

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ALTERAÇÕES DE DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO
EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS
LABIOPALATINAS**

Bianca Golzio Navarro Cavalcante

SAPIENTIA AEDIFICAT

2020

BIANCA GOLZIO NAVARRO CAVALCANTE

**ALTERAÇÕES DE DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO EM
PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Linha de Pesquisa em Fisiopatologia e Morfologia dos Tecidos buco-maxilo-faciais.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

João Pessoa

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376a Cavalcante, Bianca Gólzio Navarro.

Alterações de desenvolvimento dentário em pacientes
nascidos com fissuras labiopalatinas / Bianca Gólzio
Navarro Cavalcante. - João Pessoa, 2020.
68 f. : il.

Orientação: Alexandre Rezende Vieira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. fissura labial. 2. fissura palatina. 3. fenótipo. 4.
anormalidade dentária. I. Vieira, Alexandre Rezende.
II. Título.

UFPB/BC

BIANCA GOLZIO NAVARRO CAVALCANTE

**ALTERAÇÕES DE DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO EM
PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS**

Banca Examinadora



Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

Orientador - UFPB



Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Examinador - UFPB



Prof. Dra. Ariadne Letra

Examinadora – UTHealth School of Dentistry at Houston

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes do Hospital Universitário Lauro Wanderley e a suas famílias, que gentilmente colaboraram e se dispuseram a participar desta pesquisa. Que este estudo, com sua pequena contribuição, possa servir para uma qualidade de vida melhor, e ser mais um degrau na construção de um futuro empolgante.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Alexandre Vieira**, pelo privilégio de tê-lo como orientador e de aprender a enxergar a pesquisa sob uma nova ótica. Alguém inspirador como profissional, e com um grande coração.

Aos **professores da PPGO/UFPB**, pelos ensinamentos ao longo dessa jornada, em especial aos professores **Ricardo Castro** e **Yuri Cavalcante**, pela brilhante coordenação, sempre lutando pelas melhores oportunidades para os alunos durante a pós-graduação.

A todos que fazem parte do Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB. Vocês fizeram tudo ficar mais leve, sou extremamente grata pela acolhida e carinho diário, além da dedicação e prontidão em me auxiliar quando eu precisasse. Sem dúvidas, será minha maior saudade! **Danúbia, Socorro, Josi, Vitor, Felismina, Dr. Paulo, André, Cris, Lindalva, Aline**, vocês me inspiram com tanto amor ao servir. Em especial à **Rosa Helena** pelo cuidado, delicadeza e dedicação em tudo que faz. Sou grata a Deus por te me presenteado com a sua companhia, e sua orientação em meio a tantas dúvidas. Sua presença me fez sentir muito mais segura e capaz!

Aos companheiros de Vieira Lab João Pessoa, **Juliane, Júnior, Mari e Alice** pela parceria e aprendizado em conjunto, e à **Ionária** pela amizade, compreensão e suporte durante a trajetória da pesquisa, seja no HULW ou em Pittsburgh. A **Viana Filho** por nunca pensar duas vezes em me ajudar, e estar comigo. Minhas conquistas sempre têm um dedinho seu.

Ao Vieira Lab Pittsburgh, nas pessoas de **Elaine, Kathleen e Mariana**, pela paciência e suporte durante nossa passagem tão curta. Vocês foram essenciais para que essa pesquisa pudesse acontecer, em meio a tantos desafios!

Ao meu marido, **Leo**, por sonhar os meus sonhos e não ter receio de colocar ‘a mão na massa’ se necessário for. Obrigada pela compreensão das minhas ausências e estresses, por sempre colocar um sorriso no meu rosto e trazer leveza a essa caminhada.

Aos meus pais, **Dairley e Wallene**, pelo apoio e incentivo constantes, e por me ensinar que eu sempre poderia ir além. A determinação de querer tanto e acreditar que posso, veio de vocês.

Acima de tudo a **Deus**, que me levou a lugares melhores do que eu poderia pedir, e tem me ensinado ao longo dos anos, sem descanso, que toda minha capacidade vem dEle, me fazendo acreditar em propósitos maiores. Tornar-me mestre é uma grande conquista, mas me entender nEle fala muito mais sobre mim.

*“[Eu] Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há.
O nosso ir faz o caminho.”*

C.S. Lewis

RESUMO

Indivíduos nascidos com fissuras labiopalatais (FLP) apresentam consideravelmente mais anomalias dentárias fora da área da fissura do que indivíduos sem fissuras. Entender a associação entre FLP e anomalias de desenvolvimento dentário pode ajudar a esclarecer os mecanismos de desenvolvimento sob controle de fatores genéticos e ambientais, estabelecer novas classificações e determinar fatores de risco para a ocorrência da fissura. Para isso, têm se concentrado não somente na prevalência das anomalias dentárias, mas também na distribuição destas nos diferentes tipos de fissura, para ajudar a aumentar a homogeneidade e agilizar a identificação de genes. *MMP2* é uma metaloproteinase que demonstramos estar envolvida em patologias que envolvem o complexo dentina-polpa. O objetivo deste estudo é usar o desenvolvimento dentário como uma ferramenta para subfenotipar FLP e investigar a associação de *MMP2* com anomalias do complexo dentina-polpa em indivíduos nascidos com fissuras. Para investigar essas associações, examinamos 290 indivíduos e várias características clínicas, como completude ou incompletude da fissura, lateralidade e presença de anomalias dentárias, para serem usadas para avaliar o *status* da fissura de cada indivíduo. Testamos o polimorfismo de nucleotídeo único rs9923304 na *MMP2*. Foram realizados os testes qui-quadrado e exato de Fisher ($\alpha = 0,05$). Foram encontradas diferenças na distribuição dos alelos do rs9923304 entre indivíduos nascidos com fissuras e com *talon cusp* ($p = 0,04$). Todos os indivíduos nascidos com FLP apresentaram alterações da dentição e um quarto a metade dos indivíduos apresentou alterações na anatomia interna dos dentes. Malposição dentária, dilaceração e taurodontia são anomalias que podem ser consideradas como parte do fenótipo das fissuras para futuros estudos de associação. O gene *MMP2* pode ser um modificador do desenvolvimento dental em indivíduos afetados pela FLP.

Palavras-chave: fissura labial, fissura palatina, fenótipo, anormalidade dentária.

ABSTRACT

Individuals born with cleft lip and palate (CLP) have considerably more dental anomalies outside the cleft area than individuals born without clefts. Understanding the association between CLP and dental development anomalies can help to clarify the mechanisms of development under control of genetic and environmental factors, establish new classifications and determine risk factors. For this, we have focused not only on the prevalence of dental anomalies, but also on their distribution in different types of clefts, to help increase homogeneity and speed up the identification of genes. *MMP2* is a metalloproteinase we have shown to be involved in pathologies that involve the dentin-pulp complex. The aim of this study is to use dental development as a tool to subphenotype CLP and investigate the association of *MMP2* with dentin-pulp complex anomalies in individuals born with clefts. To investigate these associations, we examined 290 individuals and several clinical features, such as cleft completeness or incompleteness, laterality, and presence of dental anomalies were used to assess each individual's cleft status. We tested the *MMP2* single nucleotide polymorphism rs9923304. Chi-square and Fisher's exact tests were performed ($\alpha = 0.05$). Statistically significant differences between individuals with and without talon cusp was observed for the frequency of *MMP2* less common allele ($p=0.04$). All individuals born with CLP had alterations of the dentition, and a quarter to half of the individuals had alterations of the internal anatomy of their teeth. Dental malposition, dilaceration and taurodontism are anomalies that can be considered as part of the cleft phenotype for future association studies. The *MMP2* gene may be a modifier of dental development in individuals affected by CLP.

Keywords: cleft lip, cleft palate, phenotype, dental abnormality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos indivíduos segundo o <i>status</i> da fissura e a frequência das anomalias dentárias observadas.....	p.28
Tabela 2. Distribuição dos alelos e genótipos segundo as anomalias dentárias presentes no <i>status</i> da fissura dos indivíduos.....	p.29
Tabela 3. Lista de subfenótipos propostos com base no desenvolvimento dental.....	p.30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADD	Alterações De Desenvolvimento Dentário
ARHGAP29	<i>Rho Gtpase Activating Protein 29</i>
FGF8	<i>Fibroblast Growth Factor 8</i>
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FGFR2	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i>
FL	Fissura Labial
FLP	Fissura Labiopalatina
FP	Fissura Palatina
GABRB3	<i>Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Beta3</i>
IRF6	<i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
MAFB	<i>MAF Bzip Transcription Factor B</i>
MEC	Matriz Extra Celular
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MMP2	<i>Matrix Metalloproteinase2</i>
MMP8	<i>Matrix Metalloproteinasee8</i>
MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase9</i>
MMP20	<i>Matrix Metalloproteinase 20</i>
MSX1	<i>Msh Homeobox1</i>
MSX2	<i>Msh Homeobox2</i>
MTHFR	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i>
NAO	<i>Nodulosis, Arthropaty And Osteolysis.</i>
PAX7	<i>Paired Box 7</i>
PDGFC	<i>Platelet-Derived Growth Factor C</i>
PVRL1	<i>Poliovirus Receptor-Related 1</i>
SATB2	<i>Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TBX22	<i>T-Box Transcription Factor 22</i>
TGFA	<i>Transcript Growth Factor Alpha</i>
TGFB3	<i>Transforming Growth Factor Beta 3</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. CAPÍTULO 1.....	19
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	38
REFERÊNCIAS*	41
APÊNDICE	48
APÊNDICE I.....	49
APÊNDICE II.....	52
APÊNDICE IV	55
ANEXO III.....	60

1. INTRODUÇÃO

As fissuras labiopalatinas (FLP) são malformações originadas da não junção ou junção incompleta dos processos nasais medianos e maxilares, durante a vida embrionária, clinicamente representada pelo não fechamento do lábio, palato ou ambos (1,2).

Uma variedade de esquemas de classificação tem sido sugerida e recomendada para fissuras típicas e atípicas (3). A determinação fenotípica da fissura pode ser baseada na extensão completa da fissura (afetando palato primário e secundário inteiramente) e incompleta, e também na lateralidade do defeito (esquerda, direita, bilateral e central no caso de fissuras medianas) (4–6).

Embora as fissuras orofaciais sejam frequentes, sua etiologia é complexa e não é claramente estabelecida na maioria dos casos. Diversos fatores de risco modificáveis e não modificáveis são reconhecidos como possível causa, porém continua incerto que proporção do risco total é explicada por estes fatores combinados (7).

Há um consenso na literatura em relação à existência de uma causa multifatorial, incluindo fatores ambientais e/ou genéticos. Diversos fatores ambientais têm sido associados com as fissuras (8), assim como fumo ativo materno ou até passivo (9–12), falta de suplementação de ácido fólico e vitaminas B6 e B12 (13,14), além de ingestão de álcool (15). Fatores genéticos incluem variáveis genéticas herdadas da mãe ou pai, que podem ser diretamente responsáveis pela causa da FLP, ou que atribuem susceptibilidade ao aumento do risco em desenvolver a FLP (16).

As FLP afetam aproximadamente 1:700 nascidos vivos, com ampla variabilidade de acordo com origem geográfica, grupos étnicos, e também fatores ambientais e *status* socioeconômico. Esta frequência também difere de acordo com sexo e lateralidade: estudos epidemiológicos demonstram que as fissuras labiais, com ou sem envolvimento do palato, são mais comuns no sexo masculino (2:1), enquanto as fissuras de palato, no feminino são inversamente proporcionais (masculino/feminino, 0,5: 1) (2,17–19). FLP unilateral é a mais frequente e o lado esquerdo o mais afetado (2:1) (20,21).

Devido à característica interdisciplinar e complexa do cuidado às pessoas nascidas com fissuras, além de sua diversidade fenotípica, é importante sua descrição detalhada, inteligível, consistente e acurada (22). O fenótipo da FLP é mais complexo do que se presume, apresentando diversas combinações com relação ao lado afetado e extensão da fissura, ou ainda ser caracterizado por uma variedade de marcadores clínicos associados, como anomalias dentárias, defeitos de esmalte e outras características craniofaciais, que podem ser essenciais na busca da etiologia genética da condição(4).

Menezes et al.,(19) observaram, em um estudo multicêntrico no Brasil, que pelo menos 83,3% dos pacientes com FLP apresentaram algum tipo de alteração dentária. Em outro estudo, baseado em uma coorte internacional de indivíduos nascidos com FLP (23), mostrou-se uma maior frequência de anomalias dentárias nesses pacientes do que em indivíduos não afetados. É evidente que indivíduos com fissuras orofaciais têm maior frequência de anomalias dentárias na dentição permanente do que indivíduos não afetados (24–27). A maioria dos casos pode ser atribuída à hereditariedade e outros distúrbios adquiridos no ambiente físico em torno da dentição, sendo difícil classificar a etiologia dessas anomalias nos casos afetados (23,24).

A ocorrência da fissura de lábio e palato e o desenvolvimento dos germes dentários têm uma relação embriológica muito próxima, no que se refere ao período envolvido e localização anatômica (24). FLP e defeitos da formação dental se desenvolvem durante a 6ª até 12ª semana de vida intrauterina (28). Anomalias como hipodontia e dentes supranumerários se estabelecem durante os estágios de iniciação e proliferação do germe dentário (1). Estudos também indicam que as anomalias dentárias estão associadas ao grau de extensão e severidade da fissura (4,29).

A prevalência de anomalias dentárias é maior no lado afetado pela fissura em relação ao lado não afetado em pacientes com FLP, e mais frequentes em dentes permanentes do que em dentes decíduos (25,26). A anomalia mais frequentemente observada é a agenesia dentária (20,30,31). Outras anomalias relatadas incluem microdontia (32), atrasos no desenvolvimento da dentição (33), presença de dentes supranumerários (21), defeitos na formação do esmalte (25,34,35) e impacção dentária (36).

Os achados indicam que intervenções cirúrgicas na fase inicial de formação dentária seriam responsáveis por anomalias na área da fissura, enquanto anomalias fora da área afetada estariam possivelmente mais relacionadas a fatores genéticos e regulação de genes (20,25,26). Portanto, a existência de anomalias dentárias em pacientes com FLP não se deve somente à formação da fissura em si (31), e é importante considerar aquelas encontradas fora da área adjacente ao defeito, a fim de evitar superestimações e obter-se uma prevalência real das anomalias. Ademais, a presença constante destas anomalias no lado oposto das fissuras unilaterais levou à proposição de que estes tipos de fissuras poderiam ser consideradas fissuras bilaterais mal sucedidas (4,6).

Entender a associação entre FLP e anomalias de desenvolvimento dentário pode ajudar a esclarecer os mecanismos de desenvolvimento sob controle de fatores genéticos e ambientais, estabelecer novas classificações e determinar fatores de risco. Para isso, têm se concentrado não somente na prevalência das anomalias dentárias, mas também na distribuição destas nos diferentes tipos de fissura, buscando-se entender os mecanismos de origem (27).

Uma precisa etiologia e patogênese das FLP e alterações dentárias ainda não é estabelecida, e os resultados de estudos na área têm aumentado o interesse no detalhamento dos fenótipos envolvidos, para que todas as características associadas sejam levadas em consideração em estudos familiares e genéticos futuros (5).

Devido às interações genético-ambientais associadas às fissuras serem multifatoriais e complexas, existe uma grande heterogeneidade no fenótipo, atribuída à falta de uma definição clínica mais detalhada, dificultando a previsão de risco (37,38). Para melhorar o entendimento desses fatores etiológicos essenciais por trás das FLP, é importante definir um grupo mais homogêneo das características fenotípicas, aumentando a complexidade da descrição clínica através de características adicionais como a presença de anomalias dentárias (4,39,40), e assim poder ver associações antes mascaradas pela abordagem de classificação heterogênea e ampla (37), além de impulsionar estudos genéticos para encontrar novos genes e aconselhamento genético efetivo (38). A classificação precisa dos indivíduos

afetados pelas fissuras torna-se essencial quando se trata de um traço genético complexo como a FLP, em que o fenótipo pode ser altamente variável.

A ocorrência simultânea de FLP e anomalias de desenvolvimento dentário, como descrito anteriormente, sugerem que estes fenótipos possam estar geneticamente associados.

A identificação de genes que contribuem para a FLP tem sido objeto de décadas de pesquisa, usando uma variedade de abordagens (por exemplo, análise de ligação, rearranjos genômicos, estudos de associação de genes ou regiões específico se estudos de associação em todo o genoma) (2,41), porém trazendo evidências de que não há um principal modelo genético que explique ao menos um terço das FLP isoladas, mas sim um modelo poligênico, com vários genes de pequenos efeitos sendo o modo de herança mais comumente relacionado às FLP isoladas (42).

A lista de genes que parecem contribuir para esta correlação tem se expandido rapidamente desde a primeira associação relatada entre fator de crescimento transformador alfa (*TGFA*) com FLP isoladas em 1989 (43). Atualmente tem-se: *IRF6*, *MAFB*, *ARHGAP29*, *PAX7*, *MSX1*, *MTHFR*, *TGFB3*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGF8*, *PDGFC*, *PVRL1*, *GABRB3*, *MSX2*, *SATB2* e *TBX22*(41,44–50).

Quando diversas variações genéticas são testadas simultaneamente (de dezenas a um milhão), além de aumentar a lista de genes possíveis que contribuem para FLP em humanos, muitas associações esperadas podem ser ignoradas (39). Após alguns desses estudos em escala relativamente maior, muitos estão considerando esforços mais direcionados e se concentrando em genes e/ou loci específicos. A tendência para o futuro próximo é voltar aos trabalhos orientados por hipóteses, para enfim chegar a estratégias avançadas de aconselhamento ou prevenção genética (40).

Apesar do avanço ao longo dos anos, ainda não foi identificado um mecanismo que permita a aplicação dos resultados laboratoriais em mudanças da prática clínica (42). Evidências recentes, no entanto, sugerem que indivíduos com fissuras de fato apresentam um espectro de fenótipos evidentes (FL, FLP e FP), mas também possuem uma variedade de características subclínicas, que são importantes a serem consideradas no planejamento de estudos genéticos, pois o poder é reduzido quando diversos fenótipos de

diferentes etiologias são mesclados, necessitando de um tamanho amostral muitas vezes inviável. A incorporação de descrições clínicas sofisticadas permite agrupamentos biologicamente mais relevantes (41,42).

Temos proposto o conceito de que formas isoladas de fissuras são frequentemente acompanhadas por outras anomalias da dentição, e que fissuras isoladas de lábio e palato sejam na verdade síndromes que combinam uma ou mais alterações da dentição que compartilham o mesmo *background* genético. Descrições como 'isolado' e 'sindrômico' podem impedir a descoberta genética, e descrições clínicas mais completas podem ser mais adequadas para relacionar genótipo-fenótipo (39).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são os tipos mais comuns de variações genéticas (aproximadamente 90%) no genoma humano e, através da análise das frequências desses polimorfismos em indivíduos afetados por FLP, é possível verificar a contribuição de uma função alterada de um gene específico para a susceptibilidade e ocorrência das FLP, auxiliando a identificação de variações genéticas importantes na prevenção e tratamento (51,52).

Genes que potencialmente representam um papel na etiologia de uma alteração em particular são tipicamente sugeridos através de observações durante o processo de embriogênese craniofacial (53).

Durante o desenvolvimento embrionário, o processo de morfogênese é acompanhado por mudanças na composição da matriz extracelular (MEC) que permitem ainda mais a migração e diferenciação celular, interações célula-célula e reabsorção tecidual. Qualquer perturbação nesses eventos pode causar alterações irreversíveis, resultando no desenvolvimento das FLP (54).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco, conhecidas por desempenhar um papel importante nesses processos devido ao seu envolvimento na remodelação da MEC em processos fisiológicos normais, como desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelação de tecidos, bem como em processos de doenças, como artrite e metástase. A maioria das MMPs é secretada como pró-enzimas inativas que são ativadas quando clivadas por proteinases extracelulares ou, intracelularmente por sua glutationilação (4,55).

Estudos anteriores sugeriram MMPs como genes candidatos potenciais para FLP com base em padrões de expressão e nos papéis que desempenham na modelagem de tecidos craniofaciais durante a embriogênese precoce (56,57).

MMP2, também conhecida como gelatinase A e collagenase tipo IV, está localizada no cromossomo 16 na posição 12.2 e produz uma proteína pró-MMP2. A MMP2 está envolvida em diversas funções celulares, além de degradar o colágeno tipo IV, o principal componente estrutural das membranas basais: regula a formação e a remodelação dos vasos sanguíneos, participa da remodelação e reabsorção óssea (58). Mutações nesse gene têm sido associadas à síndrome de Nodulosis-Arthropathy-Osteolysis (NAO) (55).

Várias evidências apoiam o papel fundamental das MMPs durante o desenvolvimento, a remodelação e a destruição dos tecidos orais. Demonstrou-se que MMPs como MMP2, MMP8, MMP9, MMP20 desempenham papéis importantes na produção de odontoblastos, formação de esmalte, progressão de cárie, doenças pulpares e periapicais e até falha de restaurações em resina (58–62). As MMPs expressas pelos odontoblastos desempenham um papel importante na formação da matriz dentinária, modulando a progressão da cárie, formação secundária de dentina e mineralização dos dentes (56).

Portanto, este estudo justifica-se pelas lacunas existentes pelos anos de resultados inconclusivos quanto ao mecanismo das fissuras, e a importância de se estabelecer parâmetros clínicos mais detalhados das FLP, através de outros sinais associados à fissura, que auxiliará a aumentar a homogeneidade dos grupos estudados e elucidar os mecanismos envolvidos nessa condição complexa.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo utilizar o desenvolvimento dental como uma ferramenta para criar subfenótipos para a FLP com base em suas alterações, além de verificar a existência de associação entre polimorfismo no gene *MMP2* com anomalias do complexo dentino-polpa a fim de identificar anomalias dentárias que seriam parte de uma forma sindrômica da fissura que inclui alterações da dentição. A hipótese é que será possível identificar associações preferenciais entre determinados tipos de fissuras e certas anomalias dentárias, e que o *MMP2* seja um gene

que contribui para alterações de desenvolvimento dentário específicas de indivíduos nascidos com fissura.

Para isso utilizamos a metodologia proposta por Letra et al., 2007, descrita nos métodos do artigo, utilizando o formulário no Apêndice II para a descrição das anomalias encontradas nas radiografias panorâmicas dos pacientes.

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*:

Talon Cusp Associates with *MMP2* in a Cohort of Individuals Born with Cleft Lip and Palate

Bianca G. N. Cavalcante^a DDS; Rosa Helena W. Lacerda^a DDS, MS; Ionária O. Assis^a DDS; Mariana Bezamat^b DDS; Adriana Modesto^c DDS, MS, PHD, DMD; Alexandre R. Vieira^d DDS, MS, PHD.

Institutional affiliations:

^aGraduate Program in Dentistry and Center for Treatment of Cleft Lip and Palate, University Hospital Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

^bDepartment of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

^cDepartment of Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA.

^dDepartment of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA and Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

Corresponding author: Prof. Alexandre R. Vieira

412 Salk Pavilion, Department of Oral Biology
School of Dental Medicine, University of Pittsburgh
335 Sutherland Street, Pittsburgh, PA 15261
Tel.: (412) 383-8972; Fax: (412) 624-3080

Funding: This study was financed in party by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Running title-Talon Cusp Associates with *MMP2* in CLP

Acknowledgments- The authors are indebted to the participants of the study and the Smile Train for the support of the treatment of cleft lip and palate individuals.

ABSTRACT

Objective. The aim of this study is to use dental development as a tool to subphenotype oral clefts and investigate the association of *MMP2* with dentin-pulp complex anomalies, in order to identify dental anomalies that are a part of a ‘cleft syndrome’.

Design. Two hundred and ninety individuals born with cleft lip and palate were evaluated and several clinical features, such as cleft completeness or incompleteness, laterality, and presence of dental anomalies were used to assess each individual’s cleft status. We tested for over-representation of *MMP2* single nucleotide polymorphism rs9923304 alleles depending on individuals having certain dental anomalies. Chi-square and Fisher’s exact tests were used in all comparisons ($\alpha = 0.05$).

Results. Significant differences between individuals with and without certain types of dental anomalies were observed for the frequency of the *MMP2* less common allele. Differences were found for individuals born with clefts and having talon cusp ($p=0.04$).

Conclusion. All individuals born with cleft lip and palate had alterations of the dentition, and a quarter to half of the individuals had alterations of the internal anatomy of their teeth, which further indicates that dental anomalies can be considered an extended phenotype for clefts.

Key words: dental anomalies, genetics, nonsyndromic clefting.

INTRODUCTION

Cleft lip and cleft palate, which frequently occur together, are developmentally distinct entities (Fogh-Andersen, 1942). However, differences in etiology or epidemiology of these complex traits may remain undetected because of the high variability in disease phenotype. Traditionally, studies assign the cleft phenotype as of simply affected or unaffected status, and after three decades of molecular genetic studies either targeting certain genes/loci or scanning the whole genome, we are yet to determine conclusively genetic variants that can be used for better informing individual risks (Vieira, 2017).

Dental development could be used to help increase homogeneity and expedite identification of genes. Individuals born with clefts present considerably more dental anomalies outside the cleft area than individuals without clefts (Letra et al., 2007). We proposed that part of what is being defined as isolated oral clefts is in reality a syndrome that includes anomalies of the dentition (Koruyucu et al., 2018). This could explain some of the accumulated inconclusive results of the last thirty years of molecular studies, since most of these studies ascertain individuals born with clefts at birth, which does not allow for the evaluation of the dentition. Defining dental anomalies that are part of a “cleft syndrome” would allow identification of healthy individuals presenting an increased risk to be carrying genes involved in cleft formation, and hence gene-mapping efforts will have increased power and the ability to provide effective genetic counseling.

Our original report (Letra et al., 2007) explored a number of anomalies of number and we would like to more carefully characterize the dentition of a group of individuals born with clefts to evaluate structural anomalies of teeth as well. Further, we also hypothesized that *MMP2*, a metalloproteinase we have shown to be involved in

pathologies that involve the dentin-pulp complex (Menezes-Silva R et al., 2012; Vieira AR et al., 2017; Leonardi and Vieira, 2020) is a gene that may contribute to specific dental alterations when individuals are born with cleft lip and palate. Our previous studies with *MMP2* (Letra et al., 2012), testing directly if this gene associates with cleft lip and palate, by comparing the distribution of alleles with that of individuals born without a cleft, did not suggest an association. We believe *MMP2* contribution to developmental alterations in the dentition happens depending on the background of other genes that lead to cleft lip and palate.

METHODS

Subjects

We studied a group of 290 individuals born with oral clefts (cleft lip and cleft palate, cleft lip only, and cleft palate only) (Table 1) in treatment at the Center for Cleft Treatment at the xxxxxxxxxxxx. These individuals are from a geographical area that more than half of the population has more than two ethnicities (Black and White, Amerindian and White, or Black and Amerindian). The study was conducted with the consent of the participants and approved by the Research and Ethics Committee of the aforementioned institution. In the case of children under 15 years of age, authorization was also requested from their parents or from the individual legally in charge of the child, as well as the child's assent was obtained.

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Determination of Cleft Phenotypes

Individuals with clefts were examined clinically and through their medical records to determine cleft type and side to describe the individual's cleft status. Cleft status was based on cleft completeness (comprising primary and secondary palates entirely) or incompleteness and laterality (left, right, bilateral, and central in the cases of median clefts and cleft palate only) (Letra et al., 2007). In "unknown" cleft status means that either cleft type or side could not be determined even after reviewing medical records. All individuals were included in all analyses regarding dental anomalies.

Determination of Dental Anomalies

Dental anomalies such as tooth agenesis (including hypodontia and oligodontia), microdontia, supernumerary teeth, tooth malposition (rotation or inclination), impaction, shape anomalies, and transposition were assessed clinically and through radiographs and recorded for each individual. Shape anomalies were any alteration of the expected anatomy of the crown and roots. These included taurodontism, which was defined as an enlargement vertically of the pulp chamber at the expense of the roots, and pulp nodules, which although are not congenital defects appearing after aging, trauma, or orthodontic treatment, were considered of interest. For every anomaly, the inclusion criterion was that at least one permanent tooth was affected (children eight years-old or younger were excluded mainly because sometimes premolar tooth buds are not visible at younger ages) (Letra et al., 2007). Instances of anomalies adjacent to the cleft area (affecting maxillary central incisors, lateral incisors or canines) were not included, because the absence of such teeth is likely the consequence of development anomalies at the cleft site. Multiple anomalies were characterized by the simultaneous presence of two or more types of dental anomalies in the same individual.

Genotyping

Genomic DNA samples were obtained from saliva of a subset of 229 individuals from the initial sample, since some patients were not able to attend the clinic for saliva collection. Genotyping of *MMP2* single nucleotide polymorphism rs9923304 was performed by the Taqman method (Ranade et al., 2001) with a QuantStudio 6 Flex automatic instrument and pre-designed probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). This genetic variant was selected because we previously suggested that to be used as a biomarker for alterations that predispose problems in the dentin-pulp complex (Leonardi and Vieira, 2020).

Data Analyses

An interexaminer calibration was performed for assessing the dental anomalies, with kappa-value minimum 0,87 and maximum 1. Statistical power was calculated using the Genetic Power Calculator (Purcell et al., 2003) tool implemented for discrete traits comparing two groups. Chi-square and Fisher's exact tests were used to determine Hardy-Weinberg equilibrium and statistically significant differences with an alpha of 0.05. The PLINK software package (Purcell et al., 2007) was used to analyze the distribution of alleles and genotypes between individuals born with cleft lip and palate depending on having specific dental anomalies.

RESULTS

Out of the 290 individuals born with a cleft, 239 were born with a cleft lip with cleft palate, 34 with cleft lip only, and 17 with cleft palate only (Table 1). All individuals had an associated dental anomaly.

Significant differences between individuals with or without talon cusp were observed for the frequency of *MMP2* rs9923304 less common allele ($p=0.04$). No differences in the distribution of alleles were found for the other dental anomalies identified (Table 2). Genotypes were in Hardy- Weinberg equilibrium.

DISCUSSION

We have previously used dental development to classify cleft types with the goal of identifying subgroups that could have specific genetic contributions. Our original work, however, although attempted to score shape alterations, only detected two cases in 500 individuals (Letra et al., 2007). This result was likely due to the fact that taurodontism and dens in dente were not ascertained. In the present report, we carefully evaluated the internal anatomy of 290 individuals born with clefts and found that a quarter to half of the individuals have alterations of the internal anatomy of their teeth. Virtually, all individuals born with cleft lip and palate have alterations of the dentition, suggesting that the multifactorial isolated forms of clefts are “syndromes” of the dentition. We proposed that descriptions such as “isolated” versus “syndromic” when referring to cleft lip and palate may hinder gene discovery (Koruyucu et al., 2018). More complete clinical descriptions including characteristics of the dentition may be useful. We proposed in Table 3 a number of combinations that are suggestions to be used in future studies (Table 3).

The use of medical records is a common practice in many studies. A drawback of this methodology is that when samples are collected from different sources, the reliability of the records is subjected to the interpretation of the professional in charge of relating the examination or procedure. The medical records used in this study - from the University Hospital part of the xxxxxxxxxxxx - are completed according to standardized

nomenclature of the clinical descriptions and therefore minimizes the risk of misinterpretation of the findings. In addition, the same operator (xxxx.) examined every individual clinically and another operator (xxxx.) assayed their medical files and radiographs, after the assessment of interexaminer reliability were carried out in 2 sessions with a 2-week interval, assessing 20 panoramic radiographs randomly chosen each time, which also minimized errors due to misinterpretation of clinical descriptions.

According to public databases, *MMP2* rs9923304 variant allele frequency is 17.5% in Africans, 44.7% in Europeans non-Finish, 33.4% in Ashkenazi Jewish, and 27.1% in east Asians. The frequency of the variant allele in our sample was 20.5%, which is expected since we suspected that the group of individuals born with clefts in this geographic area is enriched by Amerindians. Individuals born with clefts in this area are reported to be 63% from a mix of at least two groups (Sousa, 2014) which is higher than the reported 52.7% for the general population of the state of Paraíba. *MMP2* rs9923304 frequencies ranging from 17% to 45% in populations also suggest this marker may be a good potential biomarker for risks of talon cusps in individuals born with cleft lip and palate in all parts of the globe.

Even though *MMP2* rs9923304 is an intron variant, and we could assume it does not have a direct function on protein formation, we have shown an association between this SNP and talon cusp. The polymorphism could occasion an intron retention during splicing causing the alteration, or this SNP might not be involved with the alteration itself, but linked to other mutation located at gene coding region or next to it, due to linkage disequilibrium.

We, using a hypothesis-driven approach (Letra et al., 2012) and others, using hypothesis-free methods [genome wide linkage and association studies (Prescott et al.,

2000; Wyszynski et al., 2003; Field et al., 2004; Riley et al., 2007; Vieira et al., 2008; Marazita et al., 2009; Mangold et al., 2009; Beaty et al., 2010)] did not find evidence for linkage or association between cleft lip and palate and *MMP2*. Those tests are performed comparing individuals born with cleft lip and palate with individuals born without any structural birth defect, either within families, or in populations. To detect an association between *MMP2* and cleft lip and palate was not our goal. We aimed to test for association between dental anomalies and *MMP2* when individuals are born with cleft lip and palate, with the hypothesis that anomalies involving the internal anatomy of the tooth are influenced by the enzyme.

Our results demonstrated that all individuals born with clefts have some dental anomaly, which further indicates that dental anomalies can be considered an extended phenotype for clefts (Letra et al., 2007; Menezes and Vieira, 2008; Pedro et al., 2012). Including dental anomalies when defining affection status in individuals of families segregating cleft lip and palate has allowed us to identify unique genetic associations (Vieira et al., 2008a; Vieira et al., 2008b). Here we found that genetic variation in *MMP2* that we previously showed to be associated with the formation of periapical lesions and loss of extensive composite resin restorations (Menezes-Silva et al., 2012; Vieira et al., 2017; Leonardi and Vieira, 2020) associated with talon cusp outside the cleft area. This was determined in a cohort of individuals born with clefts, which suggests that *MMP2* may be a modifier of dental development under a background of genes that contribute to cleft lip and palate formation. In other words, a comparison between individuals born with and without clefts may not detect such association.

Talon cusp is a rare dental developmental anomaly, originated from disturbances in the morpho-differentiation stage of tooth development, which may vary clinically from a slight additional cusp-like projection to a well-delineated prominent cusp extending

from the cement-enamel junction to the incisal edge (Hattab, Hazza'a, 2001; Balcioğlu et al., 2011; Cândido-Soares et al., 2014; Sarpangala, Devasya, 2017).

The prevalence of talon cusp has been reported in a range from 1 to 8% of the population, mainly in permanent dentition. The cause is still unknown, but genetic and environmental factors are thought to be involved in the etiology (Hattab, 2014). It is often reported to be accompanied by other dental anomalies such as dens in dente, taurodontism, agenesis, supernumerary teeth (Hattab, 2014; Guven et al., 2017; Elbumarak, 2019). Hattab *et al.* 1996 classified these anomalous cusps into three types: Type I (true talon), Type II (semi talon), and Type III (trace talon) varying according to the cusp formation and extension.

Talon cusp is associated with oculo-facio-cardio-dental syndrome, which is caused by mutations in *BCOR* (Lozić et al., 2012). *BCOR*, as well as *DNMT3A*, when mutated also cause Brooke-Spiegler syndrome, a rare inherited skin tumor syndrome. *DNMT3A* and *DNMT3A2* are overexpressed in Brooke Spiegler syndrome tumors, and *MMP2* expression also appears to be upregulated as a consequence of it (Davies et al., 2019). Talon cusps can also be seen in a hairless dog breed that shows a form of ectodermal dysplasia due to *FOXI3* haploinsufficiency (Kupczik et al., 2017). Enriched functional Gene Ontology module analysis showed that *FOXI3* and *MMP2* are in the same network (Huang et al., 2013). On aggregate, this evidence suggests that *MMP2* contributes to the formation of talon cusp.

In summary, individuals born with clefts always have alterations of the dentition and multifactorial clefts can be understood as a syndrome of dental development.

Conclusion

All individuals born with cleft lip and palate had alterations of the dentition, and a quarter to half of the individuals had alterations of the internal anatomy of their teeth, which further indicates that dental anomalies can be considered an extended phenotype for clefts.

Table 1. Distribution of individuals according to cleft status and frequencies of observed dental anomalies.

	Cleft types							Total
	Cleft lip with or without cleft palate							
	Cleft Lip and Palate			Cleft Lip Only				
	Unilateral Left	Unilateral Right	Bilateral	Unilateral left	Unilateral Right	Bilateral	Cleft Palate	
							Only	
n= 102	n=48	n= 89	n=20	n=6	n=8	n=17		
Malposition	66	32	51	8	4	3	8	172
Dilaceration	35	10	40	5	2	3	2	97
Impaction	28	15	20	3	3	2	6	76
Talon Cusp	26	15	8	6	0	0	5	60
Agenesis	17	10	12	4	1	2	6	52
Dens in dente	17	13	3	7	1	1	4	46
Taurodontism	17	6	13	1	1	3	4	45
Fused Roots	15	5	16	0	0	2	2	40
Microdontia	13	0	10	4	1	1	2	31
Enamel Pearl	3	6	3	2	1	0	1	16
Supernumerary	8	2	2	1	1	0	1	15
Pulp Nodules	3	2	4	0	0	0	2	11
Transposition	2	2	4	0	0	0	0	8
Macrodontia	0	2	2	1	1	0	0	6
Supernumerary Roots	3	3	0	0	0	0	0	6
Incisal clefts	0	0	0	1	1	0	1	3

Table 2. Distribution of allele and genotypes according to dental anomalies present in a subset of individuals studied. Comparisons were made with individuals without the particular dental anomaly.

	Genotypes (rs9923304)				Genotype distribution p-value	Allele frequency p-value
	n	CC	CT	TT		
Malposition	98	46	22	30	0.42	0.85
Root Dilaceration	59	29	13	17	0.60	0.50
Impaction	38	18	10	10	0.89	0.57
Talon Cusp	35	11	11	13	0.19	0.04
Tooth Agenesis	24	13	5	6	0.59	0.29
Taurodontism	28	13	9	6	0.54	0.42
Dens in Dente	24	11	6	7	0.93	0.65
Fused Roots	23	12	4	7	0.56	0.64
Microdontia	20	9	7	4	0.50	0.31
All Samples	229	100	76	53		

Table 3. List of proposed subphenotypes based on dental development.

Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) = 273		n
Unilateral Left n=122	With/without malposition outside the cleft area	74
	With/ without dilaceration outside the cleft area	40
	With/without tooth impaction outside the cleft area	31
	With/without taurodontism	18
Unilateral Right n=54	With/without malposition outside the cleft area	36
	With/without tooth impaction outside the cleft area	18
Unsuccessful Bilateral* n=117	With/without talon cusp on the non-cleft area	47
	With/without dens in dente on the non-cleft area	38
	With/without agenesis on the non-cleft area	32
Bilateral n=97	With/without malposition outside the cleft area	54
	With/ without dilaceration outside the cleft area	43
	With/without tooth impaction outside the cleft area	22
	With/without fused roots	18
	With/without taurodontism	16
	With/without agenesis outside the cleft area	14
Cleft palate only (CPO) = 17		n
Complete/Incomplete n=17	With/without malposition outside the cleft area	8
	With/without tooth impaction outside the cleft area	6
	With/without agenesis outside the cleft area	5
	With/without dens in dente outside the cleft area	4
	With/without taurodontism	4

*Those are instances in which there is a cleft in one side of the upper lip and evidence of alterations of the lateral maxillary incisor on the opposite side (Letra et al., 2007; Vieira, 2012).

REFERENCES

- Balcioğlu HA, Keklikoğlu N, Gülseren Kökte. Talon Cusp: a morphological dental anomaly. *Rom J Morphol Embryol*. 2011, 52(1):179–18
- Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*. 2010; 42:525-529.
- Cândido-Soares LE, Passador-Santos F, Thomaz LA, Mautoni MC, Araújo VC, Soares AB. A rare presentation of multiple talon cusps. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*, 2014; 62(2), 165-168.
- Davies HR, Hodgson K, Schwalbe E, Coxhead J, Sinclair N, Zou X, Cockell S, Husain A, Nik-Zainal S, Rajan N. Epigenetic modifiers DNMT3A and BCOR are recurrently mutated in CYLD cutaneous syndrome. *Nat Commun*. 2019; 10:4717.
- Elmubarak NA. Genetic Risk of Talon Cusp: Talon Cusp in Five Siblings. *Case Rep Dent*. 2019;2019:3080769.
- 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:265-271.
- Fogh-Andersen P. *Inheritance of Harelip and Cleft Palate*. Copenhagen: Arnold Busck. 1942.
- Guven Y, Kasimoglu Y, Tuna EB, Gencay K, Aktoren O. Prevalence and characteristics of talon cusps in Turkish population. *Dent Res J (Isfahan)*. 2016;13(2):145-150.

Hattab FN, Yassin OM, al-Nimri KS. Talon cusp in permanent dentition associated with other dental anomalies: Review of literature and reports of seven cases. *ASDC J Dent Child*. 1996;63:368–76.

Hattab FN, Hazza'a AM, An unusual case of talon cusp on geminated tooth. *J Can Dent Assoc*, 2001, 67(5):263–266.

Hattab FN. Double talon cusps on supernumerary tooth fused to maxillary central incisor: Review of literature and report of case. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(4):e400-e407.

Huang Q, Wu L-Y, Wang Y, Zhang X-S. GOMA: functional enrichment analysis tool based on GO modules. *Chin J Cancer*. 2013; 32:195-204.

Koruyucu M, Kasimoğlu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergöz N, Tuna EB, Gencay K, Deeley K, Bussaneli D et al. Rethinking isolated cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018; 125:307-312.

Kupczik K, Cagan A, Brauer S, Fischer MS. The dental phenotype of hairless dogs with FOXI3 haploinsufficiency. *Sci Rep*. 2017; 7:5459.

Leonardi DP, Vieira AR. From caries progression and restoration failures to periapical lesions in the era of precision. *JDR ClinTrans Res*. 2020; 5:10-12.

Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res*. 2007; 86:989-991.

Letra A, Silva RM, Motta LG, Blanton SH, Hecht JT, Granjeiro JM, Vieira AR. Association of *MMP3* and *TIMP2* promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. *Birth Defects Res A ClinMolTeratol*. 2012; 94:540-548.

- Lozić B, Ljubković J, Pandurić DG, Saltvig I, Kutsche K, Krželj V, Zemunik T. Oculo-facio-cardio-dental syndrome in three succeeding generations: genotypic data and phenotypic features. *Braz J Med Biol Res.* 2012; 45:1315-1319.
- Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, Walier M, Mattheisen M, Henschke H, Lauster C, Schmidt G, Schiefke F, Reich RH, et al. Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A.* 2009;149A:2680-2694.
- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsch S, Riley B et al. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009; 68:151-170.
- Menezes R, Vieira AR. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45:414-419.
- Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of *MMP2* and *MMP3* genes to the development of periapical lesions and healing response. *J Endod.* 2012; 38:604-607
- Pedro RL, Faria MDB, Costa MC, Vieira AR. Dental anomalies in children born with clefts: a case-control study. *Cleft Palate Craniofac J.* 2012; 49: e64-68.
- Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet.* 2000; 106:345-350.

- Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*. 2003; 19:149-150
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet*. 2007; 813:559-575.
- Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Xsiao CF, Olivier M, Pesich R, Hebert J, Chen YD, Dzau VJ et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res*. 2001; 11:1262-1268
- Riley BM, Schultz RE, Cooper ME, Goldstein-McHenry T, Daack-Hirsch S, Lee KT, Dragan E, Vieira AR, Lidral AC, Marazita ML et al. A genome wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. *Am J MedGenet A*. 2007;143A:846-852
- Sarpangala M, Devasya A. Variants of Talon Cusp (Dens Evaginatus). *J Clin Diagn Res*. 2017;11(1):ZJ01-ZJ02.
- Sousa ALB. Incidência e caracterização de fendas orofaciais em nascidos vivos registrados em dados do SINAC (DATASUS) – Paraíba – de 2002 a 2010 [Trabalho de Conclusão de Curso]. João Pessoa: Universidade Estadual da Paraíba; 2014.
- Vieira AR. Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate. *Front Oral Biol*. 2012; 16:19-31.
- Vieira AR. Three decades of molecular studies of multifactorial cleft lip and palate. *JDR ClinTrans Res*. 2017; 2:93-94.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A*. 2008a; 146A:1406-1413.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genet Med*. 2008b; 10:668-674.

Vieira AR, Silva MB, Souza KKA, Filho AVA, Rosenblatt A, Modesto A. A pragmatic study shows failure of dental composite fillings is genetically determined: a contribution to the discussion on dental amalgams. *Front Med (Lausanne)*. 2017; 4:186.

Wyszynski DF, Albacha-Hejazi H, Aldirani M, Hammod M, Shkair H, Karam A, Alashkar J, Holmes TN, Pugh EW, Doheny KF 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:140-147.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo permitiu identificar padrões de anomalias de desenvolvimento dentário (ADD) em indivíduos nascidos com FLP antes não descritos na literatura.

A presença de ADD em todos os indivíduos, a descrição de diversas anomalias de forma e a frequência consistente de *dens in dente* e *talon cusp* nas 'fissuras bilaterais malsucedidas' demonstram a importância de uma descrição clínica minuciosa e acurada, considerando o histórico do paciente, como um passo fundamental na descoberta de mecanismos não entendidos.

Destaca-se ainda a importância da homogeneidade da amostra do estudo (todos com fissura), pois assim foi possível sugerir o *MMP2* como modificador do desenvolvimento dental, com a hipótese de que anomalias envolvendo a anatomia interna do dente são influenciadas por este gene. Estudos de associação ligação de escaneamento de todo o genoma (63-70) não encontraram evidências de associação entre fissuras labiopalatinas e *MMP2*, uma vez que estes testes são realizados comparando indivíduos nascidos com e sem fissuras. Encontrar associação entre *MMP2* e fissuras não era o nosso objetivo, mas sim testar a associação entre anomalias dentárias e *MMP2* quando indivíduos nascem com fissura labiopalatina.

A palavra coorte foi adotada pela epidemiologia para definir um grupo de pessoas com características em comum que são observadas quanto a um determinado desfecho, e partimos dessa definição para definir o nosso tipo de estudo (71-73). O problema para muitas coortes de estudo é que indivíduos nascidos com fissuras podem não ter informações sobre suas dentições coletadas desde cedo, principalmente descrições clínicas de ADD. O paciente pode ter perdas dentárias, ou procedimentos dentários realizados, que levem à subestimação das ADD nas radiografias. Embora a maioria dos pacientes desse estudo seja acompanhada desde a primeira infância no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley - HULW, alguns só tiveram acesso em idade mais avançada. No entanto, essas limitações não configuram vieses no resultado das hipóteses que foram testadas.

Os resultados dessa pesquisa apontam para uma nova forma de pensar sobre FLP, considerando fissuras isoladas como uma síndrome de alterações da dentição. Ao entender que a complexidade dos fenótipos da FLP vai além do *status* 'afetado' ou 'não afetado' pela fissura, poderemos descrever associações antes não feitas, e futuramente identificar indivíduos saudáveis que apresentam um risco aumentado de ter genes envolvidos na formação de fissuras. Assim, os avanços em mapeamento genético terão maior poder e capacidade de fornecer aconselhamento genético eficaz.

4. CONCLUSÃO

Todos os indivíduos nascidos com FLP apresentaram alterações da dentição e um quarto à metade dos indivíduos apresentou alterações na anatomia interna dos dentes, o que indica ainda que as anomalias dentárias podem ser consideradas um fenótipo estendido para as fendas. O *MMP2* pode ser um modificador do desenvolvimento dental em um contexto de genes que contribuem para a fenda labial e palatina.

REFERÊNCIAS*

1. Tereza GPG, Carrara CFDC, Costa B. Tooth Abnormalities of Number and Position in the Permanent Dentition of Patients with Complete Bilateral Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate-Craniofacial J* [Internet]. 2010 May [cited 2019 Aug 23];47(3):247–52. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1597/08-268.1>
2. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* [Internet]. NIH Public Access; 2011 Mar [cited 2019 Aug 30];12(3):167–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331089>
3. Crockett DJ, Goudy SL. Cleft Lip and Palate. *Facial Plast Surg Clin NA* [Internet]. Elsevier Inc; 2016;22(4):573–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsc.2014.07.002>
4. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining Subphenotypes for Oral Clefts Based on Dental Development. *J Dent Res* [Internet]. SAGE Publications; 2007 Oct 8 [cited 2019 Aug 23];86(10):986–91. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/154405910708601013>
5. Kùchler EC, da Motta LG, Vieira AR, Granjeiro JM. Side of Dental Anomalies and Taurodontism as Potential Clinical Markers for Cleft Subphenotypes. *Cleft Palate-Craniofacial J* [Internet]. 2011 Jan [cited 2019 Aug 23];48(1):103–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20507240>
6. De Lima Pedro R, Daniel Brito Faria M, De Castro Costa M, Vieira AR. Dental Anomalies in Children Born with Clefts: A Case-Control Study. *Cleft Palate-Craniofacial J* [Internet]. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 2012 Nov 1 [cited 2019 Aug 23];49(6):64–8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1597/10-067>
7. Raut JR, Simeone RM, Tinker SC, Canfield MA, Day RS, Agopian AJ. Proportion of Orofacial Clefts Attributable to Recognized Risk Factors. *Cleft Palate Craniofac J*. 2019;56(2):151–8.
8. Molina-Solana R, Yáñez-Vico R-M, Iglesias-Linares A, Mendoza-Mendoza A, Solano-Reina E. Current concepts on the effect of environmental factors on cleft lip and palate. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. Churchill Livingstone; 2013 Feb 1 [cited 2019 Aug 23];42(2):177–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0901502712004213>
9. Li Z, Liu J, Ye R, Zhang L, Zheng X, Ren A. Maternal passive smoking and risk of cleft lip with or without cleft palate. *Epidemiology*. 2010;21(2):240–2.
10. Hoyt AT, Canfield MA, Romitti PA, Botto LD, Anderka MT, Krikov S V, et al. Associations between maternal periconceptional exposure to secondhand tobacco smoke and major birth defects. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. Elsevier; 2016 Nov 1 [cited 2019 Aug 30];215(5):613.e1-613.e11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27443814>
11. Panamonta O, Wiromrat P, Wongswadiwat Y, Chaikitpinyo A, Panamonta M, Wichajarn K. Maternal Tobacco Smoke Exposure during Pregnancy

- and the Occurrence of Orofacial Clefts: A Systematic Review of Reported Meta-analyses. *J Med Assoc Thail.* 2017;100(Suppl. 6):S270–7.
12. Saeed OB, Moore MG, Zawahrah H, Tayem M, Kavoosi T, van Aalst JA. The Influence of Consanguinity on Familial Clefting Among Palestinians. *Cleft Palate-Craniofacial J.* 2019;56(8):105566561983838.
 13. Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento De Aquino S, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Coletta RD. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol.* 2010;88(11):980–6.
 14. Worley ML, Patel KG, Kilpatrick LA. Cleft Lip and Palate. *Clin Perinatol [Internet].* 2018 Dec [cited 2019 Aug 30];45(4):661–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30396411>
 15. Leite ICG, Koifman S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res [Internet].* Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 2009 Mar [cited 2019 Aug 30];23(1):31–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242009000100006&lng=en&tlng=en
 16. Setó-Salvia N, Stanier P. Genetics of cleft lip and/or cleft palate: Association with other common anomalies. *Eur J Med Genet.* 2014;
 17. Cymrot M, Sales F de CD, Teixeira F de AA, Teixeira Junior F de AA, Teixeira GSB, Cunha Filho JF da, et al. Prevalência dos tipos de fissura em pacientes com fissuras labiopalatinas atendidos em um Hospital Pediátrico do Nordeste brasileiro. *Rev Bras Cir Plástica. FapUNIFESP (SciELO);* 2010 Dec;25(4):648–51.
 18. Freitas JA de S, Garib DG, Oliveira M, Lauris R de CMC, Almeida ALPF de, Neves LT, et al. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies-USP (HRAC-USP)--part 2: pediatric dentistry and orthodontics. *J Appl Oral Sci [Internet].* [cited 2020 Apr 13];20(2):268–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666849>
 19. Menezes C, de Arruda J-A, Silva L-V, Monteiro J-L, Caribé P, Álvares P, et al. Nonsyndromic cleft lip and/or palate: A multicenter study of the dental anomalies involved. *J Clin Exp Dent [Internet].* Medicina Oral S.L; 2018 Aug [cited 2019 Aug 23];10(8):e746–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30305871>
 20. Bartzela TN, Carels CEL, Bronkhorst EM, Jagtman AMK-. Tooth agenesis patterns in unilateral cleft lip and palate in humans. *Arch Oral Biol [Internet].* 2013 Jun [cited 2019 Aug 23];58(6):596–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295124>
 21. Jamilian A, Lucchese A, Darnahal A, Kamali Z, Perillo L. Cleft sidedness and congenitally missing teeth in patients with cleft lip and palate patients. *Prog Orthod [Internet].* Springer; 2016 [cited 2019 Aug 23];17:14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27135068>
 22. Allori AC, Mulliken JB, Meara JG, Shusterman S, Marcus JR. Classification of Cleft Lip/Palate: Then and Now. *Cleft Palate-Craniofacial J [Internet].* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 2017 Mar 1 [cited 2019 Aug 30];54(2):175–88. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1597/14-080>

23. Howe BJ, Cooper ME, Vieira AR, Weinberg SM, Resick JM, Nidey NL, et al. Spectrum of Dental Phenotypes in Nonsyndromic Orofacial Clefting. *J Dent Res* [Internet]. 2015 Jul 16 [cited 2019 Aug 23];94(7):905–12. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034515588281>
24. Tannure PN, Oliveira CAGR, Maia LC, Vieira AR, Granjeiro JM, de Castro Costa M. Prevalence of Dental Anomalies in Nonsyndromic Individuals with Cleft Lip and Palate: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cleft Palate-Craniofacial J* [Internet]. 2012 Mar [cited 2019 Aug 23];49(2):194–200. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1597/10-043>
25. Shen CA, Guo R, Li W. Enamel defects in permanent teeth of patients with cleft lip and palate: a cross-sectional study. *J Int Med Res*. 2019;47(5):2084–96.
26. Konstantonis D, Alexandropoulos A, Konstantoni N, Nassika M. A cross-sectional analysis of the prevalence of tooth agenesis and structural dental anomalies in association with cleft type in non-syndromic oral cleft patients. *Prog Orthod* [Internet]. 2017 Dec 25 [cited 2019 Aug 23];18(1):20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28681357>
27. Germec Cakan D, Nur Yilmaz RB, Bulut FN, Aksoy A. Dental Anomalies in Different Types of Cleft Lip and Palate. *J Craniofac Surg* [Internet]. 2018 Feb [cited 2019 Aug 23];29(5):1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29485555>
28. Phan M, Conte F, Khandelwal KD, Ockeloen CW, Bartzela T, Kleefstra T, et al. Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms? *Hum Genet* [Internet]. 2016 Dec 3 [cited 2019 Aug 23];135(12):1299–327. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-016-1733-z>
29. Yezioro-Rubinsky S, Eslava-Schmalbach JH, Otero L, Rodríguez-Aguirre SA, Duque ÁM, Campos FM, et al. Dental Anomalies in Permanent Teeth Associated With Nonsyndromic Cleft Lip and Palate in a Group of Colombian Children. *Cleft Palate-Craniofacial J* [Internet]. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 2019 Jul 8 [cited 2019 Aug 23];105566561986149. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1055665619861498>
30. Sá J, Araújo L, Guimarães L, Maranhão S, Lopes G, Medrado A, et al. Dental anomalies inside the cleft region in individuals with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. Medicina Oral S.L; 2016 Jan 1 [cited 2019 Aug 23];21(1):e48–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615505>
31. Tan ELY, Kuek MC, Wong HC, Ong SAK, Yow M. Secondary dentition characteristics in children with nonsyndromic unilateral cleft lip and palate: A retrospective study. *Cleft Palate-Craniofacial J*. 2018;55(4):582–9.
32. Al-Kharboush GH, Al-Balkhi KM, Al-Moammar K. The prevalence of specific dental anomalies in a group of Saudi cleft lip and palate patients. *Saudi Dent J* [Internet]. King Saud University; 2015;27(2):75–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sdentj.2014.11.007>
33. Haque S, Alam MK. Common dental anomalies in cleft lip and palate patients. *Malaysian J Med Sci*. 2015;22(2):55–60.
34. Ruiz LAL, Maya RR, D'Alpino PHP, Atta MT, Svizero NDR. Prevalence of enamel defects in permanent teeth of patients with complete cleft lip and

- palate. *Cleft Palate-Craniofacial J.* 2013;50(4):394–9.
35. Allam E, Ghoneima A, Tholpady SS, Kula K. Enamel Hypomineralization in Children with Clefts and the Relationship to Treatment: A Cross-sectional Retrospective Study. *Ann Plast Surg.* 2018;81(5):544–7.
36. Westerlund A, Sjöström M, Björnström L, Ransjö M. What factors are associated with impacted canines in cleft patients? *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(11):2109–14.
37. Vieira AR, Mchenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A Genome Wide Linkage Scan for Cleft Lip and Palate and Dental Anomalies NIH Public Access. *Am J Med Genet A [Internet].* 2008 [cited 2020 Apr 11];146(11):1406–13. Available from: <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1552-4825/suppmat/index.html>.
38. Aspinall A, Raj S, Jugessur A, Marazita M, Savarirayan R, Kilpatrick N. Expanding the cleft phenotype: the dental characteristics of unaffected parents of Australian children with non-syndromic cleft lip and palate. 2013;
39. Koruyucu M, Kasimoğlu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergöz N, et al. Rethinking isolated cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(4):307–12.
40. Vieira AR. Hypothesis-driven versus hypothesis-free approaches to the identification of genes for cleft lip and palate. Vol. 92, *Archives of Oral Biology.* Elsevier Ltd; 2018. p. 88–9.
41. Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of Cleft Lip and Cleft Palate. [cited 2020 Apr 11]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>
42. Vieira AR. Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate. *Front Oral Biol [Internet].* 2012 [cited 2020 Apr 12];16:19–31. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/337521>
43. Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. Association of genetic variation of the transforming growth factor- α gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet.* 1989;45(3):348–53.
44. 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.* University of Chicago Press; 2004 Aug 1;75(2):161–73.
45. Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, et al. Medical Sequencing of Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *PLoS Genet [Internet].* 2005 Dec [cited 2020 Apr 13];1(6):e64. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.0010064>
46. Jugessur A, Farlie P, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis [Internet].* 2009 Oct [cited 2020 Apr 11];15(7):437–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-0825.2009.01577.x>
47. Letra A, Menezes R, Govil M, Fonseca RF, McHenry T, Granjeiro JM, et al. Follow-up association studies of chromosome region 9q and nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet Part A [Internet].* Wiley-Liss Inc.; 2010 Jul [cited 2020 Apr 13];152(7):1701–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20583170>
48. Kohli SS, Kohli VS. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. Vol. 16, *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.*

- Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2012. p. 64–72.
49. Zhao H, Zhang M, Zhong W, Zhang J, Huang W, Zhang Y, et al. A novel IRF6 mutation causing non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a pedigree. *Mutagenesis* [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 13];33(3):195–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30053123>
 50. Tasanarong P, Pabalan N, Tharabenjasin P, Jarjanazi H. MSX1 gene polymorphisms and non-syndromic cleft lip with or without palate (NSCL/P): A meta-analysis [Internet]. Vol. 25, *Oral Diseases*. Blackwell Publishing Ltd; 2019 [cited 2020 Apr 13]. p. 1492–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31132300>
 51. Shaw G. Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNPs). *BJU Int* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 Sep 1 [cited 2020 Apr 13];112(5):664–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bju.12298>
 52. Kan S, Zhu G, Du Y, Fan L, Yang F, Lou S, et al. Non-syndromic cleft lip with or without palate-susceptible SNPs is associated with hyperdontia. *Oral Dis* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2019 Oct 1 [cited 2020 Apr 12];25(7):1751–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/odi.13149>
 53. Rafighdoost H, Hashemi M, Asadi H, Bahari G. Association of single nucleotide polymorphisms in WNT genes with the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Congenit Anom (Kyoto)* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2020 Apr 13];58(4):130–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cga.12271>
 54. Smane-Filipova L, Pilmane M, Akota I. MMPs and TIMPs expression in facial tissue of children with cleft lip and palate. 2016 [cited 2020 Apr 11];160(4):538–42. Available from: <https://doi.org/10.5507/bp.2016.055>
 55. National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; 2020 Mar 30. MMP2; [reviewed 2013 Aug; cited 2020 Apr 10];. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/mmp2>
 56. Jain A, Bahuguna R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview. 2015 [cited 2020 Apr 11]; Available from: www.sciencedirect.com
 57. Zhu Y, Yan L, Zhu W, Song X, Yang G, Wang S. MMP2/3 promote the growth and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via PI3K/Akt-NF-κB-mediated epithelial–mesenchymal transformation. *J Cell Physiol*. 2019;234(9):15847–55.
 58. Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic Susceptibility to Periapical Disease: Conditional Contribution of MMP2 and MMP3 Genes to the Development of Periapical Lesions and Healing Response. 2012 [cited 2020 Apr 11]; Available from: <http://www.hapmap.org>
 59. Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent* [Internet]. 2011 Aug [cited 2020 Apr 13];39(8):536–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641958>
 60. Yuan W, Anne Haendel M, Vieira AR, Silva MB, A Souza KK, A Filho A V, et al. A Pragmatic Study Shows Failure of Dental Composite Fillings Is Genetically Determined: A Contribution to the Discussion on Dental Amalgams. 2017 [cited 2020 Apr 11];4:186. Available from:

- www.frontiersin.org
61. Romualdo PC, Pucinelli CM, Tannure PN, Nelson-Filho P, Segato RAB, Brancher JA, et al. Evaluation of genetic polymorphisms in MMP2, MMP9 and MMP20 in Brazilian children with dental fluorosis. *Environ Toxicol Pharmacol*. Elsevier B.V.; 2019 Feb 1;66:104–8.
 62. Leonardi DP, Vieira AR. From Caries Progression and Restoration Failures to Periapical Lesions in the Era of Precision. *JDR Clin Transl Res*. SAGE Publications Ltd; 2020 Jan 1;5(1):10–2.
 63. Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet*. 2000; 106:345-350.
 64. Wyszynski DF, Albacha-Hejazi H, Aldirani M, Hammod M, Shkair H, Karam A, Alashkar J, Holmes TN, Pugh EW, Doheny KF 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:140-147.
 65. 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:265-271.
 66. Riley BM, Schultz RE, Cooper ME, Goldstein-McHenry T, Daack-Hirsch S, Lee KT, Dragan E, Vieira AR, Lidral AC, Marazita ML et al. A genome wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. *Am J Med Genet A*. 2007;143A:846-852.
 67. Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A*. 2008a; 146A:1406-1413.
 68. Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsch S, Riley B et al. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered*. 2009; 68:151-170.
 69. Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, Walier M, Mattheisen M, Henschke H, Lauster C, Schmidt G, Schiefke F, Reich RH, et al. Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A*. 2009;149A:2680-2694.
 70. Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*. 2010; 42:525-529.
 71. Song JW, Chung KC. Observational Studies: Cohort and Case-Control Studies. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(6):2234–42.
 72. Merriam-Webster Dictionary. Definition of Cohort [Internet]. 2020 [cited 21 June 2020]. Available from: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/cohort> [Accessed 21 June 2020]
 73. National Cancer Institute (US). Cohort Study; [Internet]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2020 [cited 21 June 2020]. Available from: [https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cohort-study#:~:text=cohort%20study%20\(KOH%2Dhort%20STUH,those%20wh](https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cohort-study#:~:text=cohort%20study%20(KOH%2Dhort%20STUH,those%20wh)

o%20do%20not%20smoke).

*De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do
International Committee of Medical Journal Editors -Grupo de Vancouver.
Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Medline*.

APÊNDICE

APÊNDICE I

RESPOSTA AOS COMENTÁRIOS DA BANCA DE QUALIFICAÇÃO:

- Comentários/Sugestões Prof^a. Dr^a. Karina Gottardello Zecchin

1) Utilizar um título menor (Ex: Alterações de desenvolvimento dentário em pacientes nascidos com fissuras labiopalatinas):

RESPOSTA: Modificação acatada.

2) Colocar termos em língua estrangeira em itálico na seção de abreviaturas e siglas:

RESPOSTA: Alterações realizadas.

3) Página 12 (linha 20) repensar a 'educação materna' apontada como fator que influencia diretamente na FLP, para co-fator:

RESPOSTA: Termo retirado para não haver interpretação errada.

4) Página 13(linha 15). A frequência de anomalias dentárias seria não só na dentição permanente, mas também na decídua, embora hajam poucos estudos nesse contexto:

RESPOSTA: Esta informação já está contida dois parágrafos abaixo.

5) Página 14 (linha 11) Que abordagem foi feita para casos de pacientes com suspeita de fissura frustra? Tomografias?

RESPOSTA: Neste caso, não teríamos abordagem com tomografias.

6) Termo glutatiolação usado erroneamente. Termo correto 'glutathionilação':

RESPOSTA: Corrigido.

7) Incluir ao fim da introdução uma menção aos apêndices e a metodologia resumida:

RESPOSTA: Inclusão realizada.

8) Mencionar classificação de Fissuras utilizada:

RESPOSTA: Classificação utilizada nos estudos anteriores, assim como Letra et.al, 2007.

9) Referenciar a metodologia em que se baseou a escolha da idade de corte:

RESPOSTA: Referência incluída.

10) Descrever melhor a seção Resultados:

RESPOSTA: Os resultados foram descritos de forma sucinta e direta como sugere as normas da revista.

11) Utilizar porcentagens nas tabelas:

RESPOSTA: Frequência relativa é um melhor descritor para tamanhos amostrais grandes, pelo menos acima de 100, e o nosso foi menor.

- Comentários/Sugestões Prof^a. Dr^a. Sabrina Garcia de Aquino

1) Metodologia do artigo com mais detalhes sobre cálculo amostral e referências do método usado para avaliação das anomalias:

RESPOSTA: Incluímos sobre o poder da amostra e as referências dos métodos.

2) Descrever melhor a seção Resultados:

RESPOSTA: Os resultados foram descritos de forma sucinta e direta como sugere as normas da revista.

3) Utilizar porcentagens nas tabelas:

RESPOSTA: Frequência relativa é um melhor descritor para tamanhos amostrais grandes, pelo menos acima de 100, e o nosso foi menor.

4) Fazer testes de associação entre MMP2 e subfenótipos propostos/tipos de fissura:

RESPOSTA: Incluímos as informações sobre este comentário na seção Considerações.

5) Deixar mais claro porque o MMP2 foi escolhido, e se há polimorfismos relatados na literatura em indivíduos fissurados:

RESPOSTA: Incluído na introdução do artigo.

- Comentários/Sugestões Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

1) Conclusão do resumo não fala sobre a relação entre desenvolvimento dentário e subfenotipagem da FLP:

RESPOSTA: Objetivos foram reescritos e a conclusão também.

2) Rever objetivo descrito na introdução para que os resultados respondam a ele/ Objetivo não claro no artigo descrito:

RESPOSTA: Objetivos foram reescritos.

3) Explicar melhor o objetivo do exame clínico descrito:

RESPOSTA: Para a classificação das fissuras, alteração realizada.

4) Incluir valor de Kappa no artigo:

RESPOSTA: Calibração e valor de Kappa foram adicionados.

5) Página 23 (linha 8), estes valores de Odds Ratio não estão apresentados nos resultados:

RESPOSTA: Os valores foram obtidos mas não foram significativos, por isso não apresentados na tabela.

6) Referenciar o estudo coorte:

RESPOSTA: Incluímos as informações sobre este comentário na seção Considerações.

7) Fazer testes de associação entre MMP2 e subfenótipos propostos/tipos de fissura:

RESPOSTA: Incluímos as informações sobre este comentário na seção Considerações.

APÊNDICE II

Análise das Imagens Radiográficas Panorâmicas
CÓDIGO: _____ idade- _____

Tipo Fissura: () _____

Observação- _____

AVALIAÇÃO RADIOGRAFICA PANORÂMICA

() Agenesia _____

() Microdontia _____

() Dentes supranumerários _____

() Má posição _____

() Retenção dentária _____

() Anomalias de forma _____

() Transposição dentária _____

() Anomalias múltiplas* _____

*presença simultânea de 2 ou mais tipos de anomalias dentárias no mesmo indivíduo

SUBFENÓTIPOS DAS FISSURAS BASEADOS NO DESENVOLVIMENTO DENTAL (Letra et.al, 2007)

- Fissura Labial e/ou Palatina(FL/P)
 - unilateral direita
 - com/sem agenesia fora da região de fissura
 - unilateral esquerda
 - com/sem agenesia fora da região de fissura
 - com/sem microdontia ou supranumerário no lado oposto da fissura
 - com/sem múltiplas anomalias
 - bilateral
 - com/sem agenesia fora da região de fissura
 - com/sem dente supranumerário no lado oposto da fissura
 - com/sem múltiplas anomalias
 - com/sem má posição dos caninos inferiores
 - bilateral frustro (FL/P unilateral com agenesia do incisivo lateral superior oposto)
 - com/sem múltiplas anomalias

APÊNDICE III

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal da Paraíba

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Prezado (a),

Você está sendo convidado a participar de pesquisa intitulada “ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS” que está sendo desenvolvida por Bianca Golzio Navarro Cavalcante, aluna do Curso de Pós-Graduação em Nível de Mestrado em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Vieira Rezende. Antes de decidir sobre sua participação é importante que entenda o motivo de a mesma estar sendo realizada e como ela se realizará, portanto, leia atentamente as informações que seguem e se tiver alguma dúvida, consulte a pesquisadora responsável ou o Comitê de Ética em Pesquisa. O objetivo deste estudo é avaliar a frequência de subfenótipos das fissuras labiopalatinas baseados no desenvolvimento dental em pacientes dos pacientes atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley, UFPB, em João Pessoa-PB. Este estudo justifica-se pelo fato de que identificando anomalias dentárias associadas, permitirá a possibilidade de elaboração de planejamentos adequados e individualizados para as fissuras labiopalatinas. Esse estudo será realizado em pacientes com fissuras orofaciais. Sua participação neste trabalho consiste em permitir o acesso aos dados de seu prontuário, como radiografias, fotografias e dados pessoais. São previstos riscos mínimos durante a sua participação nesse estudo. A coleta de dados será realizada exclusivamente por uma pesquisadora, da mesma forma, para evitar a identificação de suas respostas, os questionários serão depositados na sua presença, em envelope único. Já o TCLE será recolhido em outro envelope, separado dos questionários. Ainda assim, caso venha a sentir qualquer constrangimento ou desconforto diante das perguntas, a mesma será imediatamente interrompida. Apesar da existência de riscos, os benefícios oferecidos serão superiores. Os resultados dessa pesquisa possibilitarão o melhor entendimento sobre as fissuras labiopalatinas. Além disso, os resultados poderão ser disseminados não só para a comunidade científica, mas principalmente para a população em geral. A equipe da pesquisa estará permanentemente disponível para tirar as dúvidas, e mesmo após o encerramento do estudo, à sua disposição para quaisquer esclarecimentos ou orientações que você julgar necessários em relação ao tema abordado. Informamos que a sua participação é voluntária e, portanto, você não é obrigado a fornecer as informações e/ou colaborar com os pesquisadores, nem tampouco receberá nenhuma remuneração por isso. Você tem o direito de decidir não participar do estudo, ou de desistir de participar a qualquer momento, sem nenhum dano, prejuízo ou constrangimento. Todas as informações obtidas em relação a esse estudo permanecerão em absoluto sigilo, assegurando proteção de sua imagem, de sua privacidade e respeitando valores morais, culturais, religiosos, sociais e éticos. Os resultados dessa pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicações científicas, porém sua identidade não será divulgada nestas apresentações, nem serão utilizadas quaisquer imagens ou informações que permitam a sua identificação.

da pesquisa, pela aluna pesquisadora e pela pesquisadora responsável. Você receberá uma das vias e a outra ficará arquivada com os responsáveis pela pesquisa. em decorrência de sua contribuição neste estudo, será plenamente ressarcido. Ressaltamos ainda que, no caso de eventuais danos acarretados pela participação no presente estudo, você será indenizado.

especialmente aquelas contidas no item IV.3. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos ou sobre o desenvolvimento deste estudo você pode entrar em contato com a pesquisadora responsável, Bianca Golzio Navarro Cavalcante ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Após ter sido informado sobre a finalidade da pesquisa **“ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS”** e após ter lido os esclarecimentos prestados anteriormente no presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu _____ estou plenamente de acordo em participar do presente estudo, permitindo que os dados obtidos sejam utilizados para os fins da pesquisa, estando ciente que os resultados serão publicados para difusão e progresso do conhecimento científico e que minha identidade será preservada. Estou ciente também que receberei uma via deste documento. Por ser verdade, firmo o presente.

João Pessoa – PB ____/____/____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Impressão datiloscópica

Assinatura da Pesquisadora

Contato da pesquisadora responsável:

Bianca Golzio Navarro Cavalcante

Endereço: Serviço de Fissuras labiopalatinas, Hospital Universitário Lauro Wanderley, Campus I, UFPB, João Pessoa – PB

Telefone: (83) 993763495

e-mail da pesquisadora: biancagolzio@hotmail.com

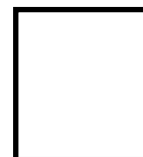
Contato do Comitê de Ética em Pesquisa do HULW

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley – 2º andar, Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa – PB

Telefone: (83) 3216.7964/ 3216.7955

Horário de Funcionamento: 8h às 12h e das 13h às 17h.

e-mail do Comitê: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



APÊNDICE IV
Termo de Assentimento (Crianças acima de 6 anos)

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia – PPGO

TERMO DE ASSENTIMENTO

João Pessoa, ____/____ de 201__

Você está sendo convidado/a para participar da pesquisa: **“ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS”**.

Seus pais permitiram que você participasse.

Com esta pesquisa queremos que colabore conosco permitindo o acesso às informações, radiografias e fotografias do seu prontuário.

As crianças que irão participar desta pesquisa têm de 0 a 19 anos de idade. Caso não queira participar da pesquisa, é um direito seu e não terá nenhum problema em recusar ou desistir.

A qualquer momento você pode nos procurar pelo telefone (83) 993763495 ou pelo e-mail biancagolzio@hotmail.com da pesquisadora Bianca Golzio Navarro Cavalcante. Ao persistirem as dúvidas sobre os seus direitos como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba pelo telefone (83) 32160-7964.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

Os resultados da pesquisa vão ser divulgados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar. Eu escrevi os telefones na parte de cima deste texto.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa **“ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS”**. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar com raiva se eu desistir. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

João Pessoa, ____ de _____ de _____.



Assinatura do menor ou impressão
dactiloscópica

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Contato com o Pesquisador (a) responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o (a) pesquisador (a) Bianca Golzio Navarro Cavalcante, Telefone: (83) 993763495 ou para o Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley -Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 2º andar. Cidade Universitária. Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58059-900.

E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com -Campus I– Fone: 32160-7964

ANEXOS

ANEXO I

E-MAIL DE SUBMISSÃO – The Cleft Palate-Craniofacial Journal

11-May-2020

Dear Prof. Vieira:

Your manuscript entitled "Talon Cusp Associates with MMP2 in a Cohort of Individuals Born with Cleft Lip and Palate" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in The Cleft Palate-Craniofacial Journal.

Your manuscript ID is CPCJ-20-0240.

You have listed the following individuals as authors of this manuscript:
Golzio, Bianca; Wanderley Lacerda, Rosa Helena; Assis, Ionária; Bezamat, Mariana; Modesto, Adriana; Vieira, Alexandre

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/cpcj> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cpcj>.

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID (<https://orcid.org/>). We encourage all authors and co-authors to use ORCID iDs during the peer review process. If you have not already logged in to your account on this journal's ScholarOne Manuscripts submission site in order to update your account information and provide your ORCID identifier, we recommend that you do so at this time by logging in and editing your account information. In the event that your manuscript is accepted, only ORCID iDs validated within your account prior to acceptance will be considered for publication alongside your name in the published paper as we cannot add ORCID iDs during the Production steps. If you do not already have an ORCID iD you may login to your ScholarOne account to create your unique identifier and automatically add it to your profile.

Thank you for submitting your manuscript to The Cleft Palate-Craniofacial Journal.

Sincerely,
Deepak Singh Rawat
The Cleft Palate-Craniofacial Journal
cpcj@sagepub.com

ANEXO II
ANUÊNCIA DO LOCAL DO ESTUDO

TERMO DE ANUÊNCIA

Declaro para os devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado “ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS”, sob a responsabilidade da pesquisadora Bianca Golzio Navarro Cavalcante, poderá ser desenvolvido no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba.

João Pessoa, 28 de Agosto de 2019.

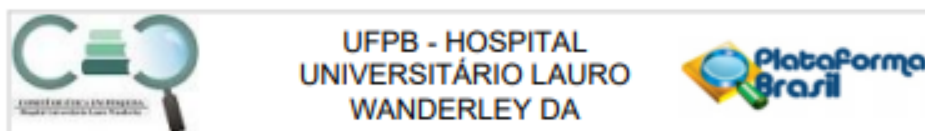


Dr. Paulo Germano Cavalcanti
Furtado

Chefe do Serviço de Fissuras labiopalatinas do
HULW/UFPB

ANEXO III

APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PREDITORES DOS RESULTADOS DOS TRATAMENTOS CIRÚRGICOS EM PACIENTES COM FISSURAS LABIOPALATINAS

Pesquisador: Rosa Helena Wanderley Lacerda

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13450819.6.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.445.829

Apresentação do Projeto:

Segunda versão do projeto de pesquisa de Rosa Lacerda, vinculado ao programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, sob orientação do Prof Alexandre Vieira.

Trata-se de um estudo do tipo coorte, observacional, com grupo controle, a ser desenvolvido no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley - UFPB.

A autora justifica a realização do estudo referindo que as fissuras labiopalatinas representam os defeitos congênitos que envolvem a face de maior prevalência no mundo e que, em função da sua complexidade, o tratamento envolve um longo período de tempo, inúmeros procedimentos e pode apresentar diferentes prognósticos, sendo importante o estudo de elementos preditores dos tratamentos a fim de permitir planejamentos adequados, individualizados, buscando eficácia e eficiência. Ante o exposto, apresenta hipótese o fato de que existem preditores para os resultados de tratamento cirúrgico em indivíduos com fissura labiopalatina.

O estudo será realizado no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do HULW-UFPB. O universo amostral será composto por 1.016 pacientes, sendo 508 portadores de fissuras labiais e/ou palatinas cadastrados no serviço de fissuras labiopalatinas do HULW – UFPB e 508 pacientes sem fissuras labiopalatina que serão recrutados no curso de Especialização em Ortodontia da Associação Brasileira de Odontologia- Seção PB. Para determinação do quantitativo da amostra a autora refere a realização de cálculo amostral.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedestica.hula2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.445.829

A coleta dos dados do grupo de pacientes fissurados será realizada em quatro etapas. (i) entrevista que consta de informações gerais de saúde, dados parentais, perfil sócio econômico e dos tratamentos realizados; (ii) exame da cavidade oral e exame odontológico; (iii) análise dos prontuários e exames complementares, além de coleta de saliva para obtenção de DNA genômico; e (iv) aqueles submetidos a cirurgias de enxerto ósseo, serão avaliados em seu pós-operatório para registro da sensibilidade à dor. Dos prontuários ortodônticos serão coletados imagens radiográficas e modelos de gesso e analisados quanto ao crescimento crânio facial, presença de má oclusões, alterações odontológicas e desenvolvimento dentário, além de serem avaliados pelos índices que determinam a qualidade dos resultados de tratamento, estes indivíduos serão reavaliados com intervalo mínimo de 5 anos da data do prontuário ortodôntico. As variáveis alterações dentárias, crescimento crânio-facial, índice oclusal, experiência de dor, características psicossociais e genéticas serão então cruzadas e, com o objetivo de definir aquelas que são eficientes preditoras dos resultados dos tratamentos, serão realizadas análises estatísticas convencionais e de regressão linear e logística ($p < 0,05$).

Quanto ao grupo controle, a autora refere apenas que avaliará os prontuários ortodônticos.

Refere como critérios de Inclusão: indivíduos (entre 16 meses e 65 anos de idade) com fissuras labial (palatina e labiopalatina) cadastrados no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do HULW-UFPB que comparecerem ao serviço durante o período da

coleta dos dados. Como critério de Exclusão, indivíduos com fissuras labial, palatina e labiopalatina com idade inferior a 16 dias e superior a 65 anos e aqueles que não concordarem em participar da pesquisa ou cujos responsáveis não concordem em assinar o termo de consentimento livre esclarecido serão excluídos do estudo.

A proposta de metodologia de análise dos dados prevê codificação das variáveis e cruzamento dos escores das variáveis dependentes entre os seus próprios scores e, em seguida, serão cruzadas com as variáveis independentes. Os dados serão processados em programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Science), na versão 20.0 e submetidos a análises estatísticas convencionais, incluindo modelos de regressão linear e logística considerando $p < 0,05$.

Vigência do Projeto: (junho de 2019 a fevereiro de 2020, conforme cronograma apresentado pela pesquisadora.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedestica.hulw2018@gmail.com

Página 22 de 27



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.445.829

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral do estudo é definir preditores para resultados de tratamento em pacientes com fissuras labiopalatinas.

Objetivos secundários:

- Verificar a associação da frequência das fissuras labial, palatina e labiopalatina ao sexo, local de nascimento e outros fatores de risco.
- Definir as alterações dentárias de número e de forma dentária nos indivíduos com fissuras labiais e/ou palatinas como preditores de resultados de tratamento
- Definir em indivíduos com fissuras labiopalatinas que apresentem outras malformações dentárias estruturais associadas se essas malformações são preditores de resultados de tratamento
- Avaliar o crescimento craniofacial como preditor de resultados de tratamento de indivíduos com fissuras labiopalatinas
- Avaliar os índices oclusais como preditores dos resultados cirúrgicos
- Avaliar a experiência de dor dos indivíduos submetidos às cirurgias de enxerto ósseo bem como os resultados de qualidade do enxerto ósseo alveolar como preditor dos resultados de tratamento
- Testar variação genética e perfil de metilação como preditores de resultados de tratamento das fissuras labiopalatinas.
- Avaliar, por meio do follow-up a eficiência dos preditores a longo prazo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A autora refere que esta pesquisa oferece riscos mínimos aos participantes. Serão respeitados valores morais, culturais, religiosos, sociais e éticos. Para divulgação dos resultados deste estudo, não serão fornecidas imagens, documentos ou qualquer tipo de informação que permita a identificação da identidade dos participantes do estudo. O principal risco para os pacientes desse trabalho é o fato de ter participado da pesquisa seja sabido por terceiros. Para minimizar essa perda do estado de anonimato, todas as informações relativas aos participantes desse trabalho serão guardadas em arquivos eletrônicos protegidos por senha em computadores também protegidos por senha localizados em escritórios de acesso restrito. Toda documentação em papel (documentação de termos de consentimento) será guardada em armários trancados à chave localizados em escritórios de acesso restrito. Acesso a toda documentação dessa pesquisa só será dado aos membros da equipe diretamente envolvidos nesse projeto e todas essas pessoas terão feito cursos relacionados à participação de humanos em pesquisa.

Os riscos relacionados ao exame da cavidade oral estariam relacionados à possível contaminação

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica.hulw2018@gmail.com

Página 03 de 07



ou injúrias aos tecidos moles, os mesmos serão minimizados, utilizando-se todos os cuidados e normas, equipamentos e insumos relativos à biossegurança, bem como será realizado por um único examinador, em ambiente adequado a este exame, sem que haja nenhum constrangimento ao indivíduo.

Os indivíduos participantes desta pesquisa, ou seus responsáveis, serão apresentados ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e aos indivíduos menores de idade, que já tenham condições de compreensão, será apresentado o termo de assentimento e serão esclarecidos sobre os aspectos éticos do estudo. Mediante concordância com as condições do estudo, os voluntários devem realizar impressão dactiloscópica ou assinar o TCLE e termo de assentimento.

Como benefícios refere que apesar dos participantes não se beneficiarem diretamente de sua participação nessa pesquisa, como benefício proporcionado pelo futuro estudo

pode-se citar a discussão científica e a divulgação de informações que resultarão em um melhor conhecimento sobre os preditores em fissuras labiopalatinas, podendo ser estabelecido tratamentos mais adequados e individualizados. A população será favorecida, visto que este estudo proporcionará profissionais melhor preparados para o enfrentamento de casos desta grandeza, propiciando atendimento e atenção integral

adequada aos pacientes com esta anomalia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta-se com instrução adequada do processo e possui valor científico para a comunidade em geral.

Em relação à avaliação do binômio risco-benefício, o projeto considera o grau de vulnerabilidade dos participantes considerando os procedimentos de coleta adotados que incluem exame de cavidade oral, moldagem e coleta de saliva.

O TCLE encontra-se bem escrito, com linguagem clara e definições do procedimentos de coleta, riscos e benefícios. O Termo de Assentimento permanece sem expressa de forma clara os procedimentos a que os participantes serão submetidos e os riscos referentes aos mesmos, bem como as medidas protetoras cabíveis. Seria importante prestar essas informações no mesmo.

A metodologia apresenta-se adequada aos objetivos pretendidos. As variáveis a serem estudadas também estão bem definidas.

Em relação à metodologia de análise dos dados, a mesma se encontra bem definida quantos aos procedimentos cabíveis.

Em relação à amostra, o projeto esclarece como o quantitativo de participantes foi definido e

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.445.829

esclarece as informações pertinentes acerca dos participantes, incluindo os critérios de inclusão e exclusão de ambos os grupos pesquisados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos de inclusão obrigatória na presente versão do protocolo de pesquisa foram apresentados, conforme recomendações contidas na Resolução CNS nº 466/2012 do MS, a saber: TCLE, Termo de Assentimento, Carta de Anuência, Folha de Rosto, Projeto de Pesquisa e Cronograma.

Recomendações:

Recomenda-se rever o termo de assentimento incluindo as informações sugeridas nos comentários realizados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que o(a) pesquisador(a) atendeu adequadamente às recomendações feitas por este Colegiado em parecer anterior a este, e que o estudo apresenta viabilidade ética e metodológica, estando em consonância com as diretrizes contidas na Resolução 466/2012, do CNS/MS, somos favoráveis ao desenvolvimento da investigação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em reunião ordinária realizada em 09 de julho de 2019.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES PARA O(S) PESQUISADORES

. O participante da pesquisa e/ou seu responsável legal deverá receber uma via do TCLE na íntegra, com assinatura do pesquisador responsável e do participante e/ou responsável legal. Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e com aposição de assinatura na última folha. O pesquisador deverá manter em sua guarda uma via do TCLE assinado pelo participante por cinco anos.

. O pesquisador deverá desenvolver a pesquisa conforme delineamento aprovado no protocolo de pesquisa e só descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade, pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem-estar

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedestica.hula2018@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.445.829

dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser apresentadas por meio de EMENDA ao CEP/HULW de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

O pesquisador deverá apresentar o Relatório PARCIAL E/OU FINAL ao CEP/HULW, por meio de NOTIFICAÇÃO online via Plataforma Brasil, para APRECIACÃO e OBTENÇÃO da Certidão Definitiva por este CEP. Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW torna-se co-responsável.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1349180.pdf	13/06/2019 19:09:57		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_tese.docx	13/06/2019 19:09:36	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoomite1.pdf	13/06/2019 19:07:29	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Outros	carta_resposta_cep.docx	13/06/2019 19:01:17	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	10/05/2019 09:43:23	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Outros	anuenciaabo.pdf	03/05/2019 19:15:34	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Outros	anuenciainstitucional.pdf	03/05/2019 19:13:09	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Outros	anuenciafiss_tese.pdf	03/05/2019 19:10:04	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Cronograma	cronograma_tese.docx	03/05/2019 19:09:45	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimento_tese.docx	03/05/2019 19:09:07	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.445.829

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 09 de Julho de 2019

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador(a))

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedestica.hulw2018@gmail.com

Página 57 de 57