parece estar diretamente relacionada à gravidade da fissura (Kraus *et al.*, 1966; Ranta, 1986; Slayton *et al.*, 2003; Letra *et al.*, 2007; Küchler *et al.*, 2010). As anomalias dentais de número são as mais comumente identificadas em indivíduos com FL/PNS, especialmente a hipodontia (ausência congênita de 1 até 6 dentes). Os incisivos laterais em área de fissura ou em região contralateral e os pré-molares são os dentes mais afetados (Tsai *et al.*, 1998; Shapira *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2008; Menezes & Vieira, 2008).

Evidências apontam para um evento genético comum entre hipodontia e FL/PNS. Por meio de estudos em humanos e com camundongos *knockouts*, defeitos em 3 genes, *MSX1*, *PAX9* e *TGFB3*, foram apontados como possíveis causadores de FL/PNS associada à hipodontia (Satokata & Maas, 1994; Peters *et al.*, 1998; van den Boogaard *et al.*, 2000; Slayton *et al.*, 2003). Dois desses genes, *MSX1* e *PAX9*, também parecem estar envolvidos em hipodontia isolada (Stockton *et al.*, 2000; Lidral & Reising, 2002). Além disso, análises de sequenciamento gênico evidenciaram que aproximadamente 2% dos indivíduos com FL/PNS apresentam mutações em *MSX1* (Jezewski *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004). Em conjunto, estes resultados sugerem que indivíduos com hipodontia, especialmente se eles apresentarem membros familiares com FL/PNS, podem estar carreando *loci* susceptíveis para FL/PNS (Weinberg *et al.*, 2006).

Dentes supranumerários representam a segunda anomalia dental mais frequentemente observada em pacientes com FL/PNS, segundo Lourenço Ribeiro e colaboradores (2003). Eles são mais frequentes na dentição permanente e na maxila, podendo causar alterações como diastema, desvio da erupção e impactação dental (Hansen & Mehdinia, 2002; Lourenço Ribeiro *et al.*, 2003; da

Silva *et al.*, 2008). Dentes menores, chamados de microdentes, também parecem estar associados a fissuras orofaciais (Menezes & Vieira, 2008). Outras anomalias comumente identificadas em pacientes com FL/PNS incluem defeitos na formação do esmalte (hipoplasias de esmalte), erupção dental ectópica, giroversão, taurodontismo, impactação dental, atraso na erupção, dentes natais e dentes neonatais (Neves *et al.*, 2002; Letra *et al.*, 2007; Tortora *et al.*, 2008; Kùchler *et al.*, 2010). Embora o significado dessas anomalias ainda seja incerto, as conclusões da maioria dos estudos demonstram que anomalias dentais podem representar microformas de FL/PNS, portanto compartilhando a mesma base genética (Weinberg *et al.*, 2006; Letra *et al.*, 2007; Menezes & Vieira, 2008).

## **2.5. Etiologia**

Mesmo representando um defeito congênito comum, a etiopatogenia das FL/PNS permanece incerta por ser difícil determinar o exato momento e a razão precisa pela qual não houve coalescência dos processos que dão origem à face (Vieira, 2008). Isto é, em grande parte, reflexo da complexidade e da diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos na embriogênese, que são influenciados pela participação de múltiplos genes e de fatores ambientais (Carinci *et al.*, 2007; Vieira, 2008).

Em comparação com outros defeitos congênitos, fissuras orofaciais têm uma alta taxa de recorrência familiar (Lie *et al.*, 1994), embora um padrão clássico de herança mendeliana não seja sempre facilmente identificado (Natsume *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2008c). Fogh-Andersen (1942) foi o primeiro a observar, em um estudo populacional, a existência de um componente hereditário associado ao desenvolvimento das FL/PNS. Em um estudo clássico, Curtis e colaboradores (1961) demonstraram que o risco de uma segunda ocorrência de FL/PNS em uma mesma família é de 4% se uma criança for afetada, 4% se os pais forem afetados, 9% se existirem duas crianças afetadas e 17% se os pais e uma criança forem afetados. Já um estudo norueguês, avaliando 4.138 crianças com FL/PNS, identificou que o risco de recorrência de fissura em familiares de primeiro grau foi

de 32% para FL e 56% para FP, sugerindo uma forte base genética para FP comparada com FL (Sivertsen *et al.*, 2008). Recentemente, Palmieri *et al.* (2008), em um estudo envolvendo 216 crianças com FL/PNS, observaram que 120 (55,56%) crianças apresentaram história familiar prévia de fissura. O trabalho do nosso grupo, avaliando a incidência familiar de FL/PNS em 185 pacientes, identificou que 35,13% dos indivíduos apresentaram histórico familiar de FL/PNS, sendo os primos (54,37%) e os irmãos (21,05%) os mais afetados independentemente do tipo de fissura (Martelli *et al.*, 2010). Em estudos com gêmeos, a taxa de concordância observada de 40 a 60% em gêmeos monozigóticos é muito maior do que a concordância de 3 a 5% identificada em gêmeos dizigóticos. A alta taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos fornece evidências convincentes para um componente genético forte para as fissuras orofaciais, mas não descarta a participação de outros fatores, como o ambiental, na gênese destas alterações (Jugessur *et al.*, 2009).

Famílias afetadas por um tipo de fissura não apresentam risco aumentado para um outro tipo de fissura, refletindo assim as origens distintas de desenvolvimento de cada forma da anomalia (Jugessur & Murray, 2005). No entanto, ocasionalmente, FL/P e FP isolada podem ocorrer dentro de uma mesma família, sugerindo que existe, pelo menos, alguma sobreposição na etiologia desses 2 tipos de fissuras. Tais situações são mais frequentes em síndromes com FL/P como parte do fenótipo, como a síndrome de van der Woude (VWS, OMIM #119300) causada por mutações no gene do fator regulador de interferon 6 (*IRF6*) (Kondo *et al.*, 2002) e FL/P com hipodontia causada por mutações em *MSX1* (van den Boogaard *et al.*, 2000).

O casamento consanguíneo, uma prática bastante comum em países do oriente médio, parece ser responsável por uma predisposição genética para o desenvolvimento de malformações congênitas, incluindo as FL/PNS (Kanaan *et al.*, 2008). Estudo recentemente realizado com uma população do Rio de Janeiro revelou uma forte associação entre consanguinidade e risco elevado para o nascimento de uma criança com FL/PNS (Leite & Koifman, 2009). Similarmente,

estudos realizados por diferentes populações demonstraram uma significativa associação entre casamentos de parentes de primeiro grau e FL/PNS (Stoll *et al.*, 1991; Zlotogora, 1997; Rajabian & Sherkat, 2000, Rittler *et al.*, 2001, Harville *et al.*, 2005, Jamilian *et al.*, 2007). Provavelmente, uma possível explicação para tal correlação é a predisposição genética como um componente recessivo associado à FL/PNS (Stoll *et al.*, 1991). Contudo, essa mesma associação não foi observada em outros estudos retrospectivos (Calzolari *et al.*, 1988, González *et al.*, 2008). Um trabalho realizado pelo nosso grupo, avaliando 246 casos de FL/PNS quanto à consanguinidade, evidenciou que 6,1% dos casos apresentaram histórico de casamento entre primos de primeiro grau (Aquino *et al.*, In press).

Além da evidente e determinante participação dos genes no desenvolvimento do lábio e do palato, há uma enorme variedade de agentes teratogênicos externos que podem influenciar tal programação genética, embora poucos deles estejam comprovados. Apesar da grande controvérsia na literatura sobre a etiologia das fissuras, é bem aceito que elas correspondam a alterações multifatoriais, resultantes da associação de fatores genéticos e ambientais (Murray, 2002; Wong & Hägg, 2004; Vieira *et al.*, 2005a; Carinci *et al.*, 2007; Vieira, 2008; Jia *et al.*, 2009; Jianyan *et al.*, 2009; Kistner *et al.*, 2009; Leite & Koifman, 2009; Mossey *et al.*, 2009).

### **2.5.1. Fatores Ambientais**

Dados experimentais e epidemiológicos sugerem que fatores ambientais, incluindo dieta e suplementação vitamínica materna, alcoolismo, tabagismo, exposição à fumaça do tabaco, teratógenos no ambiente de trabalho e em casa e uso de alguns medicamentos durante o primeiro trimestre de gestação, podem ser importantes na etiologia das FL/PNS (Jamilian *et al.*, 2007; Vieira, 2008; Mossey *et al.*, 2009).

O tabagismo materno durante o primeiro trimestre de gestação é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das FL/PNS (Little *et al.*, 2004a,b; Honein *et al.*, 2007). É Interessante observar que

embora a influência pareça ser pequena, o tabagismo passivo durante o primeiro trimestre de gestação também eleva o risco de nascimento de uma criança com FL/PNS (Jiyanan *et al.*, 2009). Honein e colaboradores (2007) observaram que o tabagismo materno contribui em 4% para o risco de desenvolvimento de todos os tipos de FL/PNS e em 12% para os casos de FLP bilateral. Além disso, é sugerido que o risco aumenta com o número de cigarros consumidos durante a gestação (Lorente *et al.*, 2000; Little *et al.*, 2004a). Embora seja bem aceito que o consumo de tabaco durante a gestação aumenta o risco de FL/PNS, alguns poucos estudos falharam em encontrar tal associação (Beaty *et al.*, 1997; Chevrier *et al.*, 2008; Zarante *et al.*, 2009). Uma interação sinérgica entre uma variante polimórfica do gene *TGFA* e o consumo de tabaco durante a gestação no risco para o desenvolvimento das FL/PNS foi observada por Hwang e colaboradores (1995), mas investigações recentes falharam, também, ao tentar encontrar tal correlação (revisado por Zeiger *et al.*, 2005; Chevrier *et al.*, 2008). Recentemente, alguns estudos avaliaram a existência de uma interação entre tabagismo e polimorfismos em genes envolvidos nas vias de desintoxicação metabólica de componentes do tabaco no desenvolvimento das FL/PNS (Shi *et al.*, 2007; Chevrier *et al.*, 2008). Entre esses genes, *CYP* e *NAT* (enzimas relacionadas com o metabolismo de uma ampla variedade de agentes tóxicos e carcinógenos) e *GST* (enzima responsável pela desintoxicação de vários compostos orgânicos) foram avaliados, e os resultados foram inconclusivos (van Rooij *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2007; Chevrier *et al.*, 2008; Lie *et al.*, 2008). No entanto, uma interação entre tabagismo materno e a presença de uma deleção no gene *GSTT1* (*GSTT1-nulo*) observada em duas diferentes populações (Iowa e Dinamarca) de pacientes com FL/PNS foi significativa. *GSTT1* catalisa a conjugação da glutathiona reduzida, um antioxidante que protege as células de toxinas como os radicais livres que são causados pelo fumo. A análise das informações indicou que, se uma mulher grávida fumar 15 cigarros ou mais por dia, as chances de seu feto *GSTT1-nulo* desenvolver FL/PNS aumentam em quase 20 vezes (Shi *et al.*, 2007).



O alcoolismo materno é uma causa bem conhecida da síndrome do alcoolismo fetal (Clarren & Smith, 1978). No entanto, a contribuição do álcool para o desenvolvimento de FL/PNS ainda é incerta, com alguns trabalhos demonstrando associação positiva (Romitti *et al.*, 1999; Lorente *et al.*, 2000; Chevrier *et al.*, 2005; DeRoo *et al.*, 2008) e outros não (Meyer *et al.*, 2003; Romitti *et al.*, 2007). Segundo DeRoo *et al.* (2008), esses resultados conflitantes são, em parte, decorrentes da dificuldade de padronização dos participantes do estudo, da mensuração da quantidade e do tempo de consumo do álcool e das interpretações dos resultados de forma arbitrária. Além disso, o contexto social e dietético relacionado ao consumo do álcool são variados e complexos e podem incluir efeitos modificadores e somatórios de nutrição, tabagismo, stress e/ou uso de drogas (Mossey *et al.*, 2009). Estudos realizados com animais e humanos demonstraram que tanto a frequência quanto a quantidade total de álcool consumida durante a gestação podem apresentar um importante efeito teratogênico para o feto em desenvolvimento (Gladstone *et al.*, 1996; Sokol *et al.*, 2003). Em geral, os estudos que encontraram associação positiva entre o uso de álcool durante o primeiro trimestre de gestação e/ou durante a gravidez e o desenvolvimento de FL/PNS demonstraram um risco aumentado de 1,36 a 4 vezes entre mães que se enquadram em uma categoria de consumo elevado de álcool (média de  $\geq 5$  doses por ocasião) (Werler *et al.*, 1991; Munger *et al.*, 1996; Shaw & Lammer, 1999; Romitti *et al.*, 1999; Lorente *et al.*, 2000; DeRoo *et al.*, 2008). Interessantemente, um estudo recente sugeriu que a associação entre consumo de álcool no período de periconcepção e FL/PNS (particularmente as FP isoladas) pode ser influenciada pelo tipo de bebida (bebida destilada > vinhos > cerveja) e o uso de ácido fólico (Romitti *et al.*, 2007). Romitti e colaboradores (1999) identificaram um risco elevado para FLP quando a mãe consumia  $\geq 4$  doses por mês e o filho carregava um alelo variante no gene *MSX1*, o qual está correlacionado ao desenvolvimento craniofacial durante a embriogênese. Esses autores sugeriram que o desenvolvimento das FL/PNS pode ser influenciado pelas exposições maternas aos agentes teratogênicos, porém mais

significativamente, pelas interações de tais exposições às variantes alélicas específicas (Romitti *et al.*, 1999). Chevrier *et al.* (2005) revelaram que uma variante polimórfica do gene *ADH1C* (responsável pelo metabolismo do etanol) em crianças parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS. No entanto, uma interação entre o genótipo do gene *ADH1C* e o consumo de álcool pela mãe não foi observada.

Sugere-se que o estado nutricional materno tenha algum papel na etiologia das FL/PNS (Krapels *et al.*, 2004a,b; van Rooij *et al.*, 2004). No entanto, a avaliação da ingestão alimentar e as medições bioquímicas do estado dietético representam um desafio e, geralmente, não são disponíveis, ou de fácil acesso, nas populações carentes, as quais abrigam a grande maioria da incidência das FL/PNS. Mesmo assim, uma alimentação rica em frutas e vegetais contendo folato, zinco, niacina, ácido ascórbico, ferro e magnésio, no período de periconcepção, parece reduzir o risco de FL/PNS (Krapels *et al.*, 2004a, b; Krapels *et al.*, 2006). Além disso, estudos demonstram que a suplementação alimentar materna com multivitaminas no primeiro trimestre gestacional parece diminuir o risco de filhos com FL/PNS (Briggs, 1976; Czeizel, 1993; Loffredo *et al.*, 2001b). Em um estudo de meta-análise, o uso de complexos multivitamínicos reduziu em 25% a prevalência de FL/PNS (Johnson & Little, 2008). Um estudo recente demonstrou que variantes alélicas do gene *IRF6* podem influenciar o risco de FL/PNS por meio de interações com suplementação vitamínica e exposição ao tabaco em uma população chinesa (Wu *et al.*, 2010).

O ácido fólico, uma vitamina do complexo B encontrada naturalmente em muitos alimentos (fígado, alface, tomate, espinafre, entre outros), é fundamental para a formação e a manutenção de eritrócitos e leucócitos e na conversão de proteínas em energia. Essa vitamina também é essencial para a biossíntese de bases nitrogenadas e aminoácidos durante a divisão celular e crescimento tecidual, eventos iniciais necessários para a formação normal do tubo neural (Zeiger & Beaty, 2002; Blom *et al.*, 2006). Vários estudos demonstraram que a ingestão de ácido fólico por meio de suplementos vitamínicos um mês antes da

gestação e durante o primeiro trimestre gestacional, período de formação e fusão do lábio e palato, parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS (van Rooij *et al.*, 2004; Canfield *et al.*, 2005; Yazdy *et al.*, 2007; Antony, 2007; Boyles *et al.*, 2008; Little *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2008; Jianyan *et al.*, 2009). No entanto, esses resultados não se reproduziram em outros estudos (Shaw *et al.*, 2006; Bille *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2008). Em um dos mais recentes estudos de meta-análise, Johnson e Little (2008) estimaram uma redução de ~18% para o risco de FL e FLP com o uso de suplementos contendo ácido fólico, mas nenhuma redução significativa para FP foi observada. Badovinac e colaboradores (2007) estimaram uma redução de aproximadamente 28% e 20% para o risco de FL com ou sem FP e FP isolada, respectivamente, quando do uso de suplementos multivitamínicos. Em suma, embora muitos estudos sugiram um efeito benéfico do ácido fólico na diminuição da incidência de FL/PNS, os resultados são inconsistentes quanto a esse efeito, bem como se a proteção se estende a todos os tipos de fissura (Wehby & Murray, 2010).

Diante dessas observações, alguns estudos investigaram a associação entre FL/PNS e variantes polimórficas de genes que codificam proteínas associadas ao metabolismo do ácido fólico (Gaspar *et al.*, 1999; van Rooij *et al.*, 2003; Mostowska *et al.*, 2006; Boyles *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008a; Carroll *et al.*, 2009). Em um estudo recente, nosso grupo avaliou o envolvimento de variantes polimórficas em 4 genes (*MTHFR*, *MTHFD1*, *MTR* e *SLC19A1*) que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico e identificou que mães carregando a variante alélica A do polimorfismo rs2274976 no gene *MTHFR* (*5,10-methylenetetrahydrofolate reductase*) apresenta um risco aumentado em 6x de ter um filho com FL/PNS. Em adição, o risco é elevado para 8,34 vezes em mães que apresentaram o genótipo GA do polimorfismo rs2274976 e não fizeram uso de suplementos vitamínicos no primeiro trimestre de gestação. Este estudo também revelou que o modelo de interação gênica contendo os polimorfismos *MTHFR* rs2274976, *MTHFD1* rs2236225 e *SLC19A1* rs1091266 indica um risco

de 5x maior e uma acurácia de 69% em predizer o risco materno para gerar um filho com FL/PNS (Bufalino *et al.*, In press).

A exposição ocupacional materna a solventes orgânicos e à exposição dos pais a produtos químicos agrícolas tem sido associada, de forma inconsistente, à FL/PNS (Garcia, 1998; Shaw *et al.*, 2003). O uso de medicamentos durante o primeiro trimestre de gestação, especialmente corticóides, anticonvulsivantes (diazepam, fenitoína e fenobarbital), nifedipina e antifolatos, também é sugerido ser um fator de risco para o nascimento de uma criança com FL/PNS (Dravet *et al.*, 1992; Rodriguez-Pinilla & Martinez-Frias, 1998; Hernandez-Diaz *et al.*, 2000; Carmichael *et al.*, 2007; Holmes *et al.*, 2008; Zarante *et al.*, 2009). Enfermidades crônicas e condições sistêmicas da mãe durante a gestação, como diabetes e obesidade, também parecem estar associadas com um maior risco de ter um filho com FL/PNS, no entanto o exato mecanismo responsável por essas doenças não está bem esclarecido (Spilson *et al.*, 2001; Cedergren & Källén, 2005). Todas essas associações merecem atenção e maiores investigações para que as verdadeiras influências possam ser definidas e abordadas para os devidos esclarecimentos quanto aos fatores modificadores do risco das FL/PNS.

### **2.5.2. Fatores Genéticos**

Até o presente momento, a compilação das informações provenientes de estudos genéticos é muito pouco esclarecedora quanto à identificação e caracterização dos genes etiológicos das FL/PNS (Jugessur & Murra, 2005; Jugessur *et al.*, 2009; Mossey *et al.*, 2009). Os estudos atuais de ligação e de associação do genoma abrangendo diversas populações demonstram que inúmeros genes e *loci* gênicos, situados em diferentes regiões cromossômicas tais como 17p13.1 (Wyszynski *et al.*, 2003), 8p11-23 (Riley *et al.*, 2007), 19p13.12, 19q12 e 2q22.3 (Vieira *et al.*, 2008b), 9q21 e 1p32 (Marazita *et al.*, 2009), 8q24.21 (Grant *et al.*, 2009; Birnbaum *et al.*, 2009), 10q25.3 e 17q22 (Mangold *et al.*, 2010), e 6q14.2-14.3 (Letra *et al.*, 2010), podem estar relacionados à etiologia das FL/PNS. Esses *loci* contêm centenas de genes de função desconhecida e vários

que participam das vias de sinalização associadas ao desenvolvimento do lábio e do palato. Mutações e polimorfismos em genes que participam da formação do lábio e do palato durante a embriogênese ou em genes responsáveis por síndromes que contêm a FL/P como uma característica fenotípica são fortes candidatos etiológicos para as FL/PNS (Scapoli *et al.*, 2008). Dentre os genes associados às FL/PNS, destacam-se: *IRF6*, *TGFA* (fator de crescimento transformante alfa), *MSX1*, *TGFB-3* (fator de crescimento transformante beta), *JAG2* (*JAGGED2*), *FGF7* (fator de crescimento de fibroblastos 7), *FGF10*, *FGF18*, *FGFR1* (receptor do fator de crescimento de fibroblasto 1), *FGFR2* e *MYH9* (*myosin, heavy chain 9, non-muscle*) (van den Boogaard *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2003; Marazita *et al.*, 2004; Riley *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2008; Rahimov *et al.*, 2008; Scapoli *et al.*, 2008; Birnbaum *et al.*, 2009; Paranaíba *et al.*, 2010a).

Mutações em *IRF6* são causadoras da VWS, uma alteração autossômica dominante caracterizada pela presença de FL/P em associação com fossetas no lábio inferior (Kondo *et al.*, 2002; Paranaíba *et al.*, 2008) e da síndrome pterígio-poplíteo (PPS, OMIM #119500), que é caracterizada por anomalias da face, incluindo FL/P, pele e genitália (Froster-Iskenius, 1990). É importante ressaltar que inúmeros estudos demonstraram que variações no gene *IRF6* podem estar associadas às FL/PNS em diferentes populações (Blanton *et al.*, 2005; Ghassibe *et al.*, 2005; Scapoli *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007). Em particular, o polimorfismo rs2235371 (820G>A) do gene *IRF6*, que resulta na substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 274 da sequência de aminoácidos (Val274Ile) da estrutura protéica de *IRF6*, foi associado de forma significativa às FL/PNS (Jugessur *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009). Em adição a esses achados, Rahimov *et al.* (2008) demonstraram uma forte associação entre FL e o polimorfismo rs642961 do gene *IRF6* (G>A que altera o sítio de ligação do fator de transcrição AP-2 $\alpha$  na região promotora de *IRF6*) e demonstraram também que a associação entre o polimorfismo rs2235371 de *IRF6* e fissuras é dependente do polimorfismo rs642961. Recentemente, nosso grupo avaliou a associação dos polimorfismos rs2235371 e rs642961 do gene *IRF6* na população brasileira. A frequência do

genótipo variante GA do polimorfismo rs2235371 foi identificada em 10,1% dos indivíduos com FL/PNS e em 10,3% do grupo controle, revelando uma diferença não significativa. Similarmente, a frequência dos genótipos raros do polimorfismo rs642961 (GA e AA) foi muito similar entre os grupos controle (28,6%) e FL/PNS (25,4%). Juntos, esses resultados são consistentes com uma falta de envolvimento dos polimorfismos rs2235371 e rs642961 no gene *IRF6* na patogênese das FL/PNS na população brasileira (Paranaíba *et al.*, 2010a). Similarmente ao observado com *IRF6*, variantes polimórficas de genes causadores de síndromes que têm como característica a FL/P podem contribuir para a etiologia das FL/PNS.

### **Gene TP63**

A síndrome da ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura lábio-palatina (EEC, OMIM #129900), uma rara alteração autossômica dominante com penetrância incompleta e expressividade variável, é caracterizada pela tríade de displasia ectodérmica, ectrodactilia das mãos e/ou pés e FL/P (Buss *et al.*, 1995). A displasia ectodérmica pode estar representada na síndrome pela presença de pele e cabelos finos e ressecados, unhas distróficas, obstrução/atresia do ducto lacrimal, hipoplasia e/ou agenesia das glândulas salivares e alterações dentais, incluindo dentes conóides e múltiplas agenesias (Roelfsema & Cobben, 1996). As fissuras frequentemente envolvem o lábio e o palato (FLP). Outras alterações observadas na síndrome são criptorquidismo, hipospadia, retardo mental e insuficiência hipotalâmica (Majewski & Goecke, 1996; Roelfsema & Cobben, 1996; van Bokhoven *et al.*, 2001). Nosso grupo relatou um caso de EEC com um fenótipo atípico, caracterizado por sardas espalhadas ao longo da face, abdômen e membros inferiores (Paranaíba *et al.*, 2010b). Considerando a grande variabilidade de expressão fenotípica da síndrome, o estudo realizado por Roelfsema & Cobben (1996) com 230 casos identificou ectrodactilia em 84% dos pacientes analisados, displasia ectodérmica em 77%, FL/P em 68%, anomalias no canal lacrimal em 59% e anomalias urogenitais em 23%.

Mutações heterozigóticas no gene *TP63* (localizado no cromossomo 3q27-29), que é um membro da família de fatores de transcrição *TP53* por compartilhar uma significativa sequência de nucleotídeos com *TP53* e *TP73* (Yang & McKeon, 2000), foram identificadas em 98% dos pacientes com a forma fenotípica clássica da síndrome, sendo assim considerado o causador dessa alteração (van Bokhoven *et al.*, 2001; Rinne *et al.*, 2007; Clements *et al.*, 2010). Mutações em *TP63* também estão associadas à etiologia de outras síndromes, incluindo a síndrome da displasia ectodérmica, FL/P e anquilobléfaro (OMIM #106260), síndrome mamária-membros (OMIM #603543), síndrome acro-dermato-ungual-lacrimar-dental (OMIM #103285) e síndrome de Rapp-Hodgkin (OMIM #129400) (Guazzarotti *et al.*, 2008). *TP63* codifica 6 isoformas geradas por 2 sítios de início de transcrição na região amino terminal, um dando origem a um domínio de transativação e outro faltando tal domínio (isoformas  $\Delta N$ ), e por sítios de splicing alternativo localizados na região 3' do gene, os quais resultam em 3 diferentes porções carboxi terminal denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Di Iorio *et al.*, 2005). A isoforma  $\alpha$  codifica um domínio chamado motivo alfa-estéril (*sterile alpha motif - SAM*), a qual está supostamente envolvida na interação com outras proteínas. Todas as isoformas contêm um domínio de ligação ao DNA e um domínio de isomerização, mas variam em suas habilidades de ativar e inibir os genes alvos (Thanos & Bowie, 1999).  $\Delta NTP63\alpha$  é a principal isoforma expressa nas células basais do epitélio e é essencial no desenvolvimento epidérmico (Laurikkala *et al.*, 2006). Recentemente, Thomason e colaboradores (2010) demonstraram que a proteína *Tp63* é uma molécula regulatória essencial no desenvolvimento do palato e exerce um efeito cooperativo com o produto do gene *Irf6* no desenvolvimento orofacial de camundongos. Estudos evidenciaram que camundongos deficientes do gene *Tp63* apresentam malformações dos membros e da região craniofacial, além de ausência da estratificação epitelial (Mills *et al.*, 1999; Koster & Roop, 2004). Dessa forma, *TP63*, ao contrário de *TP53*, não parece funcionar como supressor tumoral, mas como um fator essencial para o desenvolvimento craniofacial, dos membros e do epitélio (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). *TP63* também contribui para o

desenvolvimento do trato urogenital, visto que em outras síndromes causadas por mutações em *TP63*, micropênis, hipospádia e outras anomalias estruturais do trato genital feminino interno e externo são evidenciados (Guazzarotti *et al.*, 2008).

Já foram identificadas 34 mutações diferentes em pacientes com a síndrome da ECC, sendo a maioria resultante de mutações heterozigóticas de sentido trocado (missense) localizada no domínio conservado de ligação ao DNA, uma região comum a todas as 6 isoformas de *TP63* e com importância no direcionamento das interações com sequências alvo de DNA (van Bokhoven *et al.*, 2001; Clements *et al.*, 2010). Mutações nessa região são altamente prejudiciais na ligação ao DNA e na atividade transcricional da proteína. Além disso, aproximadamente 90% de todas essas mutações estão localizadas em 5 resíduos de arginina: p.Arg204, p.Arg227, p.Arg279, p.Arg280, e p.Arg304, sendo, portanto, consideradas como mutações “hotspot” (Celli *et al.*, 1999; Clements *et al.*, 2010; Paranaíba *et al.*, 2010b). Interessantemente, mutações em diferentes regiões do gene *TP63* podem influenciar a ocorrência das FL/P em pacientes afetados pela síndrome da EEC. Mutações missense no domínio conservado de ligação ao DNA provocam FLP, enquanto mutações na região carboxi terminal geram FL ou FP. Além disso, mutações na região amino terminal e fora da área dos domínios conservados levam à FP ou a nenhum tipo de fissura (Barrow *et al.*, 2002). Considerando a probabilidade que variantes polimórficas do gene *TP63* possam contribuir para o surgimento de FL/PNS, alguns poucos estudos avaliam a ocorrência de polimorfismos no gene *TP63* em pacientes com FL/PNS (Barrow *et al.*, 2002; Leoyklang *et al.*, 2006; Scapoli *et al.*, 2008). No entanto, os resultados são insuficientes quanto à associação de polimorfismos em *TP63* e FL/PNS. Barrow *et al.* (2002), avaliando 62 pacientes com FL/PNS, identificaram apenas um polimorfismo na região intrônica de *TP63*, sugerindo que variações polimórficas desse gene provavelmente não contribuem para o desenvolvimento das FL/PNS. Corroborando com este resultado, Scapoli *et al.* (2008) não encontraram associação dos polimorfismos intragênicos rs9842604, rs9849766, rs2176085 e rs9882348 de *TP63* com FL/PNS após analisarem 236 trios contendo



pai, mãe e filho afetado. Em oposição a esses resultados, Leoyklang *et al.* (2006) encontraram uma significativa correlação entre polimorfismos no gene *TP63* e FL/PNS na população tailandesa. Em conjunto, os resultados presentes na literatura são insuficientes para esclarecer a real associação de variantes polimórficas em *TP63* e FL/PNS.

### **MID1**

Síndrome de Opitz (OS, OMIM #300000) é uma desordem congênita caracterizada por alterações nas estruturas da linha média. Historicamente, essa síndrome é o resultado da fusão de duas outras síndromes descritas por Opitz e colaboradores em 1969 (a síndrome G e a síndrome BBB), que posteriormente foram consideradas a mesma condição (Cordero *et al.*, 1978; Cappa *et al.*, 1987). Curiosamente, a síndrome G foi assim designada por ter sido descrita em uma família com 4 membros afetados cujo sobrenome tinha por inicial a letra G e a síndrome BBB, descrita em três famílias diferentes, todas com sobrenomes iniciados pela letra B. Pacientes com OS normalmente apresentam anomalias faciais, incluindo hipertelorismo, alargamento da base nasal, bossa frontal proeminente e FL/P, além de alterações esofágico-tráqueo-laringológicas, cardíacas (defeitos do septo atrial e/ou ventricular), geniturinárias (criptorquidismo, hipospádia, bolsa escrotal bífida ou hipoplásica) e neurológicas (retardo mental e atraso no desenvolvimento) (Meroni, 2004; Fontanella *et al.*, 2008). Atraso no desenvolvimento e retardo mental são observados em cerca de 50% dos homens afetados, da mesma forma que 50% dos indivíduos afetados apresentam FL/P. Malformações presentes em menos de 50% dos indivíduos incluem defeitos cardíacos congênitos, ânus imperfurado ou ectópico e defeitos da linha média do cérebro (malformação de Dandy-Walker e agenesia ou hipoplasia do corpo caloso e/ou vérmis cerebelar). Ampla variabilidade clínica ocorre mesmo entre membros da mesma família (De Falco *et al.*, 2003).

OS é geneticamente heterogênea manifestando-se tanto como um traço autossômico dominante como ligado ao cromossomo X. As duas formas não

podem ser diferenciadas, considerando-se apenas suas características clínicas e, em ambas, o fenótipo é mais complexo e mais grave no gênero masculino do que no gênero feminino (Gorlin *et al.*, 2001; Robin *et al.*, 1996). A forma autossômica dominante está localizada em uma grande região no cromossomo 22q11.2, mas o gene específico ainda não foi identificado (Robin *et al.*, 1995; Robin *et al.*, 1996; Fontanella *et al.*, 2008). No entanto, o gene *MID1* foi identificado no braço curto do cromossomo X (Xp22.3) (Quaderi *et al.*, 1997). O gene *MID1* é organizado em 9 exons codificantes, embora parte do primeiro exon e do último representem regiões não traduzidas (Quaderi *et al.*, 1997). *MID1* é transcrito por múltiplos promotores e já foram identificadas 63 formas variantes de splicing alternativo em diferentes tecidos humanos (Winter *et al.*, 2004). A proteína MID1 apresenta 667 aminoácidos e contém um motivo tripartido composto de um domínio RING, dois motivos B-box, uma região coiled-coil, seguido por um domínio COS-box, um domínio fibronectina tipo 3 e um domínio PRY-SPRY na região carboxi terminal (Short & Cox, 2006). Embora a função específica ainda seja incerta, a proteína MID1 é identificada no desenvolvimento precoce das estruturas da linha média em células indiferenciadas dos arcos branquiais e do sistema nervoso central, gastrointestinal e urogenital (Dal Zotto *et al.*, 1998; Pinson *et al.*, 2004). Além disso, diferentemente de camundongos, a expressão da proteína MID1 foi detectada no tecido coronário em desenvolvimento de humanos, em particular, no septo interventricular, o que pode ser correlacionado com as lesões conotrunciais observadas em alguns pacientes OS (Richman *et al.*, 2002; Pinson *et al.*, 2004).

Mutações em *MID1* são identificadas por todas as regiões do gene, sendo representadas por mutações missense e nonsense (mutação sem sentido), inserções e deleções (De Falco *et al.*, 2003; Fontanella *et al.*, 2008). Essa variedade de mutações sugere que um mecanismo de perda de função é a base do fenótipo dos indivíduos com OS (Cox *et al.*, 2000; De Falco *et al.*, 2003; Fontanella *et al.*, 2008). A possível participação do gene *MID1* na etiologia das FL/PNS ainda está por ser esclarecida. Scapoli *et al.* (2008), analisando um grupo de pacientes com FL/PNS e alguns polimorfismos presentes no gene *MID1*,

indicaram uma possível transmissão não aleatória de haplótipos em pacientes do gênero masculino com FL/PNS, o que poderia ser explicado pela maior penetrância do gene no gênero masculino em decorrência de seu status hemizigótico. Contudo, a escassez de informações na literatura é nítida.

### ***PVRL1***

A síndrome da displasia ectodérmica e FL/P (CLPED1, OMIM #225060), também denominada como síndrome de Zlotogora-Ogur ou síndrome da displasia ectodérmica da Ilha Margarita, é uma alteração relativamente rara e de caráter autossômica recessiva, que apresenta como gene causador o *PVRL1* (*poliovirus receptor-related 1*), localizado na região cromossômica 11q23 (Suzuki *et al.*, 2000). Clinicamente, a síndrome é caracterizada por FL/P, displasia ectodérmica, malformações nas mãos e/ou pés (como a sindactilia) e, em alguns casos, retardo mental (Gorlin *et al.*, 2001). Essa síndrome ocorre com elevada frequência (1/2.000 nascidos vivos) na população indígena das Ilhas Margarita, região norte da Venezuela.

*PVRL1* codifica 3 proteínas distintas, resultantes de splicing alternativo (Lopez *et al.*, 2001). Todos os transcritos compartilham um segmento amino terminal composto por 3 domínios de imunoglobulina, mas divergem na região carboxi terminal (Suzuki *et al.*, 2000). A isoforma- $\alpha$  de *PVRL1* codifica nectina-1 (PRR1), um receptor transmembrânico de superfície celular relacionado à adesão celular (Takahashi *et al.*, 1999). A isoforma- $\gamma$  codifica uma proteína PVRL1 truncada que pode regular a adesão celular por meio de inibição competitiva pela ligação com nectina-1 (Lopez *et al.*, 2001). Já a isoforma- $\beta$  codifica HlgR, um provável receptor transmembrânico com um segmento carboxi totalmente diferente da nectina-1, que apresenta uma função ainda desconhecida. A isoforma- $\beta$  é codificada pelos exons 1 a 8, a isoforma- $\alpha$  pelos exons 1 a 5 e 6A, e a isoforma- $\gamma$  pelos exons 1 a 5 e 6G (Suzuki *et al.*, 2000; Reymond *et al.*, 2001). A expressão da proteína PVRL1 foi identificada, principalmente, na borda medial do

epitélio das placas palatinas, no componente ectodérmico dos germes dentários, no epitélio olfatório e no epitélio de superfície epidérmica (Suzuki *et al.*, 2000).

CLPED1 é normalmente causada por mutações homozigóticas na sequência de *PVRL1*, o que resulta em perda de função. A mutação sem sentido que resulta da deleção do aminoácido triptofano na posição 185 da cadeia protéica é a mais frequente (Suzuki *et al.*, 2000). Essa mesma mutação também está presente em outros territórios venezuelanos, onde a heterozigotidade foi identificada como um significativo fator de risco para as FL/PNS (Sözen *et al.*, 2001). Subseqüentes estudos demonstraram que alterações gênicas em *PVRL1* podem contribuir para as FL/PNS em algumas populações (Turhani *et al.*, 2005; Ávila *et al.*, 2006; Neiswanger *et al.*, 2006; Scapoli *et al.*, 2006; Tongkobpetch *et al.*, 2008; Sözen *et al.*, 2009), mas não em outras (Scapoli *et al.*, 2004; Ichikawa *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2006; Sözen *et al.*, 2009). Interessantemente, dois outros genes da família nectina, *PVR* e *PVRL2*, também foram considerados como possíveis genes candidatos à FL/PNS (Neiswanger *et al.*, 2006; Warrington *et al.*, 2006), devido à sua paralogia com *PVRL1* e sua localização no cromossomo 19q13.2, que corresponde a uma provável região de ligação para FL/PNS (Stein *et al.*, 1995). Sugere-se que a isoforma- $\beta$  seja especialmente envolvida no desenvolvimento craniofacial (Sözen *et al.*, 2009). Neste contexto, especialmente o polimorfismo rs7940667 do gene *PVRL1*, o qual é encontrado no exon 6 da isoforma  $\beta$ , dentro do domínio transmembrânico e codificante da variante p.Val361Gly (substituição de uma valina por uma glicina), acentua regiões de splicing quando o alelo variante T está presente (c.1082 C>A). Este alelo raro está presente em aproximadamente 12% dos casos de FL/PNS na população de Iowa e em 6% na população das Filipinas (Ávila *et al.*, 2006). Em adição, nessas mesmas populações, o polimorfismo rs7940667 (p.Val361Gly) foi associado a todos os tipos de fissuras isoladas (FL, FLP e FP). No entanto, uma menor associação dessa variante foi identificada na população sul-americana (Ávila *et al.*, 2006).

## ***RUNX2***

Displasia cleidocraniana (CCD, OMIM #119600) é uma alteração esquelética, autossômica dominante, com grande variabilidade na expressão fenotípica e alta penetrância (Mundlos, 1999; Mohan *et al.*, 2010). Clinicamente, pacientes afetados por CCD podem apresentar aplasia/hipoplasia clavicular, braquicefalia, hipoplasia do terço médio da face, ossos wormianos, bossa frontal, fechamento tardio das suturas cranianas e fontanelas, baixa estatura e anomalias dentais (Mundlos, 1999; Suda *et al.*, 2007; Xuan *et al.*, 2008). As alterações dentais são representadas principalmente por falta de exfoliação dos dentes decíduos, atraso na erupção da dentição permanente e dentes supranumerários. Ocasionalmente, as FL/Ps fazem parte do espectro sindrômico (Mundlos, 1999; Cooper *et al.*, 2001; Yamachika *et al.*, 2001). Especificamente, Yamachika e colaboradores (2001) relataram uma mutação nonsense heterozigótica (Gln195) no exon 3 do gene *RUNX2* em um paciente com CCD apresentando FL, e em um estudo de pacientes com CCD, Cooper e colaboradores (2001) encontraram um aumento significativo na prevalência de FP submucosa.

CCD é causada por mutações no gene *RUNX2*, um fator de transcrição que ativa a diferenciação osteoblástica, a maturação condroblástica e a morfodiferenciação dental (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Camilleri & McDonald, 2006). O gene *RUNX2*, o qual é localizado na região cromossômica 6p21, contém 9 exons e regiões com splice alternativo, resultando em três versões alternativas do exon 5 (exon 5, 5.1, e 5.2) e mais duas versões do exon 6 (exon 6 e 6.1) (Terry *et al.*, 2004). A proteína apresenta o domínio Runt, caracterizado por um motivo polipeptídico de 128 aminoácidos de ligação ao DNA, a área de sinalização de localização nuclear (NSL), localizada próxima à porção carboxi terminal do domínio Runt, e a região rica em glutaminas e alaninas (QA) na porção amino terminal, sem função conhecida até o momento. A região carboxi terminal da proteína *RUNX2* é necessária para a atividade transcricional e representa uma área rica em prolina, serina e treonina (PST), uma matriz nuclear-sinalização alvo e um domínio de interação protéica para vários corretores que medeiam a

sinalização celular (Lee *et al.*, 1997; Mundlos *et al.*, 1997). Três transcritos de *RUNX2* são conhecidos e as mutações identificadas em pacientes com CCD são caracterizadas pelo tipo missense, nonsense, com alteração na matriz de leitura (frameshift) e mutações em regiões de splicing, bem como grandes deleções cromossômicas e translocações (Quack *et al.*, 1999; Otto *et al.*, 2002; Cunningham *et al.*, 2006; Purandare *et al.*, 2008; El-Gharbawy *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2010). A maioria das mutações está localizada no domínio Runt e são caracterizadas por mutações de sentido trocado, enquanto que as mutações sem sentido e com mudança de matriz de leitura são identificadas ao longo do gene *RUNX2* (Otto *et al.*, 2002; Cunningham *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2010). Em geral, CCD é causada pelo mecanismo de haploinsuficiência do gene *RUNX2*, no entanto, o efeito negativo dominante também tem sido sugerido (Hansen *et al.*, 2010). A correlação fenótipo-genótipo não é absoluta e as mutações identificadas na CCD tem contribuído para elucidar as funções dos vários domínios presentes na proteína *RUNX2* (Tessa *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2003; Suda *et al.*, 2007). Pacientes com CCD sem mutações no gene *RUNX2* foram identificados, sugerindo uma provável heterogeneidade genética para a CCD (Quack *et al.*, 1999; Otto *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006).

Existe um único estudo na literatura avaliando polimorfismos em *RUNX2* em pacientes com FL/PNS (Sull *et al.*, 2008). Com o modelo de trios (pai, mãe e filho afetado por FL/PNS), provenientes de 4 populações diferentes, os autores demonstraram uma significativa correlação entre *RUNX2* e o risco de desenvolvimento de FL/PNS através de um efeito de transmissão materna de alelos.

### ***TBX1***

Mutações e microdeleções na região cromossômica 22q11 é associada a uma variedade de desordens (Ryan *et al.*, 1997; McDonald-McGinn *et al.*, 2001), incluindo a síndrome velocardiofacial (Síndrome de Shprintzen, VCFS, OMIM #192430) e a síndrome de Di George (DGS, OMIM #118400). Essas síndromes

são caracterizadas clinicamente por alterações cardiovasculares, hipoplasia do timo e glândulas paratireóides, FP e dismorfogênese facial (Jerome & Papauoannou, 2001). A síndrome da deleção 22q11.2 constitui uma das principais causas congênitas de doenças cardíacas entre os nascidos vivos (Goodship *et al.*, 1998), assim como representa a segunda causa mais comum de retardo mental, sendo responsável por aproximadamente 2,4% dos pacientes com atraso de desenvolvimento (Rauch *et al.*, 2006).

A maioria dos pacientes apresenta deleções de 1,5 ou 3 Mb, ambas incluindo o gene *TBX1* (Rauch *et al.*, 2005). Dentro dos 30 genes deletados, *TBX1* é o único que apresenta haploinsuficiência, gerando camundongos com fenótipos similares à GDS e à VCFS (Baldini, 2005). *TBX1* é membro de uma família de fatores nucleares de transcrição (T-box) que são conservados filogeneticamente e apresentam em comum um domínio de ligação ao DNA. *TBX1* apresenta 3 isoformas (A, B e C), que compartilham os exons 1-8, mas diferem no exon terminal: 9A, 9B/10 e 9C. O transcrito C mostrou ser o mais abundante em humanos (Chieffo *et al.*, 1997). O gene *TBX1* foi originalmente relacionado às anormalidades do arco aórtico, sendo expresso precocemente no desenvolvimento endodérmico faringeano e no revestimento dos vasos sanguíneos coronarianos, além de modelos animais confirmarem um crítico papel de *TBX1* no desenvolvimento dos órgãos derivados dessas estruturas (Chieffo *et al.*, 1997). Recentemente foi demonstrado em modelo animal que *TBX1* é necessário para o alongamento e a elevação das placas palatinas durante a palatogênese (Goudy *et al.*, 2010).

Camundongos com mutações heterozigóticas em *TBX1* demonstraram alterações no trato cardiovascular similares às encontradas na DGS (Liao *et al.*, 2004). Mutações em *TBX1* resultam em translocação nuclear ineficiente ou disfunção do domínio de ligação ao DNA, alterando a ativação de genes alvos em sua via de sinalização (Lindsay *et al.*, 2001). Recentemente, microdeleções em *TBX1* foram identificadas em pacientes escandinavos com FL/PNS, sugerindo um possível envolvimento desse gene na etiologia das fissuras orofaciais (Shi *et al.*,

2009). Interessantemente, Yagi e colaboradores (2003) identificaram em um paciente com a síndrome da deleção 22q11.2 o polimorfismo rs28939675 como sendo o agente etiológico para a alteração. No entanto, o estudo não deixou claro se o paciente apresentava FP.



### **3. PROPOSIÇÃO**

---

---

- 1) Comparar a frequência alélica e genotípica de polimorfismos contidos nos genes *TP63*, *MID1*, *PVRL1*, *RUNX2* e *TBX1* entre indivíduos com FL/PNS e indivíduos clinicamente normais.
  
- 2) Determinar a frequência de anomalias dentais em pacientes com FL/PNS e correlacioná-las com o tipo de fissura.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

### **4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP (processo 152/2009; anexo 1).

### **4.2. População**

#### **4.2.1 Para Análise dos Polimorfismos Gênicos**

Para esta parte do estudo, as amostras foram divididas em 2 grupos: grupo controle, que foi constituído por amostras de 413 indivíduos clinicamente normais, e grupo experimental, composto por amostras de 367 pacientes com FL/PNS. Ambos os grupos apresentavam indivíduos sem histórico familiar de síndromes, FL/P ou ainda qualquer alteração congênita, exceto as FL/PNS no grupo experimental. Todas as amostras dos pacientes analisados foram obtidas na Universidade de Alfenas (UNIFENAS), Minas Gerais, Brasil, durante o período de fevereiro de 2008 a maio de 2010. A coleta das amostras do grupo de pacientes com FL/PNS foi realizada no Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (Centro Pró-Sorriso - Centrinho) durante o tratamento odontológico oferecido aos indivíduos fissurados. Todos os pacientes do grupo experimental foram examinados pela Equipe Multidisciplinar do Centro referido, não revelando outra alteração sistêmica em associação à FL/PNS. A coleta das amostras do grupo controle procedeu-se na Clínica de Graduação dessa mesma instituição durante o tratamento odontológico.

#### **4.2.2 Para Análise das Anomalias Dentais**

Pacientes com FL/PNS, provenientes do Centro Pró-Sorriso, na faixa etária de 12 a 30 anos, sem história de extração dental e tratamento ortodôntico prévio e que apresentavam documentação radiográfica (radiografia panorâmica e

periapical e, eventualmente, oclusal) foram incluídos nesta parte do estudo (n=296). Quando disponíveis, modelos ortodônticos foram utilizados para confirmar os diagnósticos clínicos e radiográficos. Todos os indivíduos foram examinados retrospectivamente e suas fissuras foram classificadas como especificado por Spina *et al.* (1972). As anomalias dentais, dos pacientes com FL e FLP, presentes nas áreas envolvidas pelas fissuras (especificamente a região anterior contendo os incisivos superiores e caninos) não foram incluídas na análise final, por representarem regiões susceptíveis às alterações físicas em decorrência do desenvolvimento das FLs e FLPs. Os terceiros molares também não foram incluídos na avaliação deste estudo. As anomalias dentais encontradas nesta análise foram definidas como:

- Agenesia dental: anomalia numérica caracterizada pela ausência dental congênita, radiograficamente comprovada.

- Giroversão: anomalia de posição caracterizada pela rotação de um dente em torno do seu próprio eixo.

- Microdontia: anomalia de tamanho representada por um dente que é muito menor do que o seu homólogo ou menor do que um dente do mesmo grupo, porém do arco oposto. Neste grupo incluíram-se os incisivos conóides.

- Dente supranumerário: anomalia de número caracterizada por um dente que é adicional à contagem normal da série dos dentes.

- Dente impactado: anomalia de erupção caracterizada por um dente que não consegue erupcionar, atingindo sua posição correta na arcada dentária dentro de um período superior a 12 meses da média de erupção (Peterson *et al.*, 1996).

- Dente ectópico: anomalia caracterizada pela erupção de um dente em uma posição anormal, ou seja, fora do local esperado de erupção.

- Apinhamento dental: anomalia de erupção caracterizada pela falta de alinhamento dos dentes ou falta de posicionamento adequado dos dentes.

- Hipoplasia de esmalte: anomalia de estrutura caracterizada por um esmalte dental com perda de estrutura, muitas das vezes por falta de calcificação.

- Taurodontismo: anomalia de forma caracterizada pelo alongamento da câmara pulpar em decorrência de um deslocamento apical da região de bifurcação. Essa anomalia só foi considerada quando presente em dentes multirradiculares.

### 4.3. Seleção dos Genes Candidatos e dos Polimorfismos Gênicos

Este estudo selecionou genes (*TP63*, *MID1*, *PVRL1*, *RUNX2* e *TBX1*) que quando mutados causam síndromes com a FL/P como uma característica fenotípica. Para a seleção dos polimorfismos levou-se em consideração: 1) estar localizado em uma região de exon, 2) ser um polimorfismo não-sinônimo e 3) estar em uma região de sítio de restrição. As características dos polimorfismos estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos polimorfismos gênicos deste estudo.

Gene	rs	Polimorfismo	Resíduo de Aminoácido	Referência*
<i>TP63</i>	34713855	c. 2021G>T	p.Arg674Leu	ENST00000264731
<i>PVRL1</i>	7940667	c.1082C>A	p.Val361Gly	ENST00000341398
<i>MID1</i>	55986608	c.1457T>C	p.Phe486Ser	ENST00000380785
<i>RUNX2</i>	11498200	c.709C>T	p.Arg237Cys	ENST00000371436
<i>TBX1</i>	28649236	c.22A>G	p.Arg8Gly	ENST00000359500
<i>TBX1</i>	28939675	c.443T>A	p.Phe148Tyr	ENST00000359500
<i>TBX1</i>	4819522	c.1049C>T	p.Thr350Met	ENST00000329705

\*Informações removidas do site: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

### 4.4. Coleta das Amostras para Análise dos Polimorfismos

Previamente à coleta, todos os voluntários foram informados do propósito do estudo. Àqueles que se enquadravam nos critérios previamente estabelecidos

e concordaram em participar voluntariamente da pesquisa foi solicitado que assinassem o termo de consentimento livre de participação na mesma. As amostras de células bucais foram coletadas através de um bochecho, por 60 s, de 5 ml de solução de sacarose a 3%. O conteúdo resultante do bochecho foi transferido para um tubo de 15 ml, o qual continha o volume de 5 ml de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7 mM EDTA.

#### **4.5. Isolamento do DNA**

No laboratório, a cada tubo foi adicionada água destilada e deionizada autoclavada q.s.p. 15 ml. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado em solução aquosa, contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM EDTA. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 50°C em movimento contínuo semicircular. Após 16 hs de incubação, foram adicionados 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12.000 g a 4°C. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000 g por 5min), seco e ressuspensionado em tampão Tris-EDTA (TE Buffer). A concentração e pureza das amostras foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm (espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA).

#### **4.6. PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase Associada à Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição Enzimática)**

As reações de PCR-RFLP foram realizadas com pares de oligonucleotídeos específicos para cada um dos polimorfismos dos genes deste estudo (Tabela 2). Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do programa IDT PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/home/home.aspx>) com sequências dos respectivos genes provenientes do “Gene Bank”. A especificidade de cada par de oligonucleotídeos foi testada no programa BLAST (National Center for

Biotechnology Information-NIH, EUA - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Resumidamente, 500 ng de DNA foram amplificados em um termociclador (modelo 9600, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em uma reação de 10 µl composta por 1 µM de cada oligonucleotídeo, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dNTPmix e 0,025 UI de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As condições das reações de PCR são descritas na Tabela 2. Após amplificação, os produtos de PCR foram incubados com as enzimas de restrição específicas para a análise de cada polimorfismo (Tabela 3), segundo recomendações do fabricante (Fermentas Inc., Hannover, MD, EUA). Os produtos da digestão foram separados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida 8% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen). A documentação foi realizada no sistema de fotodocumentação *Kodak Digital Science™* equipado com câmera digital DC120 e programa *1D Image Analysis* (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA).

#### **4.7. Análise Estatística**

##### **4.7.1. Para Análise dos Polimorfismos Gênicos**

Cálculos do poder do estudo foram realizados com a ajuda do Programa G\*Power 3.1 (Faul *et al.*, 2009). O teste de Mann-Whitney foi aplicado para verificar se existia uma diferença na idade entre os grupos controle e experimental, enquanto que o teste qui-quadrado foi utilizado para comparar a distribuição do gênero e raça/cor de pele dos voluntários entre os grupos. A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada (Rodriguez *et al.*, 2009), e as diferenças na frequência dos alelos e genótipos em um modo de herança não-restrito e dominante foram comparadas pelo teste de qui-quadrado. O cálculo do risco de recorrência (*odds ratio*, OR) com intervalo de confiança (IC) em 95% foi realizado para estimar o risco de cada fator na ocorrência da FL/PNS. Regressão logística ajustada para gênero e raça/cor de pele (fatores que difeririam entre os grupos) foi realizada para determinar a correlação entre genótipos e grupos. A avaliação das interações gene-gene foi realizada através do teste de redução multifatorial de dimensionalidade (MDR), o qual identifica combinações de

genótipos associados ao risco para a doença (Hahn *et al.*, 2003). Neste estudo, foi utilizado 10x para a validação cruzada e 1000x para o teste de permutação. Visto que múltiplas comparações foram realizadas, o teste de correção de Bonferroni foi aplicado, sendo que  $p \leq 0,005$  ( $0,05/9$ ) foi indicativo de significância.

#### **4.7.2. Para Análise das Alterações Dentais**

Uma análise descritiva da frequência e dos tipos de anomalias dentais nos pacientes com FL/PNS foi inicialmente realizada. A associação entre o tipo de fissura e a prevalência das anomalias dentais foi realizada pelo teste do qui-quadrado, com  $p \leq 0,05$  como indicativo de significância estatística. O cálculo do risco de recorrência com IC em 95% foi realizado para estimar o risco de anomalia dental em pacientes com FL/PNS. Regressão logística com todas as variáveis foi aplicada para validar a correlação da agenesia dental com o tipo de fissura.

**Tabela 2.** Sequências dos oligonucleotídeos e condições das reações de PCR para os polimorfismos avaliados.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Oligonucleotídeos*</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Temperatura de Anelamento (°C)</b>
rs34713855	F: 5'TGAGCGTGTTATTGATGCTGTGCG3' R: 5'TGCAGCTTAAGGAGACACCCAACT3'	416	63
rs7940667	F: 5'AGCTCTTCCTGCCAAAGGGTTAGT3' R: 5'GGGTGCAATGTCAAAGGCAGAGTA3'	424	61
rs55986608	F: 5'TGAAGCGTTCAGGTGTGTGACTCT3' R: 5'TTTGTGATAGGAGGCATGACTCAGG3'	259	63
rs11498200	F: 5'TATAAAGCAATTTGAAATGGAAGG3' R: 5'CCAGCGTCTATGCAAGTGAA3'	380	61
rs28649236	F: 5'TTCAGCATCGCCTCTCTGGTT3' R: 5'TACAAGAGCTGCCTCCACCTACTTT3'	245	61
rs28939675	F: 5'AGCAGCTAAGCCAGGAAAGATGGA3' R: 5'GCATCGCAGGTGCCTAAAGAGTTT3'	381	61
rs4819522	F: 5'AAAGAGAGGCACCTCTGACATGGT3' R: 5'TGGGTATTGAAGGGTTGGCACTCT3'	206	61

\* Oligonucleotídeos: Forward (F) e Reverse (R).



**Tabela 3.** Enzimas de restrição e padrões dos fragmentos gerados após a reação de PCR-RFLP.

Gene	rs	Polimorfismo	Enzima	Fragmentos de Restrição (pb)		
				Homozigoto	Heterozigoto	Homozigoto
				Comum		Raro
<i>TP63</i>	34713855	2021G>T	<i>HhaI</i>	GG: 299 e 117	GT: 416, 299 e 117	TT: 416
<i>PVRL1</i>	7940667	1082C>A	<i>XmaI</i>	CC: 424	CA: 424, 230 e 194	AA: 230 e 194
<i>MID1</i>	55986608	1457T>C	<i>DraI</i>	TT: 109, 100 e 50	TC: 209, 109, 100 e 50	CC: 209 e 50
<i>RUNX2</i>	11498200	709C>T	<i>HhaI</i>	CC: 234 e 146	CT: 380, 234 e 146	TT: 380
<i>TBX1</i>	28649236	22A>G	<i>BstXI</i>	AA: 138 e 107	AG: 245, 138 e 107	GG: 245
<i>TBX1</i>	28939675	443T>A	<i>Pdml</i>	TT: 194 e 187	TA: 381, 194 e 187	AA: 381
<i>TBX1</i>	4819522	1049C>T	<i>AatII</i>	CC: 103	CT: 206 e 103	TT: 206

## **5. RESULTADOS**

---

---

Os resultados são apresentados separadamente de acordo com os objetivos específicos do estudo.

### **5.1. Análise dos Polimorfismos Gênicos**

#### **5.1.1. Características Gerais dos Grupos**

As características demográficas da população estudada encontram-se na Tabela 4. O grupo experimental foi composto por 367 pacientes com FL/PNS, dos quais 198 (54%) foram do gênero masculino e 169 (46%) do gênero feminino. Nesse grupo, a idade média dos pacientes foi de  $19,1 \pm 14,9$  anos, sendo que a cor de pele mais prevalente entre os indivíduos foi a feoderma (156 pacientes, 42,5%), seguida pela leucoderma (154 pacientes, 42,0%) e a melanoderma (57 pacientes, 15,5%). Quanto ao tipo de fissura, 198 (54%) pacientes apresentaram FLP, 88 (24%) FL e 81 (22%) FP. O grupo controle foi composto por 413 indivíduos normais, dos quais 267 (64,6%) foram do gênero feminino e 146 (35,4%) do gênero masculino. A idade média desse grupo foi de  $24,3 \pm 6,6$  anos e a cor de pele mais prevalente entre os indivíduos foi a feoderma (229 indivíduos, 55,4%), seguida pela leucoderma (157 indivíduos, 38%) e a melanoderma (27 indivíduos, 6,6%). As frequências do gênero e raça/cor de pele entre os grupos foram estatisticamente diferentes (Tabela 4).

**Tabela 4.** Características gerais dos grupos controle e experimental.

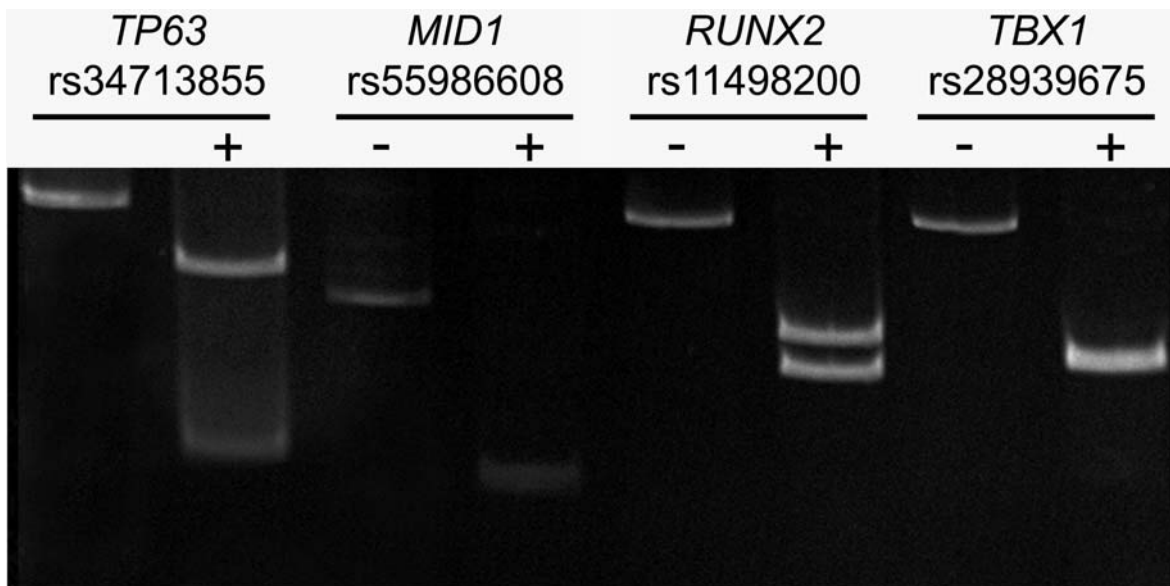
	Grupo Controle	Grupo Experimental	Valor de p
	(n=413)	(n=367)	
	n (%)	n (%)	
Idade			
Média ± DP	24,3 ± 6,6	19,1 ± 14,9	0,19
Variação	13-49 anos	1 mês-61 anos	
Gênero			
Masculino	146 (35,4)	198 (54)	0,00001
Feminino	267 (64,6)	169 (46)	
Raça/Cor de pele			
Leucoderma	157 (38) <sup>a</sup>	154 (42) <sup>a</sup>	0,00001
Melanoderma	27 (6,6) <sup>b</sup>	57 (15,5) <sup>b</sup>	
Feoderma	229 (55,4) <sup>a</sup>	156 (42,5) <sup>a</sup>	
Tipo de fissura			
Fissura Labial		88 (24)	
Fissura Lábio-Palatina		198 (54)	
Fissura Palatina		81 (22)	

<sup>a,b</sup>: Letras indicam diferença estatística.

### 5.1.2. Frequência Alélica e Genotípica dos Polimorfismos

Do total de 7 polimorfismos em potencial nos genes etiológicos para síndromes contendo FL/P como uma das características fenotípicas que foram analisados neste estudo, 3 foram confirmados: rs7940667 do gene *PVRL1* e rs28649236 e rs4819522 do gene *TBX1*. As demais regiões polimórficas não demonstraram variações na população brasileira estudada.

A figura 1 ilustra o padrão de fragmentação dos produtos de PCR após a digestão enzimática caracterizando os genótipos para os polimorfismos que não foram confirmados na nossa população.

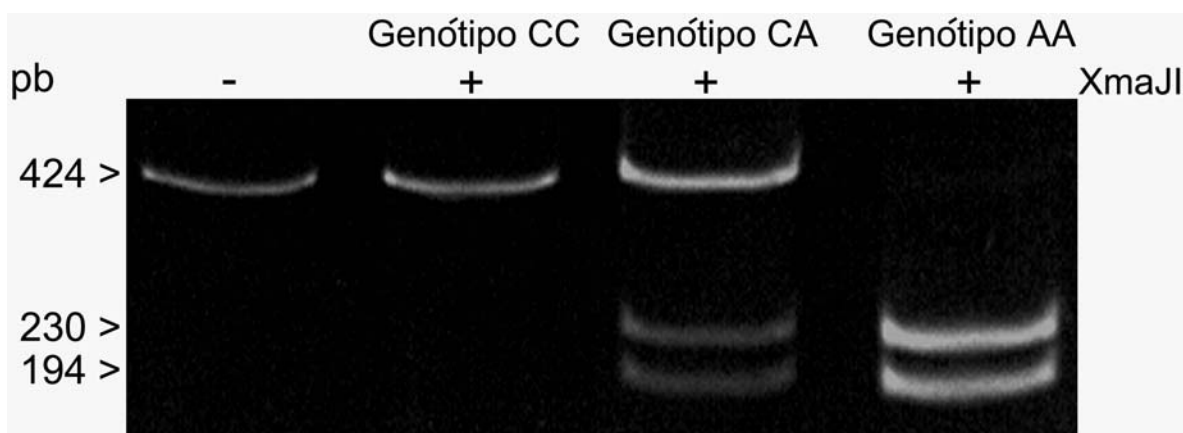


**Figura 1.** Amostras representativas dos polimorfismos que não foram confirmados em nossa população. Os indivíduos GG para o polimorfismo rs34713855 do gene *TP63* apresentaram 2 fragmentos de 299 e 117 pb após incubação com a endonuclease *HhaI*. O genótipo TT do polimorfismo rs55986608 do gene *MID1* foi caracterizado, após incubação com a enzima *DraI*, pela geração de 2 fragmentos de 109 e 100 pb que se migraram juntos após eletroforese e de mais um fragmento de 50pb que não é visto nesta imagem. Indivíduos carregando o genótipo CC do polimorfismo rs11498200 do gene *RUNX2* apresentaram 2 fragmentos de 234 e 146 pb após incubação com a enzima de restrição *HhaI*. Um dos polimorfismos do gene *TBX1* (rs28939675) não foi confirmado na nossa população. Apenas indivíduos homocigotos TT, caracterizados pela digestão do produto de PCR em 2 fragmentos de 194 e 187 pb, que não puderam ser separados, foram identificados.

#### 5.1.2.1 Polimorfismo rs7940667 no Gene *PVRL1*

Os três genótipos possíveis do polimorfismo rs7940667 (c.1082 C>A), o qual resulta na substituição de um aminoácido valina por uma glicina na posição 361 do produto protéico (Val361Gly), foram identificados na população brasileira deste estudo. Figura 2 ilustra o padrão de fragmentação dos produtos de PCR digeridos pela endonuclease *XmaI* e a caracterização dos 3 genótipos.

Para este locus polimórfico, como esperado, o alelo C foi o mais comum, sendo encontrado em 86,3% e 85,4% dos indivíduos do grupo controle e experimental respectivamente (Tabela 5). A frequência dos genótipos no grupo controle para este polimorfismo estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Individualmente, a frequência genotípica da região polimórfica rs7940667 entre os grupos controle e experimental foi significativamente diferente, indicando um efeito protetor do genótipo AA em relação ao genótipo CC ( $p=0,04$ ; OR: 0,32; IC 95%: 0,09-1,17). No entanto, esta diferença não foi mantida após correção para comparações múltiplas. Similarmente, a análise em um modo dominante (CC vs CA+AA) não confirmou tal associação (Tabela 6). Além disso, analisando a distribuição dos genótipos quanto ao tipo de fissura, também não foi observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 7).



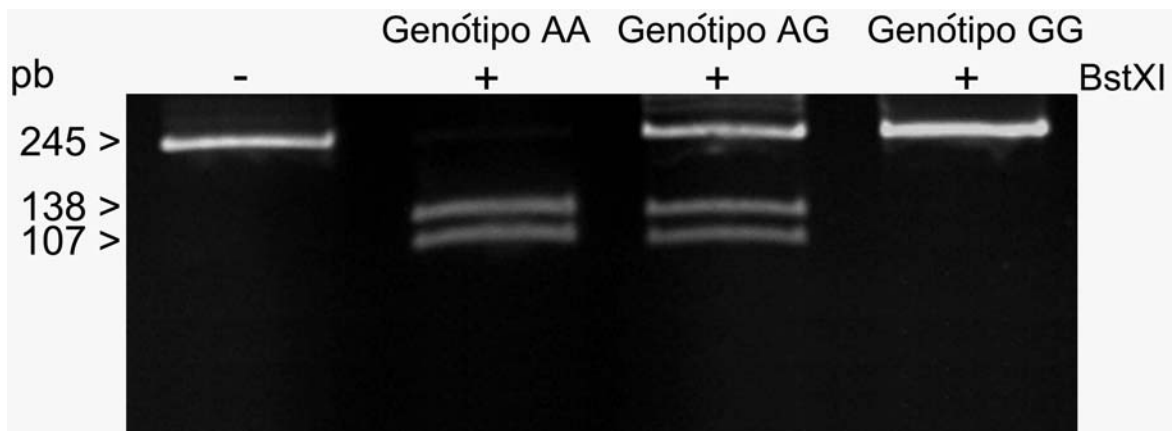
**Figura 2.** Amostras representativas da análise do polimorfismo rs7940667 do gene *PVRL1* para 1 indivíduo homocigoto CC, 1 heterocigoto CA e 1 homocigoto AA deste estudo. A presença do alelo A cria um sítio de restrição reconhecido pela enzima *XmaJI*, gerando 2 fragmentos de 230 e 194 pb, enquanto a presença do alelo C preserva a digestão do amplicon gerado pela reação de PCR de 424 pb.

#### 5.1.2.2. Polimorfismo rs28649236 no Gene *TBX1*

A população estudada apresentou os 3 genótipos possíveis do polimorfismo rs28649236 (c.22A>G) no gene *TBX1*. Este polimorfismo é caracterizado pela

substituição de uma arginina por uma glicina na posição 8 do produto protéico (Arg8Gly). A distinção dos 3 padrões genotípicos foi realizada pela digestão com a endonuclease *BstXI* (Figura 3). O alelo mais comum na população brasileira foi o alelo A (Tabela 5), sendo encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo experimental (96,7%) quando comparado com o grupo controle (92,5%). Então, a presença do alelo G demonstrou um significativo efeito protetor para o risco de FL/PNS ( $p=0,0002$ ; OR: 0,41; IC 95%: 0,25-0,67).

De acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, a proporção observada entre as frequências genotípicas para rs28649236 foi significativamente diferente da esperada ( $p<0,001$ ). A frequência dos genótipos raros AG e GG foi significativamente maior no grupo controle em comparação com o grupo experimental ( $p=0,01$ ), mas o efeito não foi mantido após correção para o teste de Bonferroni de comparações múltiplas (Tabela 6). Contudo, quando os genótipos AG e GG foram agrupados e comparados com a frequência do genótipo homocigoto comum AA (modelo dominante de comparação) foi evidenciada uma diferença estatisticamente significativa, revelando um risco significativamente menor de pertencer ao grupo de pacientes com FL/PNS ( $p=0,004$ ; OR: 0,44; IC 95%: 0,25-0,78) (Tabela 6). Interessantemente, o efeito protetor do alelo G foi mantido após correção para o teste de Bonferroni de comparações múltiplas e após regressão logística com ajuste para gênero e raça/cor de pele. No entanto, a distribuição dos genótipos não evidenciou associação com o tipo de fissura (Tabela 7).

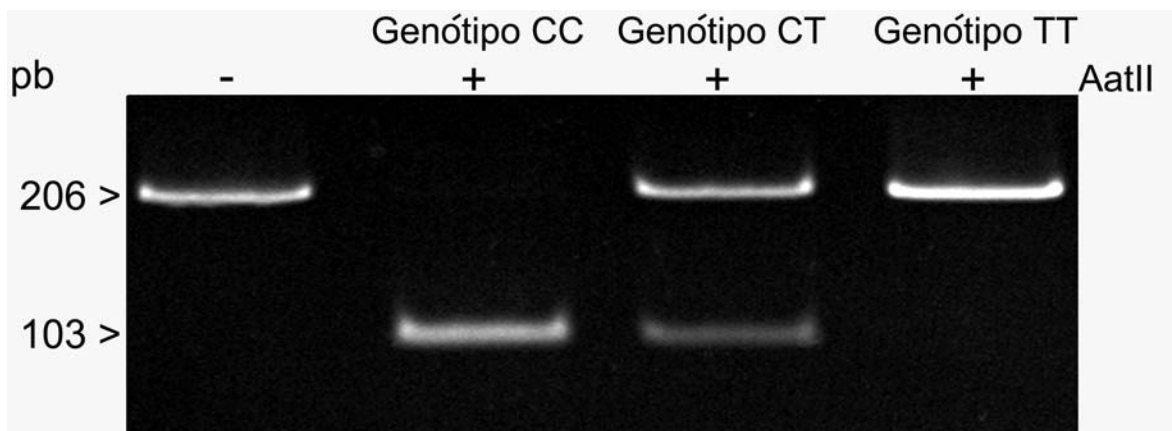


**Figura 3.** Amostras representativas do polimorfismo rs28649236 do gene *TBX1*. São demonstrados exemplos da reação de PCR-RFLP para 1 indivíduo homocigoto AA, 1 heterocigoto AG e 1 homocigoto GG, após incubação com a enzima de restrição *BstXI*. A presença do alelo A gera um sítio de restrição reconhecido pela enzima, permitindo a digestão do amplicon em 2 fragmentos de 138 e 107 pb, contudo, a presença do alelo G bloqueia esse sítio de restrição mantendo um único fragmento de 245 pb.

#### 5.1.2.3. Polimorfismo rs4819522 no Gene *TBX1*

A caracterização do polimorfismo rs4819522 (c.1049C>T) do gene *TBX1* foi realizada através da incubação com a endonuclease *AatII*, a qual revelou os 3 genótipos possíveis na população estudada (Figura 4). Esse polimorfismo é responsável pela substituição de uma treonina por uma metionina na posição 350 (The350Met) da cadeia protéica do gene *TBX1*. O alelo mais comum na população estudada foi o alelo C (~76%) (Tabela 5), sem diferença estatística entre os grupos ( $p=0,10$ ; OR: 1,21; IC 95%: 0,96-1,53). A distribuição dos genótipos para o polimorfismo rs4819522 estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência genotípica revelou uma maior prevalência do genótipo CC em ambos os grupos, não sendo encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,08$ ). No entanto, quando os genótipos foram avaliados pelo modelo dominante (CC vs CT + TT), uma diferença estatística foi observada ( $p=0,03$ ; OR: 1,35; IC 95%: 1,02-1,79;) (Tabela 6). Contudo, essa associação não foi confirmada após aplicação do teste de correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Além

disso, a análise individual ou em um modo dominante (CC vs CT+TT) não demonstrou associação com o tipo de fissura (Tabela 7).



**Figura 4.** Amostras representativas da análise do polimorfismo rs4819522 do gene *TBX1* para 1 indivíduo homozigoto CC, 1 heterozigoto CT e 1 homozigoto TT. Na presença do alelo C, a digestão com a enzima *AatII* gera 2 fragmentos de 103 pb cada um, enquanto que na presença do alelo T abole o sítio de restrição reconhecido pela enzima mantendo um único fragmento de 206 pb.



**Tabela 5.** Frequência alélica dos polimorfismos nos genes *PVRL1* e *TBX1* nos grupos controle e experimental.

Polimorfismo	Grupo Controle (n=413)		Grupo Experimental (n=367)		OR (95% IC)	Valor de p
	n	%	n	%		
<b><i>PVRL1</i></b>						
rs7940667						
Alelo C	713	86,3	627	85,4	Referência	
Alelo A	113	13,7	107	14,6	1,07 (0,81-1,43)	0,61
<b><i>TBX1</i></b>						
rs28649236						
Alelo A	764	92,5	710	96,7	Referência	
Alelo G	62	7,5	24	3,3	0,41 (0,25-0,67)	0,0002
rs4819522						
Alelo C	641	77,6	544	74,1	Referência	
Alelo T	185	22,4	190	25,9	1,21 (0,96-1,53)	0,10

**Tabela 6.** Distribuição dos genótipos dos polimorfismos nos genes *PVRL1* e *TBX1* nos grupos controle e experimental.

Polimorfismo	Grupo Controle (n=413)		Grupo Experimental (n=367)		OR (95% IC)	Valor de p
	n	%	n	%		
<b><i>PVRL1</i></b>						
rs7940667						
CC	311	75,3	263	71,7	Referência	
CA	91	22,0	101	27,5	1,31 (0,95-1,82)	0,04
AA	11	2,7	3	0,8	0,32 (0,09-1,17)	
CA+AA	102	24,7	104	28,3	1,21 (0,88-1,66)	0,25
<b><i>TBX1</i></b>						
rs28649236						
AA	370	89,6	349	95,1	Referência	
AG	24	5,8	12	3,3	0,53 (0,26-1,07)	0,01
GG	19	4,6	6	1,6	0,33 (0,13-0,84)	
AG+GG	43	10,4	18	4,9	0,44 (0,25-0,78)	0,004
rs4819522						
CC	251	60,7	196	53,4	Referência	
CT	139	33,7	152	41,4	1,40 (1,04-1,88)	0,08
TT	23	5,6	19	5,2	1,06 (0,56-1,99)	
CT+TT	162	39,3	171	46,6	1,35 (1,02-1,79)	0,03

**Tabela 7.** Distribuição dos genótipos dos polimorfismos nos genes *PVRL1* e *TBX1* quanto ao tipo de fissura.

Polimorfismo	Fissura Labial		Fissura Lábio-Palatina		Fissura Palatina		Valor de p
	n	%	n	%	n	%	
<b><i>PVRL1</i></b>							
rs7940667							
CC	63	17,2	148	40,3	52	14,2	0,19
CA	25	6,8	49	13,4	27	7,4	
AA	0	0	1	0,3	2	0,4	
CA+AA	25	6,8	50	13,7	29	7,8	0,20
<b><i>TBX1</i></b>							
rs28649236							
AA	84	22,9	188	51,2	77	21	0,97
AG	3	0,8	6	1,6	3	0,8	
GG	1	0,3	4	1,1	1	0,3	
AG+GG	4	1,1	10	2,7	4	1,1	0,98
rs4819522							
CC	52	14,2	103	28,1	41	11,2	0,72
CT	33	9	83	22,6	36	9,7	
TT	3	0,8	12	3,3	4	1,1	
CT+TT	36	9,8	95	25,9	40	10,8	0,46

### **5.1.3. Interações entre *PVRL1* e *TBX1* e o risco preditivo para FL/PNS**

Interações epistáticas entre os polimorfismos de *PVRL1* e *TBX1* foram avaliadas pelo teste de MDR (Tabela 8). A combinação de *PVRL1* rs7940667 e *TBX1* rs28649236 foi o melhor modelo de 2 fatores com um teste de acurácia de 0,52. O modelo de 3 fatores, *PVRL1* rs7940667, *TBX1* rs28649236 e *TBX1* rs4819522, demonstrou uma acurácia de 0,59 e uma consistência de validação cruzada 10/10. Contudo, nenhum modelo foi significativo em predizer o risco individual para FL/PNS.

**Tabela 8.** Interações entre os polimorfismos nos genes *PVRL1* e *TBX1* e o risco preditivo para FL/PNS pelo método multifatorial de redução de dimensionalidade.

Números de fatores	Melhor modelo	Teste de acurácia	CVC <sup>a</sup>	OR (95% IC)	Teste de permutação p valor <sup>b</sup>
2	<i>PVRL1</i> rs7940667 <i>TBX1</i> rs28649236	0,52	10/10	1,68 (0,68-4,12)	0,25
3	<i>PVRL1</i> rs7940667 <i>TBX1</i> rs28649236 <i>TBX1</i> rs4819522	0,59	10/10	1,78 (0,72-4,37)	0,21

<sup>a</sup>CVC: Consistência de validação cruzada.

<sup>b</sup>p valor baseado em 1.000 permutações.

## 5.2. Anomalias Dentais em Pacientes com FL/PNS

### 5.2.1. Características dos Pacientes com FL/PNS

Dos 296 pacientes com FL/PNS, 165 (55,7%) foram do gênero masculino e a idade média foi de  $21,36 \pm 5,47$  anos. Cinquenta % dos pacientes foram leucodermas (n=148), 42,2% foram feodermas (n=125) e apenas 7,8% foram melanodermas (n=23). Os indivíduos melanodermas foram significativamente menos frequentes que os indivíduos leucodermas e feodermas ( $p=0,0001$ ). Quanto à distribuição do tipo de fissura, 177 (59,8%) pacientes apresentaram FLP, 66 (22,3%) FL e 53 (17,9%) FP. A porcentagem de FLP foi significativamente maior que a porcentagem dos outros 2 tipos ( $p=0,0001$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Características dos pacientes com FL/PNS que foram utilizados para avaliação das anomalias dentais.

	FL/PNS (n=296)	Valor de p
	n (%)	
Idade		
(média $\pm$ DP)	$21,36 \pm 5,47$	
Varição	12-30 anos	
Gênero		
Masculino	165 (55,7)	0,048
Feminino	131 (44,3)	
Raça/Cor de pele		
Leucoderma	148 (50) <sup>a</sup>	0,0001
Melanoderma	23 (7,8) <sup>b</sup>	
Feoderma	125 (42,2) <sup>a</sup>	
Tipo de Fissura		
Fissura Labial	66 (22,3) <sup>a</sup>	0,0001
Fissura Lábio-Palatina	177 (59,8) <sup>b</sup>	
Fissura Palatina	53 (17,9) <sup>a</sup>	

<sup>a,b</sup>: Letras indicam diferença estatística.

## 5.2.2. Frequência das Anomalias Dentais

Anomalias dentais foram encontradas em 171 (57,7%) pacientes com FL/PNS, sendo que 28 pacientes apresentavam FL (16,4%), 105 apresentavam FLP (61,4%) e 38 apresentavam FP (22,2%). Pacientes com FL foram significativamente menos afetados por anomalias dentais que pacientes afetados por FLP ou FP ( $p=0,004$ , Tabela 10). Embora os homens apresentassem mais anomalias dentais ( $n=90$ ), comparando-se às mulheres ( $n=81$ ), a distribuição foi similar entre os gêneros ( $p=0,43$ ). Especificamente, os homens foram mais afetados por apinhamento dental, dente ectópico, giroversão, dente impactado, microdontia e dente supranumerário. Além disso, embora a cor de pele tenha sido estatisticamente diferente entre os grupos de fissura, não houve significância quanto à ausência e à presença de anomalia dental ( $p=0,6$ ).

Giroversão foi a anomalia dental mais frequentemente identificada entre os pacientes com FL/PNS (31,3%), seguida de agenesia dental (23,7%) e apinhamento dental (15,1%) (Tabela 11). Dentes impactados corresponderam a 8,8% de todas as anomalias dentais, microdontias corresponderam a 6,7% e taurodontias corresponderam a 4,3%. Hipoplasias de esmalte, dentes ectópicos e dentes supranumerários representaram 4,1%, 3,1% e 2,6% dos casos de anomalias dentais, respectivamente (Tabela 11). Dos 171 pacientes com FL/PNS que apresentavam anomalias dentais, 91 (53,2%) exibiram uma única anomalia e 80 (46,8%) pacientes apresentaram duas ou mais anomalias dentais (anomalias múltiplas). Agenesia dental em associação com giroversão ( $n=14$ ) foi a combinação mais frequente e foi seguida pela associação de giroversão e apinhamento dental ( $n=9$ ) e giroversão e dente impactado ( $n=5$ ). Considerando o tipo de fissura, anomalias dentais múltiplas foram significativamente menos frequentes nos pacientes com FL, comparando-se com anomalias únicas ( $p=0,02$ ) (Tabela 12).

De forma geral, os dentes mais afetados pelas anomalias dentais foram os incisivos superiores ( $n=90$ , 21,9%), marcadamente o incisivo lateral direito, seguidos dos caninos inferiores ( $n=84$ , 20,4%), pré-molares superiores ( $n=76$ , 18,5%), pré-molares inferiores ( $n=64$ , 15,6%), caninos superiores ( $n=32$ , 7,8%), molares superiores ( $n=26$ , 6,3%), molares inferiores ( $n=25$ , 6,1%) e incisivos inferiores ( $n=14$ , 3,4%). As FLs e FPs foram significativamente mais afetadas

por anomalias em incisivos e as FLPs por anomalias em pré-molares ( $p=0,01$ ). A frequência de anomalias dentais da arcada dental superior ( $n=224$ , 54,5%) foi maior do que a inferior ( $n=187$ , 45,5%), sendo as FPs as mais significativamente afetadas ( $p=0,03$ ). Não foi identificada diferença estatística entre os gêneros, considerando-se os dentes ou o grupo dental e nem quanto à arcada dental.

A única anomalia dental que demonstrou diferença significativa na distribuição entre os tipos de fissura foi a agenesia dental. A frequência de agenesia dental foi significativamente menor no grupo de pacientes com FL comparando-se com pacientes com FLP ou FP ( $p=0,03$ ) (Tabela 13). O risco de ocorrência de agenesia dental em um paciente com FLP foi 5 vezes maior que em um paciente com FL (OR: 5,4; IC: 1,87-15,79), e um paciente com FP apresentou um risco ~7 vezes maior que um paciente com FL (OR: 6,7; IC: 2,08-21,57). Entre os 66 pacientes com agenesia dental, 28 (42,4%) pacientes apresentaram agenesias múltiplas, sendo que 21 pacientes apresentaram agenesia de 2 dentes, 4 pacientes apresentaram agenesia de 3 dentes e 3 pacientes apresentaram ausência de 4 dentes. A agenesia dental foi significativamente mais frequente na arcada superior ( $n=63$ , 63,6%) do que na arcada inferior ( $n=36$ ; 36,4%) ( $p=0,007$ ), sendo os segundos pré-molares superiores (21,2%) e incisivos laterais superiores (18,2%) os dentes mais afetados. Os pré-molares foram estatisticamente mais afetados do que os outros grupos dentais ( $p=0,0001$ ).

Os dentes mais afetados por giroversão foram os caninos inferiores ( $n=59$ ) e dos 90 pacientes afetados por essa anomalia, 41 (45,6%) apresentaram 2 dentes simultaneamente envolvidos e 7 pacientes (7,8%) apresentaram 3 dentes afetados. Interessantemente, 22 (24,4%) desses pacientes apresentaram giroversão bilateral dos caninos inferiores. A mandíbula ( $n=96$ ; 74%) foi mais frequentemente acometida que a maxila ( $n=34$ ; 26%). A giroversão foi identificada em 59 pacientes que apresentavam anomalias múltiplas.

Os dentes mais afetados pelo apinhamento foram os incisivos superiores ( $n=20$ ) seguidos dos pré-molares superiores ( $n=17$ ). O apinhamento dental esteve presente associado ao dente girovertido ( $n=2$ ), ao dente impactado ( $n=1$ ), ao microdente ( $n=1$ ) e ao dente supranumerário ( $n=1$ ). Além disso, dos



37 pacientes com apinhamento dental, 24 (64,9%) apresentaram anomalias múltiplas.

Os dentes mais afetados pela impactação dental foram os pré-molares superiores (n=18) seguidos dos caninos superiores (n=12). As anomalias dentais associadas ao dente impactado foram apinhamento e hipoplasia de esmalte, giroversão e dente ectópico. Apenas 2 (7,6%) pacientes apresentaram dente impactado como uma única anomalia dental, contrastando com os 24 (92,4%) pacientes com anomalias múltiplas.

Microdontias foram observadas em incisivos superiores (n=17) e molares superiores (n=9). A microdontia foi observada como anomalia única em 8 (33,3%) pacientes e como anomalias múltiplas em 16 (66,7%) pacientes.

Dos 18 dentes afetados por taurodontismo, 13 (72,2%) ocorreram em molares inferiores e 5 (27,8%) em molares superiores. Dois pacientes apresentaram 4 taurodontias simultaneamente (um com todos os molares inferiores afetados e o outro com 2 molares superiores e 2 molares inferiores). Apenas 3 (30%) pacientes apresentaram taurodontismo como uma única anomalia dental.

Das 17 hipoplasias de esmalte identificadas nos pacientes com FL/PNS, 8 (47,1%) ocorreram nos pré-molares inferiores e 6 (35,3%) em pré-molares superiores. Um paciente apresentou 5 dentes afetados por essa anomalia (2 pré-molares superiores, 2 pré-molares inferiores e 1 canino inferior), 2 pacientes apresentaram 3 dentes afetados (2 pré-molares inferiores e 1 pré-molar superior) e 1 paciente demonstrou 2 pré-molares superiores afetados por hipoplasia de esmalte. Dos 9 pacientes afetados por hipoplasia de esmalte, apenas 1 (11,1%) apresentou a hipoplasia de esmalte como alteração única.

Erupções ectópicas envolveram os incisivos superiores (n=8, 61,5%), os caninos e pré-molares superiores (n=2 cada; 15,4%) e os pré-molares inferiores (n=1; 7,7%). Dente ectópico impactado foi observado em 4 pacientes. Em adição, dos 8 pacientes afetados, apenas 2 (25%) apresentaram o dente ectópico como alteração dental única.

Nove pacientes apresentaram 11 dentes supranumerários, sendo que apenas 2 pacientes apresentaram mais de um dente extra. Os caninos superiores, pré-molares superiores e pré-molares inferiores foram os dentes mais afetados (27,3% cada).

**Tabela 10.** Presença de anomalias dentais em pacientes com FL/PNS.

<b>Anomalia Dental</b>	<b>Fissura Labial</b>		<b>Fissura Lábio-Palatina</b>		<b>Fissura Palatina</b>		<b>Valor de p</b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
Ausência	38	57,6	72	40,7	15	28,3	
Presença	28 <sup>a</sup>	42,4	105 <sup>b</sup>	59,3	38 <sup>b</sup>	71,7	0,004
Total	66	100	177	100	53	100	

<sup>a,b</sup>: Letras indicam diferença estatística.

**Tabela 11.** Frequência das anomalias dentais identificadas no grupo de pacientes com FL/PNS.

<b>Anomalia Dental</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Giroversão	130	31,3
Agensia Dental	99	23,7
Apinhamento	63	15,1
Dente Impactado	37	8,8
Microdontia	28	6,7
Taurodontismo	18	4,3
Hipoplasia de Esmalte	17	4,1
Dente Ectópico	13	3,1
Dente Supranumerário	11	2,6
Total	416	100

**Tabela 12.** Frequência das anomalias dentais únicas e múltiplas nos pacientes com FL/PNS.

<b>Anomalia Dental</b>	<b>Fissura Labial</b>	<b>Fissura Lábio-Palatina</b>	<b>Fissura Palatina</b>	<b>Valor de p</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
Única	17 (60,7)	55 (52,4)	19 (50)	
Múltipla	11 (39,3) <sup>a</sup>	50 (47,6) <sup>b</sup>	19 (50) <sup>b</sup>	0,02
Total	28 (100)	105 (100)	38 (100)	

<sup>a,b</sup>: Letras indicam diferença estatística.

**Tabela 13.** Distribuição das anomalias dentais entre os tipos de FL/PNS.

Anomalia dental	FL		FLP		FP		Valor de p
	n	%	n	%	n	%	
<b>Agenesia dental</b>							
Não	62	93,9	131	74,0	37	69,8	0,03
Sim	4 <sup>a</sup>	6,1	46 <sup>b</sup>	26,0	16 <sup>b</sup>	30,2	
<b>Giroversão</b>							
Não	52	78,8	123	69,5	31	58,5	0,9
Sim	14	21,2	54	30,5	22	41,5	
<b>Apinhamento dental</b>							
Não	60	90,9	156	88,1	43	81,1	0,7
Sim	6	9,1	21	11,9	10	18,9	
<b>Dente Impactado</b>							
Não	61	92,4	161	91,0	48	90,6	0,8
Sim	5	7,6	16	9,0	5	9,4	
<b>Microdontia</b>							
Não	59	89,4	162	91,5	51	96,2	0,5
Sim	7	10,6	15	8,5	2	3,8	
<b>Taurodontismo</b>							
Não	66	100	170	96,1	50	94,3	0,2
Sim	0	0	7	3,9	3	5,7	
<b>Hipoplasia de esmalte</b>							
Não	65	98,5	171	96,6	51	96,2	0,6
Sim	1	1,5	6	3,4	2	3,8	

<b>Dente ectópico</b>							
Não	66	100	173	97,7	49	92,5	0,4
Sim	0	0	4	2,3	4	7,5	
<b>Supranumerário</b>							
Não	62	93,9	172	97,2	53	100	0,4
Sim	4	6,1	5	2,8	0	0	

\* Continuação da tabela 13.

<sup>a,b</sup>: Letras indicam diferença estatística.

## 6. DISCUSSÃO

---

---

### 6.1. Polimorfismos Gênicos e FL/PNS

A amostra utilizada nesta parte do estudo pode ser considerada robusta, visto que cálculos de poder estatístico demonstraram que para a detecção de um efeito de 15%, o poder do estudo foi de aproximadamente 90%. Casos e controles não foram pareados e foram identificadas diferenças significantes em relação ao gênero e raça/cor de pele dos indivíduos que formaram os grupos. Quanto ao gênero, a proporção entre homens e mulheres foi praticamente inversa, com o grupo experimental apresentando mais homens e o grupo controle mais mulheres. A prevalência de homens no grupo experimental era esperada pelo fato de que homens são mais afetados pelas FL/PNS do que as mulheres; já a maior proporção de mulheres no grupo controle poderia ser explicada pelo número maior de mulheres que procuraram por atendimento odontológico convencional na clínica da Faculdade de Odontologia de Alfenas (UNIFENAS) em relação aos homens. Quanto à etnia, a população brasileira pode ser considerada uma das mais heterogêneas do mundo, sendo representada por uma miscigenação étnica de euro-brasileiros (colonizadores espanhóis e portugueses, principalmente), afro-brasileiros e ameríndios, o que torna muito difícil caracterizar a etnicidade dos indivíduos (Vieira *et al.*, 2002; Bertoja *et al.*, 2008). Em adição, existem fortes evidências de que cor de pele não é um indicador muito seguro de raça na população brasileira (Parra *et al.*, 2004, Estrela *et al.*, 2008). Para minimizar a influência dessas diferenças entre os grupos, realizou-se regressão logística ajustada para gênero e raça/cor de pele para determinar a real associação dos polimorfismos com o grupo experimental.

Inúmeras evidências indicam que as FL/PNS, como resultado da diversidade gênica, baixa penetrância e influência de vários fatores ambientais, são geneticamente complexas (revisado por Lidral *et al.*, 2008). Não existe um único gene associado a todas às FL/PNS. Na verdade, vários *loci* foram correlacionados com a etiologia das FL/PNS (Field *et al.*, 2004; Marazita *et al.*, 2004; Koillinen *et al.*, 2005; Carinci *et al.*, 2007; Riley *et al.*, 2007b; Vieira *et al.*, 2008b; Birnbaum *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2009; Mangold *et al.*, 2009; Marazita

*et al.*, 2009; Letra *et al.*, 2010; Mangold *et al.*, 2010). Uma das estratégias que têm contribuído para identificação de genes associados às FL/PNS é a avaliação de polimorfismos em genes causadores de síndromes apresentando FL/P como uma característica. O melhor exemplo do sucesso dessa estratégia é *IRF6*, o gene causador de VWS e PPS (Zuccherro *et al.*, 2004; Scapoli *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007; Birnbaum *et al.*, 2008; Rahimov *et al.*, 2008; Jehee *et al.*, 2009; Rojas-Martinez *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). No presente estudo foram analisados 7 polimorfismos nos genes *TP63*, *MID1*, *PVRL1*, *RUNX2* e *TBX1*, os quais são etiológicos para síndromes que apresentam a FL/P como parte do espectro clínico. Apenas os polimorfismos rs7940667 do gene *PVRL1* e rs28649236 e rs4819522 do gene *TBX1* foram confirmados na população analisada.

O polimorfismo rs28649236 no gene *TBX1* foi o único a demonstrar um resultado significativo. O alelo G e os genótipos AG e GG ocorreram em uma frequência significativamente maior no grupo controle que no grupo experimental, e o alelo G promoveu um significativo efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS ( $p=0,0002$ ; OR: 0,41; IC 95%: 0,25-0,67). No entanto, a distribuição dos genótipos não foi associada a um tipo específico de fissura. Como um fato não esperado, nossos resultados demonstraram que a distribuição genotípica do polimorfismo rs28649236 não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Explicações para tal fato podem residir em erros de genotipagem, grupo de amostras com heterogeneidade étnica e fato aleatório, visto que 1 em cada 20 marcadores podem apresentar desequilíbrio (Lewis, 2002). Interessantemente, nossos resultados foram validados repetindo a reação de PCR-RFLP em 10% das amostras e encontramos uma concordância plena. Em adição, estudos utilizando a população brasileira também encontraram amostras em desequilíbrio e supõe-se que a complexidade étnica da nossa população pode justificar tal achado (Gaspar *et al.*, 1999, Zuccherro *et al.*, 2004).

Embora não existam estudos demonstrando a funcionalidade desse polimorfismo, o nucleotídeo polimórfico está situado em uma região de splicing e a presença do nucleotídeo variante G é preditivo de uma alteração nesse sítio. Em adição, nós observamos uma marcante alteração no perfil hidrofóbico da proteína na presença do aminoácido glicina (aminoácido polimórfico)



comparado com o aminoácido arginina (Hall, 1999). Em qualquer das situações, um efeito significativo na função protéica é esperado. Não existem estudos na literatura avaliando esse polimorfismo em FL/PNS. Han e colaboradores (2006) demonstraram uma frequência maior do polimorfismo rs28649236 em crianças com defeitos conotrunciais. A expressão de *TBX1* foi identificada no tecido coronariano em desenvolvimento, suportando os resultados de Han *et al.* (Chieffo *et al.*, 1997). Interessantemente, *TBX1* é expresso na palatogênese durante o alongamento e elevação das placas palatinas (Goudy *et al.*, 2010). Então, caberá aos estudos futuros avaliar a contribuição deste polimorfismo no desenvolvimento das FL/PNS em diferentes populações.

Dos outros 2 polimorfismos em *TBX1*, rs4819522 foi confirmado em nossa população, mas não apresentou significância entre os grupos após aplicação do teste de correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Uma das principais questões em estudos de associação é a forma de avaliar o significado de múltiplas comparações. A correção de Bonferroni é comumente aplicada, mas é geralmente muito estridente. Uma alternativa para o fato seria a utilização da replicação do teste em um segundo conjunto de amostras, contudo, nós não tivemos acesso a esse segundo conjunto de amostras. A proporção do alelo C na população brasileira (75,9%) foi muito similar à proporção observada na população de origem hispânica (75%). Similarmente, a distribuição genotípica do polimorfismo rs4819522 foi semelhante entre a população deste estudo (57,1%) e a população hispânica (59,1%). Diferentemente, populações da Europa, Ásia, África Sub-Saariana e Afro-americanos apresentam a frequência do alelo C e do genótipo CC mais elevada (alelo C ~91% e genótipo CC ~82%) do que na população avaliada neste estudo (GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

O genótipo comum do polimorfismo rs7940667 do gene *PVRL1* foi observado em 71,7% dos indivíduos do grupo experimental e em 75,3% dos voluntários do grupo controle, representando 73,5% da população investigada, o que é comparável com a frequência dos europeus (76,7%) (GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Uma alta frequência desse genótipo também é observada em indivíduos de origem asiática, mas uma prevalência de apenas 46% é encontrada em indivíduos africanos. Em nosso estudo, o polimorfismo

rs7940667 não foi correlacionado com nenhum dos grupos analisados. Este polimorfismo tem sido estudado como fator de risco para FL/PNS em algumas populações, porém os resultados são inconclusivos (Ávila *et al.*, 2006; Neiswanger *et al.*, 2006; Sözen *et al.*, 2009). Corroborando os nossos resultados, Sözen *et al.* (2009) não identificaram uma correlação desse polimorfismo com FL/PNS de pacientes norte-americanos e australianos. Interessantemente, esses autores encontraram o alelo variante A na população norte-americana, mas não na população australiana. Neiswanger *et al.* (2006) também não encontraram uma correlação entre o polimorfismo rs7940667 e pacientes da Guatemala com FL/PNS. Contudo, esses autores encontraram uma correlação significativa entre outro polimorfismo (rs3829260) do gene *PVRL1* e FL/PNS e demonstraram uma associação entre defeitos no músculo orbicular oral e FL/PNS. Em oposição aos nossos resultados, Ávila e colaboradores (2006) demonstraram que o polimorfismo rs7940667 é significativamente associado ao desenvolvimento de FL/PNS, principalmente nas formas isoladas de FL e FP, em populações de Iowa-EUA, Filipinas e Dinamarca. Considerando que o gene *PVRL1* codifica um receptor de superfície utilizado pelo vírus herpes simples durante o processo de infecção, e que infecções maternas durante o período gestacional têm sido correlacionadas como um fator de risco para o nascimento de um filho com FL/PNS, Ávila *et al.* (2006) exploraram a possível interação gene-ambiente em pacientes com FL/PNS e suas respectivas mães em uma amostra de pacientes sul-americanos (amostras oriundas da Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Equador, Paraguai, Uruguai e Venezuela). Nenhuma associação entre o polimorfismo rs7940667 e a exposição viral foi observada. Infelizmente, os autores não discriminaram as populações sul-americanas quanto à frequência alélica e genotípica para o polimorfismo rs7940667, o que nos impede de conhecermos a sua distribuição na população brasileira. Desta forma, mais estudos são necessários para que se possa evidenciar a real participação de variantes polimórficas do gene *PVRL1* na etiologia das FL/PNS.

Neste estudo nós também avaliamos a existência de uma possível interação gene-gene entre os polimorfismos que revelaram variações na população estudada (rs7940667 do gene *PVRL1* e rs4819522 e rs28649236 do gene *TBX1*). Entretanto, nenhuma relação foi encontrada e o rs28649236 do

gene *TBX1* parece contribuir de maneira independente para um risco aumentado de desenvolvimento de FL/PNS. Quatro dos polimorfismos estudados não foram confirmados na população brasileira estudada. Estes resultados não são inesperados, visto que 2 destes genótipos (rs34713855 do gene *TP63* e rs11498200 do gene *RUNX2*) são invariáveis em praticamente todas as populações estudadas, incluindo populações da Europa, Ásia e África Sub-Saariana (GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), enquanto que outros 2 (rs55986608 de *MID* e rs28939675 de *TBX1*) nunca foram estudados.

Em resumo, os resultados deste estudo demonstraram que o polimorfismo rs28649236 do gene *TBX1* apresenta um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS na população brasileira. Além disso, este estudo corrobora evidências prévias que demonstraram a influência de genes responsáveis por síndromes contendo FL/P na etiopatogenia das FL/PNS.

## **6.2. Anomalias Dentais e FL/PNS**

Até o presente momento, estudos genéticos em fissuras orofaciais têm definido o fenótipo FL/PNS apenas como uma característica qualitativa (afetado ou não afetado). No entanto, inúmeras linhas de evidências sugerem que os grupos de FL/PNS (FL, FLP e FP) podem apresentar subgrupos específicos com contribuições genéticas distintas, incluindo penetrância incompleta e expressividade variável dentro de uma mesma família (Lidral *et al.*, 2008; Jugesser *et al.*, 2009). Recentemente, foi proposto que as anomalias dentais em áreas não acometidas pelas fissuras poderiam servir como marcadores para a definição de subfenótipos de FL/PNS (Letra *et al.*, 2007). Sob essa perspectiva, vários trabalhos com diferentes populações de FL/PNS demonstraram que anomalias dentais, principalmente as anomalias de número, erupção e estrutura, são mais prevalentes em pacientes com FL/PNS do que na população em geral (Ranta & Rintala, 1982; Shapira *et al.*, 2000; Slayton *et al.*, 2003; Letra *et al.*, 2007; Menezes & Vieira, 2008; Al Jamal *et al.*, 2010; Kuchler *et al.*, 2010). Os nossos resultados corroboram com tais estudos e confirma que as anomalias dentais em pacientes brasileiros com FL/PNS são mais frequentes do que em indivíduos brasileiros normais (Coutinho *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2004; Kuchler *et al.*, 2008a; Kuchler *et al.*, 2008b). Dos 296

pacientes avaliados, 171 (57,7%) apresentaram pelo menos uma anomalia dental, o que foi superior a estudos semelhantes que apontaram uma frequência de anomalias dentais entre 32,2 e 49,4% em pacientes com FL/PNS (Letra *et al.*, 2007; Menezes & Vieira, 2008; KÜchler *et al.*, 2010). Esta frequência aumentada pode também ser atribuída a correções cirúrgicas realizadas em idades tenras. O número de casos na nossa amostra não permitiu a subdivisão de acordo com o tempo cirúrgico e muitos dos pacientes que chegaram ao Centro de Reabilitação de Alfenas não foram acompanhados desde a infância, o que impossibilitou o resgate da história médica/cirúrgica pregressa desses pacientes.

Outro ponto interessante dos nossos resultados foi que pacientes com FLP e FP demonstraram um número significativamente maior de anomalias dentais que pacientes com FL. Corroborando os nossos resultados, Menezes & Vieira (2008) demonstraram que pacientes com FP foram significativamente mais afetados pelas anomalias dentais do que pacientes com FL e FLP. Estes resultados contrastam com alguns estudos na literatura que demonstraram uma frequência maior de anomalias dentais em pacientes com FLP comparado com pacientes afetados por FL ou FP (van den Boogaard *et al.*, 2000; Shapira *et al.*, 2000; Eerens *et al.*, 2001; Slayton *et al.*, 2003, Aizenbud *et al.*, 2005; Letra *et al.*, 2007). Reforçando os nossos achados, os pacientes com FP foram os mais afetados mesmo entre os pacientes com anomalias dentais múltiplas. Isto sugere que não existe uma relação direta entre o número de anomalias dentais e a extensão da fissura. Contudo, os nossos resultados são similares aos reportados recentemente por Aizenbud e colaboradores (2010) que descreveram FL como subtipo de fissura com o menor índice de associação com anomalias dentais. Esses autores sugeriram que fissuras sem envolvimento de tecido ósseo apresentam menor quantidade de tecido mesenquimal deficiente e, portanto, poderiam induzir menos alterações durante o desenvolvimento dental.

Este estudo está de acordo com a maioria dos estudos evidenciando a falta de associação entre a presença das anomalias dentais e o gênero do paciente com FL/PNS (Shapira *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.* 2002, Ribeiro *et al.*, 2003; Menezes & Vieira, 2008; Al Jamal *et al.*, 2010; Akcam *et al.*, 2010; KÜchler *et al.*, 2010; Tereza *et al.*, 2010). Em pacientes sem fissura, a

correlação entre anomalias dentais e gênero é muito divergente (Whittington & Durward, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003; Kuchler *et al.*, 2008a,b). No entanto, Demirjian *et al.* (1973) observaram que os mecanismos que controlam o desenvolvimento dental são independentes da maturidade somática e sexual, mas parecem ser altamente influenciados por fatores etiológicos, tais como os das fissuras. Dentre as anomalias identificadas em nosso estudo, praticamente todas estão em uma incidência superior à população normal, com exceção de taurodontismo e dentes supranumerários. As frequências de taurodontismo e dentes supranumerários na população normal são de 0,3 a 11,3% (Shifman & Chananel, 1978; Jorgenson *et al.*, 1982; Kuchler *et al.*, 2008a) e 0,1 a 3,6%, respectivamente (Silva Meza, 2003; Arathi & Ashwini, 2005; Acikgoz *et al.*, 2006). Nós identificamos taurodontismo em 4,3% dos pacientes com FL/PNS e dentes supranumerários em 2,6% dos pacientes com FL/PNS.

Os principais dentes afetados por anomalias foram os incisivos laterais superiores, caninos inferiores e primeiros pré-molares superiores. Em geral, os pacientes com FL e FP foram mais afetados por anomalias em incisivos e os pacientes com FLP, por anomalias em pré-molares. Os nossos resultados estão parcialmente de acordo com o estudo de Menezes & Vieira (2008), que identificaram os incisivos laterais e pré-molares superiores e segundos pré-molares inferiores como sendo os dentes mais afetados. Em adição, nosso estudo se assemelha metodologicamente muito ao estudo de Menezes & Vieira (2008), embora o objetivo desses autores tenha sido definir subfenótipos de fissura baseando-se em anomalias dentais. A maioria dos estudos na literatura observou que as anomalias afetam principalmente os incisivos laterais e os pré-molares (Tsai *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2003; Letra *et al.*, 2007; Tortora *et al.*, 2008; Camporesi *et al.*, 2010; Al Jamal *et al.*, 2010; Kuchler *et al.*, 2010). Vale ressaltar que a grande diversidade de resultados encontrados na literatura pode ser explicada pela aplicação de diferentes critérios metodológicos para a classificação das fissuras e das anomalias dentais. É interessante destacar que simulamos uma análise estatística subdividindo as fissuras em 9 subtipos (FL unilateral/bilateral e completa/incompleta, FLP unilateral/bilateral e completa/incompleta e FP completa/incompleta) e os resultados foram similares aos observados utilizando a classificação clássica de 3 subtipos. Visto que o número reduzido de pacientes em alguns grupos e consequente

limitação estatística imposta por estas condições, optamos por apresentar nossos resultados com a classificação de 3 subtipos.

Giroversão foi a anomalia dental mais frequentemente identificada entre os pacientes com FL/PNS (31,3%) e giroversão bilateral dos caninos inferiores foi identificada em 24,4% dos casos. O presente estudo é o primeiro a relatar essa frequência de giroversão em pacientes fissurados. Embora não tenha ocorrido uma diferença significativa entre os tipos de fissura, os pacientes com FP foram os mais afetados por essa anomalia. Akcam *et al.* (2010) demonstraram que a giroversão estava presente principalmente na região anterior superior sem preferência por um tipo específico de fissura. No entanto, estes autores não especificaram qual dente foi o mais afetado e se estava dentro ou fora da área de fissura. Letra *et al.* (2007) identificaram que a giroversão estava entre as anomalias mais frequentemente identificadas em pacientes com FL/PNS, comparando-se a indivíduos normais, sendo os caninos inferiores os mais afetados. Os autores ainda observaram que a giroversão apresentava associação preferencial com as FLPs. A alta frequência de giroversão em nosso estudo pode ser devida ao critério metodológico empregado neste estudo. É importante ressaltar que a giroversão pode ser induzida pelas cirurgias reparadoras do lábio e/ou palato dos pacientes fissurados.

A distribuição de agenesias dentais foi significativamente diferente entre os tipos de fissura, sendo os pacientes com FL menos afetados que os pacientes com FLP ou FP. A maioria dos estudos demonstra que as FLPs apresentam maior prevalência de agenesia dental entre os tipos de fissura (Ranta & Tulensalo, 1988; Lopes *et al.*, 1991; Vichi & Franchi, 1995; Larson *et al.*, 1998; Dewinter *et al.*, 2003; Menezes & Vieira, 2008), contrastando com os nossos resultados que evidenciaram as FPs as mais afetadas por agenesia dental. Dos 296 pacientes analisados neste estudo, 66 (22,3%) apresentaram agenesia dental. Interessantemente, estudos prévios relataram uma incidência de agenesia dental em pacientes fissurados que varia de 15,7 a 77% (Shapira *et al.*, 2000; Eerens *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2003; Aizenbud *et al.*, 2005; Letra *et al.*, 2007; Al Jamal *et al.*, 2010; Menezes & Vieira 2008; da Silva *et al.*, 2008). Essa discrepância entre os resultados pode ser atribuída à inclusão inapropriada de dentes em áreas contínuas às fissuras. Nessas áreas, a

ausência dental é provavelmente uma consequência direta (local) da ausência de fusão dos processos embrionários e não somente uma ação genética. Mais importante, quando anomalias em áreas de fissuras foram excluídas, a incidência de agenesia dental foi muito semelhante (índices de 26 a 31,6%) ao encontrado em nosso estudo (Eerens *et al.*, 2001; Letra *et al.*, 2007; Menezes & Vieira 2008; da Silva *et al.*, 2008). Os principais dentes envolvidos por agenesia foram os segundos pré-molares superiores e os incisivos laterais superiores. Corroborando os nossos resultados, Ribeiro *et al.* (2003) também identificaram que os segundos pré-molares superiores foram os dentes mais afetados pela agenesia dental fora da área de fissura. Essa distribuição, especialmente distante da fissura, pode sugerir um contexto genético comum entre as alterações. Favorecendo essa hipótese, Letra *et al.* (2007) propuseram que a presença constante de anomalias dentais no lado oposto às fissuras unilaterais, especialmente agenesia de incisivo lateral, poderia representar formas “frustradas” de fissuras bilaterais. Interessantemente, alterações em *MSX1*, *TGFA*, *PAX9*, *FGFR1* e *IRF6*, genes já relacionados com a etiologia das FL/PNS, são associados também com agenesia dental isolada (Modesto *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007). Em concordância com os resultados de Letra *et al.* (2007), nós identificamos neste estudo que a agenesia dental em associação com a giroversão foi a forma mais frequente de múltiplas anomalias dentais, sendo as FLP (92,8%) as mais afetadas. O malposicionamento do canino e agenesia dental são anomalias que frequentemente ocorrem juntas na população humana (Pirinen *et al.*, 1996; Peck *et al.*, 1993; Peck *et al.*, 2002). Além disso, malposicionamento dental tem sido associado a várias anomalias dentais (Peck *et al.*, 1993; Peck *et al.*, 2002; Ely *et al.*, 2006) e às fissuras orais (Letra *et al.*, 2007). Em conjunto, os dados sugerem que as FL/PNS e certos tipos de anomalias dentais, tais como a agenesia dental e a giroversão, podem apresentar um similar contexto genético e anomalias dentais podem representar possíveis marcadores clínicos para subfenotipar as FL/PNS. Futuros estudos genéticos irão esclarecer tal suposição.

Embora este estudo represente uma descrição minuciosa das anomalias dentais presentes em um grupo de pacientes com FL/PNS, amostras maiores são necessárias para efetivamente determinar a relação de cada anomalia dental com os respectivos tipos de fissura. Além disso, o desenho inicial deste

trabalho era analisar clínica e geneticamente pacientes com FL/PNS e indivíduos normais (controle) quanto à frequência de anomalias dentais. Portanto, estes dados representam resultados preliminares e serão complementados em estudos futuros.

Considerando a importância do diagnóstico das anomalias dentais, é bem evidente que elas geram não somente problemas estéticos como também alterações funcionais. Portanto, o diagnóstico precoce dessas alterações permite que se estabeleçam condutas clínicas e ortodônticas preventivas, interceptivas e corretivas, visando à minimização dos seus efeitos deletérios no desenvolvimento da oclusão dental e da estética dos pacientes fissurados, favorecendo assim uma melhora na qualidade de vida desses pacientes.

Em resumo, este trabalho está de acordo com muitos estudos que demonstraram uma frequência elevada de anomalias dentais em pacientes com FL/PNS, enfatizando que tais alterações possam fazer parte de um contexto genético único. Associadamente, os resultados sugerem que determinadas anomalias dentais, como agenesia dental e giroversão, possam fazer parte do espectro fenotípico de FL/PNS com contribuições etiológicas específicas.



## 7. CONCLUSÕES

---

---

1. A presença do alelo variante G no gene *TBX1* (rs28649236) foi significativamente mais frequente no grupo controle e sua presença no genótipo contribuiu para um risco de aproximadamente 2,5 vezes menor de apresentar FL/PNS.
2. Os polimorfismos rs7940667 do gene *PVRL1* e rs4819522 do gene *TBX1* não apresentaram nenhuma associação significativa com FL/PNS nesta população brasileira avaliada.
3. Quatro dos polimorfismos em potencial deste estudo, rs34713855 de *TP63*, rs55986608 de *MID1*, rs11498200 de *RUNX2* e rs4819522 de *TBX1* não foram confirmados na população brasileira.
4. Pacientes com FL apresentaram uma frequência significativamente menor de anomalias dentais comparando com pacientes afetados por FLP ou FP.
5. Agenesia dental foi a única anomalia dental mais frequentemente identificada em pacientes com FLP e FP que em pacientes com FL.

## REFERÊNCIAS

---

---

- Acikgoz A, Acikgoz G, Tunga U, Otan F. Characteristics and prevalence of non syndrome multiple supernumerary teeth: a retrospective study. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006; 35(3): 185-90.
- Aizenbud D, Camasuvi S, Peled M, Brin I. Congenitally missing teeth in the Israeli cleft population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(3): 314-7.
- Aizenbud D, Coval M, Hazan-Molina H, Harari D. Isolated soft tissue cleft lip: epidemiology and associated dental anomalies. *Oral Dis.* 2010; 26.
- Akcam MO, Evirgen S, Uslu O, Memikoğlu UT. Dental anomalies in individuals with cleft lip and/or palate. *Eur J Orthod.* 2010; 32(2): 207-13.
- Al Jamal GA, Hazza'a AM, Rawashdeh MA. Prevalence of Dental Anomalies in a Population of Cleft Lip and Palate Patients. *Cleft Palate Craniofac J.* 2010; 47(4): 413-20.
- Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr*, 2007; 85(2): 598S-603S.
- Antoszewski B, Kruk-Jeromin J. Epidemiology of cleft lip and palate in Lodz, Poland, in the years 1981-1995. *Acta Chir Plast.* 1997; 39(4): 109-12.
- Aquino SN, Paranaiba LMR, Martelli DRB, Swerts MSO, Barros L M, Bonan PRF *et al.* Study of patients with cleft lip and palate with consanguineous parents. *BJORL.* 2010; 76. In press.
- Arathi R, Ashwini R. Supernumerary teeth: A case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2005; 23(2):103-5.
- Ávila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K *et al.* *PVRL1* variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet A.* 2006; 140(23): 2562-70.
- Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, Kelsey KT, Hayes C. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79(1): 8-15.

---

\*De acordo com a norma UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Baldini A. Dissecting contiguous gene defects: TBX1. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15(3): 279-84.
- Barrow LL, van Bokhoven H, Daack-Hirsch S, Andersen T, van Beersum SE, Gorlin R *et al.* Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J Med Genet.* 2002; 39(8): 559-66.
- Beaty TH, Maestri NE, Hetmanski JB, Wyszynski DF, Vanderkolk CA, Simpson JC *et al.* Testing for interaction between maternal smoking and TGFA genotype among oral cleft cases born in Maryland 1992-1996. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997; 34(5): 447-54.
- Bellis TH, Wohlgemuth B. The incidence of cleft lip and palate deformities in the south-east of Scotland (1971-1990). *Br J Orthod.* 1999; 26(2): 121-5.
- Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs.* 2000; 15(4): 242-9.
- Berk NW, Marazita ML. The costs of cleft lip and palate: personal and societal implications. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment.* New York: Oxford University Press, 2002: 458-67.
- Bertoja EA, Alho CS, De França E, Menegotto B, Robinson WM. TGFA/TAQ I polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate patients from Rio Grande Do Sul, Brazil. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45(5): 539-44.
- Bille C, Winther JF, Bautz A, Murray JC, Olsen J, Christensen K. Cancer risk in persons with oral cleft-a population-based study of 8.093 cases. *Am J Epidemiol.* 2005; 161(11): 1047-55.
- Bille C, Olsen J, Vach W, Knudsen VK, Olsen SF, Rasmussen K *et al.* Oral clefts and life style factors – a case-cohort study based on prospective Danish data. *Eur J Epidemiol.* 2007; 22(3): 173-81.
- Birnbaum S, Reutter H, Lauster C, Scheer M, Schmidt G, Saffar M *et al.* Mutation screening in the IRF6-gene in patients with apparently nonsyndromic orofacial clefts and a positive family history suggestive of autosomal-dominant inheritance. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A(6): 787-90.

- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M *et al.* Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41(4): 473-7.
- Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2005; 137A(3): 259-62.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM *et al.* Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A(4): 440-9.
- Briggs RM. Vitamin supplementation as a possible factor in the incidence of cleft lip/palate deformities in humans. *Clin Plast Surg.* 1976; 3(4): 647-52.
- Bufalino A, Paranaíba LMR, Aquino SN, Martelli-Júnior H, Swerts MSO, Coletta RD. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. In press.
- Buss PW, Hughes HE, Clarke A. Twenty-four cases of the EEC syndrome: clinical presentation and management. *J. Med. Genet.* 1995; 32(9): 716-23.
- Calzolari E, Milan M, Cavazzuti GB, Cocchi G, Gandini E, Mangnani C *et al.* Epidemiological and genetic study of 200 cases of oral cleft in Emilia Romagna Region of Northern Italy. *Teratology.* 1988; 38(6): 559-64.
- Camilleri S, McDonald F. RUNX2 and dental development. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(5): 361-73.
- Camporesi M, Baccetti T, Marinelli A, Defraia E, Franchi L. Maxillary dental anomalies in children with cleft lip and palate: a controlled study. *Int J Paediatr Dent.* 2010: 18.
- Canfield MA, Collins JS, Botto LD, Williams LJ, Mai CT, Kirby RS *et al.* Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(10): 679-89.

- Cappa M, Borrelli P, Marini R, Neri G. The Opitz Syndrome: a new designation for the clinically indistinguishable BBB and G Syndromes. *Am J Med Genet.* 1987; 28(2): 303-9.
- Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007; 71(10): 1509-19.
- Carmichael SL, Nelson V, Shaw GM, Wasserman CR, Croen LA. Socio-economic status and risk of conotruncal heart defects and orofacial clefts. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2003; 17(3): 264-71.
- Carmichael SL, Shaw GM, Ma C, Werler MM, Rasmussen SA, Lammer EJ *et al.* Maternal corticosteroid use and orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197(6): 585.e1-7.
- Carroll N, Pangilinan F, Molloy AM, Troendle J, Mills JL, Kirke PN *et al.* Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. *Hum Genet.* 2009; 125(3): 247-56.
- Castro JFL, Oliveira SB, Sales RD. Prevalência das anomalias dentárias em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2004; 9(5): 79-84.
- Cedergren M, Källén B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(4): 367-71.
- Celli J, Duijf P, Hamel BCJ, Bamshad M, Kramer B, Smits AP *et al.* Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 1999; 99(2): 143-53.
- Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C *et al.* Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of nonsyndromic oral clefts: an evaluation of the contribution of child and maternal genotypes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(2): 114-22.
- Chevrier C, Bahuau M, Perret C, Iovannisci DM, Nelva A, Herman C *et al.* Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A(18): 2396-406.

- Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L *et al.* Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics*. 1997; 43(3): 267-77.
- Christensen K, Mortensen PB. Facial clefting and psychiatric diseases: a follow-up of the Danish 1936-1987 Facial Cleft cohort. *Cleft Palate Craniofac J*. 2002; 39(4): 392-96.
- Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ*. 2004; 328(7453): 1405.
- Clarren SK, Smith DW. The fetal alcohol syndrome. *N Engl J Med*. 1978; 35(10): 4-7.
- Clements SE, Techanukul T, Coman D, Mellerio JE, McGrath JA. Molecular basis of EEC (ectrodactyly, ectodermal dysplasia, clefting) syndrome: five new mutations in the DNA-binding domain of the *TP63* gene and genotype-phenotype correlation. *Br J Dermatol*. 2010; 162(1): 201-7.
- Cooper ME, Stone RA, Liu Y, Hu DN, Melnick M, Marazita ML. Descriptive epidemiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China, from 1980 to 1989. *Cleft Palate Craniofac J*. 2000; 37(3): 274-80.
- Cooper SC, Flaitz CM, Johnston DA, Lee B, Hecht JT. A natural history of cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet*. 2001; 104(1): 1-6.
- Cooper ME, Ratay JS, Marazita ML. Asian oral-facial cleft birth prevalence. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006; 43(5): 580-89.
- Cordero JF, Holmes, LB. Phenotypic overlap of the BBB and G syndromes. *Am J Med Genet*. 1978; 2(2): 145-52.
- Coutinho TCL, Tostes MA, Santos MEO, Bastos VAS. Anomalias dentárias em crianças: um estudo radiográfico. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1998; 12(1): 51-55.
- Cox TC, Allen LR, Cox LL, Hopwood B, Goodwin B, Haan E *et al.* New mutations in MID1 provide support for loss of function as the cause of X-linked Opitz syndrome. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(17): 2553-62.
- Czeizel AE. Controlled studies of multivitamin supplementation on pregnancy outcomes. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 15(678): 266-75.

- Cunningham ML, Seto ML, Hing AV, Bull MJ, Hopkin RJ, Leppig KA. Cleidocranial dysplasia with severe parietal bone dysplasia: C-terminal RUNX2 mutations. *Birth Defects Res A*. 2006; 76(2): 78-85.
- Curtis EJ, Fraser FC, Warburton D. Congenital cleft lip and palate. *Am J Dis Child*. 1961; 102: 853-57.
- Dal Zotto L, Quaderi NA, Elliott R, Lingerfelter PA, Carrel L, Valsecchi V, *et al*. The mouse Mid1 gene: implications for the pathogenesis of Opitz syndrome and the evolution of the mammalian pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet*. 1998; 7(3): 489-99.
- da Silva AP, Costa B, de Carvalho Carrara CF. Dental anomalies of number in the permanent dentition of patients with bilateral cleft lip: radiographic study. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008; 45:(5): 473-6.
- De Falco F, Cainarca S, Andolfi G, Ferrentino R, Berti C, Rodriguez *et al*. X-linked Opitz syndrome: novel mutations in the MID1 gene and redefinition of the clinical spectrum. *Am J Med Genet*. 2003; 120A(2): 222-28.
- Demirjian A, Goldstein H, Tanner J M. A new system of dental age assessment. *Human Biology*. 1973; 45(2): 211-27.
- DeRoo LA, Wilcox AJ, Drevon CA, Lie RT. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol*. 2008; 168(6): 638-46.
- Dewinter G, Quirynen M, Heidbuchel K, Verdonk A, Willems G. 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(4): 343-50.
- Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(27): 9523-8.
- Dravet C, Julian C, Legras C, Magaouda A, Guerrini R, Genton P *et al*. Epilepsy, antiepileptic drugs, and malformations in children of women with epilepsy: a French prospective cohort study. *Neurology*. 1992; 42(4 Suppl 5): 75-82.

- Eerens K, Vlietinck R, Heidbuchel K, Van Olmen A, Derom C, Willems G *et al.* Hypodontia and tooth formation in groups of children with cleft, siblings without cleft, and nonrelated controls. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2001; 38:(4): 374-378.
- El-Gharbawy AH, Peeden JN Jr, Lachman RS, Graham JM Jr, Moore SR, Rimoin DL. Severe cleidocranial dysplasia and hypophosphatasia in a child with microdeletion of the C-terminal region of RUNX2. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(1): 169-74.
- Ely NJ, Sherriff M, Cobourne MT. Dental transposition as a disorder of genetic origin. *Eur J Orthod*. 2006; 28(2): 145-51.
- Estrela RC, Ribeiro FS, Carvalho RS, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ *et al.* Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics*. 2008; 9(3): 267-76.
- Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009; 41(4): 1149-60.
- Field LL, Ray AK, Cooper ME, Goldstein T, Shaw DF, Marazita ML. Genome Scan for Loci Involved in Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Families From West Bengal, India. *Am J Med Genet A*. 2004; 130A(3): 265-71.
- Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate, Busck, Copenhagen, 1942.
- Fontanella B, Russolillo G, Meroni G. MID1 mutations in patients with X-linked Opitz G/BBB syndrome. *Hum Mutat*. 2008; 29(5): 584-94.
- Fraser FC. The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Genet*. 1970; 22(3): 336-52.
- Freitas JA, Dalben GS, Santamaria M, Júnior Freitas PZ. Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. *Braz Oral Res*. 2004; 18(2): 128-33.
- Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, Karam R, Manouvrier S, Graziadio C *et al.* Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Med Genet*. 2006; 43(2): 138-42.



- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995; 10(1): 111-3.
- Froster-Iskenius UG. Popliteal pterygium syndrome. *J Med Genet* 1990; 27(5): 320-6.
- Garcia AM. Occupational exposure to pesticides and congenital malformations: a review of mechanisms, methods, and results. *Am J Ind Med.* 1998; 33(3): 232-40.
- Gaspar DA, Pavanello RC, Zatz M, Passos-Bueno MR, Andre M, Steman S *et al.* Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil. *Am J Med Genet.* 1999; 87(2): 197-9.
- 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; 13(11): 1239-42.
- Gladstone J, Nulman I, Koren G. Reproductive risks of binge drinking during pregnancy. *Reprod Toxicol.* 1996; 10(1): 3-13.
- González BS, López ML, Rico MA, Garduño F. Oral clefts: a retrospective study of prevalence and predisposal factors in the State of Mexico. *J Oral Sci.* 2008; 50(2): 123-9.
- Goodship J, Cross I, LiLing J, Wren C. A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. *Arch Dis Child.* 1998; 79(4): 348-51.
- Gorlin R, Cohen M, Hennekam R. *Syndromes of the head and neck.* 4. ed. New York: Oxford University Press; 2001.
- Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE *et al.* A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr.* 2009; 155(6): 909-13.
- Goudy S, Law A, Sanchez G, Baldwin HS, Brown C. Tbx1 is necessary for palatal elongation and elevation. *Mech Dev.* 2010; 127(5-6): 292-300.
- Guazzarotti L, Caprio C, Rinne TK, Bosoni M, Pattarino G, Mauri S *et al.* Limb-mammary syndrome (LMS) associated with internal female

- genitalia dysgenesis: a new genotype/phenotype correlation? *Am J Med Genet A*. 2008; 146A(15): 2001-4.
- Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*. 2003; 19(3): 376-82.
  - Ha XM, Lou Y, Zhu XY, Hu XF, Pang WY, Sun ZJ *et al*. Single nucleotide polymorphism and haplotype in TBX1 gene of patients with conotruncal defects: analysis of 130 cases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006; 86(22): 1553-7.
  - Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999; 41: 95-98.
  - Hansen K, Mehdinia M. Isolated soft tissue cleft lip: the influence on the nasal cavity and supernumerary laterals. *Cleft Palate Craniofac J*. 2002; 39(3): 322-26.
  - Hansen L, Riis AK, Silaharoglu A, Hove H, Lauridsen E, Eiberg H *et al*. *RUNX2* analysis of Danish cleidocranial dysplasia families. *Clin Genet*. 2010: 5.
  - Harville EW, Wilcox AG, Lie RT, Vindenes H, Abyholm F. Cleft lip and palate versus cleft lip only: Are they distinct defects? *Am J Epidemiol*. 2005; 162(5): 448-53.
  - Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med*. 2000; 343(22): 1608-14.
  - Holmes LB, Baldwin EJ, Smith CR, Habecker E, Glassman L, Wong SL *et al*. Increased frequency of isolated cleft palate in infants exposed to lamotrigine during pregnancy. *Neurology*. 2008; 27;70(2): 2152-8.
  - Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J, Romitti PA, Lammer EJ, Sun L *et al*. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology* 2007; 18(2): 226-33.
  - Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S *et al*. Association study of transforming growth factor alpha (TGF alpha) TaqI

- polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol.* 1995; 141(7): 629-36.
- Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A *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(1): 38-46.
  - Jamilian A, Nayeri F, Babayan A. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2007; 25(4): 174-6.
  - Jehee FS, Burin BA, Rocha KM, Zechi-Ceide R, Bueno DF, Brito L. Novel mutations in IRF6 in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should IRF6 mutational screening be done? *Am J Med Genet A.* 2009; 149A(6): 1319-22.
  - Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. 2001; *Nat Genet.* 2001; 27(3): 286-91.
  - Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE *et al.* Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2003; 40(6): 399-407.
  - Jia ZL, Li Y, Li L, Wu J, Zhu LY, Yang C *et al.* Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western china. *DNA Cell Biol.* 2009; 28(5): 249-57.
  - Jianyan L, Zeqiang G, Yongjuan C, Kaihong D, Bing D, Rongsheng L. Analysis of interactions between genetic variants of BMP4 and environmental factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate susceptibility. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 39(1): 50-6.
  - Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008; 37(5): 1041-58.
  - Jordan R, Kraus B, Neptune C. Dental abnormalities associated with cleft lip and/or palate. *Cleft Palate J.* 1966; 3: 22-55.
  - Jorgenson RJ, Salinas CF, Shapiro SD. Prevalence of taurodontism in a select population. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1982; 2(2): 125-35.
  - Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(3): 270-78.

- 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(5): 413-24.
- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Diseases.* 2009; 15(7): 437-53.
- Kanaan ZM, Mahfouz R, TaOMIM H. The prevalence of consanguineous marriages in an underserved area in Lebanon and its association with congenital anomalies. *Genet Test.* 2008; 12(3): 367-72.
- Kim HJ, Nam SH, Kim HJ, Park HS, Ryoo HM, Kim SY *et al.* Four novel RUNX2 mutations including a splice donor site result in the cleidocranial dysplasia phenotype. *J Cell Physiol.* 2006; 207(1): 114-22.
- Kistner EO, Shi M, Weinberg CR. Using cases and parents to study multiplicative gene-by-environment interaction. *Am J Epidemiol.* 2009; 170(3): 393-400.
- Koillinen H, Lahermo P, Rautio J, Hukki J, Peyrard-Janvid M, Kere J. A genome-wide scan of nonsyndromic cleft palate only (CPO) in Finnish multiplex families. *J Med Genet.* 2005; 42(2): 177-84.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K *et al.* Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997; 89(5): 755-64.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS *et al.* Mutation in IRF6 cause van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 2002; 32(2): 285-89.
- Koster MI, Roop DR. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci.* 2004; 34(1): 3-9.
- Krapels IP, van Rooij IA, Ocké MC, West CE, van der Horst CM, Steegers-Theunissen RP. Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *J Nutr.* 2004a; 134(11): 3106-13.
- Krapels IP, van Rooij IA, Ocké MC, van Cleef BA, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP. Maternal dietary B vitamin intake, other than folate, and the association with orofacial cleft in the offspring. *Eur J Nutr.* 2004b; 43(1): 7-14.

- Krapels IP, Vermeij-Keers C, Muller M, de Klein A, Steegers-Theunissen RP. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. *Nutr Rev.* 2006; 64(6): 280-8.
- Kraus BS, Jordan RE, Pruzansky S. Dental abnormalities in the deciduous and permanent dentition of individuals with cleft lip and palate. *J Dent Res.* 1966; 45(6): 1736-46.
- K uchler EC, Risso PA, Costa MC, Modesto A, Vieira AR. Assessing the proposed association between tooth agenesis and taurodontism in 975 paediatric subjects. *Int Paediatr Dent.* 2008a; 18(3): 231-4.
- K uchler 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(10): 941-6
- K uchler E, Motta L, Vieira A, Granjeiro J. Side of dental anomalies and taurodontism as potential clinical markers for cleft subphenotypes. *Cleft Palate Craniofac J.* 2010; 19.
- 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; 32(2): 203-12.
- Laurikkala J, Mikkola ML, James M, Tummers M, Mills AA, Thesleff I. p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development.* 2006; 133(8): 1553-63.
- Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J *et al.* Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblastspecific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet.* 1997; 16(3): 307-10.
- Leite IC, Koifman S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23(1): 31-7.
- Leoyklang P, Siriwan P, Shotelersuk V. A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip. *J Med Genet* 2006; 43(6): e28.
- Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *Journal of Dental Research.* 2007; 86(10): 986-91.

- Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. AXIN2 and CDH1 Polymorphisms, Tooth Agenesis, and Oral Clefts. *Birth Defects Research*. 2009; 85(2): 169-73.
- Letra A, Menezes R, Fonseca RF, Govil M, McHenry T, Murphy MJ *et al*. Novel Cleft Susceptibility Genes in Chromosome 6q. *J Dent Res*. 2010; 28.
- Liao J, Kochilas L, Nowotschin S, Arnold JS, Aggarwal VS, Epstein JA *et al*. Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/Di-George syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage. *Hum Mol Genet*. 2004; 13(15): 1577–85.
- Lidral AC, Reising BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res*. 2002; 81(4): 274-78.
- Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. Genetic Factors and Orofacial Clefting. *Semin Orthod*. 2008; 14(2): 103-14.
- Lie RT, Wilcox AJ, Skjaerven R. A population-based study of the risk of recurrence of birth defects. *N Engl J Med*. 1994; 331(1): 1-4.
- Lie RT, Wilcox AJ, Taylor J, Gjessing HK, Saugstad OD, Aabyholm F *et al*. Maternal smoking and oral clefts: the role of detoxification pathway genes. *Epidemiology*. 2008; 19(4): 606-15.
- Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T *et al*. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*. 2001; 410(6824): 97-101.
- Little J, Cardy A, Arslan MT, Gilmour M, Mossey PA. Smoking and Orofacial Clefts: A United Kingdom–Based Case-Control Study. *Cleft Palate Craniofac J*. 2004a; 41(4): 381-6.
- Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ*. 2004b; 82(3): 213-8.
- Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J *et al*. Folate and clefts of the lip and palate--a U.K.-based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008; 45(4): 428-38.
- Loffredo LCM, Freitas JAS, Grigolli AAG. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2001a; 35(6): 571-5.

- Loffredo LC, Souza JM, Freitas JA, Mossey PA. Oral clefts and vitamin supplementation. *Cleft Palate Craniofac J.* 2001b; 38(1):76-83.
- Lopes LD, Mattos BSC, Andre´ M. Anomalies in number of teeth in patients with lip and/or palate clefts. *Braz Dent J.* 1991; 2(1): 9-17.
- Lopez M, Cocchi F, Avitabile E, Leclerc A, Adelaide J, Campadelli-Fiume G *et al.* Novel, soluble isoform of the herpes simplex virus (HSV) receptor nectin1 (or PRR1-HlgR-HveC) modulates positively and negatively susceptibility to HSV infection. *J Virol.* 2001; 75(12): 5684-91.
- Lorente C, Cordier S, Goujard J, Aymé S, Bianchi F, Calzolari E *et al.* Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Am J Public Health.* 2000; 90(3): 415-9.
- Lourenço Ribeiro L, Teixeira Das Neves L, Costa B, Ribeiro Gomide M. Dental anomalies of the permanent lateral incisors and prevalence of hypodontia outside the cleft area in complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2003; 40(2): 172-5.
- Majewski F, Goecke T. Rectal atresia as a rare manifestation in EEC syndrome. *Am J Med Genet.* 1996; 63(1): 190-92.
- Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, Walier M, Mattheisen M, Henschke H *et al.* Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A(12): 2680-94.
- Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S *et al.* Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet.* 2010; 42(1): 24-6.
- Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T *et al.* Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet.* 2004; 75(2): 161-73.
- Marazita ML. Subclinical features in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P): review of the evidence that subepithelial orbicularis oris muscle defects are part of an expanded phenotype for CL/P. *Orthod Craniofac Res.* 2007; 10(2): 82-7.

- Marazita ML, Lidral AC, Murray J, Field L, Maher BS, McHenry TG *et al.* Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009; 68(3): 151-70.
- Marcucio RS, Cordero DR, Hu D, Helms JA. Molecular interactions coordinating the development of the forebrain and face. *Dev Bio.* 2005; 284(1): 48-61.
- Martelli DR, Bonan PRF, Soares MC, Paranaíba LM, Martelli-Júnior H. Analysis of familial incidence of non-syndromic cleft lip and palate in a Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010: 1.
- Martelli-Júnior H, Orsi Júnior J, Chaves MR, Barros LM, Bonan PRF, Freitas JA. Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas - Minas Gerais - de 1986 a 1998. *RPG.* 2006; 13(1): 31-35.
- 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. *Braz Oral Res.* 2007; 21(4): 314-7.
- McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med.* 2001; 3(1): 23-9.
- Menegotto BG, Salzano FM. Epidemiology of oral clefts in a large South American sample. *Cleft Palate Craniofac J.* 1991; 28(4): 373-6.
- Menezes R, Vieira AR. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45(4): 414-9.
- Menezes R, Letra A, Ruff J, Granjeiro JM, Vieira AR. Studies of genes in the FGF signaling pathway and oral clefts with or without dental anomalies. *Am J Med Genet A.* 2008; 15;146A(12): 1614-7.
- Menezes R, Marazita ML, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Bardi K, Brandon C *et al.* AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140(1): 80-4.



- Meroni G. X-Linked Opitz G/BBB Syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2004. Dec 17.
- Meyer KA, Werler MM, Hayes C, Mitchell AA. Low maternal alcohol consumption during pregnancy and oral clefts in off spring: the Slone Birth Defects Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2003; 67(7): 509-14.
- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 1999; 398(6729): 708-13.
- Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, Conley MR *et al.* Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82(9): 636-43.
- Modesto A, Moreno LM, Krahn K, King S, Lidral AC. MSX1 and orofacial clefting with and without tooth agenesis. *J Dent Res.* 2006; 85(6): 542-6.
- Mohan RP, Suma GN, Vashishth S, Goel S. Cleidocranial dysplasia: clinico-radiological illustration of a rare case. *J Oral Sci.* 2010; 52(1): 161-6.
- Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet.* 2006; 69(6): 512-7.
- Mossey PA, Little J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origins to treatment.* New York: Oxford University Press, 2002: 127-58.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009; 374(9703): 1773-85.
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, *et al.* Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* 1997; 89(5): 773-79.
- Mundlos S. Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J Med Genet.* 1999; 36(3): 177-82.

- Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology*. 1996; 54(1): 27-33.
- Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 2002; 61(4): 248-56
- Murthy J, Bhaskar LVKS. Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts. *Indian J Plast Surg*. 2009; 42 (1): 68-81.
- Nagem Filho H, Moraes N, Rocha RGF. Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênitas labiopalatais na população escolar de Bauru. *Rev Fac Odont USP*. 1968; 6(2): 111-28.
- Nakatomi M, Wang XP, Key D, Lund JJ, Turbe-Doan A, Kist R *et al*. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology*. 2010; 340(2): 438-49.
- Narod SA, Hawkins MM, Robertson CM, Stiller CA. Congenital anomalies and childhood cancer in Great Britain. *Am J Hum Genet*. 1997; 60(3): 474-85.
- Natsume N, Kawai T, Ogi N, Yoshida W. Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 38(1): 23-5.
- Neiswanger K, Deleyiannis FW, Avila JR, Cooper ME, Brandon CA, Vieira AR *et al*. Candidate genes for oral-facial clefts in Guatemalan families. *Ann Plast Surg*. 2006; 56(5): 518-21.
- Neiswanger K, Weinberg SM, Rogers CR, Brandon CA, Cooper ME, Bardi KM *et al*. Orbicularis oris muscle defects as an expanded phenotypic feature in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A(11): 1143-49.
- Neves ACC, Patrocínio MC, Leme KP, Ui RT. Dental anomalies in the patients with cleft lip and palate: a literature review. *Rev Biociênc*. 2002; 8 (2): 75-81.
- Nishi M, Miyake H, Takeda T, Hatae Y. Congenital malformations and childhood cancer. *Med Pediatr Oncol*. 2000; 34(4): 250-54.

- Nopoulos P, Langbehn DR, Canady J, Magnotta V, Richman L. Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007; 161(8): 753-58.
- Nunes LMN, Queluz DP, Pereira AC. Prevalência de fissuras labiopalatais no município de Campos dos Goytacazes-RJ, 1999-2004/ Prevalence of oral cleft in Campos dos Goytacazes-RJ, 1999-2004. *Rev Bras Epidemiol.* 2007; 10(1): 109-116.
- Opitz JM, Frias JL, Gutenberger JE, Pellett JR. The G syndrome of multiple congenital anomalies. In: Bergsma D ed. *The Clinical Delineation of Birth Defects. Part II. Malformation Syndromes.* New York: The National Foundation, 1969; 5: 95-101.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997; 89(5): 765-71.
- Otto F, Kanegane H, Mundlos S. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat.* 2002; 19(3): 209-16.
- Palmieri A, Masiero E, Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Caramelli E *et al.* The MTHFD1 gene is not involved in cleft lip with or without palate onset among the Italian population. *Ann Hum Genet.* 2008; 72(3): 297-9.
- Paranaíba 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(4): 507-11.
- Paranaíba LM, de Almeida H, de Barros LM, Martelli DRB, Orsi Júnior JD, Martelli Júnior H. Reabilitação cirúrgica de fissuras lábio-palatinas, no estado de Minas Gerais, Brasil. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009; 75(6): 839-43.
- Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Junior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2010a; 16(2): 193-7.
- Paranaíba L, Martelli-Junior H, Miranda R, Bufalino A, Abdo Filho R, Coletta R. Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia and Cleft Lip/Palate

- Syndrome Associated with p63 Mutation and an Uncommon Phenotype. *Cleft Palate Craniofac J.* 2010b, 22.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(1): 177-82.
  - Peck L, Peck S, Attia Y. Maxillary canine-first premolar transposition, associated dental anomalies and genetic basis. *Angle Orthod.* 1993; 63(2): 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(6): 657-60.
  - Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J *et al.* Familial non-syndromic cleft lip and palate: analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. *Eur J Orthod.* 2008; 30(2): 169-75.
  - Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* 1998; 12(17): 2735-47.
  - Peterson LJ. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*, 2<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 702.
  - Pinson L, Auge J, Audollent S, Mattei G, Etchevers H, Gigarel N *et al.* Embryonic expression of the human MID1 gene and its mutations in Opitz syndrome. *J Med Genet.* 2004; 41(5): 381–386.
  - Pirinen S, Arte S, Apajalahti S. Palatal displacement of canine is genetic and related to congenital absence of teeth. *J Dent Res.* 1996; 75(10): 1346-52.
  - Purandare SM, Mendoza-Londono R, Yatsenko AS, Napierala D, Scott DA, Sibai T *et al.* *De novo* three-way chromosome translocation 46,XY,t(4;6;21) (p16;p21.1;q21) in a male with cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A(4): 453-58.
  - Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L *et al.* Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(5): 1268-78.
  - Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W *et al.* Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to

- mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet.* 1997; 17(3): 285-91.
- 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(11): 1341-7.
  - Rajabian MH, Sherkat M. An epidemiologic study of oral clefts in Iran: analysis of 1,669 cases. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(2): 191-6.
  - Ranta R, Rintala A. Tooth anomalies associated with congenital sinuses of the lower lip and cleft lip/palate. *Angle Orthod.* 1982; 52:(3): 212-21.
  - Ranta R. A review of tooth formation in children with cleft lip/palate. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1986; 90(1): 11-18.
  - Ranta R, Tulensalo T. Symmetry and combinations of hypodontia in noncleft and cleft palate children. *Scand J Dent Res.* 1988; 96(1): 1-8.
  - Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R *et al.* Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet.* 2005; 42(11): 871-76.
  - Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C *et al.* Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2006; 140(19): 2063-74.
  - Reymond N, Fabre S, Lecocq E, Adelaide J, Dubreuil P, Lopez M. Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J Biol Chem.* 2001; 276(46): 205-215.
  - Ribeiro L L, Das Neves L T, Costa B, Gomide M R. Dental development of permanent lateral incisor in complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 2002; 39(2): 193-6.
  - Ribeiro L L, DasNeves L T, Costa B, Gomide M R. Dental anomalies of the permanent lateral incisors and prevalence of hypodontia outside the cleft area in complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 2003; 40(2): 172-5.
  - Richman JM, Fu KK, Cox LL, Sibbons JP, Cox TC. Isolation and characterisation of the chick orthologue of the Opitz syndrome gene,

- Mid1, supports a conserved role in vertebrate development. *Int J Dev Biol.* 2002; 46(4): 441-48.
- Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM *et al.* Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007a; 104(11): 4512-7.
  - Riley BM, Schultz RE, Cooper ME, Goldstein-McHenry T, Daack-Hirsch S, Lee KT *et al.* A genome-wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. *Am J Med Genet Part A.* 2007b; 143A(8): 846-52.
  - Rinne T, Brunner HG, van Bokhoven H. p63-associated disorders. *Cell Cycle* 2007; 6(3): 262-8.
  - Rittler M, Liascovich R, Lopez-Camelo J, Catilla EE. Parental consanguinity in specific types of congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 2001; 102(1): 36-43.
  - Robin NH, Feldman GJ, Aronson AL, Mitchell HF, Weksberg R, Leonard CO *et al.* Opitz syndrome is genetically heterogeneous, with one locus on Xp22, and a second locus on 22q11.2. *Nat Genet.* 1995; 11(4): 459-61.
  - Robin NH, Opitz JM, Muenke M. Opitz G/BBB syndrome: clinical comparisons of families linked to Xp22 and 22q, and a review of the literature. *Am J Med Genet.* 1996; 62(3): 305-17.
  - Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23(1): 38-42.
  - Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol.* 2009; 15; 169(4): 505-14.
  - Rodriguez-Pinilla E, Martinez-Frias ML. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: a case-control study. *Teratology.* 1998; 58(1): 2-5.
  - Roelfsema NM, Cobben JM. The EEC syndrome: a literature study. *Clin Dysmorphol.* 1996; 5(2):115-27.
  - Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, Leon-Cachon RB, Munoz-Jimenez SG, Nowak S *et al.* Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican

- population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88(7): 535-7.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology.* 1999; 59(1): 39-50.
  - Romitti PA, Sun L, Honein MA, Reefhuis J, Correa A, Rasmussen SA. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *Am J Epidemiol.* 2007; 166(7): 775-85.
  - Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H *et al.* Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet.* 1997; 34(10): 798-804.
  - Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994; 6(4): 348-56.
  - Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Carinci F, Marchesini J, Martinelli M *et al.* Investigation of the W185X nonsense mutation of *PVRL1* gene in Italian nonsyndromic cleft lip and palate patients. *Am J Med Genet A.* 2004; 127A(2): 211.
  - 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. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(1): 180-3.
  - Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Vaccari C, Marchesini J, Pezzetti F *et al.* Study of the *PVRL1* gene in Italian nonsyndromic cleft lip patients with or without cleft palate. *Ann Hum Genet.* 2006; 70(Pt3): 410-13.
  - Scapoli L, Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Masiero E, Pezzetti F *et al.* Genes causing clefting syndromes as candidates for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a family-based association study. *Eur J Oral Sci.* 2008; 116(6): 507-11.
  - Schutte BC & Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(10): 1853-9.

- Shapira Y, Lubit E, Kuffinec MM, Borell G. The distribution of clefts of the primary and secondary palates by sex, type, and location. *Angle Orthod.* 1999; 69(6): 523-8.
- Shapira Y, Lubit E, Kuffinec MM. Hypodontia in children with various types of clefts. *Angle Orthod.* 2000; 70(1): 16-21.
- Shaw GM, Lammer EJ. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *J Pediatr.* 1999; 134(3): 298-303.
- Shaw GM, Nelson V, Iovannisci DM, Finnell RH, Lammer EJ. Maternal occupational chemical exposures and biotransformation genotypes as risk factors for selected congenital anomalies. *Am J Epidemiol.* 2003; 157(6): 475-84
- Shaw GM, Carmichael SL, Laurent C, Rasmussen SA. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. *Epidemiology.* 2006; 17(3): 285-91.
- Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A *et al.* Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *Am J Hum Genet.* 2007; 80(1): 76-90.
- Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K *et al.* Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009; 85(1): 42-51
- Short KM, Cox TC. Subclassification of the rbcc/trim superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem.* 2006; 281(13): 8970-980.
- Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A *et al.* Orofacial Cleft Risk Is Increased with Maternal Smoking and Specific Detoxification-Gene Variants. *Am J Hum Genet.* 2007; 80(1):76-90.
- Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K *et al.* Identification of Microdeletions in Candidate Genes for Cleft Lip and/or Palate. *Birth Defects Research (Part A).* 2009; 85(1): 42-51.
- Shifman A, Chanannel I. Prevalence of taurodontism found in radiographic dental examination of 1,200 young adult Israeli patients. *Community Dent Oral Epidemiol* 1978; 6(4): 200-03.



- Silva Meza R. Radiographic assessment of congenitally missing teeth in orthodontic patients. *Int J Paediatr Dent.* 2003; 13(2): 112-6.
- Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E *et al.* Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ.* 2008; 336(7641): 432-34.
- Slayton RL, Williams L, Murray JC, Wheeler JJ, Lidral AC, Nishimura CJ. Genetic sociation studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate Craniofac J.* 2003; 40(3): 274-9.
- Sokol RJ, Delaney-Black V, Nordstrom B. Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA.* 2003; 290(22): 2996-9.
- Sözen MA, Suzuki K, Tolarova MM, Bustos T, Fernandez Iglesias JE, Spritz RA. Mutation of *PVRL1* is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Nat Genet.* 2001; 29(2): 141-2.
- Sözen, Hecht JT, Spritz RA. Mutation Analysis of the *PVRL1* Gene in Caucasians with Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009; 13(5): 617-21.
- Sperber GH. Formation of the primary and secondary palate. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment.* New York: Oxford University Press, 2002: 5–24.
- Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1972; 27(1): 5-6.
- Spilson SV, Kim HJ, Chung KC. Association between maternal diabetes mellitus and newborn oral cleft. *Ann Plast Surg.* 2001; 47(5): 477-81.
- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(1): 73-81.
- Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcolm S, Winter R *et al.* Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to *BCL3* in 17 multigenerational families. *Am J Hum Genet.* 1995; 57(2): 257-72.

- Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Epidemiologic and genetic study in 207 cases of oral clefts in Alsace, North- Eastern France. *J Med Genet.* 1991; 28(5): 325-29.
- Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Associated malformations in cases with oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(1): 41-7.
- Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet.* 2000; 24(1): 18-19.
- Suda N, Hamada T, Hattori M, Torii C, Kosaki K, Moriyama K. Diversity of supernumerary tooth formation in siblings with cleidocranial dysplasia having identical mutation in RUNX2: possible involvement of non-genetic or epigenetic regulation. *Orthod Craniofac Res.* 2007; 10(4): 222-5.
- Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, Fallin MD, Ingersoll RG, Park J *et al.* Differential Parental Transmission of Markers in RUNX2 Among Cleft Case-Parent Trios From Four Populations. *Genet Epidemiol.* 2008; 32(6): 505-12.
- 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. *Nat Genet.* 2000; 25(4): 427-30.
- Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper M *et al.* In a Vietnamese population MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med.* 2004; 6(3): 117-25.
- Taioli E, Ragin C, Robertson L, Linkov F, Thurman NE, Vieira AR. Cleft Lip and Palate in Family Members of Cancer Survivors. *Cancer Invest.* 2010; 22.
- Takahashi K, Nakanishi H, Miyahara M, Mandai K, Satoh K, Satoh A *et al.* Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J Cell Biol.* 1999; 145(3): 539-49.
- Tang W, Du X, Feng F, Long J, Lin Y, Li P *et al.* Association analysis between the IRF6 G820A polymorphism and nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009; 46(1): 89-92.

- Tereza GPG, Carrara CFC, Costa B. Tooth Abnormalities of Number and Position in the Permanent Dentition of Patients with Complete Bilateral Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2010; 47(3): 247-52.
- Terry A, Kilbey A, Vaillant F, Stewart M, Jenkins A, Cameron E *et al.* Conservation and expression of an alternative 30 exon of RUNX2 encoding a novel proline-rich C-terminal domain. *Gene.* 2004; 336(1): 115-25.
- Tessa A, Salvi S, Casali C, Garavelli L, Digilio MC, Dotti MT, Di Giandomenico S, Valoppi M, Grieco GS, Comanducci G *et al.* Six novel mutations of the RUNX2 gene in Italian patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat.* 2003; 22(1): 104.
- Thanos CD, Bowie JU. p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Sci.* 1999; 8(8): 1708-10.
- Thomas AM, Chopra S, Singh N, Simratvir M, Moghe G. Syndromes associated with labiopalatine clefting: a report of three cases. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2008; 26(2): 88-91.
- Tolarova MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet.* 1998; 75(2): 126-37.
- Tonge CH. Identification of cell patterns in human tooth differentiation. *J Dent Res.* 1967; 46(5): 876-8.
- Tongkobpetch S, Suphapeetiporn K, Siritwan P, Shotelersuk V. Study of the poliovirus receptor related-1 gene in Thai patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 37(6): 550-3.
- 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(2): 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(2): 154-60.
- Tseng YT, Hsiao HH, Hsiao HP, Tsai WC, Chiu HH. A study of *PVRL1* mutations for non-syndromic cleft lip and/or palate among Taiwanese patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35(5): 453-55.

- Turhani D, Item CB, Watzinger E, Sinko K, Watzinger F *et al.* Mutation analysis of CLPTM 1 and PVRL 1 genes in patients with nonsyndromic clefts of lip, alveolus and palate. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005; 33(5): 301-06.
- van Bokhoven H, Jung M, Smits AP, van Beersum S., Ruschendorf F, van Steensel M. *et al.* Limb mammary syndrome: a new genetic disorder with mammary hypoplasia, ectrodactyly, and other Hand/Foot anomalies maps to human chromosome 3q27. *Am J Hum Genet.* 1999; 64(2): 538-46.
- van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000; 24(4): 342-3.
- van Rooij IA, Groenen PM, van Drongelen M, Te Morsche RH, Peters WH, Steegers-Theunissen RP. Orofacial clefts and spina bifida: N-acetyltransferase phenotype, maternal smoking, and medication use. *Teratology.* 2002; 66(5): 260-6.
- Van Rooij JA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocké MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM *et al.* Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol.* 2003; 157(7): 583-91.
- van Rooij IA, Ocke MC, Straatman H, Zielhuis GA, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev Med.* 2004; 39(4): 689-94.
- Vichi M, Franchi L. Abnormalities of the maxillary incisors in children with cleft lip and palate. *ASDC J Dent Child.* 1995; 62(6): 412-7.
- Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, Castilla EE, Murray JC. Genetic origins in a South American clefting population. *Clin Genet.* 2002; 62(6): 458-63.
- Vieira AR, Romitti PA, Orioli IM, Castilla EE. Complex segregation analysis of 1,792 cleft lip and palate families in South America: 1967-1997. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17(2): 161-5.
- Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res.* 2003; 82(3): 162-5.

- Vieira AR, 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(6): 538-45.
- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Castilla EE, Orioli IM. Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res*. 2008a; 41(8): 689-93.
- Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A*. 2008b; 146A(11): 1406-13.
- Vieira AR, Marazita ML, Goldstein-McHenry T. Genome-wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res*. 2008c; 87(5): 435-9.
- Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res*. 2008; 87(2): 119-25.
- Xuan D, Li S, Zhang X, Hu F, Lin L, Wang C *et al*. Mutations in the RUNX2 gene in Chinese patients with cleidocranial dysplasia. *Ann Clin Lab Sci*. 2008; 38(1): 15-24.
- Warrington A, Vieira AR, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Romitti PA *et al*. Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2006; 43(6): 26.
- Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Diseases*. 2010; 16(1): 11-9.
- Weinberg SM, Neiswanger K, Martin R, Mooney MP, Kane AA, Wenger SL. The Pittsburgh Oral-Facial Cleft study: expanding the cleft phenotype. Background and justification. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006; 43(1): 7-20.
- Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L, Mitchell AA. Maternal alcohol use in relation to selected birth defects. *Am J Epidemiol*. 1991; 134(7): 691-8.
- Werner SP, Harris EF. Odontometrics of the permanent teeth in cleft lip and palate: systemic size reduction and amplified asymmetry. *Cleft Palate J*. 1989; 26(1): 36-41.
- WHO Human Genetics Programme. Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies: report of WHO meetings on

- international collaborative research on craniofacial anomalies. Geneva: World Health Organization, 2002.
- Whittington BR, Durward CS. Survey of anomalies in primary teeth and their correlation with the permanent dentition. *N Z Dent J.* 1996; 92(407): 4-8.
  - Winter J, Lehmann T, Krauss S, Trockenbacher A, Kijas Z, Foerster J *et al.* Regulation of the MID1 protein function is finetuned by a complex pattern of alternative splicing. *Hum Genet.* 2004; 114(6): 541-52.
  - Wong FK, Hägg U. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J.* 2004; 10(5): 331-6.
  - Wyszynski DF, Albacha-Hejazi H, Aldirani M, Hammod M, Shkair H, Karam A *et al.* A genome-wide scan for loci predisposing to non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two large Syrian families. *Am J Med Genet A.* 2003; 123A(2): 140-7
  - 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: 23.
  - Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S *et al.* Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003; 362(9393): 1366-73.
  - Yamachika E, Tsujigiwa H, Ishiwari Y, Mizukawa N, Nagai N, Sugahara T. Identification of a stop codon mutation in the CBFA1 runt domain from a patient with cleidocranial dysplasia and cleft lip. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30(6): 381-3
  - Yang A, Schweitzer R, Sun D, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 1999; 398(6729):714-8.
  - Yang A, McKeon F. P63 and P73: P53 OMIMics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1(3): 199-207.
  - Yazdy MM, Honein MA, Xing J. Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the U.S. grain supply. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79(1): 16-23.

- Yoshida T, Kanegane H, Osato M, Yanagida M, Miyawaki T, Ito Y *et al.* Functional analysis of RUNX2 mutations in Japanese patients with cleidocranial dysplasia demonstrates novel genotype–phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(4): 724-38.
- Zarante I, Lopez MA, Caro A, Garcia-Reyes JC, Ospina JC. Impact and risk factors of craniofacial malformations in a Colombian population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009: 19.
- Zeiger JS, Beaty TH. Is there a relationship between risk factors for oral clefts? *Teratology.* 2002; 66(5): 205-8.
- Zeiger JS, Beaty TH, Liang KY. Oral clefts, maternal smoking, and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(1): 58-63.
- Zhu JL, Basso O, Hasle H, Winther JF, Olsen JH, Olsen J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark. *Br J Cancer.* 2002; 87(5): 524-8.
- Zlotogora J. Genetics disorders among Palestinian Arabs: effects of consanguinity. *Am J Med Genet.* 1997; 68(4): 472-47.
- Zuccherro T, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L *et al.* Interferon regulatory factor (IRF6) is a modifier for isolated cleft lip and palate. *Engl J Med.* 2004; 351(8): 769-80.

## Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação de polimorfismos gênicos em pacientes com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas**", protocolo nº 152/2009, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta, Lívia Máris Ribeiro Paranaíba e Sibeles Nascimento de Aquino, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 28/06/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Polymorphisms in patients with nonsyndromic cleft lip and palate**", register number 152/2009, of Ricardo Della Coletta, Lívia Máris Ribeiro Paranaíba and Sibeles Nascimento de Aquino, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 06/28/2010.

**Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.