

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

**AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO E SEVERIDADE DOS
DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE
DOS INCISIVOS MAXILARES EM INDIVÍDUOS
NASCIDOS COM FISSURA LABIAL E/OU
PALATINA**

Juliane Rolim de Lavôr

SAPIENTIA AEDIFICAT

2020

JULIANE ROLIM DE LAVÔR

**AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO E SEVERIDADE DOS DEFEITOS DE
DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE DOS INCISIVOS MAXILARES
EM INDIVÍDUOS NASCIDOS COM FISSURA LABIAL E/OU
PALATINA**

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

L414a Lavôr, Juliane Rolim de.

Avaliação da extensão e severidade dos defeitos de desenvolvimento do esmalte dos incisivos maxilares em indivíduos nascidos com fissura labial e/ou palatina / Juliane Rolim de Lavôr. - João Pessoa, 2020.

87 f. : il.

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

UFPB/BC

CDU 616.315-007.254(043)

JULIANE ROLIM DE LAVÔR

**AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO E SEVERIDADE DOS DEFEITOS DE
DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE DOS INCISIVOS MAXILARES
EM INDIVÍDUOS NASCIDOS COM FISSURA LABIAL E/OU
PALATINA**

Banca Examinadora



Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

Orientador – UFPB



Prof. Dr. Paulo Rogerio Ferreti Bonan

Examinador – UFPB



Prof. Dra. Juliana Feltrin de Souza Caparroz

Examinadora – UFPR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes do Setor de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley e a suas famílias, que gentilmente colaboraram e se dispuseram a participar desta pesquisa. Gostaria que cada página conseguisse retratar um pouco da coragem, determinação e força que aprendi com cada um de vocês. Que este estudo possa, ainda que de uma pequena forma, contribuir para uma qualidade de vida melhor de indivíduos de coração grande!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ser a minha força diária, por ter permitido que todos os caminhos me trouxessem até este momento, por cuidar de mim e acalmar meu coração nos momentos de ansiedade.

Ao **Professor Alexandre Vieira**, pela paciência e dedicação. Por ter me mostrado o verdadeiro significado do que é fazer ciência e do que realmente tem relevância. Por ter me ensinado que o mais importante não é resolver o problema, mas descobri-lo.

Aos **professores da UFPB**, pelos ensinamentos ao longo dessa jornada, em especial aos professores **Ramon Salazar, Ricardo Castro, Paulo Bonan e Fábio Sampaio**, vocês são fonte de inspiração para a profissional que almejo ser.

A professora **Andressa Feitosa**, que me ensinou boa parte do que sei hoje. Por continuar tão presente mesmo após a graduação. Por ser esse exemplo extraordinário de mulher, pessoa, orientadora, amiga, mãe. Por ter me dado a oportunidade de realizar o estágio docência de maneira tão enriquecedora. Serei sempre sua eterna pupila.

A todos que fazem parte do Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB. A dedicação e alegria de cada um de vocês me inspiram! Sem dúvidas, o setor é um lugar abençoado. Obrigada por me acolherem e por fazerem tão bem esse trabalho tão lindo. Em especial à **Rosa Helena**, sou extremamente grata a Deus por ter colocado esse anjo em minha vida. Tu foste luz durante minha caminhada, assim como és para todos os teus pacientes. Obrigada por todo apoio, dedicação, cuidado e amor. Por ter acreditado em mim quando eu mesma não acreditei. Por ter sido meu porto seguro e a maior inspiração que eu poderia ter. Impossível não se apaixonar por esses pacientes e por você!

Aos meus companheiros de pesquisa **Bianca, Ionária e Júnior**, por toda a ajuda, carinho e disponibilidade, essa trajetória não teria sido a mesma sem vocês. A todos os integrantes do **Vieira Lab Pittsburgh** que infelizmente não tive a oportunidade de conhecer, mas que também contribuíram com o processo de genotipagem.

Aos meus pais, **Débora** e **Quintino**, e a minha avó **Julieta**, por todo o apoio que tive para chegar até aqui. Por terem fornecido todos os meios e recursos para a minha educação, apesar das limitações. Por terem me ajudado a construir a mulher que sou hoje e da qual me orgulho. Eu nada seria sem vocês. E aos meus irmãos **Felipe** e **Rafael**, que trazem leveza e alegria para minha vida e durante toda essa trajetória.

Ao meu amor **Felipe** por toda compreensão, apoio e paciência. Por ter sido consolo nos momentos difíceis, por ter me dado colo quando foi difícil conciliar o trabalho e o mestrado, por vibrar com cada pequena vitória. Por acreditar tanto em minha capacidade que finalmente consegui enxergá-la em mim. Obrigada!

"Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós."

(Trecho de "O Pequeno Príncipe", Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Fissuras de lábio e/ou palato (FLP) constituem a malformação congênita mais frequente da cabeça e pescoço, com os indivíduos fissurados exibindo mais chances de apresentar anormalidades como os defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE). A metaloproteinase 2 da matriz (*MMP2*) é uma proteína ligada à membrana celular com capacidade de degradação do colágeno e desempenha papéis importantes na formação e mineralização dos dentes. Os objetivos deste estudo foram de avaliar a frequência, tipo de defeito, localização, severidade e extensão dos DDE encontrados nos incisivos maxilares permanentes para grupos de indivíduos nascidos com FLP, bem como compreender sua relação com o lado da fenda. Além disso, este estudo aborda a hipótese de que DDE podem ser influenciados pela variação nos genes *MMP2* (rs9923304). Amostras de saliva, história clínica e fotografias intraorais foram obtidas de 233 pacientes (percentis de idade 9, 12, 15) em tratamento no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba. As imagens digitais foram examinadas pelo mesmo avaliador por meio do Índice DDE Modificado (k intraexaminador = 0,88), e então carregadas no software Image Tool, onde duas medições nos incisivos maxilares foram realizadas: proporção da área total da superfície vestibular (A_{sup}) e área do defeito do esmalte (A_{def}), obtendo-se a porcentagem da área da superfície afetada ($\%A_{afet}$) (ICC = 0,99). DNA genômico foi extraído de amostras de saliva de 124 indivíduos. A genotipagem foi realizada usando o método TaqMan para um marcador em *MMP2* (rs9923304). As análises estatísticas foram realizadas pelo software The Jamovi Project. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado, seguido do teste t de Student e do teste de Mann-Whitney. Foram realizados os testes qui-quadrado e exato de Fisher, assim como os cálculos de odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC) para determinar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e associações avaliativas entre DDE e fissuras ($\alpha = 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas na prevalência e extensão dos DDE entre homens e mulheres nascidos com FLP ($p = 0,06$). A frequência de indivíduos apresentando incisivos com DDE, em relação ao lado fissurado e não fissurado, foi estatisticamente diferente ($p < 0,001$; OR = 7,15; IC: 4,674 - 10,942). No entanto, as médias para a $\%A_{afet}$ foram semelhantes ($p = 0,18$). As maiores médias da $\%A_{afet}$ foram

encontradas em indivíduos com fissura bilateral labial com ou sem fenda palatina (FBLP) quando comparados aos indivíduos com fissura unilateral labial com ou sem fenda palatina (FULP), para os incisivos dentro (DA) e fora da área da fissura (FA) ($p < 0,001$). Independentemente do lado da fissura, FBLP exibiu 7,85 vezes mais chances de ter mais de um terço da superfície dentária afetada, apresentando DDE mais presentes nos três terços (FA: $p < 0,001$) (DA: $p = 0,03$), bem como maior frequência de mais de um tipo de DDE no mesmo incisivo (FA: $p < 0,001$) (DA: $p = 0,008$), enquanto indivíduos com FULP exibiram DDE isolados e restritos a apenas um terço, mais comumente o terço incisal (FA: $p = 0,009$) (DA: $p = 0,001$), com maior prevalência de defeitos mais brandos, como as opacidades demarcadas ($p = 0,02$) e difusas ($p = 0,008$). Quanto a análise genética, maior frequência do alelo T, menos comum, foi observada no grupo de indivíduos com FLP que apresentava todos os incisivos afetados ou pelo menos dois incisivos com $\%A_{afet}$ maior que 20% ($p = 0,02$). Nossos resultados sugerem que a *MMP2* pode ter um papel importante nos casos que apresentaram DDE e a genotipagem rs9923304 poderia servir como base para uma abordagem genômica com o intuito de definir riscos para indivíduos nascidos com FLP. A frequência e a severidade dos DDE estão fortemente relacionadas ao fenótipo da FLP, uma vez que os maiores valores foram encontrados para a FBLP. No entanto, a extensão desses defeitos não depende de sua relação com o lado da fenda.

Palavras-chave: fissura labial, fissura palatina, hipoplasia do esmalte dentário, anormalidade dentária.

ABSTRACT

Cleft lip with or without cleft palate (CLP) is considered the most frequent congenital malformations of the head and neck, with cleft individuals exhibiting more chances of presenting abnormalities such as developmental defects of enamel (DDE). Matrix metalloproteinase 2 (*MMP2*) is a membrane-bound protein with collagen-degrading ability and have important roles in tooth formation and mineralization. This study aimed to evaluate the frequency, type of enamel defect, location, severity and extent of DDE found in the permanent maxillary incisors for groups of individuals born with CLP, as well as understanding their relationship with the cleft side. Besides, this study addresses the hypothesis that DDE can be influenced by variation in the *MMP2* genes (rs9923304). Saliva samples, clinical history and intraoral photographs were obtained from 233 patients (age percentiles 9, 12, 15) under treatment at the Cleft Lip and Palate Service of the University Hospital Lauro Wanderley at the Federal University of Paraíba. Digital images were examined by the same evaluator using the Modified DDE Index (k intraexaminer = 0.88), and then loaded into the Image Tool software, where two measurements in the maxillary incisors were made: the proportion of the total area of the buccal surface (SA) and the area of enamel defect (DA), obtaining the percentage of the surface area affected (%SAD) (ICC=0.99). Genomic DNA was extracted from saliva samples from 124 participants. Genotyping was carried out using TaqMan chemistry for one marker in *MMP2* (rs9923304). Statistical analyses were performed by The Jamovi Project software. The Shapiro-Wilk test was applied, followed by the Student's t-test and the Mann-Whitney test. Chi-square and Fisher's exact tests, and odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) calculations were used to determine Hardy-Weinberg equilibrium and evaluative associations between DDE and clefts ($\alpha = 0.05$). No significant differences in the prevalence and extent of DDE were found between male and female individuals born with CLP ($p=0.06$). The frequency of individuals presenting incisors with DDE, in relation to the cleft and non-cleft side, was statistically different ($p < 0.001$; OR = 7.15, CI: 4.674 - 10.942). However, the averages of %SAD were similar ($p = 0.18$). The highest means of the %SAD were found in individuals with bilateral cleft lip with or without cleft palate (BCLP) when compared to individuals with unilateral cleft lip with or without cleft palate (UCLP), for the incisors inside (IA) and outside

the cleft area (OA) ($p < 0.001$). Regardless of the cleft side, BCLP was 7.85 times more likely to have more than one third of the tooth surface affected, showing more frequently DDE in the three thirds (OA: $p < 0.001$) (IA: $p = 0.03$), as well as a higher frequency of more than one type of DDE (OA: $p < 0.001$) (IA: $p = 0.008$), whereas in UCLP, DDE were isolated and restricted to only one third, more frequently, the incisal third (OA: $p = 0.009$) (IA: $p = 0.001$), with greater frequency of milder defects, such as demarcated ($p = 0.02$) and diffuse ($p = 0.008$) opacities. A higher frequency of the T allele, less common, was observed in the group of CLP individuals who had all the affected incisors or at least two incisors with %SAD greater than 20% ($p = 0.02$). Our results suggest that *MMP2* may have a role in the cases that presented DDE and genotyping rs9923304 could serve as the basis for a genomic approach to define risks for individuals born with CLP. Frequency and severity of DDE is strongly related to the CLP phenotype, since the highest values were found for BCLP. However, the extent of the DDE is independent of its relationship with the side of the cleft.

Keywords: cleft lip, cleft palate, dental enamel hypoplasia, dental abnormality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos defeitos de acordo com o Índice DDE Modificado com uma nova alteração.....	p.22
Tabela 2. Detalhes do gene e do polimorfismo de nucleotídeo único investigado nesse estudo.....	p.23
Tabela 3. Valores do Coeficiente de Correlação Intraclass (ICC) para cada elemento.....	p.25
Tabela 4. Interpretação dos valores do ICC.....	p.25
Tabela 5. Médias e medianas do percentual da superfície afetada dos elementos dentro e fora da área, para todos os tipos de fissuras analisados.....	p.26
Tabela 6. Frequência de elementos dentários com e sem a presença de defeitos de desenvolvimento do esmalte, por indivíduo, dentro e fora da área da fissura.....	p.28
Tabela 7. Frequência de elementos dentários afetados por tipo de fissura em relação à localização do defeito na superfície, dentro e fora da área (n= número de indivíduos avaliados).....	p.29
Tabela 8. Frequência de elementos dentários afetados por tipo de fissura em relação ao código do defeito, fora da área (n= número de pacientes avaliados).....	p.30
Tabela 9. Frequência de alelos C e T encontrados nos indivíduos alocados em G1 e G2.....	p.31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\%A_{afet}$	Porcentagem da área da superfície afetada
A_{def}	Área do defeito do esmalte
A_{sup}	Área total da superfície vestibular
<i>ARHGAP29</i>	<i>Rho Gtpase Activating Protein 29</i>
DA	Dentro da área da fissura
DDE	Defeitos de desenvolvimento do esmalte
FA	Fora da área da fissura
FL	Fissura labial
FLP	Fissura de lábio e/ou palato
FP	Fissura palatina
FBLP	Fissura bilateral labial com ou sem fenda palatina
FULP	Fissura unilateral labial com ou sem fenda palatina
<i>FGF8</i>	<i>Fibroblast Growth Factor 8</i>
<i>FGFR1</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
<i>FGFR2</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i>
<i>GABRB3</i>	<i>Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Beta3</i>
<i>IRF6</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
<i>MAFB</i>	<i>MAF Bzip Transcription Factor B</i>
<i>MMPs</i>	<i>Metaloproteinases da matriz</i>
<i>MMP2</i>	<i>Metaloproteinase 2 da matriz</i>
<i>MSX1</i>	<i>Msh Homeobox1</i>
<i>MSX2</i>	<i>Msh Homeobox2</i>
<i>MTHFR</i>	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i>
<i>PAX7</i>	<i>Paired Box 7</i>
<i>PDGFC</i>	<i>Platelet-Derived Growth Factor C</i>
<i>PVRL1</i>	<i>Poliovirus Receptor-Related 1</i>
<i>SATB2</i>	<i>Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2</i>
<i>TBX22</i>	<i>T-Box Transcription Factor 22</i>
<i>TGFB3</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta 3</i>

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.CAPÍTULO 1	17
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	45
4. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS*	49
APÊNDICE I	56
APÊNDICE II	59
APÊNDICE III	60
APÊNDICE IV	62
APÊNDICE V	63
ANEXO I	65
ANEXO II	66
ANEXO III	75
ANEXO IV	78
ANEXO V	79

1. INTRODUÇÃO

Fissuras de lábio e/ou palato (FLP) são um grupo de malformações estruturais em torno da cavidade oral e podem se estender na face resultando em deformidades orais e faciais, originadas da não junção ou junção incompleta dos processos nasais medianos e maxilares, sendo representada clinicamente pelo não fechamento do lábio, palato ou ambos (1,2). São consideradas as malformações congênitas mais freqüentes da cabeça e pescoço (3), exibindo implicações médicas, psicológicas, sociais e financeiras significativas nos indivíduos e famílias afetadas.

Apresenta uma etiologia complexa, com fatores genéticos, ambientais e suas interações desempenhando um importante papel (3,4). A média global da prevalência de fissuras orofaciais é de aproximadamente 1 em 700 nascidos vivos, com considerável variação étnica e geográfica (3,5,6). No Brasil, a prevalência das fissuras é em torno de 1.54 a cada 1.000 nascimentos vivos (7,8). As principais categorias são fissura labial (FL) com ou sem fissura de palato (FLP) e a fissura palatina isolada (FP), também designadas como pré, trans e pós-forame incisivo, respectivamente, segundo a classificação de Spina et al. (9). Podem se apresentar isoladas ou como parte de uma síndrome, podendo ter outras anormalidades associadas (3).

A maior parte das deformidades craniofaciais congênitas ocorre durante a 5ª a 12ª semana de desenvolvimento, sendo o período embrionário (da 3ª a 9ª semana) o mais sensível, durante o qual os teratógenos podem ser particularmente prejudiciais, especialmente para os distúrbios morfológicos da linha média, como a fissura labial e palatina, alterando o complexo processo de morfogênese dos palatos primário e secundário, em direção a um limiar de anormalidade no qual a fenda pode ocorrer (10). Diversos fatores ambientais foram associados à etiologia das fissuras (11). Tabagismo materno ativo ou passivo durante a gestação (12-14) e baixa ingestão de ácido fólico são os dois principais fatores sob investigação que parecem modificar os riscos genéticos para as FLP (5). As estimativas sugerem que 3 a 14 genes contribuem para a ocorrência de fissura de lábio e palato (5,15), evidenciando um modelo poligênico,

com vários genes de pequenos efeitos sendo o modo de herança mais comumente relacionado às FLP isoladas (16).

A distribuição geográfica das fissuras orofaciais varia significativamente em todo o mundo (4,6). Segundo dados do International Perinatal Database of Typical Oral Clefts Working Group (17), há pouca ou nenhuma informação sobre a frequência de fissuras orofaciais para muitas partes do globo, sendo, portanto, de suma importância a realização de estudos observacionais em diferentes áreas geográficas e populações. A literatura reporta uma maior prevalência das FLP em comparação as FP (18,19), sendo as FL e FLP mais frequentes no sexo masculino (2:1), enquanto as FP são mais comuns no gênero feminino (masculino/feminino, 0,5:1) (2,20-22).

No geral, 15% de todas as fissuras orais são sindrômicas, com mais de 300 síndromes reconhecidas. Dos 85% restantes dos indivíduos com fissura não-sindrômica, 50% têm outras anomalias dentárias menos bem definidas, onde observou-se que a FP tem a maior prevalência de deformidades associadas, seguida pela FLP, e a FL, a menor (6,23).

Acredita-se que formas isoladas de FLP são freqüentemente acompanhadas por outras pequenas anomalias dentárias, com indivíduos fissurados exibindo pelo menos quatro vezes mais chances de apresentar anormalidades como agenesias, dentes supranumerários (24,25), defeitos do esmalte e/ou microdontia (26,27).

Existe uma lacuna na literatura em relação a pesquisas que correlacionem o tipo de fissura com a severidade dos defeitos encontrados e que investiguem mais profundamente essa associação, visto que a gravidade dessas anomalias parece estar diretamente relacionada à gravidade da fissura (24,28,29), sugerindo que o desenvolvimento embriológico do lábio, palato e dente é controlado por fatores genéticos comuns (5). Muitos estudos atribuem o fenótipo das fissuras orais simplesmente ao status 'afetado' ou 'não afetado', enquanto as evidências cada vez mais indicam que outros marcadores clínicos, como a presença de anomalias dentárias, devem ser considerados, definindo fenótipos mais amplos que ajudem a desvendar a base genética da doença (24,30).

Indivíduos nascidos com fissuras apresentam maior frequência de defeitos de desenvolvimento do esmalte dentário (DDE) (25,26,28). Durante a amelogenese, os ameloblastos são sensíveis às mudanças do ambiente, sendo

suscetíveis a vários fatores externos que afetam o desenvolvimento da matriz orgânica e sua calcificação (31). A fase de duração desta perturbação, juntamente com sua severidade, bem como em que fase da formação da coroa ocorreu, determina o aparecimento dos tipos mais frequentes de DDE, tanto na dentição decídua quanto na permanente: hipoplasia – um defeito quantitativo – e/ou hipomineralização, também conhecida por opacidade, um defeito qualitativo, que pode ser demarcada ou difusa (32-34).

A opacidade demarcada se caracteriza por uma alteração na translucidez do esmalte, variável em grau. O esmalte defeituoso é de espessura normal, com uma superfície friável e porosa, exibindo um limite claro com o esmalte normal adjacente e pode ser branco, creme, amarelo ou marrom (32). Já a opacidade difusa apresenta coloração branca e não há limites claros com o esmalte normal adjacente (35). A hipoplasia é caracterizada por uma falha na fase de secreção da matriz do esmalte, produzindo uma espessura reduzida deste, com sua ausência podendo ser parcial ou total, levando a exposição da dentina. A extensão e o contorno do defeito também podem variar, ocorrendo na forma de cavidades, sulcos ou áreas irregulares maiores de esmalte ausente (26,35,36).

A perda da estrutura do esmalte também pode ocorrer pós-erupção, por atrito ou trauma, como resultado de esmalte hipomineralizado ou, alternativamente, por fratura de áreas sem suporte do esmalte, dificultando o diagnóstico (32). A aparência clínica das fraturas pós-eruptivas de esmalte pode confundir-se com as hipoplasias, no entanto, suas bordas são irregulares (diferindo das hipoplasias, as quais são lisas) e frequentemente localizadas em áreas mais susceptíveis à fratura, como ponta de cúspides e incisais.

O esmalte dentário hipomineralizado é menos duro e mais poroso do que o esmalte normal, facilitando o acúmulo de placa e o desenvolvimento da cárie dentária (37). Portanto, DDE representam um indicador de risco para esta e outras condições – como a erosão dentária – em crianças (33,34).

Em ambas as dentições, os DDE são encontrados com frequência nos incisivos superiores (26,36), onde observou-se que os dentes adjacentes à fenda apresentam alterações mais pronunciadas em comparação ao lado não fissurado (26,38). Nestes estudos, acredita-se que isso provavelmente ocorra devido à estreita correlação cronológica entre o desenvolvimento da fissura (5ª a 12ª semana embrionária) e o desenvolvimento dentário (6ª a 20ª semana embrionária)

(28,36). Outra hipótese é de que infecções e cirurgia corretiva para lábio e palato podem contribuir para o surgimento desses defeitos na área da fissura (39), enquanto anomalias fora da área afetada estariam possivelmente mais relacionadas a fatores genéticos e regulação de genes (26,27). O presente estudo sustenta a hipótese de que os fatores etiológicos mais viáveis para o surgimento dos DDE podem ser os mesmos da fissura (26,28,40) representando uma manifestação incompleta de seu processo (36).

A amelogênese é um processo biológico complexo onde proteínas, proteinases e minerais interagem para formar o esmalte, sendo a amelogenina a proteína mais abundante (42). Durante o estágio de maturação, a amelogenina torna-se cada vez mais hidrolisada por proteases, onde esses produtos menores resultantes da clivagem serão em quase sua totalidade, eliminados da camada de esmalte, acreditando-se que regulem o crescimento e a orientação dos cristais de hidroxiapatita (42,43).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são uma classe de marcadores genéticos, sendo os tipos mais comuns de variantes genéticas, fazendo-se importantes em testes de associação para suscetibilidade ou resistência a doenças, devido a sua influência na regulação da transcrição gênica ou alteração da atividade protéica (41), possibilitando verificar a contribuição de uma função alterada de um gene específico para a vulnerabilidade e ocorrência das FLP e DDE.

As metaloproteinases da matriz (*MMPs*) constituem uma família de endopeptidases dependentes de zinco, secretadas e associadas à membrana celular, sendo as principais reguladoras da renovação da matriz extracelular por serem capazes de degradar seletivamente um amplo espectro de proteínas (41,44). A metaloproteinase 2 da matriz (*MMP2*), também conhecida como gelatinase A, degrada principalmente o colágeno tipo IV e é expressa constitutivamente pela maioria das células do tecido conjuntivo, incluindo células endoteliais, osteoblastos, fibroblastos e mioblastos (41,45). Nos dentes, o colágeno tipo IV está localizado ao longo da junção amelodentinária (46), desempenhando papéis importantes na formação e mineralização dos dentes (42,43,47-49).

A expressão alterada e os níveis de atividade de *MMP2* são conhecidos por estarem associados a estados patológicos, especialmente aqueles que envolvem

a remodelação tecidual (45). De acordo com um levantamento realizado pelo estudo de Vieira et al. (45), mutações inativadoras do *MMP2* levam a problemas do tecido conjuntivo subjacente, como ocorre na síndrome de Torg-Winchester (50), osteólise multicêntrica e artrite (51), além de estarem associadas a formação de queloides (52), degradação do endométrio, regulação vascular e respostas inflamatórias (53).

Polimorfismos genéticos em genes responsáveis pela formação do esmalte podem contribuir para alterações estruturais que podem levar ao aumento de sua porosidade, presença de proteínas inibidoras dos cristais de hidroxiapatita e consequente diminuição de seu conteúdo mineral (44,54,55). Alguns estudos têm demonstrado a expressão da *MMP2* durante a formação dentária (42,43,47). No entanto, nenhum estudo investigou polimorfismos do *MMP2* em defeitos do esmalte.

Este gene foi estudado em outras condições bucais: formação de lesão periapical (56); fracasso de restaurações de resina composta (45); presença nos tecidos periodontais e sua relação com a ingestão de flúor (57); e com a fluorose dentária (49).

Há poucos estudos disponíveis na literatura que comparam a prevalência dos DDE entre os elementos dentários dentro e fora da área da fissura. No entanto, nenhum deles foi capaz de medir a extensão e, portanto, severidade desses defeitos, com associações inéditas entre os DDE e os diferentes tipos de fissuras. Assim, o presente trabalho tem como objetivo investigar as características dos DDE em indivíduos nascidos com fissuras orais, bem como compreender sua relação com o lado da fissura. Nós avaliamos a frequência, tipo de defeito, localização, caráter das mudanças estruturais na morfologia dentária, extensão e severidade dos DDE encontrados nos incisivos maxilares para grupos específicos de indivíduos nascidos com fissuras. A hipótese é de que será possível identificar associações preferenciais entre determinados tipos de fissuras e certos DDE e de que esses defeitos podem estar associados a polimorfismo no gene *MMP2* (*rs9923304*).

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir foi aceito e publicado no periódico *PLoS One*.

Maxillary Incisor Enamel Defects in Individuals Born with Cleft Lip/Palate

Juliane R. Lavôr¹, Rosa Helena W. Lacerda¹, Adriana Modesto², Alexandre R. Vieira^{1,2}

¹Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal da Paraíba

²Departments of Pediatric Dentistry and Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh

Corresponding Author: Alexandre R. Vieira, arv11@pitt.edu

Author Contributions

Juliane R. Lavôr:

Data curation

Formal analysis

Investigation

Writing – original draft

Rosa Helena W. Lacerda:

Data curation

Funding acquisition

Project administration

Validation

Writing – review & editing

Adriana Modesto:

Conceptualization

Funding acquisition

Investigation

Methodology

Resources

Writing – review & editing

Alexandre R. Vieira:

Conceptualization

Funding acquisition

Investigation

Methodology

Project administration

Resources

Supervision
Writing – review & editing

Competing Interests:

The authors have declared that no competing interests exist.

Financial Disclosure:

The author(s) received no specific funding for this work.

Abstract

Cleft lip with or without cleft palate (CLP) is considered the most frequent congenital malformations of the head and neck, with cleft individuals exhibiting more chances of presenting abnormalities such as developmental defects of enamel (DDE). Matrix metalloproteinase 2 (*MMP2*) is a membrane-bound protein with collagen-degrading ability and has important roles in tooth formation and mineralization. The aim of this study was to evaluate the frequency, location, severity and extent of DDE found in the maxillary incisors for groups of individuals born with CLP, as well as understanding their relationship with the cleft side. Besides, this study addresses the hypothesis that DDE can be influenced by variation in the *MMP2* genes (rs9923304). Saliva samples, clinical history, intraoral photographs and panoramic radiographs were obtained from 233 patients under treatment at the Cleft Lip and Palate Service of the University Hospital Lauro Wanderley at the Federal University of Paraíba. Digital images were examined by the same evaluator using the Classification of Defects According to the Modified DDE Index ($k = 0.88$), and then loaded into the Image Tool software, where two measurements were made: the proportion of the total area of the buccal surface (SA) and the area of the DDE (DA), obtaining the percentage of the surface area affected (%SAD) (ICC=0.99). Genomic DNA was extracted from saliva samples from 124 participants. Genotyping was carried out using TaqMan chemistry for one marker in *MMP2* (rs9923304). Statistical analyses were performed by The Jamovi Project software. The Shapiro-Wilk test was applied, followed by the Student's t-test and the Mann-Whitney test. Chi-square and Fisher's exact tests, and odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) calculations were used to determine Hardy-Weinberg equilibrium ($\alpha = 0.05$). No significant differences in the prevalence and extent of enamel defects were found between male and female individuals born with CLP ($p=0.058256$). The frequency of individuals presenting teeth with DDE, in relation to the cleft and non-cleft side, was statistically different ($p < 0.001$; OR = 7.15, CI: 4.674 > 7.151 > 10.942). However, the averages of %SAD were similar ($p = 0.18$). The highest means of the %SAD were found in individuals with bilateral cleft lip with or without cleft palate (BCLP) when compared to individuals with unilateral cleft lip with or without cleft palate (UCLP), for the teeth inside (IA) and outside the cleft area (OA) ($p < 0.001$). Regardless of the cleft side, individuals with BCLP were 7.85 times more likely to have more than one third of the tooth surface affected, showing more frequently defects in the three thirds (OA: $p < 0.001$) (IA: $p = 0.03$), as well as a higher frequency of more than one type of defect (OA: $p=0.000358$) (IA: $p=0.008016$), whereas in UCLP, defects were isolated and restricted to only one third, more frequently, the incisal third (OA: $p = 0.009$) (IA: $p = 0.001$), with greater frequency of milder defects, such as demarcated ($p = 0.02$) and diffuse ($p = 0.008$) opacities. A higher frequency of the T allele, less common, was observed in the group of CLP individuals who had all the affected teeth or at least two teeth with %SAD greater than 20% ($p = 0.019843$).

Our results suggest that *MMP2* may have a role in the cases that presented DDE and genotyping rs9923304 could serve as the basis for a genomic approach to define risks for individuals born with CLP. Frequency and severity of DDE is strongly related to the CLP phenotype, since the highest values were found for BCLP. However, the extent of the DDE is independent of its relationship with the side of the cleft.

Introduction

Cleft lip and palate are a group of structural malformations around the oral cavity and can extend on to the face resulting in oral and facial deformities, being considered the most frequent congenital malformations of the head and neck [1]. It has a complex etiology, with genetic and environmental factors and their interactions playing an important role [1,2], with an average birth prevalence of 1/700 [1,3,4]. By tradition, oral clefts have been referred to as cleft lip with or without cleft palate (CLP) and cleft palate only (CPO), due to differences in embryology [1].

Overall, 15% of all oral clefts are syndromic, and they are part of more than 300 recognized syndromes. Of the remaining 85% of individuals with non-syndromic cleft, 50% have other less well-defined anomalies [4,5], with individuals born with clefts exhibiting at least four times more chances of presenting abnormalities such as agenesis, supernumerary teeth [6,7], enamel defects and/or microdontia [8,9].

The severity of the dental anomalies seems to be directly related to the severity of the cleft [6,10,11], suggesting that the embryological development of the lip, palate and tooth is controlled by common genetic factors [3]. There is, however, a gap in the knowledge regarding the reason why there is a correlation between the type of cleft and the severity of the dental abnormalities found. Many studies attribute the phenotype of oral clefts simply to 'affected' or 'unaffected' status, while evidence increasingly indicates that other clinical markers, such as the presence of dental anomalies, should be considered, defining broader phenotypes that help to unravel the genetic basis of the condition [6,12].

Individuals born with oral clefts have a higher frequency of developmental defects of enamel (DDE) [7,8,10], faulty or deficient formations of enamel on primary and permanent teeth during tooth development, resulting in hypoplasia, a quantitative defect, and/or hypomineralisation, namely opacity, a qualitative defect characterized by abnormal enamel translucency [13-15].

The hypomineralized enamel is softer and more porous, facilitating the accumulation of plaque and the development of dental caries [16]. Therefore, DDE represent a risk indicator for dental caries and erosive tooth wear in children [14,15].

In both dentitions, enamel defects are found more frequently in the maxillary incisors [7,8,10]. It is believed that the teeth adjacent to the cleft show more pronounced changes, in comparison with the nonclefted side [8,17]. There are few studies available in the literature that compared the prevalence of enamel defects between the affected and unaffected sides of individuals born with CLP [8,17-19]. However, none of them were able to measure the extent and, therefore, the severity of these defects.

The matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a family of secreted and membrane-associated zinc-dependent endopeptidases that are the major regulators of extracellular matrix turnover and are capable of selectively degrading a wide spectrum of both extracellular matrix and non-matrix proteins [20,21]. Matrix metalloproteinase 2, also known as gelatinase A, is a membrane-bound protein with collagen-degrading ability [20,22] and has important roles in tooth formation and mineralization [23-27]. Genetic polymorphisms in enamel formation genes could contribute to structural alterations that could lead to enamel porosity, presence of enamel crystal inhibitory proteins and decreased mineral content [21,28,29]. Some studies have demonstrated the expression of MMP2 during enamel formation [23-25]. However, no study has investigated polymorphisms in *MMP2* in enamel defects.

Thus, the aim of this study was to investigate the characteristics of enamel defects in individuals born with oral clefts. We evaluated the frequency, location, character of structural changes in dental morphology, and severity and extent of enamel defects found in the maxillary incisors for groups of individuals born with CLP, as well as attempted to understand their relationship with the cleft side. Besides, this study addressed the hypothesis that DDE can be influenced by variation in the *MMP2*.

Materials and Methods

This is a cohort cross-sectional study approved by the Research Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley of the Federal University of Paraíba [3.445.829]. All 233 individuals born with CLP without any other structural abnormalities and with suitable materials were evaluated. The sample had a mean age of 13.13 years (ranging from 6 to 35 years-old). Written informed consent documents were obtained from all subjects. We followed the STREGA guidelines for this study. Photographic material was obtained prior to orthodontic treatment and several years after surgical lip repair.

Individual saliva samples, clinical history, intraoral photographs and panoramic radiographs were obtained from patients under treatment at the Cleft Lip and Palate Service of the University Hospital Lauro Wanderley at the Federal University of Paraíba. The exclusion criteria included labial surfaces of permanent central and lateral incisors not accessible for proper examination (presence of restorations, orthodontic appliances or crowns) or individuals with low quality intraoral photographs.

The methodology of the study was divided into five stages:

Stage 1 – Intraoral photographs

Standardized photographs were taken by an experienced specialist (R.H.W.L.), with the patient sitting in a dental chair and leaning back to avoid movement during focus and photography. After an initial examination, the surfaces of the teeth were cleaned and dried and the appearance of the enamel was recorded using a digital camera (Canon EOS Rebel T5i, Ohta-ku, Tokyo, Japan), with standard lens (Canon EF 100 mm macro lens) and settings (ISO 6400, speed 1/125 and aperture F/25), always under the same flash (Macro Ring Flash Sigma EM-140 DG) and natural lighting conditions. Cheeks and lips were retracted using T-Shape intraoral cheek lip retractor, which was sterilized prior to each use. The photographs were taken focusing on the center of the four permanent incisors [30]. Two photographs with side views were also taken, each showing the lateral incisors and canines on each side of the arch [31], which were used when doubts arose when analyzing the frontal photograph. Each photo was evaluated for acceptability and quality by the photographer (R.H.W.L.). When a photograph was not acceptable because of being out of focus, it was repeated.

Stage 2 – Determination of cleft and DDE phenotypes

The determination of the cleft phenotype was obtained through information from the medical record. It was based on the extent and laterality of the cleft through a single examiner with more than 10 years of experience in examining tooth surfaces of children born with oral clefts (R.H.W.L.). To eliminate inter-examiner differences, existing intraoral photographs of all participants were examined by one single evaluator (J.R.L.), after being calibrated by an experienced specialist (R.H.W.L.), using the Classification of Defects According to the Modified DDE Index based on the Fédération Dentaire Internationale recommendation [32]. Evaluation of intraexaminer agreement by the kappa test revealed a

value of 0.88. It allowed classification of participants to any of the following diagnostic subgroups: (0) normal; (1) demarcated opacity; (2) diffuse opacity; (3) hypoplasia; (4) other defects; and its combinations: (5) demarcated and diffuse; (6) demarcated and hypoplasia; (7) diffuse and hypoplasia; (8) all three defects. A new code (9) was added due to the inability of observing defects in some teeth, especially those adjacent to the cleft, where the tooth is often distalized, mesialized, ectopic, not erupted or absent (Table 1).

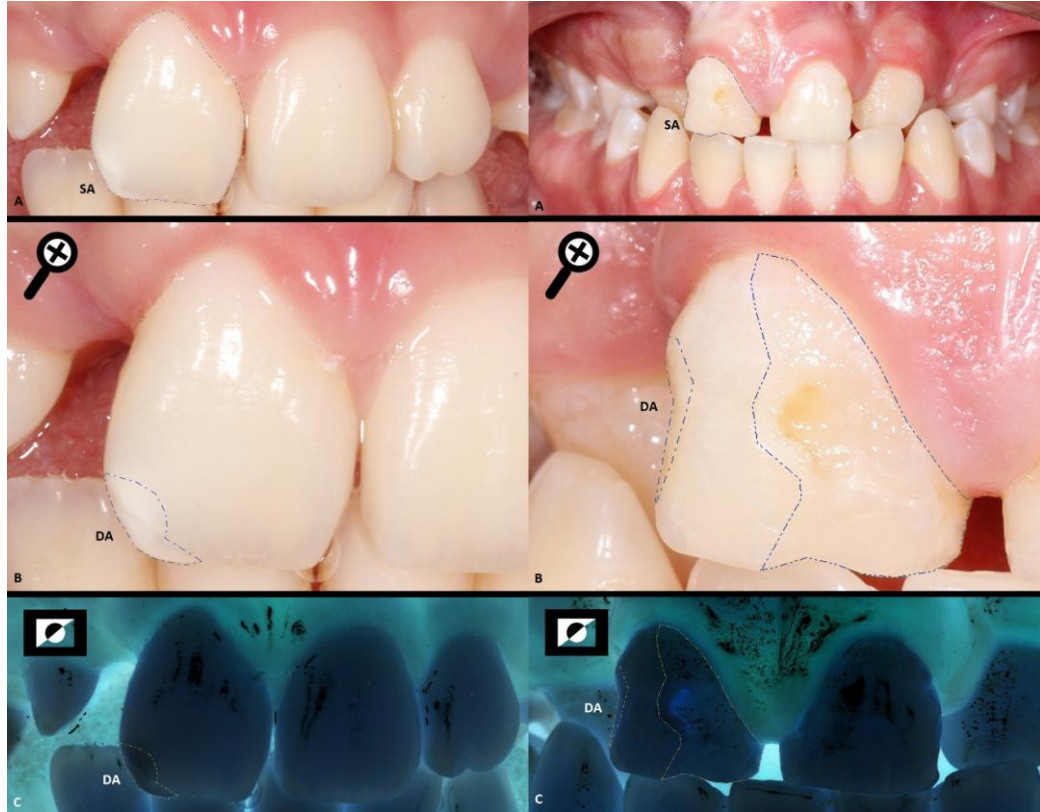
Table 1. Classification of defects that includes a modification of the modified DDE index, which includes the addition of code 9.

Defect	Code
Normal	0
Demarcated opacity	1
Diffuse opacity	2
Hypoplasia	3
Other defects	4
<i>Combinations</i>	
Demarcated and diffuse	5
Demarcated and hypoplasia	6
Diffuse and hypoplasia	7
All three defects	8
Unobservable or absent	9

Stage 3 – Measuring the extent of enamel defects: proposal for a new method

Digital images were loaded into the Image Tool software (v. 3.0, San Antonio Dental School, University of Texas Health Science, TX, USA). Two measurements were made: (1) the proportion of the total area of the buccal surface in the photograph (SA); (2) and the area of each enamel defect found in the respective tooth (DA) (Figure 1), thus obtaining a ratio that indicated the percentage of the surface area affected by the DDE ($\%SAD = (DA)/(SA) \times 100$).

Figure 1. (A) Measuring the total area of the buccal surface (SA) and (B) the areas of the enamel defects found (DA) of a UCLP and BCLP individuals, respectively, (C) using the negative photo as a tool to help to limit the extension.



A pilot study was carried out with 20 patients to identify possible errors, test, and validate the proposed method. Three weeks later, the first assessment was carried out, with all the necessary adjustments raised by the pilot made. The intra-examiner agreement was assessed by a second evaluation of the images after three weeks, with an Intraclass Correlation Coefficient (ICC) of 0.999.

Stage 4 – DNA samples and genotyping

Genomic DNA was extracted from saliva samples from 124 participants, using established protocols [33]. A single nucleotide polymorphism (SNP) in the *MMP2* gene (rs9923304) was selected, considering disequilibrium linkage and gene structure. This SNP

was selected based on published reports and its location within the gene. We used information from the NCBI dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) and HUGO Gene Nomenclature Committee (<https://www.genenames.org/tools/multi-symbol-checker/>) databases. Details of the selected gene and polymorphism are presented in Table 2.

Genotyping was performed by polymerase chain reactions using the Taqman method [34] with an ABI PRISM QuantStudio 6 Flex automatic instrument and pre-designed probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Table 2. Details of the gene and SNP investigated in this study.

Chromosome	Gene	SNP marker	Base Position	SNP Function	Base change ^a
16	matrix metalloproteinase 2 (<i>MMP2</i>)	rs9923304	55496389 (GRCh38.p12)	Intron	CT

^aAncestral allele listed first.

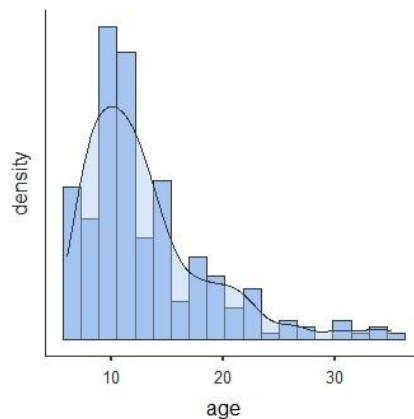
Stage 5 – Statistical analysis

Data processing and statistical analysis were performed by The Jamovi Project software (Version 1.1). The sample size included the spontaneous demand of patients at the Cleft Lip and Palate Service of the University Hospital Lauro Wanderley, respecting the inclusion criteria and based on previous studies [8,19]. In order to verify the normal distribution of the numerical variables, the Shapiro-Wilk test was applied, followed by an analysis of variance with the Student's t-test and the Mann-Whitney test, in the cases of normal and non-normal distribution, respectively. Chi-square and Fisher's exact tests, and odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) calculations were used to determine Hardy-Weinberg equilibrium and statistically significant differences with an alpha of 0.05.

Results

A total of 233 individuals born with cleft lip with or without cleft palate (CLP) were evaluated. Of this total, 105 were female and 128 were male, with an average age of 13.13 (ranging from 6 to 35 years) (Figure 2).

Figure 2. Graph representing the frequency of the ages of the individuals evaluated.



Through the proposed method it was possible to obtain the percentage of the buccal tooth surface area affected by the defect of each unit, with an average Intraclass Correlation Coefficient (ICC) of 0.999, resulting from the reassessment of 20 patients after six weeks of the pilot study. $ICC \geq 0.75$ confirms the excellent reproducibility of a study.

Taking into account the maxillary permanent central and lateral incisors of each patient, 681 teeth were evaluated, of which 469 exhibited developmental defects of enamel (DDE), while only 195 were unaffected. Of the affected teeth, 53% were from male individuals, with an average of the surface area affected by the defect (%SAD) of 44%, while 46% were from female individuals, with an average %SAD of 39.75% ($p=0.058256$). Of these, 270 were inside the cleft area, while 199 were outside the cleft area.

Statistically significant differences ($p<0.001$) were found when comparing bilateral and unilateral clefts in relation to the percentage of the surface area affected by the defect

of the teeth outside the cleft area, with the highest mean and median values observed in the cases born with bilateral clefts, as shown in Table 3.

Table 3. Means and medians of the percentage of the surface area affected by the defect of the teeth inside and outside the cleft area, for all types of clefts analyzed.

Type of Cleft	N (individuals)	Inside the cleft area		Outside the cleft area		p-value
		Mean	Median	Mean	Median	
Unilateral cleft lip only	19	43.1	33.6	22.2	14.3	<0.001
Bilateral cleft lip only*	8	47.4	41.8	-	-	-
Unilateral cleft lip with cleft palate	130	44.2	39.8	30.1	23.9	<0.001
Bilateral cleft lip with cleft palate	65	54.9	47.4	54.5	48.2	>0.05
Cleft palate only*	11	-	-	33.6	25.5	-

Note: *No cases with bilateral cleft lip only had teeth we considered to be outside the cleft area, since we only evaluated maxillary incisors. Similarly, no cleft palate only cases were affecting maxillary incisors.

Regarding the percentage of the surface area affected by the defect (proposed method) and the modified DDE index [32], statistically significant differences ($p < 0.001$) were observed for the teeth outside the cleft area, showing a low Spearman's correlation coefficient ($r = 0.2748$), resulting from the difference between the variables: while the first is continuous, the second is ordinal.

The frequency of the types of enamel defects concerning their location on the buccal surface showed a significant difference, both for the teeth inside ($p < 0.001$) and outside the cleft area ($p < 0.001$), with diffuse opacity (code 2) being more frequent in the incisal third and the combination of diffuse opacity and hypoplasia (code 7) in all the three thirds.

Statistically significant differences were also found between individuals born with bilateral and unilateral clefts (cleft lip only and cleft lip with cleft palate) for the grouped index of all incisors together, both for the teeth inside ($p=0.04$) and outside the cleft area ($p<0.001$). The difference is in the combinations of defects (codes 5, 6, and 7), which are more frequent in bilateral than in unilateral, showing that in bilateral cases there is a greater chance of finding more than one type of enamel defect on the buccal surface, both for teeth inside ($p=0.008016$) and outside the cleft area ($p=0.000358$), therefore exhibiting greater severity.

The frequency of individuals exhibiting teeth with developmental defects of enamel, concerning the cleft and non-cleft side, was statistically different ($p<0.001$). However, the averages of the percentage of the surface area affected by the defect for each tooth, inside and outside the cleft area, were similar ($p=0.18$). Therefore, we cannot say that enamel defects on the cleft side are more extensive and severe than those on the non-cleft side. We observed that the frequency is, in fact, different ($p<0.001$; Odds Ratio=7.15, 95% confidence interval: 4.674-10.942), in which a tooth outside the cleft area was 7.15 times more likely to be without defect in comparison to a tooth within the cleft area. However, when affected, the extent of the defects was similar, as shown in Table 4.

Table 4. Frequency of individuals presenting teeth with and without the presence of developmental defects of enamel, inside and outside the cleft area.

Location	Frequency of teeth affected by individual (% Surface Affected Area)				Total	P-value
	Maxillary right lateral incisor (%SAD)	Maxillary right central incisor (%SAD)	Maxillary left central incisor (%SAD)	Maxillary left lateral incisor (%SAD)		
Inside the cleft area	31 (53.57)	71 (53.3)	118 (46.7)	49 (48.68)	269	<0.001 (0.18)
Outside the cleft area	49 (25.67)	77 (31.53)	55 (43.71)	18 (31.34)	199	
Total	80	148	173	67	468	

Frequency of teeth not affected by individual					
Location	Maxillary right lateral incisor	Maxillary right central incisor	Maxillary left central incisor	Maxillary left lateral incisor	Total
Inside the cleft area	7	10	9	5	31
Outside the cleft area	50	56	30	28	164
Total	57	66	39	33	195

Regarding the type of cleft and the location of enamel defects on the buccal surface, statistically significant differences were found for the teeth outside the cleft area ($p < 0.001$) and for those inside the cleft area ($p = 0.022$). Table 5 shows the frequency of affected teeth found in each third. It should be noted that the number of teeth and not individuals were used due to the small sample size since cleft lip with or without cleft palate and developmental defects of enamel are relatively rare conditions. Besides, teeth outside the cleft area are uncommon when considering bilateral clefts, in which generally the central and maxillary lateral incisors are adjacent to the cleft and, therefore, inside the cleft area, being less common the cases in which the cleft is located between the lateral incisor and canine.

Table 5. Frequency of teeth affected by the type of cleft concerning the location of the enamel defect on the buccal surface, inside and outside the cleft area (n=number of individuals evaluated).

<u>Outside the cleft area</u> Location of DDE	Type of Cleft					Total
	Bilateral cleft lip with cleft palate (n=25)	Unilateral cleft lip with cleft palate (n=83)	P-value*	Unilateral cleft lip only (n=13)	Cleft palate only (n=5)	
Cervical	0	21	0.001	2	0	23
Cervical/Incisal	1	6	0.67	1	2	10
Cervical/Middle	2	17	0.24	1	1	21
Cervical/Middle/Incisal	19	27	<0.001	1	2	49
Incisal	2	35	0.009	9	4	50

Middle	2	11	0.62	3	0	16
Middle/Incisal	8	14	0.04	7	1	30
Total	34	131	<0.001	24	10	199
Inside the cleft area Location of DDE	Type of Cleft					Total
	Bilateral cleft lip with cleft palate (n=65)	Unilateral cleft lip with cleft palate (n=130)	P-value	Unilateral cleft lip only (n=19)	Bilateral cleft lip only (n=8)	
Cervical	8	8	0.71	1	1	18
Cervical/Incisal	5	4	1	1	2	12
Cervical/Middle	13	7	0.32	2	2	24
Cervical/Middle/Incisal	76	49	0.03	6	8	139
Incisal	8	21	0.001	4	1	34
Middle	5	7	0.36	1	1	14
Middle/Incisal	14	12	1	2	0	28
Total	129	108	0.05	17	15	269

In agreement with the results of Table 3, in Table 5 we can observe statistically significant differences ($p<0.001$) concerning the variable location of the enamel defect for the teeth outside the cleft area when comparing the bilateral and unilateral clefts. Individuals born with bilateral cleft lip were 7.85 times more likely to have more than one-third of the buccal surface affected (odds ratio=7.85156, 95% confidence interval 2.619-23.542), and also presented, more frequently, enamel defects in all thirds ($p<0.001$), whereas in the unilateral individuals, the defects were restricted to only one third, being more frequent in the incisal ($p=0.009$) and cervical ($p=0.001$) thirds.

For the teeth inside the cleft area, the results found were corresponding, with unilateral individuals exhibiting a higher frequency of enamel defects in the incisal third ($p=0.001$) while the bilateral individuals, in all thirds ($p=0.03$), agreeing once again with

the previous findings that, when affected, enamel defects are similarly found in the buccal surface, both in extension and in location, regardless of their position to the cleft.

When analyzing the type of cleft concerning the enamel defect, statistically significant differences were found for the teeth outside the cleft area ($p=0.031$), in which a higher frequency of milder defects, such as isolated opacities (codes 1 and 2), was observed for the unilateral individuals. The presence of all combined defects (code 8) was observed for the individuals born with bilateral cleft lip, as shown in Table 6.

Table 6. Frequency of teeth affected by the type of cleft concerning the DDE code, outside the cleft area (n = number of individuals evaluated).

<u>Outside the cleft area</u> DDE Code	Type of Cleft						Total
	Bilateral cleft lip with cleft palate ^a (n=25)	Unilateral cleft lip with cleft palate ^b (n=83)	Unilateral cleft lip only ^c (n=13)	Cleft palate only ^d (n=5)	P-value* (axb)	P- value** (axc)	
Code 1	0	10	4	0	0.02	0.003	14
Code 2	6	55	12	4	0.008	0.008	77
Code 3	11	28	3	1	0.17	0.08	43
Code 4	2	8	2	0	1	0.71	12
Code 5	4	7	1	0	0.18	0.30	12
Code 6	0	1	0	0	0.49	1	1
Code 7	7	20	2	4	0.45	0.20	33
Code 8	4	2	0	0	0.004	0.03	6
Total***	34	131	24	9	0.04	0.26	198

*comparison between bilateral and unilateral cleft lip with cleft palate

**comparison between bilateral cleft lip with cleft palate and unilateral cleft lip only

***Teeth with Code 9 were not included for these comparisons. There were 251 teeth missing or not possible to score and 17 teeth with restorations.

MMP2 (rs9923304) association analysis

Individuals with genotypes analyzed (n=124) were allocated to two groups. In group 1 (G1) are the individuals who presented all the teeth affected or at least two teeth

with a percentage of the surface area affected by the defect greater than 20% (n=67). The others were allocated to group 2 (G2) (n=57), exhibiting one or no affected teeth or two with percentages below 20%. A higher frequency of the C allele was observed in G2 and a higher frequency of the less common T allele in G1 (p=0.019843) (Table 7).

Table 7. Frequency of C and T alleles found in individuals allocated to G1 and G2.

	G1	G2	
Alleles	(n=67)	(n=57)	P-value
C	71	77	
T	63	37	0.01

Raw measurements and genotypes for all participants are available as a supplemental file (Supplement S1).

Discussion

Studies have attempted to define sub-phenotypes of oral clefts based on dental development [6,9,35]. Evidence suggests that individuals born with oral clefts have a higher frequency of DDE [7,8,10,17,19]. The reason for this higher prevalence rate of enamel defects in individuals born with CLP remains unclear. Several different etiological factors have been suggested as responsible, such as illness, trauma, nutrition, and metabolic conditions generally [19]. The present study supports the hypothesis that the most viable etiological factors for these defects may be the same as those for the cleft [8,10,36]. It is possible that these dental anomalies could represent an incomplete manifestation of the clefting process [19]. In a longitudinal study, Malanczuk et al. (1999) [10] observed that 19 patients had at least one permanent tooth retaining the same structural changes of the primary tooth in the dental enamel, therefore exhibiting corresponding pathological

mechanisms both for disorders of the dental structure and for the development of the primary palate.

There are few reports on the diagnosis of DDE and the differential diagnosis is not simple because mistakes can be made in its assessment [15,37]. Although direct clinical examination is a fast and cheap method, it has many disadvantages such as observer bias and effects of visual problems related to fatigue of the examiner [30]. Photography has been employed to assist the diagnosis of clinical examinations and increase the accuracy in detecting DDE, with most studies demonstrating high reliability [30,31,37-40]. The photographic method may facilitate blinded and repeated examinations [30,37] and can be kept for future reassessment or application of different approaches or score systems [30,31,40]. However, technical sensitivity, inability to use touch and cost are some of its disadvantages of the use of photographs [30]. Some have suggested that the photographic method was much more sensitive than direct clinical examination in detecting DDE and was the best method for epidemiological studies [30,37]. For these reasons, we analyzed intraoral photographs in this study, and developed a new method that facilitates the diagnosis of enamel defects and provides more information. To decrease the potential impact on variability, only one examiner obtained the measurements from the photographs. However, this approach has limited our ability to suggest the method can be reliably used by others.

Over the years, numerous score systems have been proposed for measuring enamel defects, causing further confusion in reporting results and making comparisons between these studies difficult [32]. The modified DDE index has been employed in several studies of enamel defects [8,15,18,19,37]. However, as the aim of this study was to understand not only the frequency of enamel defects found in individuals born with CLP but also to

compare the severity and extent between the types of cleft and the affected and unaffected side, the new method was developed with the intention of providing these particular details. The low correlation found in this study ($r = 0.2748$) concerning the percentage of the surface affected by the defect (proposed method) and the Modified DDE Index was expected. Some of the reasons [32] for the proposed modification of the used DDE Index [41] were to enable the assessment of the severity of the defects found and because the recording of data was time-consuming. However, although the variable is ordinal, it is not necessarily progressive, leading to confusion. Code 1, for example, represents demarcated opacity, while code 2, diffuse. Code 1 can affect the entire surface, whereas code 2 may be restricted to only one of the thirds of the tooth. Severity, in this case, is relative. Our proposed method, being a continuous variable, does not allow for this inconsistency, explaining and justifying the low correlation we found between the two analyses.

The present study found no significant differences in the prevalence of dental anomalies, similar to previous work [9,42,43], including enamel defects [8,18], between male and female individuals born with CLP.

We analyzed the presence of enamel defects in the permanent maxillary incisors since studies have demonstrated that these teeth are the most commonly affected [8,17,19,44]. We found a higher frequency of enamel defects on the cleft side, for both primary and permanent dentitions, compared with the noncleft side, in agreement with previously reported data [8,19,45,46]. We believe that the frequency is, in fact, different, in which a tooth outside the cleft area was 7.15 times more likely to be healthy compared to one within. However, when affected, the extent, severity, and location of the defects were similar. Our findings confirmed that there is a higher frequency of defects within the cleft area, though there are no previous studies that have assessed their extent compared to the non-cleft side. We managed to obtain these data through the proposed measurement method

because when we use the codes of the modified DDE index, it tells only if there is an enamel defect and its type. Therefore, it was believed that teeth outside the cleft area were less affected in severity, when, in fact, they are only in frequency. A probable explanation is that although environmental factors may play some role, the genetic factors are decisive, since we observed the same severity of these defects both in teeth inside and outside the cleft area [18,19]. However, the mechanism by which the cleft may interfere with tooth formation is not well understood [19,36,42,45].

In this study, both for the teeth inside and outside the cleft area, we observed a pattern when comparing UCLP with BCLP individuals. The results found for the UCLP are in agreement with other studies, in which most defects affected less than one third of the crown, commonly the incisal third [17,18]. Also, the occurrence of a single defect on the tooth surface was observed, both on the cleft and noncleft sides [17] with the highest frequencies for opacities [17,18].

We observed that BCLP individuals are 7.85 times more likely to have more than one third of the tooth surface affected, showing, more often, combinations of enamel defects. In agreement with this result, Ruiz et al. (2013) found that bilateral cleft lip and palate had the highest prevalence of enamel defects (47.4%), followed by left unilateral cleft (33.8%) and right unilateral cleft (18.8%) [19]. Further, Wangsrimongkol et al. (2013) found that the most prevalent missing teeth were found in 70.7% of subjects in BCLP group [43]. Al Jamal et al. (2010) observed that BCLP subjects had significantly more microdontia, dilaceration and hypoplastic teeth than subjects with UCLP [42]. One hypothesis is that in these patients, treatments required are more extensive because of the severity of the malformation and this may extend the period during which the tooth is exposed to cariogenic factors [19]. However, Alam & Alfawzan (2020) [47] evaluated sella turcica bridging, an important landmark in the cranium on lateral cephalogram that helps to

identify pathologies related to syndromes that affect the craniofacial region. Seven parameters related to Sella turcica morphology and skeletal malocclusion were analyzed and the authors found that BCLP individuals exhibit smaller values of all seven parameters as compared to all other CLP groups. This result extrapolates the hypotheses that correlate tooth formation with the clefting process, showing that it is necessary for studies that investigate the possible reasons for the higher prevalence and severity of anomalies, in general, in BCLP individuals.

The T allele of *MMP2* rs9923304 was associated with cases with more extensive enamel defects. *MMP2* encodes an enzyme that degrades type IV collagen and is constitutively expressed by most connective tissue cells including endothelial cells, osteoblasts, fibroblasts, and myoblasts [20,22]. Altered expression and activity levels of *MMP2* is known to be associated with pathological states, especially those involving tissue remodeling [22].

Previous studies have demonstrated that genes involved in enamel development are associated with DDE [21,48,49]. Also, studies have shown the association of *MMP2* with formation and mineralization of dental tissues [23-25], and dental conditions such as periapical lesions [50], non-carious loss of extensive composite resin restorations [22], and talon cusp [51]. However, this was the first time this gene was specifically studied for DDE. In periodontal tissues, excessive fluoride intake increases *MMP2* expression [52], but genetic variation of *MMP2* was not associated with dental fluorosis [27]. Therefore, genetic variation of *MMP2* may be an additional factor leading to enamel defects that can be added to others such as previous orthodontic treatment and/or surgical treatment [53-55].

We implemented a cross-sectional cohort design, which may provide some advantages since the interval between the presence of oral clefts and its initial surgical repair is many years prior to maxillary incisors have fully erupted. However, some

limitations to this type of design include nonignorable exiting, measurement error, and selection bias [56]. It is not possible to determine if the individuals included in the study had relatively less severe enamel defects, and individuals with more severe enamel defects were not included since they already underwent restorative treatment, which prevented us from determining the extent of the original surface defect. Although measurement error and selection bias are not exclusively likely in cross-sectional cohort designs, the time between oral clefts interventions start and when the maxillary incisors could be evaluated may have influenced the sample we finally had available for this study. An additional limitation was the limited number of observations for some subtypes of clefts, such as unilateral cleft lip (n=19) or bilateral cleft lip (n=8).

MMP2 rs9923304 TT genotype could serve as the basis for a genomic approach to define risks for enamel defects in individuals born with CLP. Longitudinal studies in larger samples need to be conducted, as well as other genetic studies, for confirmation of the presented results. Our study has the limitation of not having evaluated *MMP2* expression during human enamel formation of the studied individuals.

In the near future, genetics might be used as a tool to screen children that will need biology-based preventive approaches. From the findings presented here, it was possible to observe that the frequency and severity of enamel defects is strongly related to the CLP phenotype. Therefore, the broadening of the cleft phenotype may allow for better gene-mapping efforts and provide more effective genetic counseling.

Acknowledgements

Ionaria O. Assis, Bianca G.N. Cavalcante, and Mariana Bezamat helped with the *MMP2* genotyping.

References

- [1] Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 2002;61(4):248-56. doi: 10.1034/j.1399-0004.2002.610402.x. PubMed PMID: 12030886.
- [2] Allam E, Stone C. Cleft lip and palate: etiology, epidemiology, preventive and intervention Strategies . *Anat Physiol* 2014;4:150. doi: 10.4172/2161-0940.1000150
- [3] 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*. 2008;146A(11):1406-13. doi: 10.1002/ajmg.a.32295. PubMed PMID: 1844209.
- [4] Mossey PA, Modell B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Front Oral Biol*. 2012;16:1-18. doi: 10.1159/000337464. PubMed PMID: 22759666.
- [5] Rittler M, Cosentino V, López-Camelo JS, Murray JC, Wehby G, Castilla EE. Associated anomalies among infants with oral clefts at birth and during a 1-year follow-up. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(7):1588-96. doi: 10.1002/ajmg.a.34046. PubMed PMID: 21671378.
- [6] Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res*. 2007;86(10):986-91. doi: 10.1177/154405910708601013. PubMed PMID: 17890676.
- [7] Koruyucu M, Kasimoglu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergoz N, et al. Rethinking isolated cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018; 125: 307–312. doi: 10.1016/j.oooo.2018.01.007.
- [8] 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):2084-2096. doi: 10.1177/0300060519832165. PubMed PMID: 30913937.
- [9] 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.* 2017;18(1):20. doi: 10.1186/s40510-017-0169-x. PubMed PMID: 28681357.

[10] Malanczuk T, Opitz C, Retzlaff R. Structural changes of dental enamel in both dentitions of cleft lip and palate patients. *J Orofac Orthop.* 1999;60(4):259-68. doi: 10.1007/BF01299784. PubMed PMID: 10450638.

[11] de Lima Pedro R, Faria MD, de Castro Costa M, Vieira AR. Dental anomalies in children born with clefts: a case-control study. *Cleft Palate Craniofac J* 2012;49:e64-8. doi: 10.1597/10-067.

[12] Rice JP, Saccone NL, Rasmussen E. Definition of the phenotype. In: *Genetic dissection of complex traits.* Rao DC, Province MA, editors. San Diego: Academic Press; 2001. p.69-76.

[13] Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J.* 1997;47(3):173-82. doi: 10.1002/j.1875-595x.1997.tb00783.x. PubMed PMID: 9448804.

[14] Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B. Association between enamel hypoplasia and dental caries in primary second molars: a cohort study. *Caries Res.* 2009;43(5):345-53. doi: 10.1159/000231571. PubMed PMID: 19648745.

[15] Kobayashi TY, Vitor LLR, Carrara CFC, Silva TC, Rios D, Machado MAAM, et al. Dental enamel defect diagnosis through different technology-based devices. *Int Dent J.* 2018;68(3):138-143. doi: 10.1111/idj.12350. PubMed PMID: 29168574.

[16] Americano GC, Jacobsen PE, Soviero VM, Haubek D. A systematic review on the association between molar incisor hypomineralization and dental caries. *Int J Paediatr Dent.* 2017;27(1):11-21. doi: 10.1111/ipd.12233. PubMed PMID: 27098755.

- [17] Maciel SP, Costa B, Gomide MR. Difference in the Prevalence of Enamel Alterations Affecting Central Incisors of Children with Complete Unilateral Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2005;42(4):392-395. doi: 10.1597/02-152.1
- [18] Gomes AC, Neves LT, Gomide MR. Enamel defects in maxillary central incisors of infants with unilateral cleft lip. *Cleft Palate Craniofac J*. 2009;46(4):420-4. doi: 10.1597/08-044.1.
- [19] Ruiz LA, Maya RR, D'Alpino PH, Atta MT, da Rocha Svizero N. Prevalence of enamel defects in permanent teeth of patients with complete cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2013;50(4):394-9. doi: 10.1597/11-200. PubMed PMID: 22292803.
- [20] Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2001;276:7549–58. doi:10.1074/jbc.M010242200.
- [21] Vasconcelos KR, Arid J, Evangelista S, Oliveira S, Dutra AL, Silva LAB, et al. MMP13 Contributes to Dental Caries Associated with Developmental Defects of Enamel. *Caries Res*. 2019;53(4):441-446. doi: 10.1159/000496372.
- [22] 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. doi: 10.3389/fmed.2017.00186. PubMed PMID: 29164121.
- [23] Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res*. 1995;74(5):1226-34. doi: 10.1177/00220345950740051301.
- [24] Caron C, Xue J, Sun X, Simmer JP, Bartlett JD. Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. *J Dent Res*. 2001;80(7):1660-4. doi: 10.1177/00220345010800071201.

- [25] Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Exp Cell Res*. 2005;304(2):493-505. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.11.024.
- [26] 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. *Journal of Dentistry* 2011;39:536–42. doi: 10.1016/j.jdent.2011.05.004.
- [27] Romualdo PC, Pucinelli CM, Tannure PN, Nelson-Filho P, Segato RAB, Brancher JÁ, et al. Evaluation of genetic polymorphisms in MMP2, MMP9 and MMP20 in Brazilian children with dental fluorosis. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2019;66:104-108. doi: 10.1016/j.etap.2018.12.016.
- [28] Vieira AR, Manton DJ. On the Variable Clinical Presentation of Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res* 2019;53:482-488. doi: 10.1159/000496542
- [29] Kelly AM, Kallistova A, Küchler EC, Romanos HF, Lips A, Costa MC, et al. Measuring the microscopic structures of human dental enamel can predict caries experience. *J Pers Med* 2020;10(1):5. doi: 10.3390/jpm10010005.
- [30] Golkari A, Sabokseir A, Pakshir HR, Dean MC, Sheiham A, Watt RG. A comparison of photographic, replication and direct clinical examination methods for detecting developmental defects of enamel. *BMC Oral Health*. 2011;11:16. doi: 10.1186/1472-6831-11-16. PubMed PMID: 21510890.
- [31] Wong HM, McGrath C, Lo EC, King NM. Photographs as a means of assessing developmental defects of enamel. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005;33(6):438-46. doi: 10.1111/j.1600-0528.2005.00245.x. PubMed PMID: 16262611.

- [32] Clarkson J, O'Mullane D. A modified DDE Index for use in epidemiological studies of enamel defects. *J Dent Res.* 1989;68(3):445-50. doi: 10.1177/00220345890680030201. PubMed PMID: 2921385.
- [33] Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007; 18(2):148–52. doi: 10.1590/s0103-64402007000200012.
- [34] Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 2001;11(7):1262-8. doi: 10.1101/gr.157801. PubMed PMID: 11435409.
- [35] Küchler EC, da Motta LG, Vieira AR, Granjeiro JM. Side of dental anomalies and taurodontism as potential clinical markers for cleft subphenotypes. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011;48(1):103-8. doi: 10.1597/09-159. PubMed PMID: 20507240.
- [36] Ranta R. A review of tooth formation in children with cleft lip/palate. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1986;90(1):11-8. doi: 10.1016/0889-5406(86)90022-3. PubMed PMID: 3524249.
- [37] Chen Y, Lee W, Ferretti GA, Slayton RL, Nelson S. Agreement between photographic and clinical examinations in detecting developmental defects of enamel in infants. *J Public Health Dent.* 2013;73(3):204-9. doi: 10.1111/jphd.12014. PubMed PMID: 23560699.
- [38] Ellwood RP, Cortea DF, O'Mullane DM. A photographic study of developmental defects of enamel in Brazilian school children. *Int Dent J.* 1996;46(2):69-75. PMID: 8930676.
- [39] Robertson AJ, Toumba KJ. Cross-polarized photography in the study of enamel defects in dental paediatrics. *J Audiov Media Med.* 1999;22(2):63-70. doi: 10.1080/014051199102179. PubMed PMID: 10628000.
- [40] Cochran JA, Ketley CE, Sanches L, Mamai-Homata E, Oila AM, Arnadóttir IB, et al. A standardized photographic method for evaluating enamel opacities including fluorosis.

Community Dent Oral Epidemiol. 2004;32 Suppl 1:19-27. doi: 10.1111/j.1600-0528.2004.00135.x. PubMed PMID: 15016113.

[41] FDI Commission on oral health, research & epidemiology: An Epidemiological Index of Developmental Defects of Dental Enamel (D.D.E.Index), Int Dent J. 1982;32:159-167.

[42] Al Jamal GA, Hazza'a AM, Rawashdeh MA. Prevalence of dental anomalies in a population of cleft lip and palate patients. Cleft Palate Craniofac J. 2010;47:413–420. doi: 10.1597/08-275.1.

[43] Wangsrimongkol T, Manosudprasit M, Pisek P, Chittiwatanapong N. Prevalence and types of dental anomaly in a Thai non-syndromic oral cleft sample. J Med Assoc Thai. 2013;96 Suppl 4:S25-35. PMID: 24386739.

[44] Sundell AL, Nilsson AK, Ullbro C, Twetman S, Marcusson A. Caries prevalence and enamel defects in 5- and 10-year-old children with cleft lip and/or palate: A case-control study. Acta Odontol Scand. 2016;74(2):90-5. doi: 10.3109/00016357.2015.1044562.

[45] Vichi M, Franchi L. Abnormalities of the maxillary incisors in children with cleft lip and palate. ASDC J Dent Child. 1995;62(6):412-7. PMID: 8636477.

[46] Camporesi M, Baccetti T, Marinelli A, Defraia E, Franchi L. Maxillary dental anomalies in children with cleft lip and palate: a controlled study. Int J Paediatr Dent. 2010;20(6):442-50. doi: 10.1111/j.1365-263X.2010.01063.x.

[47] Alam MK, Alfawzan AA. Evaluation of sella turcica bridging and morphology in different types of cleft patients. Front. Cell Dev. Biol. 2020;8:656. doi: 10.3389/fcell.2020.00656.

[48] Jeremias F, Koruyucu M, Kuchler EC, Bayram M, Tuna EB, Deeley K, et al. Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization. Arch Oral Biol. 2013;58(10):1434-42. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.05.005. PubMed PMID: 23790503.

- [49] Jeremias F, Pierri RA, Souza JF, Fragelli CM, Restrepo M, Finoti LS, et al. Family-Based Genetic Association for Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res.* 2016;50(3):310-8. doi: 10.1159/000445726. PubMed PMID: 27179118.
- [50] 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(5):604-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.009. PubMed PMID: 22515887.
- [51] Cavalcante BGN, Lacerda RHW, Assis IO, Bezamat M, Modesto A, Vieira AR. Talon cusp associates with MMP2 in a cohort of individuals born with oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2020;1055665620958569. doi: 10.1177/1055665620958569. PMID: 32935555.
- [52] Lutfioglu M, Sakallioğlu EE, Sakallioğlu U, Gulbahar MY, Muglali M, Bas B, et al. Excessive fluoride intake alters the MMP-2, TIMP-1 and TGF-beta levels of periodontal soft tissues: an experimental study in rabbits. *Clin. Oral Investig.* 2012;16: 1563–1570.
- [53]. Carpentier S, Ghijselings E, Schoenaers J, Carels C, Verdonck A. Enamel defects on the maxillary premolars in patients with cleft lip and/or palate: a retrospective case-control study. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2014;15(3):159–165.
- [54] Korolenkova MV, Starikova NV, Udalova NV. The role of external aetiological factors in dental anomalies in non-syndromic cleft lip and palate patients. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2019;20(2):105–111.
- [55] Marzouk T, Alves IL, Wong CL, DeLucia L, McKinney CM, Pendleton C, Howe BJ, Marazita ML, Peter TK, Kopycka-Kedzierawski DT, Morrison CS, Malmstrom H, Wang H, Shope ET. Association between dental anomalies and orofacial clefts: A meta-analysis. *JDR Clin Trans Res.* 2020 Oct 8;2380084420964795. DOI: 10.1177/2380084420964795. Epub ahead of print. PMID: 33030085.
- [56]. Hudson JI, Pope HG Jr., Glynn RJ. The cross-sectional cohort study. An underutilized design. *Epidemiol.* 2005;16(3):355-359. doi: 10.1097/01.ede.0000158224.50593.e3

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nosso grupo de pesquisa abordou o desafio de identificar genes que contribuem para a ocorrência de FLP isoladas, explorando a presença de anomalias dentárias e defeitos de desenvolvimento do esmalte, além da ocorrência de câncer nas famílias que tiveram filhos nascidos com fissuras orais (5,16,25,58).

Apesar de cerca de 70% dos casos serem assim chamados, nós acreditamos que definir o defeito como “isolado” provavelmente seja um fator limitante, uma vez que formas isoladas de FLP são raras, com a maior parte dos casos sendo acompanhados por outras anomalias menores (59). É intuitivo pensar que se trata, na realidade, de uma síndrome ou de um grupo de síndromes que compartilham contribuintes genéticos (16). Propomos, então, que estas sejam na verdade uma “síndrome de alterações da dentição” e considerá-la assim pode permitir a identificação de correlações genótipo-fenótipo que podem ser úteis para o manejo clínico de indivíduos nascidos com fissuras orais (25).

Estudos realizados durante a década de 1990 foram guiados por análises de segregação que sugeriram que um terço dos casos de FLP isoladas poderiam ser explicados por um principal modelo genético (60,61). No entanto, observou-se que esse modelo provavelmente explicava muito menos do que se imaginava. Um modelo poligênico com vários genes com pequenos efeitos pode ser o modo de herança mais comum relacionado às FLP isoladas (16).

Atualmente, alguns genes têm sido propostos que parecem contribuir para a ocorrência desta condição: *IRF6*, *MAFB*, *ARHGAP29*, *PAX7*, *MSX1*, *MTHFR*, *TGFB3*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGF8*, *PDGFC*, *PVRL1*, *GABRB3*, *MSX2*, *SATB2* e *TBX22* (62-69).

Variações na morfologia da face, cérebro, dentes, dermatoglia, mão dominante/lateralidade e outras características foram propostas como ferramentas para caracterizar ainda mais formas isoladas de fissuras (70).

Zhu et al. (71) observaram que pais de crianças nascidas com FLP apresentaram maior risco de câncer - em particular, linfomas e leucemia - concordando com os achados de Yildirim et al. (72), evidenciando a possibilidade de que, em algumas famílias, as mesmas variantes genéticas podem contribuir

para a ocorrência de FLP e, mais tardiamente, uma predisposição ao câncer (5,59).

Indivíduos nascidos com FLP são mais propensos a apresentar anomalias dentárias – principalmente agenesias – mesmo fora da área da fissura e, por essa razão, têm sido um dos traços propostos para essa caracterização (24,58,59). Sugere-se que indivíduos com DDE tenham mais agenesia dentária de segundos pré-molares (73) ou coocorrência de agenesia dentária e dentes supranumerários (74). Por essa razão, decidimos estudar a associação entre DDE e indivíduos nascidos com fissuras orais, uma vez que evidências apontam para uma maior frequência desta condição nestes pacientes (25,26,28) e como mais um marcador clínico que possibilite a definição de fenótipos mais amplos que ajudem a desvendar a base genética da doença. O uso de definições clínicas mais extensas poderia substituir os termos "isolado" ou "não sindrômico" em oposição às formas "sindrômicas" de fissuras, sendo uma forma promissora de identificar genes que influenciam nesta condição (5,16,59).

Através do método de medição proposto, identificamos padrões de DDE em indivíduos com FBLP e FULP antes não descritos na literatura, assim como observamos severidade semelhante entre os defeitos encontrados nos elementos dentro e fora da área da fissura, um resultado que corrobora a hipótese de que diferenças no lado afetado visto nas FLP isoladas pode ser resultado de eventos específicos de regulação gênica nos lados esquerdo e direito (16).

Outro achado importante do nosso estudo foi que dos 11 indivíduos nascidos com fissura pós-forame avaliados, 38 dentes foram analisados, respeitando os critérios de inclusão. Desses, apenas 10 apresentaram defeitos do esmalte, enquanto 28 estavam normais. Apesar do tamanho amostral não expressivo deste grupo, a prática clínica vem nos mostrando que, de fato, estes indivíduos parecem apresentar uma menor frequência de DDE, contrariando os estudos de Mossey & Modell (6) e Rittler et al. (23), onde observou-se que a fenda palatina isolada apresentou a maior prevalência de deformidades associadas. Portanto, estudos populacionais maiores que investiguem mais profundamente essa associação devem ser considerados, assim como a incorporação de outras variáveis como alimentação, local de nascimento, área geográfica em que reside, consumo de água fluoretada, entre outras, que podem interferir diretamente na formação dos diferentes tipos de defeitos de desenvolvimento do esmalte.

Como discutido anteriormente, este gene já foi estudado em outras condições bucais (45,49,56,57,58). Tendo em vista que a MMP2 tem um importante papel na remodelação tecidual, estudos que explorem sua associação com a doença periodontal poderiam fornecer maiores informações acerca desta condição, cujo tratamento representa um dos maiores desafios da odontologia.

Pesquisas envolvendo o MMP2 podem contribuir para a aplicação dos resultados para o cenário clínico. Apesar de acreditar-se que apenas amostras de DNA, no futuro, não serão suficientes para a realização de estudos que nos permitam prever e prevenir certas condições como as FLP, uma melhor compreensão de sua base genética pode ajudar a melhorar o aconselhamento para famílias com um possível risco maior. Entender a sua participação em outras condições, como os defeitos de desenvolvimento do esmalte, pode ajudar a identificar indivíduos com função alterada deste gene, alertando ao profissional sobre a necessidade de um cuidado maior, onde o recall desses pacientes seria mais freqüente para minimizar os efeitos de um estado patológico associado a MMP2.

4. CONCLUSÃO

O método proposto para avaliação da extensão dos defeitos do esmalte foi capaz de fornecer informações mais detalhadas sobre a severidade desses, permitindo comparação entre os diferentes tipos de fissura e entre o lado afetado e não afetado. A frequência e a severidade dos DDE estão fortemente relacionadas ao fenótipo da FLP, uma vez que os maiores valores foram encontrados para a FBLP. No entanto, a severidade desses defeitos não depende de sua relação com o lado da fenda.

MMP2 pode ter um papel importante nos casos que apresentaram DDE e a genotipagem rs9923304 poderia servir como base para uma abordagem genômica com o intuito de definir riscos para indivíduos nascidos com FLP.

REFERÊNCIAS*

1. Tereza GP, Carrara CF, Costa B. Tooth abnormalities of number and position in the permanent dentition of patients with complete bilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010 May;47(3):247-52.
2. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011 Mar;12(3):167-78.
3. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 2002 Apr;61(4):248-56.
4. Allam E, Stone C. Cleft Lip and Palate: Etiology, Epidemiology, Preventive and Intervention Strategies . *Anat Physiol* 2014;4:150.
5. 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*. 2008 Jun 1;146A(11):1406-13.
6. Mossey PA, Modell B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Front Oral Biol*. 2012;16:1-18.
7. Martelli Junior H, Porto LV, Martelli DRB, Bonan PRF, Freitas AB, Coletta RD. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res* 2007; 21(4): 314-7
8. Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MAF. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res*. 2009; 23(1): 38-42.
9. Spina V, Psillakis JM, Lapa FS. Classificação das fissuras labiopalatinas: sugestão de modificação. *Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo* 1972; 27(1): 5-6.
10. Muhamad AH. Cleft Lip and Palate: Etiological Factors, A Review. *Indian J Dent Adv*. 2012;4(2):830+.
11. Molina-Solana R, Yáñez-Vico RM, 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*. 2013 Feb;42(2):177-84.
12. 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.
13. Hoyt AT, Canfield MA, Romitti PA, Botto LD, Anderka MT, Krikov SV, et al. Associations between maternal periconceptional exposure to 9 secondhand

tobacco smoke and major birth defects. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215:613 e1-613 e11.

14. 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.

15. Schliekelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J Hum Genet.* 2002 Dec;71(6):1369-85.

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

17. Prevalence at Birth of Cleft Lip with or without Cleft Palate: Data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). *Cleft Palate Craniofac J.* 2011;48(1):66-81.

18. Matthews JLK, Oddone-Paolucci E, Harrop RA. The Epidemiology of Cleft Lip and Palate in Canada, 1998 to 2007. *Cleft Palate Craniofac J.* 2015 Jul; 52(4): 417-424.

19. Diwana VK, Gupta G, Chauhan R, Mahajan K, Mahajan A, Gupta R, et al. Clinical and Epidemiological Profile of Patients with Cleft Lip and Palate Anomaly: 10-Year Experience from a Tertiary Care Center in the Sub-Himalayan State of Himachal Pradesh in Northern India. *J Nat Sci Biol Med.* 2019 Jan-Jun; 10(1): 82-87.

20. 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

21. Menezes C, de Arruda JA, Silva LV, Monteiro JL, Caribé P, Álvares P, et al. Nonsyndromic cleft lip and/or palate: A multicenter study of the dental anomalies involved. *J Clin Exp Dent.* 2018 Aug 1;10(8):e746-e750.

22. Freitas JA, Garib DG, Oliveira M, Lauris Rde C, Almeida AL, 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.* 2012 Mar-Apr;20(2):268-81.

- 23.** Rittler M, Cosentino V, López-Camelo JS, Murray JC, Wehby G, Castilla EE. Associated anomalies among infants with oral clefts at birth and during a 1-year follow-up. *Am J Med Genet A*. 2011 Jul;155A(7):1588-96.
- 24.** Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res*. 2007 Oct;86(10):986-91.
- 25.** Koruyucu M, Kasimoglu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergoz N, et al. Rethinking isolated cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018; 125: 307–312.
- 26.** 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 May;47(5):2084-2096.
- 27.** 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*. 2017 Dec;18(1):20.
- 28.** Malanczuk T, Opitz C, Retzlaff R. Structural changes of dental enamel in both dentitions of cleft lip and palate patients. *J Orofac Orthop*. 1999;60(4):259-68.
- 29.** de Lima Pedro R, Faria MD, de Castro Costa M, Vieira AR. Dental anomalies in children born with clefts: a case-control study. *Cleft Palate Craniofac J* 2012;49:e64-8.
- 30.** Rice JP, Saccone NL, Rasmussen E. Definition of the phenotype. In: Genetic dissection of complex traits. Rao DC, Province MA, editors. San Diego: Academic Press; 2001. p.69-76.
- 31.** Ten Cate AR. Oral histology: development, structure and function. In: Ten Cate AR, ed. *Amelogenesis*. Rio de Janeiro, Brazil: Guanabara Koogan; 2001. p.186–204.
- 32.** Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J*. 1997 Jun;47(3):173-82.
- 33.** Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B. Association between enamel hypoplasia and dental caries in primary second molars: a cohort study. *Caries Res*. 2009;43(5):345-53.
- 34.** Kobayashi TY, Vitor LLR, Carrara CFC, Silva TC, Rios D, Machado MAAM, et al. Dental enamel defect diagnosis through different technology-based devices. *Int Dent J*. 2018 Jun;68(3):138-143.

- 35.** Suckling GW, Nelson DG, Patel MJ. Macroscopic and scanning electron microscopic appearance and hardness values of developmental defects in human permanent tooth enamel. *Adv Dent Res.* 1989 Sep;3(2):219-33.
- 36.** Ruiz LA, Maya RR, D'Alpino PH, Atta MT, da Rocha Svizero N. Prevalence of enamel defects in permanent teeth of patients with complete cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2013 Jul;50(4):394-9.
- 37.** Americano GC, Jacobsen PE, Soviero VM, Haubek D. A systematic review on the association between molar incisor hypomineralization and dental caries. *Int J Paediatr Dent.* 2017 Jan;27(1):11-21.
- 38.** Maciel SP, Costa B, Gomide MR. Difference in the Prevalence of Enamel Alterations Affecting Central Incisors of Children with Complete Unilateral Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005;42(4):392-395.
- 39.** Dixon DA. Defects of structure and formation of the teeth in persons with cleft palate and the effect of reparative surgery on the dental tissues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1968 Mar;25(3):435-46.
- 40.** Ranta R. A review of tooth formation in children with cleft lip/palate. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1986 Jul;90(1):11-8.
- 41.** Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2001;276:7549–58.
- 42.** Caron C, Xue J, Sun X, Simmer JP, Bartlett JD. Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. *J Dent Res.* 2001 Jul;80(7):1660-4.
- 43.** Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Exp Cell Res.* 2005 Apr 1;304(2):493-505.
- 44.** Vasconcelos KR, Arid J, Evangelista S, Oliveira S, Dutra AL, Silva LAB, et al. MMP13 Contributes to Dental Caries Associated with Developmental Defects of Enamel. *Caries Res.* 2019;53(4):441-446.
- 45.** 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 Nov 6;4:186.

- 46.** McGuire JD, Gorski JP, Dusevich V, Wang Y, Walker MP. Type IV collagen is a novel DEJ biomarker that is reduced by radiotherapy. *J Dent Res.* 2014;93:1028–34.
- 47.** Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res.* 1995 May;74(5):1226-34.
- 48.** 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. *Journal of Dentistry* 2011;39:536–42.
- 49.** Romualdo PC, Pucinelli CM, Tannure PN, Nelson-Filho P, Segato RAB, Brancher JÁ, et al. Evaluation of genetic polymorphisms in MMP2, MMP9 and MMP20 in Brazilian children with dental fluorosis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019 Feb;66:104-108.
- 50.** Zankl A, Pachman L, Poznanski A, Bonafé L, Wang F, Shusterman Y, et al. Torg syndrome is caused by inactivating mutations in MMP2 and is allelic to NAO and Winchester syndrome. *J Bone Miner Res.* 2007;22:329–33.
- 51.** Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, et al. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet.* 2001;28:261–5.
- 52.** Chen Y, Liao N, Lu F, Peng H, Gao J. The role of Duffy antigen receptor for chemokines in keloids. *Gene.* 2015;570:44–9.
- 53.** Soini Y, Alarakkola E, Autio-Harmainen H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in nonneoplastic and neoplastic endometrium. *Hum Pathol.* 1997;28:220–6.
- 54.** Vieira AR, Manton DJ. On the Variable Clinical Presentation of Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Res* 2019;53:482-488.
- 55.** Kelly AM, Kallistova A, Küchler EC, Romanos HF, Lips A, Costa MC, et al. Measuring the microscopic structures of human dental enamel can predict caries experience. *J Pers Med* 2020;10(1):5.
- 56.** 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 May;38(5):604-7.

- 57.** Lutfioglu M, Sakallioglu EE, Sakallioglu U, Gulbahar MY, Muglali M, Bas B, et al. Excessive fluoride intake alters the MMP-2, TIMP-1 and TGF-beta levels of periodontal soft tissues: an experimental study in rabbits. *Clin. Oral Investig.* 2012;16: 1563–1570.
- 58.** Cavalcante BGN, Lacerda RHW, Assis IO, Bezamat M, Modesto A, Vieira AR. Talon Cusp Associates With MMP2 in a Cohort of Individuals Born With Oral Clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2020 Sep 16;1055665620958569.
- 59.** Vieira AR. Three Decades of Molecular Studies of Multifactorial Cleft Lip and Palate. *JDR Clin Trans Res.* 2017;2(1):93-94.
- 60.** Chung CS, Bixler D, Watanabe T, Koguchi H, Fogh- Andersen P: Segregation analysis of cleft lip with or without cleft palate: a comparison of Danish and Japanese data. *Am J Hum Genet* 1986;39:603–611.
- 61.** Marazita ML, Spence MA, Melnick M: Major gene determination of liability to cleft lip with or without cleft palate: a multiracial view. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1986;2:89–97
- 62.** Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013 Nov;163C(4):246-58.
- 63.** 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.
- 64.** 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.* 2005 Dec;1(6):e64.
- 65.** Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009 Oct;15(7):437-53.
- 66.** Letra A, Menezes R, Govil M, Fonseca RF, McHenry T, Granjeiro JM, Castilla EE, Orioli IM, Marazita ML, Vieira AR. Follow-up association studies of chromosome region 9q and nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet A.* 2010 Jul;152A(7):1701-10.
- 67.** 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.

- 68.** 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*. 2018 Sep 17;33(3):195-202.
- 69.** 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. *Oral Dis*. 2019 Sep;25(6):1492-1501..
- 70.** Weinberg SM, Neiswanger K, Martin RA, Mooney MP, Kane AA, Wenger SL, et al. The Pittsburgh Oral- Facial Cleft Study: expanding the cleft phenotype. Background and justification. *Cleft Palate Craniofac J* 2006;43:7–20.
- 71.** Zhu JL, Basso O, Hasle H, Winther JF, Olsen JH, Olsen J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nation wide study in Denmark. *Br J Cancer*. 2002;87:524-528.
- 72.** Yildirim M, Seymen F, Deeley K, Cooper ME, Vieira AR. Defining predictors of cleft lip and palate risk. *J Dent Res*. 2012;91(6):556-561.
- 73.** Baccetti T. A controlled study of associated dental anomalies. *Angle Orthod*. 1998;68:267-274.
- 74.** Suprabha BS, Sumanth KN, Boaz K, George T. An unusual case of non-syndromic occurrence of multiple dental anomalies. *Indian J Dent Res*. 2009;20:385-387.
-

*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 I
RESPOSTA AOS COMENTÁRIOS DA BANCA DE QUALIFICAÇÃO:

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

- 1) Observar com maior atenção a prevalência dos defeitos de esmalte nos indivíduos nascidos com fissuras pós-forame, visto que a experiência clínica da mesma sugere que esses indivíduos possuem uma frequência menor de DDE.

RESPOSTA: Foram adicionadas nas Considerações Gerais algumas informações que concordam com esta observação. De fato, em nosso estudo, foi possível encontrar uma frequência menor de defeitos de esmalte nesses pacientes, indo de contra os achados de Rittler et al. (2011) e Mossey & Modell (2012), onde observou-se que a fenda palatina isolada apresentou a maior prevalência de deformidades associadas.

- 2) Sugestão: Como os mecanismos que levam a formação das hipoplasias e hipomineralizações são distintos, possivelmente um polimorfismo em MMP2 pode provocar alterações também diferentes. Seria interessante, então, em estudos futuros, inserir os pacientes com elementos afetados por hipoplasias ou hipomineralizações em grupos distintos, ou até mesmo entre aqueles com hipomineralizações (que são mais frequentes) mais leves x mais severas. Seria interessante também adicionar mais variáveis como: alimentação; local de nascimento; área geográfica em que reside; consumo de água fluoretada.

RESPOSTA: Esta é uma sugestão muito boa para estudos futuros, no entanto, precisaríamos de uma amostra maior de pacientes com genótipos analisados, já que um mesmo indivíduo pode apresentar dentes com ambos os defeitos, o que exigiria tempo de coleta também maior do que o que temos em um mestrado. Outras variáveis como local de nascimento e área geográfica seriam estudadas, no entanto, devido à pandemia do Covid-19, não foi possível realizar o recall dos pacientes. Essas sugestões foram inseridas na seção Considerações.

- 3) Melhorar a descrição da lesão hipoplásica.

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

Comentários/Sugestões Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

1) Na apresentação, organizar os slides de cima para baixo e da esquerda para direita para ser mais didático.

RESPOSTA: As sugestões foram acatadas e os slides para a apresentação da defesa foram reorganizados.

2) Organizar os dados em quartis para transformar a variável contínua em categórica e permitir comparação entre elas para encontrar uma correlação mais favorável.

RESPOSTA: Apesar de o índice DDE Modificado ser uma variável categórica por propor códigos para cada defeito, este não possui uma lógica ordinal, visto que não há uma progressividade real entre um código e outro em relação à extensão do defeito, uma vez que o código 1 (opacidade demarcada) pode ter uma extensão maior do que o código 3 (hipoplasia). Portanto, não foi possível realizar essa transformação, pois a correlação ainda assim seria baixa. Vale lembrar que o objetivo principal deste trabalho é o de mensurar com precisão a extensão dos defeitos, possível apenas por meio do uso de uma variável contínua, fornecendo assim maiores detalhes.

3) Em estudos futuros seria interessante avaliar a associação entre MMP2 e a doença periodontal.

RESPOSTA: Sugestão muito interessante e adicionada na seção Considerações Gerais.

4) Nos resultados, não colocar nas tabelas o número do elemento, mas o seu nome por extenso, assim como retirar as siglas das imagens.

RESPOSTA: Sugestões acatadas e alterações realizadas.

Comentários/Sugestões Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

1) Deixar claro em todo o trabalho que são amostras individuais de saliva.

RESPOSTA: Realizamos esta alteração em todo o trabalho.

2) Considerar o local em que reside cada paciente para diagnóstico diferencial entre fluorose e opacidade. Revisar os casos com auxílio de estudos de mapeamento que levem em consideração a exposição à água fluoretada.

RESPOSTA: Como exposto anteriormente, essa seria uma variável que iríamos abordar em um segundo momento, no entanto, diante da pandemia da Covid-19, não foi possível obter esses dados por meio dos prontuários, uma vez que ficamos impossibilitados de ir ao setor. O diagnóstico diferencial, então, foi realizado a partir do estabelecimento de diferenças referentes à simetria (simétricas ou assimétricas) e aos padrões das lesões presentes. Em caso de dúvida, uma profissional com mais de 20 anos de experiência na área foi consultada.

3) Fornecer o valor do índice Kappa em relação ao Índice DDE Modificado utilizado após calibração.

RESPOSTA: Para a concordância intraexaminador, foi realizado previamente à coleta de dados o Índice Kappa ($k = 0,88$) para as variáveis categóricas e o Coeficiente de Correlação Intraclassa (ICC = 0,99) para as variáveis contínuas. Essas informações foram adicionadas na seção Materiais e Métodos.

4) Seria interessante informar os percentis da idade, uma vez que com o passar dos anos os defeitos no terço incisal tendem a diminuir.

RESPOSTA: A média da variável idade dos pacientes avaliados foi de 13,13 (variando de 6 a 35 anos). Um gráfico representativo da frequência das idades foi adicionado na seção Resultados para comprovar que os percentis variaram de 9.0 a 15.0, portanto, esse fator não influenciou em nossos resultados.

5) Melhorar o último parágrafo das Considerações Gerais, dando ênfase na importância clínica, com suas palavras.

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

APÊNDICE II

FICHA DE AVALIAÇÃO

- Nome/CAD:

- Sexo:

- Idade:

- Cidade de origem:

- Tipo de Fissura: Pré-forame () Direita () Esquerda () Bilateral
 Transforame () Direita () Esquerda () Bilateral
 Pós-forame ()

- Presença de DDE fora da área da fissura: () Sim () Não
 Se sim, em quais elementos? ()12 ()11 ()21 ()22

- Classificação dos defeitos de acordo com o Índice DDE Modificado:

12	() 0	() 1	() 2	() 3	() 4	() 5	() 6	() 7	() 8	() 9	() 10
11	() 0	() 1	() 2	() 3	() 4	() 5	() 6	() 7	() 8	() 9	() 10
21	() 0	() 1	() 2	() 3	() 4	() 5	() 6	() 7	() 8	() 9	() 10
22	() 0	() 1	() 2	() 3	() 4	() 5	() 6	() 7	() 8	() 9	() 10

*9: Não foi possível observar (Mesializado/Distalizado);Elemento ausente/ectópico

*10: Destruido por cárie

- Erupção da coroa:

12	11	21	22
1/3 ()	1/3 ()	1/3 ()	1/3 ()
2/3 ()	2/3 ()	2/3 ()	2/3 ()
3/3 ()	3/3 ()	3/3 ()	3/3 ()
Ausente ()	Ausente ()	Ausente ()	Ausente ()

- Localização na superfície:

12	11	21	22
Cervical ()	Cervical ()	Cervical ()	Cervical ()
Médio ()	Médio ()	Médio ()	Médio ()
Incisal ()	Incisal ()	Incisal ()	Incisal ()
N.D.N ()	N.D.N ()	N.D.N ()	N.D.N ()

- Percentual relativo da área do elemento afetada pelo defeito:

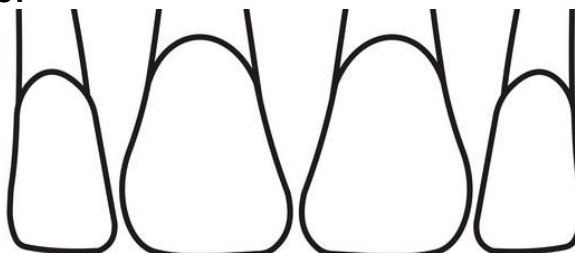
12:

11:

21:

22:

- Formato do defeito:



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 **“DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE NOS INCISIVOS MAXILARES EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIAL E/OU PALATINA”** que está sendo desenvolvida por Juliane Rolim de Lavôr, 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, o tipo, a localização, as características, a severidade e a extensão dos defeitos do esmalte encontrados nos incisivos maxilares em pacientes com fissuras labiopalatinas, atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley, UFPB, em João Pessoa, Paraíba. Tem como justificativa a necessidade de estudos populacionais maiores que investiguem a associação entre fissuras e alterações do esmalte, a fim de esclarecer essa interatividade e contribuindo para o desenvolvimento de projetos preventivos e na melhoria da qualidade de vida desses pacientes. Sua participação neste trabalho consiste em responder a um formulário fornecendo alguns dados demográficos como sexo, idade e região geográfica a qual pertence, bem como permitir e colaborar na tomada de fotografias intra-orais. 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 formulários serão depositados na sua presença, em envelope único. Já o TCLE será recolhido em outro envelope, separado dos formulários. Ainda assim, caso venha a sentir qualquer constrangimento ou desconforto diante das perguntas ou fotografias, a mesma será imediatamente interrompida.

Apesar da existência de riscos, os benefícios oferecidos serão superiores. Os resultados dessa pesquisa possibilitarão obter dados mais precisos a respeito da correlação entre as fissuras orofaciais e defeitos de desenvolvimento do esmalte dentário. 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, mesmo após o encerramento do estudo, à sua disposição para prestar informações sobre a frequência de alterações do esmalte em pacientes com fissura labial e/ou palatina. Mesmo após o encerramento do estudo a equipe da pesquisa prestará 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.

Este documento foi elaborado em duas vias de igual conteúdo, que deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo participante da pesquisa, pela aluna pesquisadora e pela pesquisadora responsável. Você receberá uma das vias e a outra ficará arquivada com os responsáveis pela pesquisa.

Não é previsto que você tenha nenhuma despesa na participação nesta pesquisa ou em virtude da mesma, todavia, caso você venha a ter qualquer despesa 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.

Declaramos que o desenvolvimento desta pesquisa seguirá rigorosamente todas as exigências preconizadas pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, 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, Juliane Rolim de Lavôr, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

APÊNDICE IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Após ter sido informado sobre a finalidade da pesquisa “**DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE NOS INCISIVOS MAXILARES EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIAL E/OU PALATINA**” 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:

Juliane Rolim de Lavôr
Endereço: Pós-Graduação em Odontologia
Campus I, UFPB, João Pessoa – PB
Telefone: (83) 98826.6994
e-mail da pesquisadora: julianerolim@gmail.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 V
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: **DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE NOS INCISIVOS MAXILARES EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIAL E/OU PALATINA**. Seus pais permitiram que você participasse.

Com esta pesquisa queremos que colabore conosco permitindo seja feita a tomada de fotografias intra-orais.

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) 98826-6994 ou pelo e-mail julianerolim@gmail.com da pesquisadora Juliane Rolim de Lavôr. 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 **DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE NOS INCISIVOS MAXILARES EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIAL E/OU PALATINA**. 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 a pesquisadora Juliane Rolim de Lavôr. Telefone: (83) 98826-6994 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

ANEXO I

Artigo Publicado – PLoS One

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244506>

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Maxillary incisor enamel defects in individuals born with cleft lip/palate

Juliane R. Lavôr¹, Rosa Helena W. Lacerda¹, Adriana Modesto², Alexandre R. Vieira^{1,2*}

1 Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, **2** Departments of Pediatric Dentistry and Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America

* arv11@pitt.edu



Abstract

Cleft lip with or without cleft palate (CLP) is considered the most frequent congenital malformations of the head and neck, with cleft individuals exhibiting more chances of presenting abnormalities such as developmental defects of enamel (DDE). Matrix metalloproteinase 2 (*MMP2*) is a membrane-bound protein with collagen-degrading ability and has important roles in tooth formation and mineralization. The aim of this study was to evaluate the frequency, location, severity and extent of DDE found in the maxillary incisors for groups of individuals born with CLP, as well as understanding their relationship with the cleft side. Besides, this study addresses the hypothesis that DDE can be influenced by variation in the *MMP2* genes (rs9923304). Individual samples, clinical history, intraoral photographs and panoramic radiographs were obtained from 233 patients under treatment at the Cleft Lip and Palate Service of the University Hospital Lauro Wanderley at the Federal University of Paraíba. Digital images were examined by the same evaluator using the Classification of Defects According to the Modified DDE Index, and then loaded into the Image Tool software, where two measurements were made: total area of the buccal surface (SA) and the area of the DDE (DA), obtaining the percentage of the surface area affected (%SAD) (ICC = 0.99). Genomic DNA was extracted from saliva samples from 124 participants. Genotyping was carried out using TaqMan chemistry for one marker in *MMP2* (rs9923304). Statistical analyses were performed by The Jamovi Project software. The Shapiro-Wilk test was

OPEN ACCESS

Citation: Lavôr JR, Lacerda RHW, Modesto A, Vieira AR (2020) Maxillary incisor enamel defects in individuals born with cleft lip/palate. PLoS ONE 15(12): e0244506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244506>

Editor: JJ Gray, Jr., Ohio State University, UNITED STATES

Received: October 12, 2020

Accepted: December 10, 2020

Published: December 28, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author

ANEXO II

REBUTTAL LETTER TO EDITOR (1ª REVISÃO)

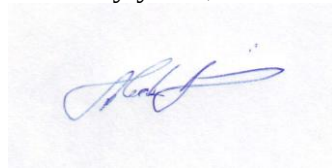
October 12, 2020

TO Editor PLoS One:

Dear Madam/Sir:

We are resubmitting our original work entitled “**Maxillary Incisor Enamel Defects in Individuals Born with Cleft Lip/Palate**” for further appreciation and possible publication in PLoS One. We have devised a new approach to evaluate enamel defects and show for the first time how severity differs depending on the severity of the cleft. We are looking forward to having our work favorably reviewed and considered suitable now for publication.

Sincerely yours,



Alexandre R. Vieira, MS, DDS, PhD
Full Professor of Oral Biology, Pediatric Dentistry, Human Genetics, and
Anthropology
Director of Clinical Research
Director of Student Research
School of Dental Medicine
412 Salk Pavilion
335 Sutherland Street
University of Pittsburgh
Pittsburgh, PA 15261
Phone # 412 383-8972
FAX # 412 624-3080
Email: arv11@pitt.edu

Point-by-point answers to the critique are below. All changes in the text are marked in yellow:

Reviewer #1: Thank you for your submission on the important topic. In many areas in the paper there are sentences that are not clear, so some rewriting is required. There are two sets of Tables 1 and 2. I shall make comments and suggestions page by page

Abstract - this appears long, however i do not have a word count
second sentence line 5 - 'has', not 'have'

RESPONSE: We made the grammatical correction asked.

3rd last line page 1 - 'individuals with BCLP were 7.85..'

RESPONSE: We made the requested correction.

Introduction

3rd para

line 3 - There is, however, a gap

line 4 - the reason 'why' there is..

5th para

'enamel is softer and more porous'

RESPONSE: We made these corrections as requested.

The presence of a DDE only potentiates existing increased caries, it doesnt create caries risk i itself - this needs to be made clear

RESPONSE: The sentence does not state DDE creates risk, but rather that its presence is a risk indicator. The sentence right before mentions “facilitating the development.” We are not making a claim of causal relationship.

It would be preferential to use maxillary rather than upper

RESPONSE: We made these changes as requested.

6th para 'It is' rather than 'Which are'
compare nor compared

RESPONSE: We changed to “it is” as requested. Since the studies are published, we left the statement that in them it was compared.

7th para

line 6 - has not have

there is varied use of MMP2 in italics and not

RESPONSE: We made the correction. MMP2 appears in italic fonts when it refers to the gene and non-italic when it refers to the protein.

8th para - the verb tenses vary - i prefer past

RESPONSE: We made the correction to the past tense as suggested.

M&M

It is unclear how the sample size was determined - was this a convenience sample that was a time limited recruitment process?

para 1 - last word study not report

RESPONSE: The sample as determined by using all the available material. We added a clarification as suggested. We also made the correction on the style requested.

para 2

line 4 - surfaces not faces

RESPONSE: We made the correction as requested.

stage 1

more details needed for ring flash used

What type of cheek retractors were used? were they sterilised between patients and how?

When was the quality of the image assessed to determine if it needed to be retaken?

What metrics were used to assess quality?

RESPONSE: We added the details as suggested.

stage 2

Image assessment - after the calibration exercise, were any images assessed by a second examiner to determine inter-examiner agreement and validate continuing correlation with the reference standard?

RESPONSE: No.

para 2

'of participants to any of the ..'

inability instead of impossibility

RESPONSE: We made the corrections as requested.

Table1 (in M&M) - this isn't the modified DDE index anymore as you have modified it. I suggest creating a name for your index

RESPONSE: We incorporated the suggestion as stated.

Stage 3

You mention 'total area' was measured - how was this achieved without some sort of measurement reference in the images? without a reference you cannot measure area, only proportion of area

RESPONSE: That is what we meant. We clarified the text to address the point raised.

para 2 - delete 'approximately 10% of the sample' - this is superfluous

RESPONSE: It was deleted as requested.

Results

the first paragraph should be moved down one paragraph, it is out of order

RESPONSE: We made the suggested change.

Table 1 (results) and Table 2 (results) should be deleted and incorporated into the text (most of the information is there already)

RESPONSE: We deleted the tables as suggested.

CLP has already been defined

RESPONSE: We deleted the definition as suggested.

Table 3 would benefit by having statistical analysis results added

RESPONSE: We added the p-values as requested.

I suggest using the term 'teeth' rather than 'elements' throughout the text

RESPONSE: We made the requested change.

in para starting 'As expected' - delete 'as expected' - this is results not discussion

RESPONSE: It was deleted as suggested.

In table 4 - no need for % with the numbers as the unit is %SAD

RESPONSE: We made the correction as suggested.

in para below Table 4 - fourth line - delete 'counting' and 'to find'. Also, maxillary rather than 'upper'

last sentence before Table 5 - 'between the lateral incisor and canine'

RESPONSE: We made the suggested corrections.

Tables 5 and 6 - no need for p= in the table as header is 'p value'

RESPONSE: We made the corrections as suggested.

Para after table 5 - 'enamel defects in all thirds' (same for following paragraph)

RESPONSE: We made the suggested correction.

Table 6 - where is code 9 data?

RESPONSE: We added the missing information as requested.

Discussion - first para - primary not deciduous

RESPONSE: We made the correction as requested.

para 2 - there should be a better word than tactility

RESPONSE: We changed the word as requested.

At this stage you should discuss that only 1 examiner/rater was used and the limitations this places on the validity of the results

RESPONSE: We added the comment in the discussion as requested.

Para 4 - the sentence starting 'however, the first can reach..' is unclear, especially the reference to 'one third'

RESPONSE: We rewrote the sentence as suggested.

para 6- delete 'studies have demonstrated' and primary teeth not deciduous

RESPONSE: We made the suggested corrections.

para 8 - sentence starting 'regarding studies on dental...' is unclear and needs rewriting
In the sentence starting one hypothesis - rehabilitation and risk is mentioned - these has no context at present
final sentence - add 'for' after necessary

RESPONSE: We made the corrections as suggested.

there is some variability in the format of the references - e.g., some have months and issue numbers, some don't

RESPONSE: We removed months as suggested.

Reviewer #2: - This manuscript describes the results of a cohort cross-sectional study performed on 233 individuals born with cleft lip and/or palate. The authors aimed to

evaluate the frequency, location, severity, and extent of developmental enamel defects found in the maxillary incisors as well as understand their relationship with the cleft side. Furthermore, the authors addressed the hypothesis that developmental enamel defects can be influenced by variation in the MMP2 genes (rs9923304). A better understanding of the association between oral clefts and developmental enamel defects will inform dental practitioners in preventing, diagnosing, and treating dental complications that appear to be inevitable consequences of oral clefts.

- As a reviewer with expertise in the field of dental anomalies among individuals with oral clefts, I offer the following perspectives and suggestions that should be considered in the revision of this manuscript.

Introduction:

- Last paragraph: "Thus, the aim of this study was to investigate (the) characteristics of enamel defects and individuals born with oral clefts. " The word (the) is missing.

RESPONSE: We made the correction requested.

Methods:

- The study offers a clear description of the study objectives, outcomes, outcome assessment methods, and exclusion criteria. The study describes examiners' calibration and reports the Intraclass Correlation Coefficient.

- First paragraph: "233 individuals born with CLP were evaluated, with (a) mean age of 13.13 years (ranging from 6 to 35 years-old)." The word (a) is missing.

RESPONSE; We made the correction.

- Stage 1 – Intraoral photographs: "After (an) initial examination, the surfaces of the teeth were cleaned and dried and the appearance of the enamel was recorded using a digital camera (Canon EOS Rebel T5i, Ohta-ku, Tokyo, Japan), with standard lens (Canon EF 100 mm macro lens) and settings (ISO 6400, speed 1/125 and aperture F/25), always under the same flash (Macro Ring Flash Sigma) and natural lighting conditions. " The word (an) is missing.

RESPONSE: We made the correction requested.

- While the authors talk about syndromic/non-syndromic patterns of oral clefts in their introduction, they don't mention the syndromic status of their participants in the methods section.

RESPONSE: We added the information in the first paragraph of the methods section to address this comment.

- Furthermore, the authors need to shed the light on the history of surgical and orthodontic treatment among their participants as such treatment may have an effect on the development of enamel defects among individuals with oral clefts.

1. Carpentier, S, Ghijselings, E, Schoenaers, J, Carels, C, Verdonck, A. 2014. Enamel defects on the maxillary premolars in patients with cleft lip and/or palate: a retrospective case-control study. *Eur Arch Paediatr Dent*. 15(3):159–165.
2. Korolenkova, MV, Starikova, NV, Udalova, NV. 2019. The role of external aetiological factors in dental anomalies in non-syndromic cleft lip and palate patients. *Eur Arch Paediatr Dent*. 20(2):105–111.
3. Marzouk T, Alves IL, Wong CL, DeLucia L, McKinney CM, Pendleton C, Howe BJ, Marazita ML, Peter TK, Kopycka-Kedzierawski DT, Morrison CS, Malmstrom H, Wang H, Shope ET. Association between Dental Anomalies and Orofacial Clefts: A Meta-analysis. *JDR Clin Trans Res*. 2020 Oct 8:2380084420964795. DOI: 10.1177/2380084420964795. Epub ahead of print. PMID: 33030085.

RESPONSE: We added a comment regarding surgical and orthodontic treatment as suggested in the first paragraph. Photographic material is obtained prior to orthodontic treatment and many years after corrective cleft surgery for the lip. The references the reviewer listed also include changes in other teeth not studied by us.

- The examiner's calibration (Stage 2 – Determination of cleft and DDE phenotypes) is confusing to the reader. According to the study, the initial examination was performed by R.H.W.L and then the study mentions " To eliminate inter-examiner differences, intraoral photographs of all participants were examined by the same evaluator (J.R.L)". What do the authors mean by the word "same"? Who performed the primary evaluation?

RESPONSE: We edited the text to clarify this concern. R.H.W.L. did all photographic documentation and J.R.L. did all the measurements in the existing photographs.

- Stage 4 – DNA samples and genotyping: "A single nucleotide polymorphisms (SNP) in the MMP2 gene (rs9923304) was selected, considering disequilibrium linkage and gene structure." Remove the letter (s) from "A single nucleotide polymorphism(s)"

RESPONSE: We made the correction requested.

- Stage 5 – Statistical analysis: "In order to verify (the) normal distribution of the numerical variables, the Shapiro-Wilk test was applied, followed by (an) analysis of variance with the Student's t-test and the Mann-Whitney test, in the cases of normal and non-normal distribution, respectively." The word (the) and (an) are missing.

RESPONSE: We made the corrections described.

- As many clinicians may not be familiar with the "cohort cross-sectional study design", it may be useful for the authors to report the limitations of such design. Refer to (Hudson JI, Pope HG Jr, Glynn RJ. The cross-sectional cohort study: an underutilized design. Epidemiology. 2005 May;16(3):355-9. DOI: 10.1097/01.ede.0000158224.50593.e3. PMID: 15824552)

RESPONSE: We added the limitations as suggested in the discussion section.

- While the authors reported that the number of teeth and not individuals were used for outcome assessment due to the small sample size available. It should be highlighted that one of the limitations of the present study is the presence of a limited number of participants in the unilateral and bilateral cleft lip groups. (n=19 uCL; n=8 bCL)

RESPONSE: We added this point as well in the discussion section.

- The authors should try to offer an explanation of why the means and medians of the percentage of the surface area affected by the defect of the elements inside the cleft palate area and outside the bilateral cleft lip area were zero.

RESPONSE: We added the requested explanation as a note to the table.

Results:

- The results section is confusing to the reader who seeks more definitive conclusions.

RESPONSE: The other reviewer suggested some edits that may help with this concern.

Discussion

- The discussion section is well written.

- 8th paragraph: "Regarding studies on dental anomalies, Wangsrimongkol et al. (2013) found that the most prevalent missing teeth (was) found in 70.7% of subjects in BCLP group [43]." Replace (was) with (were).

RESPONSE: We made the correction suggested.

- While the authors highlighted the significance of genetic factors as a possible cause for the development of enamel defects among individuals with oral clefts, it is important to point out that previous orthodontic and/or surgical treatment can also contribute.

1. Carpentier, S, Ghijselings, E, Schoenaers, J, Carels, C, Verdonck, A. 2014. Enamel defects on the maxillary premolars in patients with cleft lip and/or palate: a retrospective case-control study. *Eur Arch Paediatr Dent*. 15(3):159–165.
2. Korolenkova, MV, Starikova, NV, Udalova, NV. 2019. The role of external aetiological factors in dental anomalies in non-syndromic cleft lip and palate patients. *Eur Arch Paediatr Dent*. 20(2):105–111.
3. Marzouk T, Alves IL, Wong CL, DeLucia L, McKinney CM, Pendleton C, Howe BJ, Marazita ML, Peter TK, Kopycka-Kedzierawski DT, Morrison CS, Malmstrom H, Wang H, Shope ET. Association between Dental Anomalies and Orofacial Clefts: A Meta-analysis. *JDR Clin Trans Res*. 2020 Oct 8:2380084420964795. DOI: 10.1177/2380084420964795. Epub ahead of print. PMID: 33030085.

RESPONSE: We added a comment in the discussion and these references as suggested.

ANEXO III

REBUTTAL LETTER TO EDITOR (2ª REVISÃO)

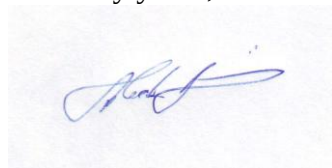
December 9, 2020

TO Editor PLoS One:

Dear Madam/Sir:

We have taken into consideration all the latest review comments and are resubmitting our original work entitled “**Maxillary Incisor Enamel Defects in Individuals Born with Cleft Lip/Palate**” for further appreciation and possible publication in PLoS One. We have devised a new approach to evaluate enamel defects and show for the first time how severity differs depending on the severity of the cleft. We are looking forward to having our work favorably reviewed and considered suitable now for publication.

Sincerely yours,



Alexandre R. Vieira, MS, DDS, PhD
Full Professor of Oral Biology, Pediatric Dentistry, Human Genetics, and
Anthropology
Director of Clinical Research
Director of Student Research
School of Dental Medicine
412 Salk Pavilion
335 Sutherland Street
University of Pittsburgh
Pittsburgh, PA 15261
Phone # 412 383-8972
FAX # 412 624-3080
Email: arv11@pitt.edu

Point-by-point answers to the critique are below. All changes in the text are marked in yellow:

Reviewer #1: Thank you for your responses, i believe you have addressed my comments adequately - you will probably find some minor amendments to the written language at final editing

Reviewer #2: Thank you to the authors for revising and resubmitting the manuscript on this important topic. There are a few sentences where rewriting could be beneficial.

Materials and Methods

The last sentence in the first paragraph "Photographic material was obtained prior orthodontic treatment and several years after surgical repair of the lip occurred."

- Please consider rephrasing to "Photographic material was obtained prior [to] orthodontic treatment and several years after [surgical lip repair]" for clarity.

RESPONSE: We rewrote the text as suggested.

The last sentence in the second paragraph "The exclusion criteria included labial surfaces of permanent central and lateral incisors not accessible for proper examination (presence of restorations, orthodontic appliances or crowns) or individuals with [bad] quality intraoral photographs."

- Please consider changing [bad] to [low]

RESPONSE: We made the change as suggested.

Stage 1 – Intraoral photographs

"Cheeks and lips were retracted using [dental cheek lip retractor mouth opener T-shape], which was sterilized prior [to] each use."

-Please consider changing [dental cheek lip retractor mouth opener T-shape] to [T-Shape intraoral cheek lip retractor]

- Please consider adding [to]

RESPONSE: We made the suggested changes.

"When not acceptable because it was not in focused according to the naked eye, the photograph was repeated."

- Please consider rephrasing to [When a photograph was not acceptable because of being out of focus, it was repeated]

RESPONSE: We made the suggested change.

Stage 2 – Determination of cleft and DDE phenotypes

Second to the last sentence in the second paragraph

"A new code (9) was added due to the inability of observing defects in some teeth, especially those adjacent to the cleft, where the tooth is often distalized, mesialized, ectopic, not erupted or absent"

- Please change [inability] to [inability]

RESPONSE: We made the correction on the typo.

"Table 1. Classification of defects that includes a modification of the modified DDE index, which [in] the addition of code 9."

- Please consider changing [in] to [includes]

RESPONSE: We made the correction of the typo.

"Table 3. Note: *No cases with bilateral cleft lip only had teeth we considered to be outside the cleft [área], since we only evaluated maxillary incisors. Similarly, no cleft palate only cases were affecting maxillary incisors."

- Please consider changing [área] to [area]

RESPONSE: We made the correction of the typo.

ANEXO IV
ANUÊNCIA DO LOCAL DO ESTUDO

TERMO DE ANUÊNCIA

Declaro para os devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado “DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE EM PACIENTES NASCIDOS COM FISSURAS LABIAL E/OU PALATINA”, sob a responsabilidade da pesquisadora Juliane Rolim de Lavôr, poderá ser desenvolvido no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba.

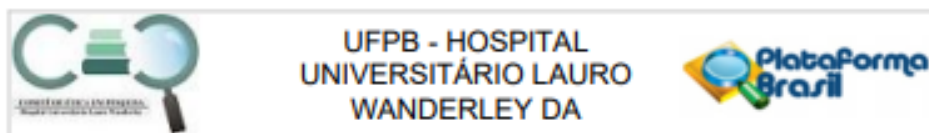
João Pessoa, 28 de Agosto de 2019.



Dr. Paulo Germano Cavalcanti Furtado
Chefe do Serviço de Fissuras labiopalatinas do
HULW/UFPB

ANEXO V

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:** JOÃO 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

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: comitedeetica.hulw2018@gmail.com

Página 02 de 07



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



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 datiloscópica 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:** JOÃO 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:** comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



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 APRECIÇÃO 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: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.445.829

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOÃO 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:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7984 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica.hulw2018@gmail.com

Página 57 de 57