

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

**ANOMALIAS DENTÁRIAS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS
COMO PREDITORES DO CRESCIMENTO MAXILO FACIAL EM
INDIVÍDUOS NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS**

ROSA HELENA WANDERLEY LACERDA

SAPIENTIA AEDIFICAT

2022

ROSA HELENA WANDERLEY LACERDA

**ANOMALIAS DENTÁRIAS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS
COMO PREDITORES DO CRESCIMENTO MAXILO FACIAL EM
INDIVÍDUOS NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS**

**DENTAL ANOMALIES AND GENETIC POLYMORPHISMS AS
PREDICTORS OF MAXILLO-FACIAL GROWTH IN INDIVIDUALS
BORN WITH CLEFT LIP AND PALATE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

João Pessoa

2022

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L131a Lacerda, Rosa Helena Wanderley.

Anomalias dentárias e polimorfismos genéticos como preditores do crescimento maxilo facial em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas / Rosa Helena Wanderley Lacerda. - João Pessoa, 2022.

164 f. : il.

Orientação: Alexandre Rezende Vieira.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Odontologia. 2. Fissura labial. 3. Fissura palatina. 4. Anomalias dentárias. 5. Desenvolvimento maxilofacial. I. Vieira, Alexandre Rezende. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314(043)

Elaborado por RUSTON SAMMEVILLE ALEXANDRE MARQUES DA SILVA -
CRB-15/386

Informações Complementares:

Título em outro Idioma: Dental anomalies and genetic polymorphisms as predictors of maxillo-facial growth in individuals born with cleft lip and palate.

Palavras-chave em outro Idioma: Cleft lip, cleft palate, maxillo-facial growth,

MMP2, GLI2, FGFR2, TGF α , dental anomalies

Área de concentração: Ciências odontológicas

Linha de Pesquisa: Fisiopatologia dos tecidos buco-maxilo-faciais

Banca examinadora: Examinador 1- Alexandre Rezende Vieira (Orientador, UFPB/ University of Pittsburgh); Examinador 2 - Ricardo Dias de Castro (UFPB); Examinador 3 - Terumi Okada Ozawa (USP); Examinador 4 -Nivaldo Alonso (USP/SP); Examinador 5- Rui Manoel Pereira (IMIP/PE).

Data de defesa: 05-09-2022

Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)

- ORCID: 0000-0003-0011-6487

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3814160380801379>

]



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



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE TESE DO DOUTORADO
NÚMERO DA DEFESA: 002
2022

Aos cinco dias do mês de setembro do ano de 2022, às 14:30 horas, no Auditório do Centro de Ciências da Saúde, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelas professores doutores: Alexandre Rezende Vieira (Orientador(a) e Presidente), Ricardo Dias de Castro (membro interno ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB), Terumi Okada Ozawa (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB), Nivaldo Alonso (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e Rui Manoel Pereira (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB), a fim de argüem a doutoranda Rosa Helena Wanderley Lacerda, com relação ao seu trabalho final de curso de doutorado (Tese), sob o título "Anomalias dentárias e polimorfismos genéticos como preditores do crescimento maxilo facial em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas". Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube a(o) candidata(o), na forma regimental, expor o tema de sua Tese, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionado pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito "Aprovado"; 2º Examinador (membro externo): Conceito "Aprovado"; 3º Examinador (membro externo): Conceito "Aprovado"; 4º Examinador (membro vinculado ao PPGO): Conceito "Aprovado" e 5º Examinador (Orientador(a) e presidente): Conceito "Aprovado". O que resultou em conceito final igual: "APROVADO", o que permite a(o) candidata(o) fazer jus ao título de Doutor em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação da(o) candidata(o) durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo presidente, pelos demais membros da banca e pela(o) candidata(o).

1º Examinador – Membro Externo

2º Examinador – Membro Externo

3º Examinador – Membro Externo

4º Examinador – Membro do PPGO

5º Examinador – Presidente

Candidata(o)

ROSA HELENA WANDERLEY LACERDA
ANOMALIAS DENTÁRIAS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO
PREDITORES DO CRESCIMENTO MAXILO FACIAL EM INDIVÍDUOS
NASCIDOS COM FISSURAS LABIOPALATINAS

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a Defesa de Tese apresentada em sessão pública no dia 05 de setembro de 2022 e atribuiu o conceito_____

Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira
Orientador - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Examinador – PPGO/UFPB

Prof. Dra Terumi Okada Ozawa
Examinador externo- HRAC- USP/Bauru

Prof. Dr. Nivaldo Alonso
Examinador externo- USP

Prof. Dr. Rui Manoel Pereira
Examinador externo- IMIP

DEDICATÓRIA

Dedico as crianças nascidas com fissuras labiopalatinas e seus familiares. Que a ciência possa, sempre, buscar respostas que venham tornar mais suave e eficiente a longa estrada da reabilitação...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir ser instrumento... e por me presentear com pessoas tão queridas e sentimentos tão nobres ao longo da minha trajetória.

Ao meu marido **Décio**, e meus filhos “**Decinho**” e “**Thata**” por serem meu porto seguro e maiores incentivadores. Pela compreensão da ausência, pelo apoio e carinho, amo vocês.

Ao meu orientador **Alexandre Vieira**, por me ensinar um olhar diferenciado e amplo sobre pesquisa, pela atenção, disponibilidade e amizade. Que possamos continuar desenvolvendo novas pesquisas, buscando respostas sobre esse tema que nos é tão caro, minha gratidão.

Aos minha mãe **Rosa Coeli** e minhas irmãs **Rosa Virgínia** e **Ana Rosa**, por sempre torcerem por mim, e, ao meu pai **José Carlos** (*in memorian*), meu carinho.

Ao **Dr. Paulo Germano Furtado**, inspiração de amor ao trabalho com fissuras labiopalatinas, sua dedicação e carinho nos enche de felicidade, o senhor é um grande exemplo, sou muito grata por poder tê-lo em minha vida.

A nossa “família-equipe” do Serviço de Fissuras Labiopalatinas, **Vítor, Danúbia, Christiana, André, Aline, Greice, Josy, Odílio, Lindalva, Lúcia, Clarissa e Poliana**, pela parceria, companheirismo e amizade, que possamos buscar juntos, sempre, o melhor para o tratamento das nossas crianças.

Ao professor **Ricardo Castro** e sua querida família, **Gisele, Laurinha e Cecília**, agradeço a parceria e acolhimento nos tempos de “Pitt”, foi muito bom conviver com sua adorável família.

À equipe da Universidade de Pittsburgh, em nome das queridas **Mariana, Kathleen** e **Elaine**, por todo apoio logístico, ensinamentos e amizade. Por me permitirem

trazer um sentimento de amizade e carinho na bagagem, espero poder revê-las em breve.

À equipe do “Vieira Lab” João Pessoa, **Ionária, Juliane, Júnior, Bianca e Alice**, foi muito bom trabalhar com vocês!!!

Aos queridos colegas da 1ª turma do doutorado da PPGO, **Camila, Cris, Charrira, Daniel, Débora, Débora Ellen, Eugênia, Fábio, Fernanda, Isis, James, Karla, Marcos Alexandre, Maria Luisa, Rebeca, Rejane, Sara e Suyene**, vocês tornaram toda caminhada mais leve e adorável.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO/UFPB), pela dedicação e desejo de partilhar, foi muito bom aprender com vocês.

A fundação Smile train, por tornar viável o tratamento ortodôntico dos pacientes atendidos no serviço de fissuras labiopalatinas do Hospital Lauro Wanderley/ UFPB e pelo suporte financeiro de parte desta pesquisa.

Agradeço à CAPES, à Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO/UFPB) pelo apoio recebido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, proveniente do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) e da fundação Smile Train através do grant 0190450.

EPÍGRAFE

*Pode se viver uma vida magnífica quando se sabe trabalhar e **amar**. Trabalhar por aquilo que se ama e **amar** aquilo em que se trabalha.*

Leon Tolstói

RESUMO

Introdução: Fissuras labiopalatinas são as anomalias congênitas mais comuns na face do ser humano. Apresentam etiologia multifatorial, poligênica, e que pode estar associada à fatores ambientais. O efeito iatrogênico do tratamento cirúrgico sobre o padrão de crescimento ósseo facial em pacientes portadores de fissuras labiopalatinas é bem estabelecido na literatura. Diversos estudos longitudinais evidenciaram que o fator de maior impacto nos resultados do tratamento cirúrgico está relacionado à experiência do cirurgião, no entanto, o registro de resultados que variam de excelentes à desfavoráveis, mesmo em cirurgias realizadas por cirurgiões experientes, traz à luz a necessidade de investigação de variáveis intrínsecas que podem estar associadas a estes resultados de tratamento. Neste estudo realizou-se a análise de polimorfismos genéticos e da frequência de anomalias dentárias. **Objetivo:** O objetivo do presente trabalho foi analisar o polimorfismo genético nos genes *MMP2*, *GLI2*, *TGFa* e *FGFR2* e a frequência de anomalias dentárias como preditores do resultado do crescimento maxilo facial em pacientes com fissura labial com ou sem fissura palatina. **Metodologia:** Foi realizado um estudo de coorte em 537 indivíduos nascidos com fissuras labial com e sem palatina, operados pelo mesmo cirurgião. Foram incluídos na amostra os indivíduos com idade de 7 a 14 anos de idade, com documentação radiográfica, modelos de gesso e documentação fotográfica, antes de qualquer intervenção ortodôntica/ortopédica e, excluídos casos síndrômicos ou que apresentassem fissuras incompletas ou microformas, totalizando 360 indivíduos. Como variável desfecho, o crescimento maxilo facial foi avaliado utilizando radiografia cefalométrica de perfil, por meio das medidas Wits e Násio perpendicular ao ponto A e, nos modelos de gesso, por meio dos índices oclusais. Como variáveis predictoras, foram avaliados os polimorfismos *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880 e rs2279741, *TGFa* rs2166975 e *FGFR2* rs11200014 e rs10736303 e frequência de anomalias dentárias (avaliação clínica, fotográfica e radiográfica). O tamanho inicial da fissura labial e palatina (em fotografias e modelos de gesso pré cirúrgicos), como preditor dos resultados de crescimento foi investigado como desfecho secundário. As variáveis idade de realização das cirurgias primárias (queiloplastia e palatoplastia), idade do indivíduo na data da coleta do exame, sexo, e lateralidade da fissura foram consideradas variáveis de confusão. **Análise estatística:** Foi

realizada análise estatística considerando-se intervalo de confiança de 95%. Os resultados de crescimento maxilo facial, com intervalo mínimo de 4 anos, foram avaliados por meio do teste Wilcoxon. As variáveis preditoras foram avaliadas em associação ou correlação com as variáveis desfecho por meio dos testes qui-quadrado, exato de Fisher, análise multivariada e análises de regressão linear e logística. A possível interação entre os SNPs avaliados foi estudada utilizando o teste do qui-quadrado. **Resultados:** Foi observada associação entre a frequência de anomalias dentárias e piores resultados de crescimento maxilo facial na amostra total ($p < 0,0001$), nos casos nascidos com fissuras labiopalatinas unilaterais ($p < 0,0001$), e nos casos nascidos com fissuras bilaterais ($p < 0,0001$). Nas fissuras labiais unilaterais, os resultados de crescimento maxilo facial foram associados à agenesia dentária ($p = 0,03$); nas fissuras labiopalatinas unilaterais, à agenesia dentária ($p = 0,03$), anomalias de estrutura do esmalte ($p < 0,0001$), e anomalias de forma ($p < 0,0001$) e, nas fissuras labiopalatinas bilaterais, os resultados de crescimento apresentaram associação com as anomalias de esmalte dentário ($p = 0,02$), anomalias de erupção ($p = 0,04$), e anomalias de forma ($p = 0,01$). Houve associação entre o polimorfismo no *MMP2* rs9923304 e o crescimento maxilo facial ($p < 0,0001$). Indivíduos com a variante rara T apresentaram 4.5 vezes de chance aumentada para retrognatismo maxilar e necessidade de cirurgia ortognática. Observou-se também associação do polimorfismo no *GLI2* rs3738880 e os resultados de crescimento maxilar em indivíduos nascidos com fissura labiopalatina unilateral ($p = 0,02$), com o risco aumentado de 1,43 vezes para piores prognósticos de crescimento quando o alelo raro “G” está presente. Foi observada interação entre o *MMP2* rs9923304 e o *GLI2* rs3738880, quando indivíduos são homozigotos raros para ambos os SNPs, comparados com indivíduos sem nenhuma cópia do alelo raro, a chance de hipoplasia maxilar aumenta em 78 vezes ($p < 0,0001$). *TGFa* rs2166975 apresentou associação com o posicionamento maxilar em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas unilaterais ($p = 0,004$). Já o *FGFR2* rs11200014 apresentou associação com o posicionamento maxilar na amostra total ($p = 0,005$), sem preferência por nenhum tipo específico de fissura. As variáveis relacionadas à gravidade da fissura e data de submissão das cirurgias não apresentaram associação com as variáveis relacionadas ao crescimento maxilo facial. **Conclusões:** *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880, *TGFa* rs2166975 e *FGFR2*

rs2166975, bem como a presença de anomalias dentárias, podem ser utilizadas como variáveis que predizem a tendência de crescimento maxilo facial.

Palavras-chave: Fissura palatina; Fenda labial; anomalias dentárias; desenvolvimento maxilofacial; polimorfismo de nucleotídeo único, *MMP2*, *TGFa*, *GLI2*, *FGFR2*.

Palavras-chave: Fissura palatina; Fenda labial; anomalias dentárias; desenvolvimento maxilofacial; polimorfismo de nucleotídeo único, *MMP2*, *TGFa*, *GLI2*, *FGFR2*.

ABSTRACT

Introduction: Cleft lip and palate is the most common congenital anomaly in the human face. Most cases of cleft lip and palate have a multifactorial, polygenic etiology, which may be associated with environmental factors. The effect of surgical treatment on the facial bone growth pattern in patients with cleft lip and palate is well established in the literature. Several longitudinal studies have shown that the factor with the greatest impact on the results of surgical treatment is related to the surgeon's experience, however, the record of results that vary from excellent to unfavorable, even in surgeries performed by experienced surgeons, brings to light the need for investigating intrinsic variables that may be related to these treatment outcomes. In this study, the intrinsic factors studied included genetic polymorphisms and the frequency of dental anomalies. **Objective:** The aim of this study was to analyze genetic variation in *MMP2*, *GLI2*, *TGFA*, and *FGFR2* and the frequency of dental anomalies as predictors of maxillofacial growth in patients born with cleft lip with or without cleft palate. **Method:** A cohort of 537 individuals born with cleft lip and palate, operated on by the same surgeon, was studied. Individuals between 7 and 14 years of age, with radiographic documentation, dental casts, and photographic documentation, before any orthodontic/orthopedic intervention, were included in the sample, and syndromic cases or those with incomplete clefts or microforms were excluded, totaling 360 individuals. As an outcome variable, maxillofacial growth was evaluated using lateral cephalometric radiography, using Wits and Nasion measurements perpendicular to point A and, in dental casts, using occlusal scores. As predictor variables, the polymorphisms *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880 and rs2279741, *TGFA* rs2166975, and *FGFR2* rs11200014 and rs10736303, and the frequency of dental anomalies (clinical, photographic and radiographic evaluation) were evaluated. Analysis of initial cleft lip and palate size (in pre-surgical photographs and dental casts) as a predictor of growth outcomes was investigated as a secondary outcome. The variables age at which the primary surgeries were performed (cheiloplasty and palatoplasty) and the individual's age on the date of examination, sex and, laterality of the cleft were considered confounding variables. **Statistical analysis:** Statistical analysis was performed considering a confidence interval of 95%. The results of maxillofacial growth, with a

minimum of 4 years, were evaluated using the Wilcoxon test. The predictive variables were analyzed in association or correlation with outcome variables using chi-square test, multivariate analysis, logistic and linear regression. The possible interaction between the SNPs was tested using chi-square. **Results:** An association was found between the frequency of dental anomalies and the results of maxillofacial growth in the total sample ($p < 0.0001$). Maxillofacial growth was associated with dental anomalies in individuals born with unilateral cleft lip and palate ($p < 0.0001$), and in cases born with bilateral cleft lip and palate ($p < 0.0001$). Maxillofacial growth was associated in cases born with unilateral cleft lip with tooth agenesis ($p = 0.03$). In cases born with unilateral cleft lip and palate, associations between maxillofacial growth and tooth agenesis ($p = 0.03$), enamel structural anomalies ($p < 0.0001$), and shape anomalies ($p < 0.0001$) were found. In cases born with bilateral clefts, maxillofacial growth was associated with enamel structural anomalies ($p = 0.02$), eruptive anomalies ($p = 0.04$), and shape anomalies ($p = 0.01$). We found an association between *MMP2* rs9923304 and maxillofacial growth ($p < 0.0001$). Individuals with the rare T variant had 4.5 times increased chance for maxillary retrognathism and the need for orthognathic surgery. There was also an association between *GLI2* rs3738880 and maxillary growth outcomes in individuals born with unilateral cleft lip and palate ($p = 0.02$), with an increased risk of 1.43 times for worse growth prognoses when the rare allele G is present. Statistical evidence for interaction between *MMP2* rs9923304 and *GLI2* rs3738880 was observed in individuals with two copies of rare alleles in both SNPs compared to individuals with no copies of rare alleles, with the chance of maxillary retroposition increased by 78 times ($p < 0.0001$). *TGFa* rs2166975 was associated with maxillary retroposition in individuals born with unilateral cleft lip and palate ($p = 0.004$) and *FGFR2* rs11200014 was associated with maxillary retroposition within the total sample ($p = 0.005$), with no preference with any specific type of clefts. The severity of the defect and the age at the date of the surgery variables did not present association with the variables related to maxillofacial growth. **Conclusions:** *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880, *TGFa* rs2166975, and *FGFR2* rs2166975, as well as the presence of dental anomalies, can be used as variables that predict a trend of maxillofacial growth.

Keywords: cleft lip; cleft palate; dental anomalies; maxillofacial development polymorphism; *MMP2*, *TGFa*, *GLI2*, *FGFR2*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GOSLON	Great Ormond Street London and Oslo
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
<i>MMP2</i>	Metaloproteinase da matriz celular 2
<i>TGFα</i>	Fator de crescimento transformador alfa
<i>FGFR2</i>	Receptor 2 de fator de crescimento de fibroblastos
<i>TGFB</i>	Fator de crescimento transformador Beta
<i>MMP3</i>	Metaloproteinase da matriz celular 2
<i>MSX1</i>	MSH Homeobox 1
<i>MTHFR</i>	Metilenotetrahidrofolato redutase
<i>FOXE1</i>	Forkhead Box E1

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1- Desenvolvimento embriológico e etiologia das fissuras labiopalatinas	18
2.2- Estudo dos resultados de crescimento craniofacial em indivíduos com fissuras labiopalatinas e fatores associados.....	21
2.3- Variação genética.....	27
2.3.1- Polimorfismo de nucleotídeo único	27
2.3.2- Metaloproteinase da matriz celular 2 (<i>MMP2</i>)	28
2.3.3- <i>GLI2</i> (<i>GLI Family Zinc Finger 2</i>)	28
2.3.4- Fator de crescimento transformador alfa (<i>TGFα</i>).....	29
2.3.5- Fator de crescimento de fibroblastos 2 (<i>FGFR2</i>).....	29
2.4- Anomalias dentárias em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas	30
2.5- Medidas de avaliação da severidade da fissura e crescimento maxilofacial em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas.....	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 GERAL:	40
3.2 ESPECÍFICOS:	40
4. ARTIGO 1.....	41
APÊNDICES.....	124
APÊNDICE 1- DESCRIÇÃO METODOLÓGICA DA PESQUISA.....	125
APÊNDICE 2-FORMULÁRIO DADOS DO EXAME DE CAVIDADE ORAL E EXAME ODONTOLÓGICO.....	136
APÊNDICE 3- ANÁLISE DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS PANORÂMICAS.....	137
APÊNDICE 4- ANÁLISE CEFALOMÉTRICA CÓDIGO	138
APÊNDICE 5- RESPOSTA A BANCA DE QUALIFICAÇÃO.....	139
ANEXOS	154
ANEXO 1- STROBE CHECKLIST	155
ANEXO 2- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	158

O presente sumário segue as determinações da resolução 01/2022 do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (PPGO/UFPB), considerando o formato alternativo.

1. INTRODUÇÃO

Fissuras labiopalatinas são as deformidades craniofaciais de maior prevalência no mundo, com frequência média de 1 a cada 700 nascimentos, variando de acordo com etnia e regiões geográficas (Mossey et al., 2009; Marazita, 2012). As fissuras labiopalatinas, representam importante problema de saúde pública, devido a sua morbidade ao longo da vida e etiologia complexa (Marazita e Mooney 2004). Comprometem estruturas faciais e geram problemas estéticos, funcionais e psicossociais, podendo afetar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (Kennedy et al., 1978). Em função da complexidade, o seu tratamento envolve um grande período, iniciando nos primeiros meses de vida até a idade adulta, sendo necessário tratamento especializado por equipe multidisciplinar e vários procedimentos cirúrgicos (Mossey et al., 2009).

O tratamento tem como objetivo a associação entre boa estética facial, fala inteligível, ausência de comprometimentos auditivos, oclusão dentária normal, bem-estar psicossocial e crescimento craniofacial adequado (Freitas et al., 2012). Os resultados obtidos variam, podendo ser encontrada a reabilitação completa do indivíduo ou a presença de sequelas importantes na estética ou função que afetam o reestabelecimento de uma boa condição de inserção na sociedade (Dogan et al., 2006).

Segundo a literatura, a resposta ao tratamento pode estar relacionada às características iniciais da fissura (Honda et al., 1995; Peltomaki et al., 2001; Botticelli et al., 2020), à experiência da equipe multidisciplinar, especialmente das especialidades de cirurgia plástica, ortodontia e fonoaudiologia, e aos protocolos cirúrgicos empregados (Mars et al., 1992; Williams et al., 2011; Kappen et al., 2017; Rossell-Perry et al., 2017; Haque et al., 2017). No entanto, ainda não está claro quais seriam os protocolos ideais de tratamento, ou mesmo, qual o conjunto de variáveis que são, de fato, responsáveis pelo sucesso, já que, mesmo em centros considerados de excelência, com cirurgiões experientes, embora em proporções menores, resultados desfavoráveis de crescimento maxilar estão presentes.

Estudos relacionados à etiologia das fissuras não sindrômicas demonstraram a característica poligênica e interação genética. Estão envolvidos genes associados ao desenvolvimento do complexo craniofacial, ao mecanismo de formação óssea e desenvolvimento dentário (Schliekelman et al., 2002; Vieira et al., 2005; Vieira et al., 2007; Callahan et al., 2009; Vieira, 2012; Letra et al., 2012; Alves-Ferreira et al., 2014).

Alguns dos genes associados à etiologia das fissuras (*GLI2*, *MSX1*, *FGFR2*, *BMP2*) estão relacionados ao desenvolvimento de maloclusões esqueléticas em indivíduos nascidos sem fissuras labiopalatinas (da Fontoura et al., 2015; Gupta et al., 2017; Marañón-Vasques et al., 2019; Jiang et al., 2019; Gershater et al. 2021).

Outro dado a ser destacado, diz respeito às características craniofaciais dos pais de indivíduos nascidos com fissuras. Vários estudos demonstraram diferenças consistentes, embora sutis, nas características cefalométricas de pais de crianças nascidas com fissuras em comparação aos de crianças nascidas sem deformidades craniofaciais (Raghavan et al., 1994; Mossey et al., 1998; Maulina et al., 2006; Weinberg et al., 2006). Esses estudos oferecem parâmetros para a susceptibilidade à fissura (Mossey et al., 1998; McIntyre e Mossey, 2004; Mossey et al., 2010), e indicam uma responsabilidade genética subjacente (Weinberg et al., 2006). Além disso, pais e irmãos de indivíduos nascidos com fissura apresentam frequência aumentada de anomalias dentárias em relação à população geral (Küchler et al., 2011).

Considerando-se a elevada frequência de hipoplasia maxilar e de anomalias dentárias em indivíduos nascidos com fissuras, além da evidência de que os mesmos genes estão envolvidos no desenvolvimento da face e dos dentes, parece razoável se propor uma melhor compreensão de qual seria de fato a interação entre estas variáveis. Avaliar os resultados de crescimento maxilo facial e, buscar a identificação de variáveis inerentes ao indivíduo e fenotípicas capazes de predizer os resultados a longo prazo, pode contribuir para a resposta deste questionamento.

Estudos investigando outras variáveis, senão aquelas relacionadas ao procedimento cirúrgico, e a sua relação com as respostas de crescimento maxilo facial, em indivíduos nascidos com fissuras, são escassos, e podem contribuir para o estabelecimento de protocolos de manejo clínico mais adequados ao potencial crescimento facial individual e aconselhamento genético. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a

associação entre os resultados de crescimento maxilo-facial e polimorfismos nos genes *MMP2*, *GLI2*, *TGFa*, e *FGFR2*, frequência de anomalias dentárias, e severidade da fissura em pacientes operados por um único cirurgião, com os mesmos protocolos cirúrgicos a fim de identificar variáveis e indicadores clínicos capazes de sugerir o prognóstico dos resultados de crescimento craniofacial a longo prazo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Desenvolvimento embriológico e etiologia das fissuras labiopalatinas

As fissuras orofaciais, especialmente as fissuras de lábio e palato, estão entre os defeitos congênitos mais comuns na região de cabeça e pescoço em todas as populações do mundo (Lidral et al., 2008, Rahimov et al., 2012, Leslie and Marazita, 2013), com a frequência de aproximadamente 1.7 a cada 1000 nascimentos com notáveis diferenças populacionais, étnicas e de gênero na prevalência do nascimento (Mossey et al., 2009; Dixon et al., 2011; Marazita, 2012;). Europeus do norte, asiáticos, nativos americanos e australianos aborígenes são mais comumente afetados por fissura labial com fenda palatina associada, em contraste com os africanos e afrodescendentes que apresentam maior número de casos com fissuras isoladas de lábio (Vieira, 2008; Mossey et al, 2009; Dixon et al, 2011).

O desenvolvimento do lábio e palato envolve uma complexa rede de eventos de migração, crescimento, diferenciação e apoptose celular. Células da crista neural, migram, através do tecido mesenquimal no desenvolvimento craniofacial e, a partir da quarta semana, participam da formação da proeminência fronto nasal, processos maxilares e mandibulares (Mossey et al., 2009), este movimento de migração das células da crista neural é controlado por algumas famílias de genes, que inclui sonic hedgehog (*SHH*) e muscle segment homeobox (*MSX*) (Marazita e Mooney, 2004).

Na sexta semana de vida intrauterina, ocorre a fusão dos processos nasais e deles com os processos maxilares. Durante a sétima semana, as lâminas palatinas iniciam o processo de desenvolvimento em direção à linha média para que ocorra a fusão e as células mesenquimais do palato se diferenciem em tecido ósseo e muscular formando o palato duro e palato mole, processo que conclui por volta da 12ª semana gestacional (Abbot, 2014), estes eventos, são controlados, em parte, pela família de genes Fatores de Crescimento de Fibroblastos (*FGFs*), proteínas morfogenéticas (BMPs), Sonic Hedgehog (*SHH*), ácido retinóico, e Fatores de Crescimento Transformador alfa e beta (*TGF*) (Marazita e Mooney, 2004).

A falha na fusão dos processos nasais, maxilares e/ou palatinos resulta nas fissuras labial e ou palatina (Carsten, 2002; Mossey et al., 2009; Dixon et al, 2011; Rahimov, et al, 2012; Leslie and Marazita, 2013). As fissuras labiopalatinas são definidas como sindrômicas, quando associadas à outras anomalias de desenvolvimento, cognitivas ou estruturais (Rahimov et al, 2012; Marazita, 2012)

As fissuras não sindrômicas representam 70% dos casos de fissuras labiais associadas ou não a fissura palatina e 50% das fissuras isoladas de palato (Marazita, 2012). Do ponto de vista etiológico, apresentam etiologia complexa, poligênica e multifatorial com a interação de fatores genéticos e ambientais (Vieira, 2008; Marazita, 2012, Vieira 2012). Dos fatores ambientais, que interagem com os fatores genéticos, o tabagismo materno parece ser o mais fortemente associado (Shi et al., 2007; Vieira et al., 2008, Dixon et al., 2011; Vieira et al., 2012) com aumento do risco de até 3 vezes do nascimento da criança com fissura (Little et al., 2004), além do consumo de álcool e consanguinidade entre os pais (Jamilian et al., 2017), embora estes apresentem menor evidência de associações com a etiologia das fissuras labiopalatinas (Vieira et al., 2012).

A primeira associação genética positiva, publicada para o risco de fissuras labiopalatinas, foi uma associação entre fissura labiopalatina e um polimorfismo do sítio de restrição TaqI no locus do fator de crescimento transformador alpha (*TGFα*), com 57 indivíduos brancos de Iowa (Estados Unidos) comparados a um grupo controle de indivíduos sem histórico de fissura na família (Ardinger et al., 1989). A partir deste estudo, muitos outros estudos foram desenvolvidos com o objetivo de buscar os genes associados à etiologia das fissuras (Marazita et al., 2004a; Zeiger et al., 2003; Birnbaum et al., 2009; Zuccherro et al., 2004; Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2008a; Vieira et al., 2008b; Birnbaum et al., 2009; Beaty et al., 2010; Vieira et al., 2012; Leslie et al., 2016; Carlson et al., 2017), confirmando o caráter poligênico, no qual múltiplos genes, com pequenos efeitos parecem ser a maneira mais adequada de compreender o fator genético na etiologia das fissuras labiais e ou palatinas não sindrômicas (Vieira, 2012). Dentre os genes associados a etiologia das fissuras labiopalatinas estão *TGFα* (Ardinger et al., 1989; Letra et al., 2012; Lu et al., 2013; Lu et al., 2014; Avasthi et al., 2022), *IFR6* (Zuccherro et al., 2004; Vieira et al., 2007; Letra et al., 2012; Lu et al., 2013), *MTHFR* (Jagomägi et al., 2010; Aşlar et al., 2013; Pan et al., 2015; Niktabar et al., 2019; Avasthi et al., 2022), *BMP4* (Jianyan et al., 2010; Antunes et al., 2013; Saket et al., 2016; Hao et al., 2018; Avasthi et al., 2022), *MSX1* (Jezewisk et al., 2003; Vieira et al., 2005; Jagomägi et al., 2010; Tasanarong et al., 2019; Kumari et al., 2019), *MMP3* (Letra et al., 2012a; Saboia et al., 2015; Kumari et al., 2019), *GLI2* (Vieira et al., 2005; Zhao et

al., 2006); *FGFR2* (Riley et al., 2007; Oseogawa et al., 2008; Leslie et al., 2015); *FOXE1* (Vieira et al., 2005; Yinx et al., 2016; Leslie et al., 2017), entre outros.

2.2- Estudo dos resultados de crescimento craniofacial em indivíduos com fissuras labiopalatinas e fatores associados.

O estudo do crescimento craniofacial dos indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas teve impulso em meados do século XX com evidências da interferência dos fatores ambientais nos resultados de crescimento maxilar (Pruzanski, 1955; Aduss, 1971; Ross, 1987; Semb, 1991; da Silva Filho et al., 1998).

A elevada frequência de indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas com padrão esquelético de classe III apresentando hipoplasia maxilar e, o conhecimento dos efeitos iatrogênicos das cirurgias primárias de queiloplastia e palatoplastia (Normando et al., 1992; Molsted et al., 1992; Rohrich et al., 1996; Rohrich et al., 2000; Choudhary et al., 2003; Jena et al., 2004; Williams et al., 2011; Kappen et al., 2017; Rossell-Perry et al., 2017; Haque et al., 2017; Pereira et al., 2018; Wong et al., 2020; Wlodarczyk et al., 2021; Ozawa et al., 2021; Iwasaki et al., 2022) motivam a realização de estudos para busca de boas práticas de tratamento no que diz respeito a técnicas cirúrgicas, número de tempos cirúrgicos e época ideal para realização das cirurgias (Mars et al., 1992; Ozawa et al., 2001; Molsted et al., 2005; Bartzela et al., 2010a; Daskalogiannakis et al., 2011; Jorge et al., 2016; Heliövaara et al., 2017; Fudalej et al., 2019; Ozawa et al., 2021; Heliövaara et al., 2022).

Para avaliar as medidas craniofaciais, a metodologia de avaliação radiográfica por meio de avaliação cefalométrica maxilar, mandibular, dentária e craniana é amplamente utilizada (Meazzini et al., 2011; Batwa et al., 2018; Latief et al., 2020a; Rizer et al., 2021). No entanto, a localização de pontos cefalométricos em indivíduos nascidos com fissuras, especialmente que envolvem o lábio e região alveolar, apresenta um maior nível de dificuldade e requer experiência do profissional (Shaw, 1977; Bongaarts et al., 2008; Dogan et al., 2020; Doberschütz et al., 2022).

A necessidade de avaliação dos resultados de crescimento maxilo facial e as especificidades relacionadas às características oclusais dos indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas estimularam o desenvolvimento de instrumentos de medidas

simples e com elevada reprodutibilidade que fossem capazes de estabelecer scores de prognóstico de resultados dos tratamentos.

Em 1987, Mars e colaboradores publicaram o índice “GOSLON” (Great Ormond Street, London and Oslo) para os casos de fissuras labiopalatinas unilaterais. Este índice classificou os resultados de tratamento em excelente (score 1), bom (score 2), moderado (score 3), pobre (score 4), e muito pobre (score 5), baseado em três fatores clínicos: a relação anteroposterior dos arcos, a relação vertical, e a relação transversa (Mars et al., 1992) (**Figura 1**).

Em 1997, Attack e colaboradores desenvolveram um índice similar ao índice de GOSLON, indicado para os 5 anos de idade (Attack et al., 1997). Em virtude da sua ampla aceitação pela comunidade científica, devido à sua simplicidade e reprodutibilidade, os índices de GOSLON e Attack tornaram-se metodologias de referência nos estudos dos centros de tratamento a pacientes com fissuras labiopalatinas em todo mundo, sendo amplamente utilizados para comparação de resultados terapêuticos (Honda et al., 1995; Ozawa et al., 2001; Molsted et al., 2005; Liljia et al., 2006; Sinko et al., 2008; Peterson et al., 2019; Rizel et al., 2021; Hëeliovara et al., 2022)

No ano de 2005 foi desenvolvido o índice Bilateral, com o objetivo de avaliar os resultados de crescimento dos indivíduos com fissuras labiopalatinas bilaterais. Com scores semelhantes aos do índice de GOSLON, o índice Bilateral é subdividido em 3 índices, adequados para as idades de 6, 9, e 12 anos (**Figuras 2-4**). Esta metodologia vem sendo utilizada como referência nos estudos que avaliam os resultados de tratamento em pacientes com fissuras labiopalatinas bilaterais (Bartzela et al., 2010; Bartzela et al., 2011; Leenarts et al., 2012; Luz et al., 2017;

Batra et al., 2018; Bittermann et al., 2018; Fowler et al., 2019; Kuang et al., 2021; Sullivan et al., 2022).

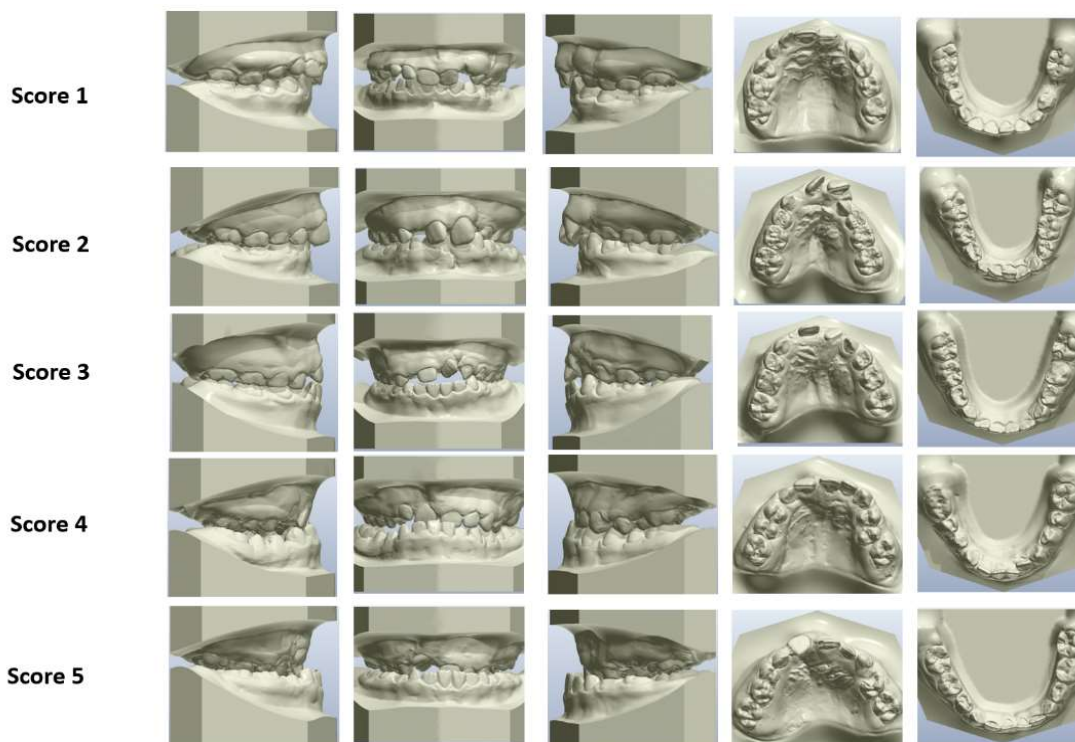


Figura 1- Ilustração dos scores do índice de GOSLON.

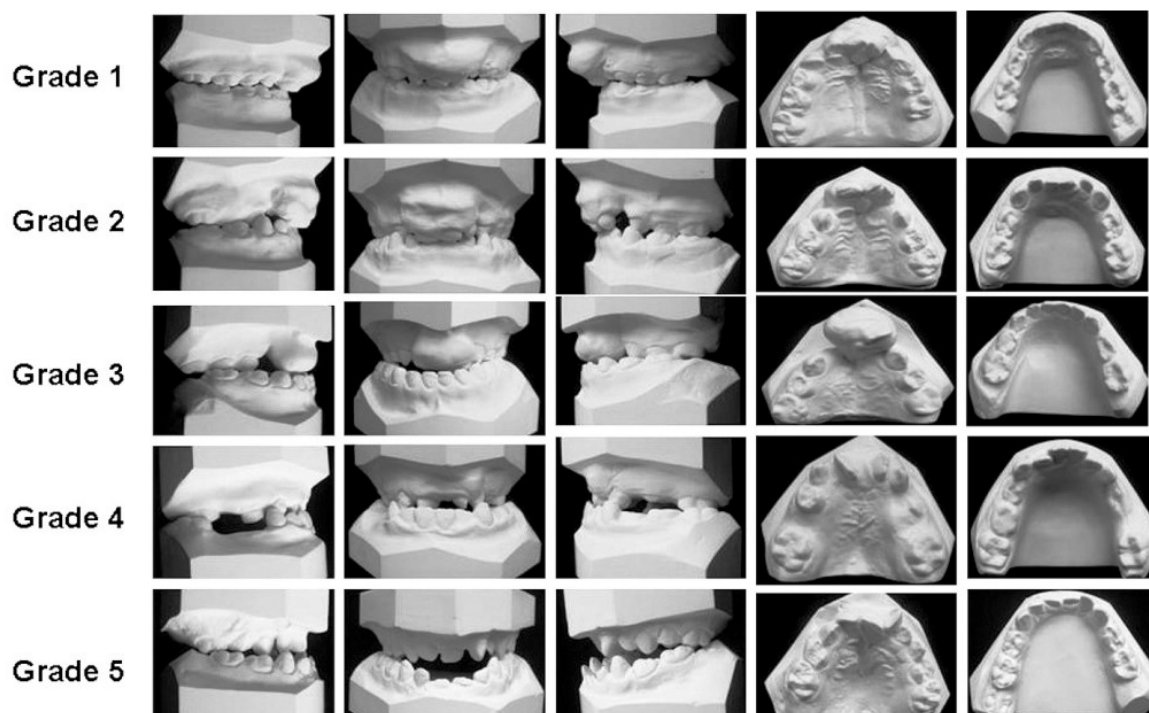


Figura 2- Ilustração do índice Bilateral aos 6 anos de idade. (Fonte- Ozawa, 2011)

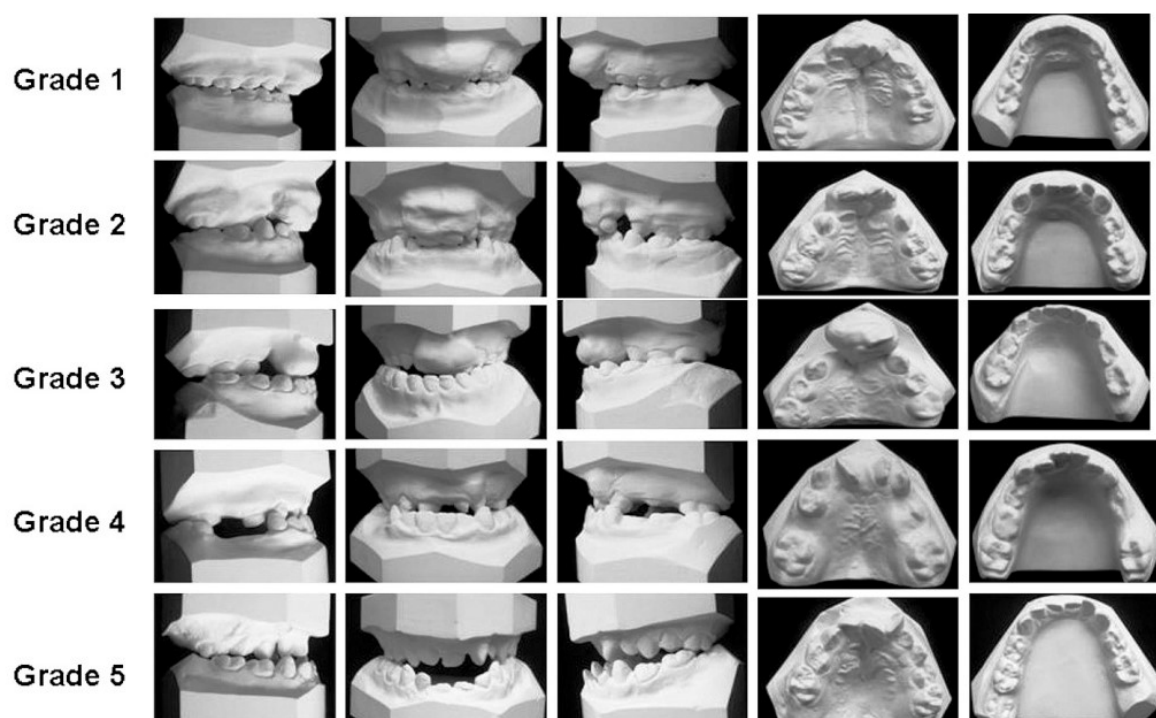


Figura 1. Índice bilateral para avaliação aos 9 anos de idade (fonte: Ozawa et al., 2011).

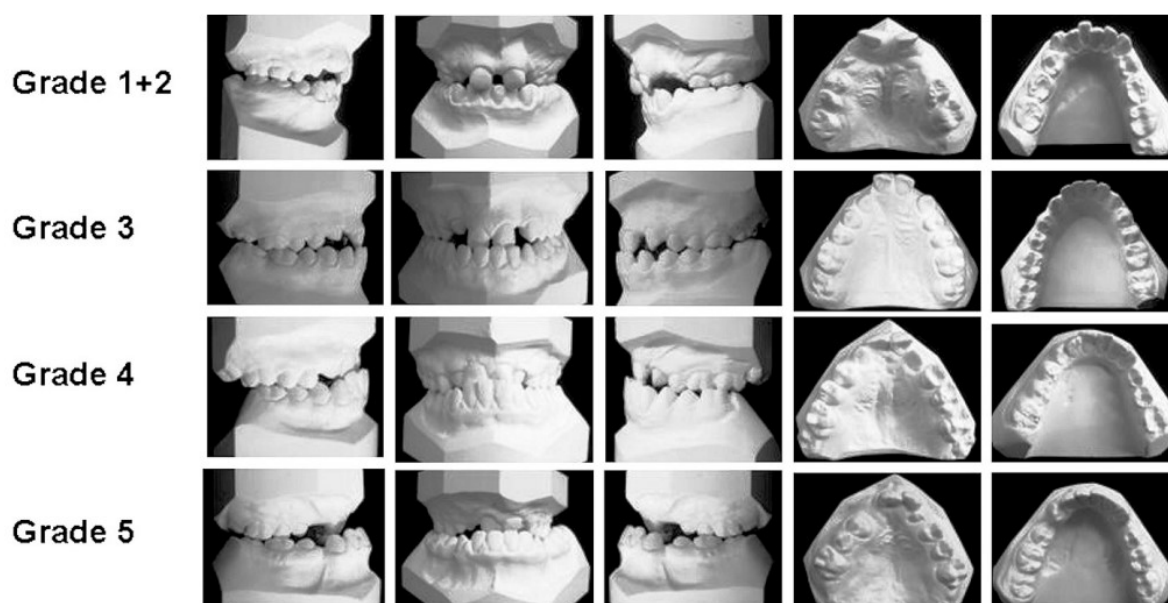


Figura 2. Índice bilateral para avaliação aos 12 anos de idade (fonte: Ozawa et al., 2011).

Ozawa et al., 2022, realizaram estudo com o objetivo de avaliar longitudinalmente a relação maxilo-mandibular de indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas unilaterais. Os autores analisaram o índice oclusal de GOSLON por meio de modelos de gesso. Foram avaliados 367 indivíduos, em dois momentos, na fase de dentição mista (± 7.4 anos de idade) e na fase de dentição permanente (± 16.4 anos de idade). A avaliação do índice de GOSLON foi dividida em 3 grupos, grupo A (índice 1 e 2- resultado bom), grupo B (índice 3- resultado moderado) e grupo C (índices 4 e 5- resultados ruins). Como resultados, observaram que em T1, dos indivíduos que apresentaram bom prognóstico na dentição mista (Grupo A), 86,46% tiveram prognóstico satisfatório a muito bom em T2. Indivíduos com prognóstico regular (Grupo B), 65,8% permaneceram na mesma ou melhoraram sua oclusão, considerando o tratamento ortodôntico. Dos indivíduos com mau prognóstico (Grupo C), apenas 30,72% apresentaram melhora na relação maxilo mandibular, confirmando que a maioria dos casos com discrepâncias maxilo mandibulares graves em T1, evoluem para a necessidade de cirurgia ortognática.

Vários estudos intercentros foram realizados desde o início da década de 90 para investigar as variáveis que poderiam afetar a relação dos arcos dentários em fissuras labiopalatinas unilaterais. Em 1992, Shaw e colaboradores avaliaram 6 centros europeus (Manchester, Londres, Stocolmo, Copenhaga, Amsterdã e Oslo), em modelos aos 9 anos totalizando 127 modelos de gesso e encontraram diferentes protocolos e resultados de tratamento, estes mesmos centros, tiveram os pacientes reavaliados aos 12 e 17 anos (Molsted et al., 2005), mantendo a diferença nos resultados entre os centros, no entanto, sem diferenças nas médias descritas em cada centro aos 9, 12 e 17 anos. Os resultados foram expressos por médias, e o número de participantes, por centro, variou entre 19 e 23 indivíduos por centro. Nos três momentos de avaliação, em percentuais diferentes, todos os centros apresentam resultados bons, moderados e ruins, e o centro que apresentou resultados menos favoráveis, apresentava um número maior de cirurgias com menores volumes de cirurgias.

No estudo inter centros Americleft, 4 centros foram avaliados, 169 modelos de gesso, entre 18 e 40 modelos por centro (Hataway et al., 2011). Foi encontrada diferença entre

a média de score dos índices oclusais de GOSLON de apenas um centro, em relação aos demais, (Hataway et al., 2011), este centro, tinha apenas um cirurgião e um pequeno número de cirurgias secundárias, e, assim como as conclusões do Eurocleft, os centros com menores números de cirurgias, tendem a mostrar melhores resultados.

A mesma iniciativa foi realizada na Escandinávia, em 2017 (Heliövara et al.), avaliando centros de tratamento de fissuras labiopalatinas na Dinamarca, Irlanda, Noruega, Suécia e Reino Unido, testando 4 protocolos cirúrgicos, e concluíram não haver diferenças entre os protocolos cirúrgicos estudados, em relação ao crescimento dos arcos dentários.

Os estudos acima descritos, assim como outros estudos inter centros (Fudalej et al., 2019; do Vale et al., 2022) ou de comparação de protocolos em um mesmo tratamento (Pereira et al., 2018; Ozawa et al., 2021) apontam para a conclusão da importância do papel do cirurgião nos resultados de tratamento em fissuras labiopalatinas, não existindo de fato, um protocolo cirúrgico ideal, mas o direcionamento para boas práticas, o que inclui monitoramento dos resultados e documentação adequada dos casos tratados pelos centros de tratamento de fissuras labiopalatinas (do Vale et al., 2022; Alonso et al., 2022).

Além dos fatores relacionados aos procedimentos cirúrgicos e as sequelas que podem gerar ao crescimento facial, os possíveis fatores intrínsecos, associados ao crescimento facial em pacientes com fissuras são muito pouco conhecidos. Estudos recentes sugerem que podem estar relacionados à configuração craniofacial e alterações de desenvolvimento dentário (Liao e Mars 2005; Meazzini et al., 2008; Latief et al., 2009; Meazzini et al., 2011; Latief et al., 2020a; Latief et al., 2020b; Liberton et al., 2020).

Meazzini e colaboradores, em 2011, realizaram um estudo com 129 indivíduos com fissuras labiopalatinas unilaterais e avaliaram modelos de gesso pré cirúrgico (para a medição da severidade da fissura), radiografias cefalométricas de perfil (avaliação do posicionamento da maxila e base craniana), além de agenesia do incisivo lateral e lateral conóide, com o objetivo de avaliar variáveis relacionadas ao crescimento maxilar. Os resultados do estudo mostraram que a severidade da fissura não apresentou correlação com o crescimento maxilar, no entanto, a agenesia do incisivo lateral, além

ângulos mais obtusos da base craniana foram relacionados ao retroposicionamento da maxila.

A hipótese de o crescimento maxilar estar associado a fatores relacionados às medidas cefalométricas em pacientes não operados, foi testada por Latief e colaboradores em 2020, para fissuras unilaterais (Latief et al., 2020b) e bilaterais (Latief et al., 2020a), analisando por meio de avaliação de componentes principais o crescimento de indivíduos não operados. No estudo de indivíduos com fissuras unilaterais encontraram os fatores: forma da maxila, inclinação da base craniana e inclinação dentária diferentes entre os grupos de indivíduos com fissuras não operadas comparados com um grupo controle, e, nas fissuras bilaterais a variação de crescimento dos indivíduos com fissuras ocorreu no sentido anteroposterior, diferente do encontrado em indivíduos sem fissuras. Os autores concluíram, em ambos os trabalhos, que indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas unilaterais (Latief et al., 2020b) e bilaterais (Latief et al., 2020a), apresentam fatores intrínsecos de limitação de crescimento, afetando a morfologia facial.

2.3- Variação genética

2.3.1- Polimorfismo de nucleotídeo único

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP- Single Nucleotide polymorphism) é a variação em uma única posição na sequência de DNA entre indivíduos. Essa variação é chamada de SNP quando mais de 1% da população não carrega o mesmo nucleotídeo na mesma posição. Os polimorfismos de nucleotídeo único podem estar associados a determinadas características ou funções alteradas de um gene e, o seu estudo pode ser realizado por meio da análise da frequência do polimorfismo em indivíduos afetados (<https://www.nature.com/scitable/definition/snp-295/>).

A escolha dos genes alvo que explicariam as alterações estudadas é baseada na função do gene e em associações prévias desse gene como potencialmente envolvido na etiologia da situação estudada, encontrada na literatura científica.

No presente estudo, SNPs dos genes *MMP2*, *GLI2*, *TGF α* e *FGFR2* foram selecionados. A razão para a escolha desses genes será descrita nos itens que seguem.

2.3.2- Metaloproteinase da matriz celular 2 (*MMP2*)

As metaloproteinases da matriz celular (*MMPs*) constituem uma família de enzimas extracelulares, endopeptidases, cálcio e zinco dependentes.

MMP2 é uma metaloproteinase da matriz celular da classe 2, gelatinase ativa contra o colágeno desnaturado. A *MMP2* apresenta importante papel na formação e mineralização dentária e alguns estudos demonstraram a expressão do gene (*MMP2*) que codifica essa proteína durante a formação do esmalte dentário (Heikinheimo et al., 1995; Caron et al., 2001; Bourd-Boittin et al., 2005). Apesar das *MMPs* apresentarem função na palatogênese (Brown et al., 2002), não foi encontrada associação com a etiologia das fissuras labiopalatinas (Letra et al., 2012a).

Estudos com imuno-histoquímica encontraram quantidade aumentada de *MMP2* em tecidos labiais de indivíduos com fissuras comparados com indivíduos sem fissuras labiopalatinas (Smane et al., 2013; Smane-Filipova et al., 2016).

Estudos prévios do nosso grupo encontraram associação entre *MMP2* rs9923304 e defeitos de desenvolvimento de esmalte dentário (Lavôr et al., 2020), e anomalia de forma, especificamente evaginação dentária (Cavalcante et al., 2021), em indivíduos nascidos com fissuras labial e/ou palatina. Por esta razão o SNP rs993304 foi selecionado para este estudo.

2.3.3- *GLI2* (*GLI Family Zinc Finger 2*)

GLI2 é uma proteína codificada pelo gene *GLI2*. É um fator de transcrição que funciona como principal mediador da proteína sonic-hedgehog (SHH), que atua na regulação e morfogênese do complexo craniofacial.

O *GLI2* desempenha o papel importante na mediação do SHH e regulação da proteína morfogenética 2 (*BMP2*) (Zhao et al., 2006), para diferenciação de osteoblastos e, a sua mutação resulta em severos defeitos no desenvolvimento esquelético (Mo et al., 1997; Hardcastle et al., 1998; Miao et al., 2004; Zhao et al., 2006).

Estudos demonstraram a associação do *GLI2* com o desenvolvimento dentário (Hardcastle et al., 1998; Thesleff, 2003), agenesia dentária (Liu et al., 2013; Vieira et al., 2013) tamanho dentário (Cunha et al., 2021), e com deformidade esquelética de classe

III por deficiência maxilar com agenesia dentária associada, em indivíduos sem fissuras labiopalatinas (Maranõn-Vasques et al., 2019).

Estudos encontraram a contribuição do *GLI2* no desenvolvimento de fissura palatina (Zhao et al., 2006) e nas fissuras labiopalatinas com maior associação nos casos bilaterais com histórico familiar positivo (Vieira et al., 2005). Os SNPs 3738880 e rs2278741 do *GLI2*, foram selecionados para este estudo.

2.3.4- Fator de crescimento transformador alfa (*TGF α*)

Fator de crescimento transformador alfa é uma proteína codificada pelo gene *TGF α* como membro da família de fatores de crescimento epidérmico. É expressa durante o crescimento craniofacial no epitélio das lâminas palatinas, promovendo a síntese de matriz extracelular e migração das células mesenquimais (Dixon e Ferguson., 1992).

TGF α foi o primeiro gene associado à fissura labiopalatina em um estudo caso-controle (Ardinger et al., 1989) e, em 2006, foi confirmado efeito do *TGF α* como fator de risco nas fissuras, sendo considerado um fator de modificação para os diferentes fenótipos das fissuras labiopalatinas (Vieira, 2006). Em 2014, associação positiva entre *TGF α* e fissuras labiopalatinas foi novamente encontrada e os autores sugeriram que indivíduos que apresentaram o alelo A tinham risco diminuído para fissuras labiopalatinas (Lu et al., 2014).

Além da relação com a fissura labiopalatina, o *TGF α* apresenta associação com agenesias dentária. Esta associação foi primeiramente reportada por Vieira e colaboradores em 2004, demonstrando associação do *TGF α* com os casos de fissuras labiopalatinas unilaterais com agenesia dentária (rs1058213 e rs2166975) e fissura labiopalatina bilateral com agenesia dentária (rs2902345). Outros estudos confirmaram a associação do *TGF α* e agenesia dentária (Vieira et al., 2007; Callahan et al., 2009; Alves-Ferreira et al., 2014) e a combinação de fenótipos de fissura labiopalatinas com agenesia dentária associadas ao *TGF α* (Letra et al., 2012).

O SNP rs2166975 foi avaliado no presente estudo.

2.3.5- Fator de crescimento de fibroblastos 2 (*FGFR2*)

O receptor 2 dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFR2) é uma proteína codificada pelo gene *FGFR2*, que é expresso durante o desenvolvimento craniofacial. Fatores de crescimento de fibroblastos apresentam importante papel na formação óssea do complexo craniofacial e regulação do crescimento sutural e palatogênese (Nie et al., 2006, Jin et al., 2012), mediando a proliferação, diferenciação e apoptose osteo progenitora (Jin et al., 2012).

Mutações no *FGFR2* estão relacionadas à craniossinostoses e síndromes que afetam o desenvolvimento craniofacial com hipoplasia severa de terço médio da face, como síndromes de Apert, Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss, Beare-Stevenson (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2263>). O *FGFR2* também está relacionado na etiologia das fissuras não sindrômicas (Riley et al., 2007; Osoegawa et al., 2008; Leslie et al., 2015), podendo contribuir com 3 a 6 % para o total de casos de fissuras (Riley et al., 2007, Riley et al., 2007a).

Foi encontrada associação do *FGFR2* com maloclusões esqueléticas (da Fontoura et al., 2015; Jiang et al., 2019; Gershater et al., 2021), com retrognatismo maxilar (da Fontoura et al., 2015), e agenesia dentária de pré-molares (Küchler et al., 2013) em indivíduos nascidos sem fissuras labiopalatinas. Os SNPs rs11200014 e rs10736303, foram selecionados para análise no presente estudo.

2.4- Anomalias dentárias em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas

Indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas apresentam frequência aumentada de anomalias dentárias quando comparados com indivíduos sem fissura, (Ranta, 1973; Ranta, 1983; Ranta, 1986; Eerens et al., 2001; Letra et al., 2007; Tortora et al., 2008; Bartzela et al., 2010b; Küchler et al., 2011; Tannure et al., 2012; de Lima Pedro et al., 2012; Ruiz et al., 2013; Howe et al., 2015; Shen et al., 2019; Rizel et al., 2020; das Neves et al., 2022).

A elevada frequência das anomalias dentárias em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas pode estar relacionada ao fato de que o período de desenvolvimento embriológico e a localização dos dentes é próxima da localização do lábio e palato além de apresentarem a mesma origem celular (células da crista neural). Pode ser causada por deficiências no tecido mesenquimal, suprimento sanguíneo ou perturbações na

sinalização molecular entre a lâmina dentária e o mesênquima circundante (Ranta, 1986).

Distúrbios na proliferação celular, diferenciação e apoptose poderiam gerar tanto anomalias dentárias quanto fissuras labiopalatinas. Variação em genes relacionados ao desenvolvimento craniofacial e formação dentária pode explicar a coocorrência de fissuras e anomalias dentárias (Letra et al., 2009; Letra et al., 2012). A formação do broto dentário depende de múltiplos genes (*PAX9*, *MSX1*, *SHH*, *DLX*, *WNT*) e fatores de crescimento (FGF e BMPs) (Marazita e Mooney, 2004), vários genes associados ao risco de ocorrência das fissuras, também estão associados a anomalias dentárias, como os genes *GLI2*, *GLI3* (Hardcastle et al., 1998;), *IFR6* (Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2008c; Fernandez et al., 2021), *MSX1* (Vieira, 2003; Vieira et al., 2004; Paixão-Cortez et al., 2011; Bonczec et al., 2021), *PAX9* (Vieira, 2003; Cudney and Vieira, 2012; Küchler et al., 2014; Vieira et al., 2004; Vaivads et al., 2021; Sweat et al., 2021), and *TGFa* (Vieira et al., 2004, Callahan et al., 2009, Letra et al., 2012).

Em 2008, Vieira e colaboradores, avaliaram em 42 famílias com dois ou mais irmãos com fissura labiopalatinas a presença de anomalias dentárias (agenesia, supranumerários e microdontia), e concluíram que algumas regiões do DNA poderiam contribuir tanto para fissura quanto para as anomalias dentárias. Os autores sugeriram que a informação acerca das anomalias dentárias poderia contribuir para definição de subfenótipos que ajudariam no mapeamento genético da susceptibilidade às fissuras (Vieira et al., 2008a; Vieira et al., 2008b).

A caracterização das fissuras (quanto à completude e lateralidade) associada à presença de anomalias dentárias, permitiu estabelecer subfenótipos mais detalhados para as fissuras labiopalatinas, descritos por Letra e colaboradores em 2007, e Menezes e Vieira em 2008 (Letra et al., 2007; Menezes e Vieira, 2008). A maior frequência de anomalias dentárias também mostrou associação com a severidade da fissura (Ranta, 1986; Menezes e Vieira, 2008).

A avaliação das associações entre anomalias dentárias, apresentando diferentes combinações por tipo de fissura, sugere diferentes genes contribuindo nos diferentes fenótipos das fissuras estudadas (Letra et al., 2007; de Lima Pedro et al., 2012). A mesma conclusão foi obtida em 2014 por Riis e colaboradores, que avaliaram 90 indivíduos com diferentes tipos de fissuras e observaram diferentes frequências de tipos

de anomalias dentárias, sugerindo do mesmo modo, diferenças na etiologia/genes envolvidos (Riis et al., 2014).

É importante ressaltar que a análise da presença de anomalias dentárias deve ser considerada em anomalias localizadas fora da área da fissura, já que as fissuras de palato primário podem apresentar o deslocamento do germe dentário ou a agenesia (Marazita e Mooney, 2004) e, portanto, na região da fissura, as anomalias dentárias representam a falta de desenvolvimento das estruturas na região afetada, o que poderia trazer interpretações equivocadas para análise de mecanismos biológicos e superestimação da quantidade do problema estudado (de Lima Pedro et al., 2012).

Após os estudos desenvolvidos por Letra et al. (2007), outros estudos foram realizados relacionando presença de determinadas anomalias dentárias como marcadores de subfenótipos em fissuras labiopalatinas (Küchler et al., 2011; Cavalcante et al., 2021).

A evidência de que a frequência de anomalias dentárias é de 3 a 4 vezes maior em indivíduos nascidos com fissuras (Letra et al., 2007), e os pais e irmãos de indivíduos nascidos com fissura apresentam frequência maior de anomalias dentárias do que a população geral (Küchler et al., 2011), levantou o questionamento se de fato a fissura labiopalatina é isolada ou na realidade representa formas sindrômicas associadas a combinações de alterações dentárias que apresentam mesmos padrões genéticos (Vieira., 2012).

Dentro desta perspectiva, estudos que avaliam a presença de fissuras labiopalatinas somadas a anomalias dentárias vem demonstrando associações com polimorfismos genéticos (Letra et al., 2009; Koruyucu et al., 2018; Cavalcante et al., 2021), sugerindo que, de fato, a existência de fissuras "verdadeiramente isoladas" pode ser rara. A ocorrência conjunta da agenesia dentária e fissura labiopalatina é registrada no "Online Mendelian Inheritance in Man" (OMIM) em uma mutação heterozigótica que afeta o gene

MSX1 (<https://www.omim.org/entry/106600?search=orofacial%20cleft%20AND%20hypodontia&highlight=cleft%20hypodontia%20orofacial>). Esta ocorrência conjunta também foi reportada com a presença de variantes raras do gene *IFR6* (Letra et al., 2012).

A presença de agenesia em indivíduos com fissura labiopalatinas foi associada a deficiência maxilar. Os estudos de Meazzini et al., 2008; Meazzini et al., 2011, já descritos no capítulo 2.2 desta revisão, encontraram a agenesia dentária e base

craniana inclinada, como fatores associados a resultados piores de crescimento maxilar. Antonakaris e colaboradores, em 2015, analisaram se a presença de agenesia do incisivo lateral estaria relacionada ao crescimento maxilar em 50 crianças nascidas com fissuras labiopalatinas, divididas em dois grupos, baseado na presença ou ausência de agenesia de incisivo lateral, o crescimento maxilar foi avaliado pelo índice Hudart/ Bodenhan em modelos de gesso e por medidas cefalométricas, e, como resultado, observaram maior deficiência maxilar no grupo com agenesia dentária.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lai e colaboradores, em 2015, que observaram uma maior frequência de casos com necessidade de cirurgia ortognática nos indivíduos com fissuras labiopalatinas unilaterais com agenesia de incisivos laterais e, medidas cefalométricas indicativas de hipoplasia maxilar em indivíduos com agenesia dentária. Vale salientar que o estudo avaliou os casos após a movimentação ortodôntica e relata ter utilizado a compensação dentária como fator de correção na análise estatística.

A agenesia de incisivos também foi associada a índices oclusais menos favoráveis em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas unilaterais, quando investigada neste mesmo ano por Hardwicke (Hardwicke et al., 2015), que encontraram maior frequência de agenesia de laterais nos casos de índices 4 e 5 comparando com a frequência desta anomalia nos casos de índice oclusal 1).

O impacto da agenesia no perfil facial foi avaliado utilizando medidas de análise do perfil tegumentar em radiografias cefalométricas de 96 indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas unilaterais. Foram divididos em 2 grupos, baseado na presença de agenesia dentária. Concluíram que a ausência de incisivos laterais traz impacto negativo para o perfil facial, interferindo na posição do lábio inferior e sulco mento labial (Almoammar et al., 2017), a redução do overjet em indivíduos com fissuras labiopalatinas e agenesia, também foi reportada (Wu, et al., 2013; Batwa et al., 2018).

Indivíduos com fissuras labiopalatinas unilaterais, participantes do estudo multicêntrico Scandcleft, foram avaliados em 2021, com o objetivo de investigar o impacto da agenesia dentária no crescimento craniofacial e relação dentária. Foram avaliados 408 indivíduos. O índice de GOSLON foi analisado no total da amostra, dos quais 399 foram também avaliados por meio de radiografias cefalométricas. A presença de agenesias foi o parâmetro utilizado para divisão da amostra em três grupos, com agenesia, agenesia de apenas um dente e agenesia de dois ou mais dentes. A

associação entre resultados ruins de crescimento e índices oclusais maiores com a ausência de dois ou mais dentes na maxila foi encontrada. Para a associação encontrada as agenesias foram somadas das regiões dentro e fora da fissura. Este resultado de associação não foi encontrado quando analisaram apenas a região do defeito alveolar.

É importante ressaltar que os estudos reportados incluem os dentes na área da fissura e apenas foram realizados estudos em fissuras labiopalatinas unilaterais. A investigação desta associação e de outras anomalias dentárias poderá trazer contribuições clínicas e genéticas importantes.

Outras anomalias dentárias em fissuras labiopalatinas não foram estudadas em associação aos resultados de crescimento maxilar, no entanto, em 2020, Sullivan e colaboradores encontraram maior frequência de resultados desfavoráveis de crescimento (índices oclusais 4 e 5) em crianças que apresentavam maior risco de cárie dentária (Sullivan et al., 2022). Este resultado sugere uma possível susceptibilidade aumentada de indivíduos nascidos com fissuras a apresentarem anomalias de estrutura do esmalte.

Para classificar as anomalias dentárias, no presente trabalho, foi utilizada a classificação descrita por Queiroz e colaboradores (Queiroz et al., 2019), que divide as anomalias dentárias de desenvolvimento em: anomalias de número, tamanho, irruptivo/topográfico, morfologia e estrutura (Tabela 1). As Figuras 5 a 9 ilustram as anomalias encontradas nos sujeitos do estudo. A alteração observada na região das cúspides de pré-molares como aumento de esmalte foi classificada como “Vtip” e incluída na lista das anomalias de forma (Figura 8). Os casos de fluorose foram descartados e cuidadosamente diferenciados dos casos de opacidades difusas, levando-se em consideração, as áreas endêmicas de fluorose no estado da Paraíba (Sampaio et al., 2010; Sousa et al., 2018).

Tabela 1- Classificação anomalias dentárias de desenvolvimento avaliadas no presente estudo. Relação das anomalias de número, tamanho, erupção/topografia, morfologias e estrutura do esmalte (Queiroz et al., 2019).

ANOMALIAS DE DESENVOLVIMENTO				
NÚMERO	TAMANHO	ERUPÇÃO/TOPOGRÁFICO	MORFOLÓGICO	ESTRUTURAL

Supranumerário	Macrodonia	Impacção	Dilaceração	Hipoplasia
Agenesia	Microdonia	Transposição	Taurodonia	Opacidade demarcada
		Retenção prolongada	Invaginação	Opacidade difusa
			Evaginação	
			Fusão radicular	
			Geminação	
			Pérolas de esmalte	
			Incisivo em pá	

ANOMALIAS DE NÚMERO (QUANTITATIVAS)



Agenesia



Supranumerário

Figura 3. Exemplo de anomalias de número encontradas na amostra estudada (agenesia e supranumerário)

ANOMALIAS DE TAMANHO (DIMENSIONAIS)



Microdontia

Figura 4. Exemplo de anomalias de tamanho encontradas na amostra estudada (microdontia). Não foi registrada macrodontia

ANOMALIAS DE ERUPÇÃO E TOPOGRÁFICAS



IMPACÇÃO



RETENÇÃO PROLONGADA



TRANSPOSIÇÃO

Figura 5. Exemplo de anomalias de erupção encontradas na amostra estudada (impacção, transposição e retenção prolongada).

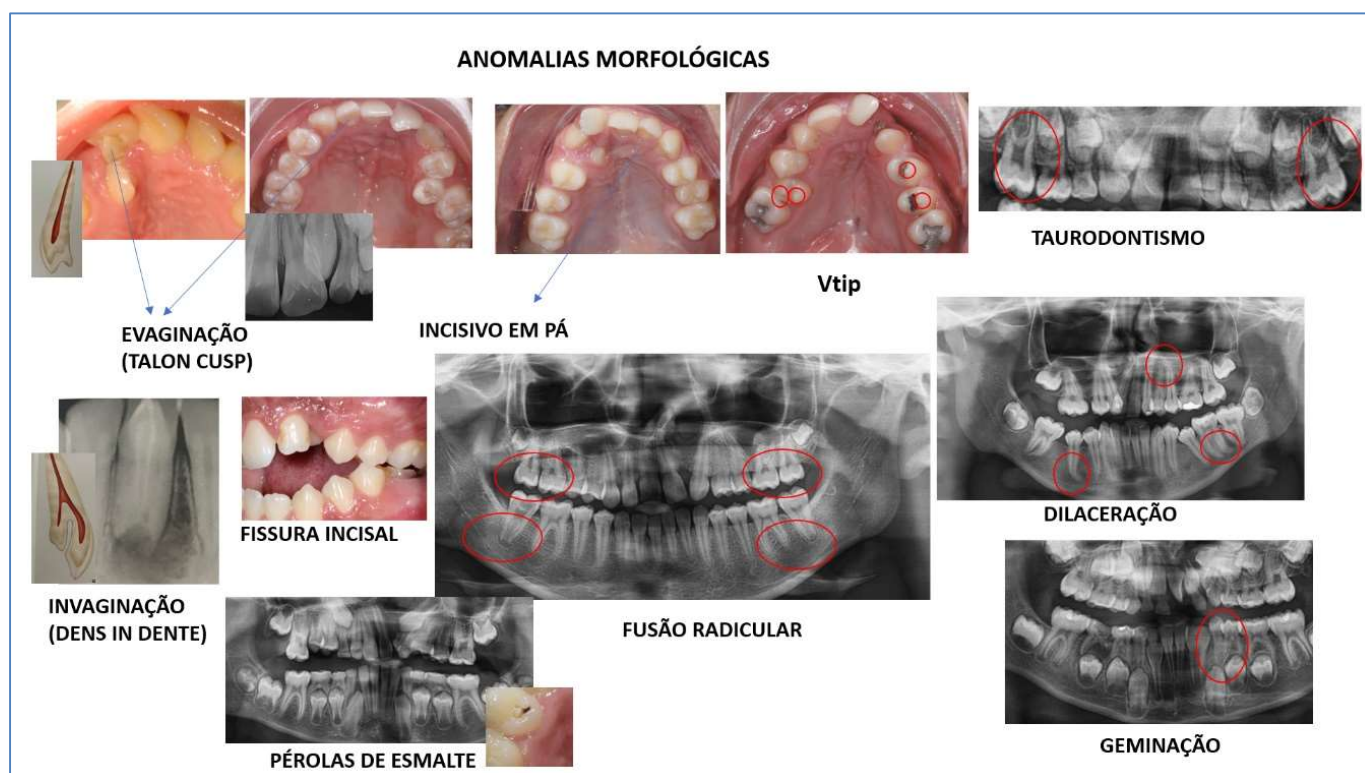


Figura 6. Exemplos de anomalias morfológicas (talon cusp, dens in dente, pérolas de esmalte, incisivo em pá, "Vtip", taurodontismo, dilaceração radicular, geminação) encontradas na amostra estudada.



Figura 7. Exemplos de anomalias de estrutura do esmalte (opacidade demarcada, opacidade difusa e hipoplasia), encontradas na amostra estudada.

2.5- Medidas de avaliação da severidade da fissura e crescimento maxilofacial em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas.

O impacto do tamanho inicial da fissura sobre os resultados de crescimento facial é inconclusivo (Chiu e Liao, 2012). Estudos apontam não haver interferência do tamanho da fissura e os resultados de crescimento (Suzuki et al., 1993; Johnson et al., 2000; Meazzini et al, 2011, Russel et al., 2015). Por outro lado, alguns estudos encontraram relação entre o crescimento maxilar e o tamanho inicial da fissura (Peltomaki et al., 2001; Botticelli et al., 2020). Esta diferença de resultados, possivelmente, está relacionada à diferentes metodologias de avaliação. Suzuki e colaboradores avaliaram a gravidade da fissura com medidas intraorais antes da palatoplastia (Suzuki et al., 1993). Johnson e colaboradores utilizaram modelos de gesso e elaboraram um índice de proporção (Johnson et al, 2000).

Meazzini et al., para análise da gravidade da fissura avaliaram as distâncias entre os segmentos na região alveolar e palatina (Meazzini et al., 2011). Russel e colaboradores avaliaram a severidade em modelos de gesso pré cirúrgico através da avaliação da razão entre a área do palato e o defeito palatino (Russel et al., 2015). Petolmaki e colaboradores avaliaram medidas em modelos pré cirúrgicos utilizando 7 medidas modelo, das quais, apenas uma (na região do defeito alveolar) apresentou diferença significativa (uma análise multivariada não foi realizada) (Petolmaki et al., 2001). Finalmente, Botticelli e colaboradores, em 2020, avaliaram a gravidade do defeito por análises bi e tridimensionais.

Além das diferentes metodologias para a avaliação da severidade da fissura, a heterogeneidade das amostras em relação ao número de cirurgiões envolvidos, técnicas, e época de realização das cirurgias, também pode ter interferido nos diferentes resultados encontrados (Botticelli et al., 2020).

A avaliação da gravidade da fissura deve ser feita sob a ótica de 3 regiões: nasolabial, alveolar e palatina (Yao et al., 2021). Dentre as diversas apresentações fenotípicas encontradas, ressalta-se ainda, questões relacionadas à quantidade e qualidade dos tecidos musculares, tanto na região labial, quanto palatina, estas estruturas podem impactar o manejo cirúrgico e, conseqüentemente, nos resultados de tratamento. Estes tecidos são afetados pelos mesmos mecanismos durante o desenvolvimento embrionário (Mossey, 2009).

Em 2008, Fisher e colaboradores propuseram uma análise objetiva do defeito nasolabial em fissuras labiopalatinas. Os autores propuseram duas medidas, e definiram a razão entre a largura da narina do lado fissurado sobre a largura da narina do lado não fissurado. Quanto maior o valor, maior a severidade. A segunda medida proposta foi o ângulo columelar, que é o ângulo formado base nasal e columela. Ambas as medidas apresentaram elevada reprodutibilidade.

A análise da severidade da fissura requer estudos que sejam desenhados para obterem amostras mais homogêneas, com validação das metodologias empregadas, que contemplem os pontos relacionados ao defeito nasal, alveolar e palatino, para se diminuir a complexidade desta variável.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Avaliar polimorfismo genéticos e a frequência de anomalias dentárias como preditores para resultados de crescimento maxilo facial em pacientes nascidos com fissuras labiopalatinas, operados pelo mesmo cirurgião.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar polimorfismos nos genes *MMP2*, *GLI2*, *TGFa* e *FGFR2* como preditores para resultados de crescimento maxilo facial em pacientes nascidos com fissuras labiopalatinas, operados pelo mesmo cirurgião;
- Avaliar a frequência de anomalias dentárias como preditores para resultados de crescimento maxilo facial em pacientes nascidos com fissuras labiopalatinas, operados pelo mesmo cirurgião;
- Avaliar, ao longo do tempo, comportamento do crescimento maxilo facial utilizando os scores de índices oclusais em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas;
- Avaliar a associação entre o defeito nasal, alveolar e palatino e os resultados de crescimento maxilo facial em pacientes nascidos com fissuras labiais com ou sem palatina.

4. ARTIGO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Plos One”

Dental anomalies and genetic polymorphisms as predictors of maxillo-facial growth in individuals born with cleft lip and palate

R.H.W. Lacerda¹, A.R. Vieira²

1- Postgraduate program in dentistry and University Hospital Lauro Wanderley, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil.

2- Departments of Oral and Craniofacial Sciences and Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

All authors declare no conflict of interest.

Word count abstract: 279/

Number of figures: 31 / Number of tables: 21

Number of references: 42

Keywords: cleft lip and palate, maxillofacial growth, outcomes, genetics, dental anomalies

Corresponding Author:

Alexandre R. Vieira, Department of Oral & Craniofacial Sciences, School of Dental Medicine,
University of Pittsburgh, 412 Salk Pavilion, 335 Sutherland Street, Pittsburgh, PA 15261, USA.

e-mail- arv11@pitt.edu

Dental anomalies and genetic polymorphisms as predictors of maxillo-facial growth in individuals born with cleft lip and palate

R.H.W. Lacerda¹, A.R. Vieira²

Abstract

Cleft lip and palate are the most common congenital anomalies on the human face that have a complex inheritance caused by more than one gene that may be influenced by the environment. The impact of surgical procedures on maxillofacial growth is well known, however, intrinsic factors interference in these growth outcomes are not elucidated. The present study aimed to analyze genetic polymorphism and frequency of dental anomalies as predictors of maxillofacial growth outcomes in patients with cleft lip with or without cleft palate. A cohort study was carried out with 537 individuals born with cleft lip with and without cleft palate, operated on by the same surgeon. Maxillofacial growth outcomes were evaluated using Wits, nasion perpendicular to point A, and occlusal scores. The markers *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880 and rs2279741, *TGFa* rs2166975, and *FGFR2* rs11200014 and rs10736303, frequency of dental anomalies, and cleft severity were analyzed to define their association with maxillofacial growth outcomes. Age at primary surgery treatment, sex, cleft laterality, and age were variables adjustment in the analysis. We found association between the frequency of dental anomalies and the maxillofacial growth in unilateral ($p=0.001$) and bilateral ($p=0.03$) cleft lip and palate. *MMP2* rs9923304 and maxillofacial growth were associated ($p<0.0001$). There was also an association between *GLI2* rs3738880 and *TGFa* rs2166975 and maxillary outcomes in individuals with unilateral cleft lip and palate ($p=0.003$ and $p=0.004$, respectively), and between *FGFR2* rs11200014 and maxillary outcomes regardless of cleft type ($p=0.005$). Statistical evidence of interaction between *MMP2* rs9923304 and *GLI2* rs3738880 was observed ($p<0.0001$). Presence of dental anomalies and genetic variation in *MMP2*, *GLI2*, *TGFa*, and *FGFR2* are associated with maxillofacial growth outcomes in individuals born with cleft lip and palate.

Keywords: cleft lip and palate, maxillofacial growth, outcomes, genetics, dental abnormalities

INTRODUCTION

Cleft lip and/or palate is the most common congenital anomaly in the human face. It has multifactorial or complex inheritance, caused by more than one gene and may be influenced by the environment (Vieira 2008). Common genetic factors and neural crest cell origin may explain a high frequency of dental anomalies found in individuals born with cleft lip and palate (Letra et al. 2007; Cavalcante et al. 2021).

Clinical presentation of orofacial clefts is heterogeneous concerning the cleft type, severity, number of dental anomalies (Letra et al. 2007; Vieira et al. 2008), and prognosis (Botticelli et al. 2020). Treatment starts early in the first months of life with nutrition counseling, and lasts for several years with surgical procedures, orthodontic treatment, and speech therapy, in addition to other specialties throughout the rehabilitation process (Sandy et al. 2001).

Surgical techniques, age at cleft repair, and surgeon experience interfere in the outcomes related to speech, nasolabial aesthetics, and maxillary growth, and have motivated inter-center studies around the world (Molsted et al. 2005; Long et al. 2011; Heliövaara et al. 2017). Maxillary growth outcomes in individuals born with cleft lip and or palate may be impacted by cleft type and severity (Antonarakis et al. 2015a; Botticelli et al. 2020), dental agenesis (Meazzini et al., 2011; Antonarakis et al. 2015b; Rizell et al. 2021), and cranial base configuration (Meazzini et al. 2011).

It is unclear which mechanism and variables can predict growth outcomes. Most studies have been conducted under non-homogeneous conditions regarding primary surgery timing, the method used, and the number of surgeons involved (Botticelli et al. 2020). There is a gap in knowledge regarding intrinsic factors, such as genetic variation, related to maxillofacial growth in individuals born with cleft lip and palate.

In this study, we evaluated intrinsic factors (genetic variation, frequency of dental anomalies, and cleft severity) in a cohort of individuals born with cleft lip and palate, followed since birth, and operated by one surgeon with the same technique. We hypothesized that genetic variation and frequency of dental anomalies can better predict maxillofacial growth outcomes in individuals born with cleft lip and palate.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

A cohort, study was developed in a reference cleft lip and palate treatment center in Brazil from a geographical area where more than half of the population has more than two ethnicities (Black and White, Amerindian and White, or Black and Amerindian). All the individuals were operated on by the same surgeon with the same technique. No pre-surgical orthopaedics were provided. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) guidelines were followed, and the STROBE checklist was completed.

The protocol of this study was approved by the local Institutional (Hospital Universitário Lauro Wanderley- Universidade Federal da Paraíba) Review Board (5.410.456) and written informed consent from all individuals and/or parents/legal guardians was obtained.

Cohort

A cohort of 537 individuals born with isolated cleft lip with or without palate, was studied. In the first part of the study, individuals aged 7 to 14 years, born with complete cleft lip and palate, who underwent primary surgeries in the cleft center, were evaluated. As inclusion criteria, patients with nonsyndromic cleft lip and palate that had pre-orthodontic dental casts and a minimum follow-up of four years were selected. One hundred twenty-one individuals were included. Maxillofacial outcomes were defined two times using the GOSLON Yardstick score (Mars et al. 1987), for unilateral cleft lip and palate and a Bilateral Yardstick score was used (Ozawa et al. 2011) for bilateral cleft lip and palate (Figures 1 and 2).

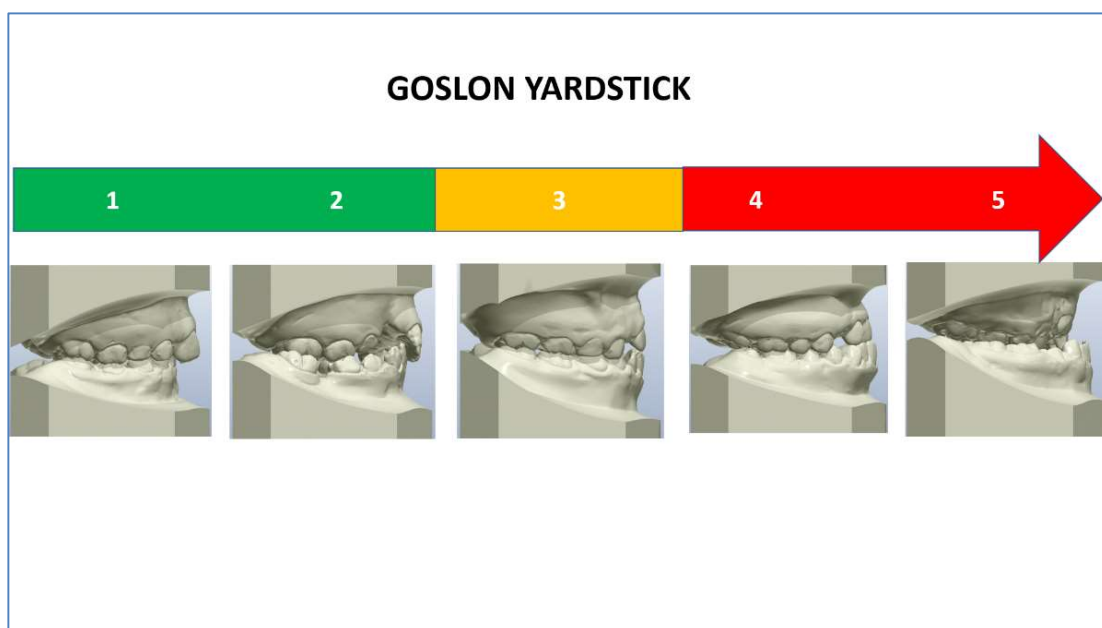


Figure 1- GOSLON Yardstick. Scores 1 and 2 – Good prognosis, 3- moderate prognosis, and 4 and 5- poor prognosis with orthognathic surgery indication.

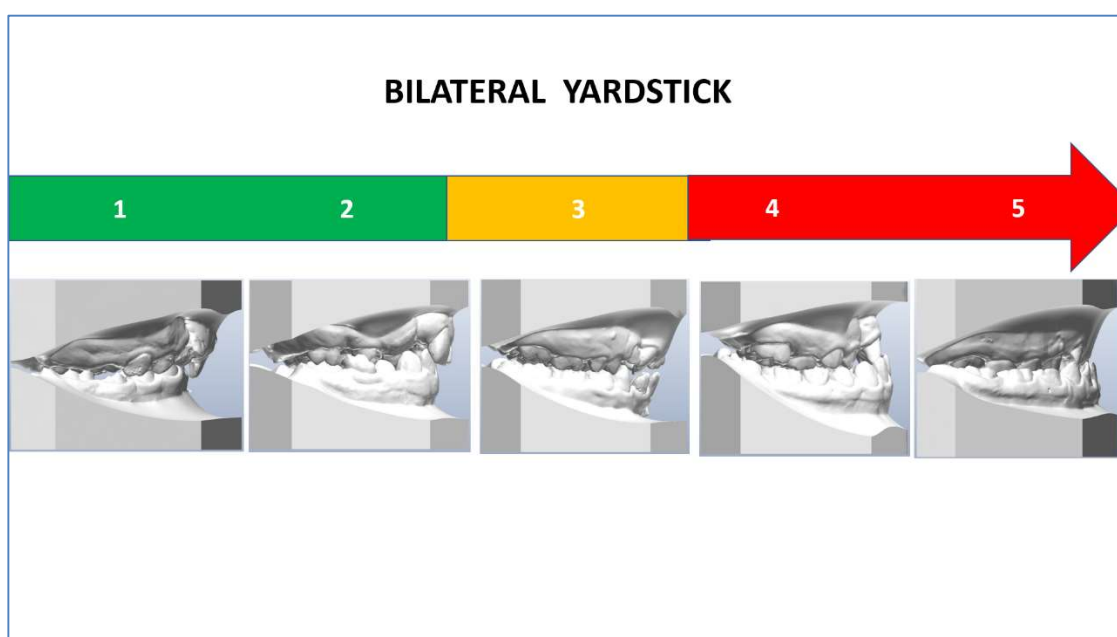


Figure 2- Bilateral Yardstick. Scores 1 and 2 – Good prognosis, 3- moderate prognosis, and 4 and 5- poor prognosis with orthognathic surgery indication.

This experiment was designed to confirm in what proportion the prognosis of the need for orthognathic surgery defined in pre orthodontic dental casts, was maintained throughout growth. A baseline evaluation of dental casts was obtained prior to any orthodontic or orthopaedic intervention, and before alveolar bone graft surgery, was made. Dental casts obtained after four years or more of follow-up were accessed for a second evaluation. Because orthodontic intervention happened before the second evaluation, the skeletal bases were the main priority and in cases where dental compensatory inclinations were done, worse indexes were considered. Cephalometric radiographs were accessed to clarify any questions. In cases that underwent orthognathic surgery, pre-surgical dental casts were analyzed. Growth trajectory outcomes according to the occlusal index were defined (Figure 3).

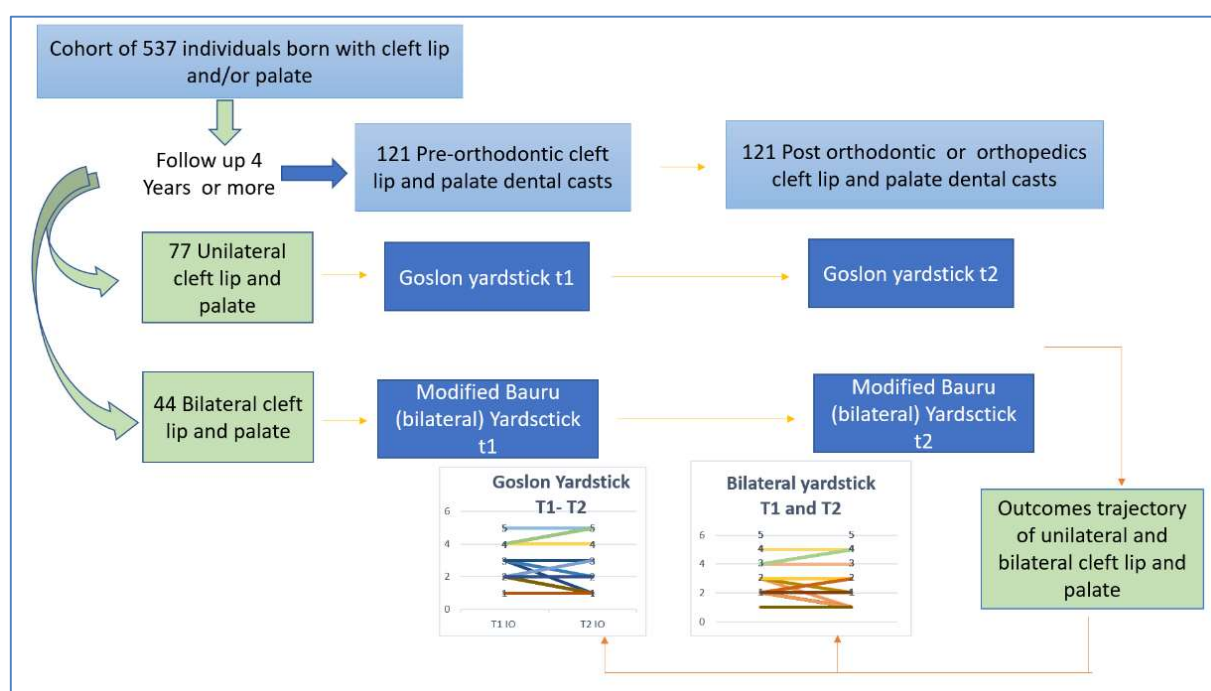


Figure 3- Overall study design of the first experiment.

From the definition of facial growth trajectory outcomes, a subsequent experiment was developed, aiming to identify predictors for the different prognoses found in the first part of the study (Figure 4).

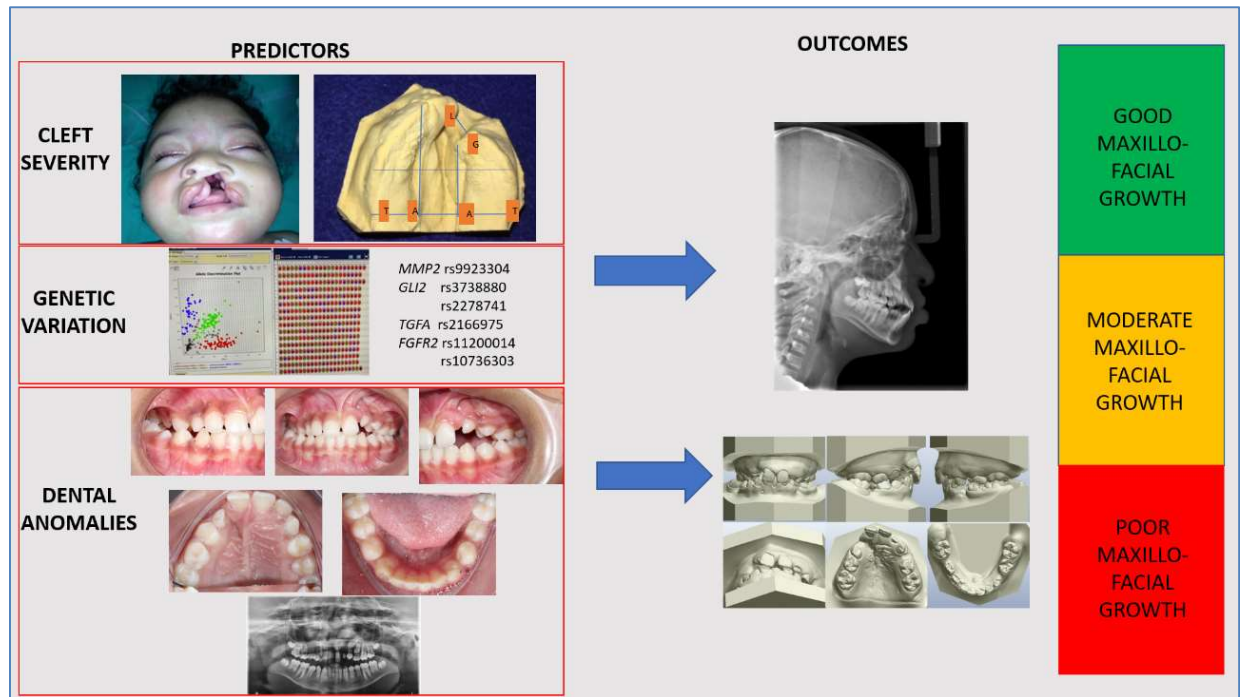


Figure 4- Overall study design of the second experiment.

Patients with non-syndromic complete cleft lip with or without cleft palate, 7 years of age or more, with no orthodontic or orthopaedic interventions, were included in the sample.

Three hundred sixty-six out of 537 individuals were further studied. Since there were only six cases born with bilateral cleft lip, they were excluded from the sample and a total of 360 individuals were included in the second part of the study (Figure 5). From these cases, the outcomes were analyzed through the occlusal scores obtained from dental casts, and cephalometric measurements regarding anteroposterior relationship and maxillary position. As independent variables, genetic variation, dental anomalies, age at the time of primary surgeries, and cleft severity were analyzed.

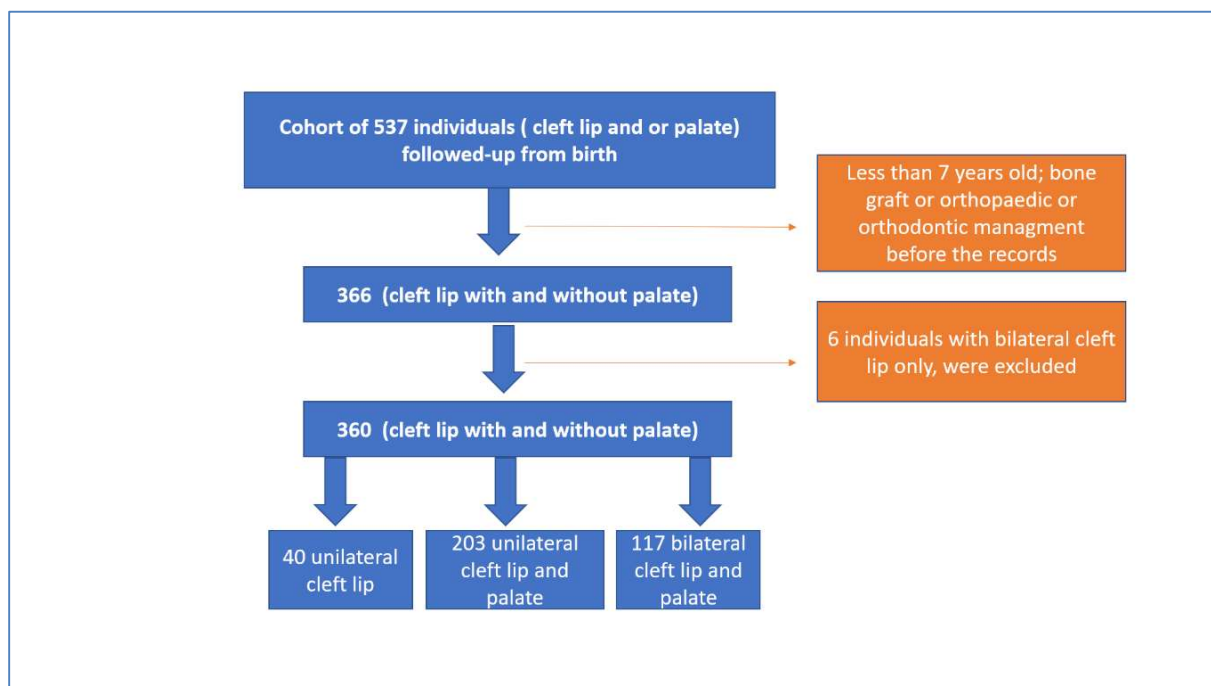


Figure 5- participants of the study, and exclusion criteria.

Outcomes measures

• OCCLUSAL SCORES

Three hundred twenty out of 360 individuals were born with cleft lip and palate. Dental-occlusal relations before orthodontic treatment were accessed using GOSLON yardstick scores (Mars et al. 1987) for unilateral cleft lip and palate (Figure1) and Bilateral yardstick scores were used (Ozawa et al. 2011) for bilateral cleft lip and palate (Figure 2). The 40 remaining individuals who had cleft lip only, for who the occlusal index does not apply, were excluded from this analysis. The scores were performed by one experient craniofacial orthodontist (R.H.W.L.) and 80 randomly selected dental casts (40 with unilateral cleft lip and palate and 40 with bilateral cleft lip and palate) were analyzed twice within 2 months for reliability.

CEPHALOMETRIC MEASURES

Pre-treatment lateral cephalometric radiographs were manually traced and analyzed by a calibrated and experient craniofacial orthodontist (R.H.W.L.).

Cephalometric points and planes were manually traced: cranial base (S-N), Frankfurt plane, occlusal plane, nasion perpendicular to Frankfurt plane, point A, and point B. The anteroposterior maxillomandibular relationship was defined using the Wits appraisal (Jacobson 1975) and the maxillary position using the nasion perpendicular to point A (Figure 6).

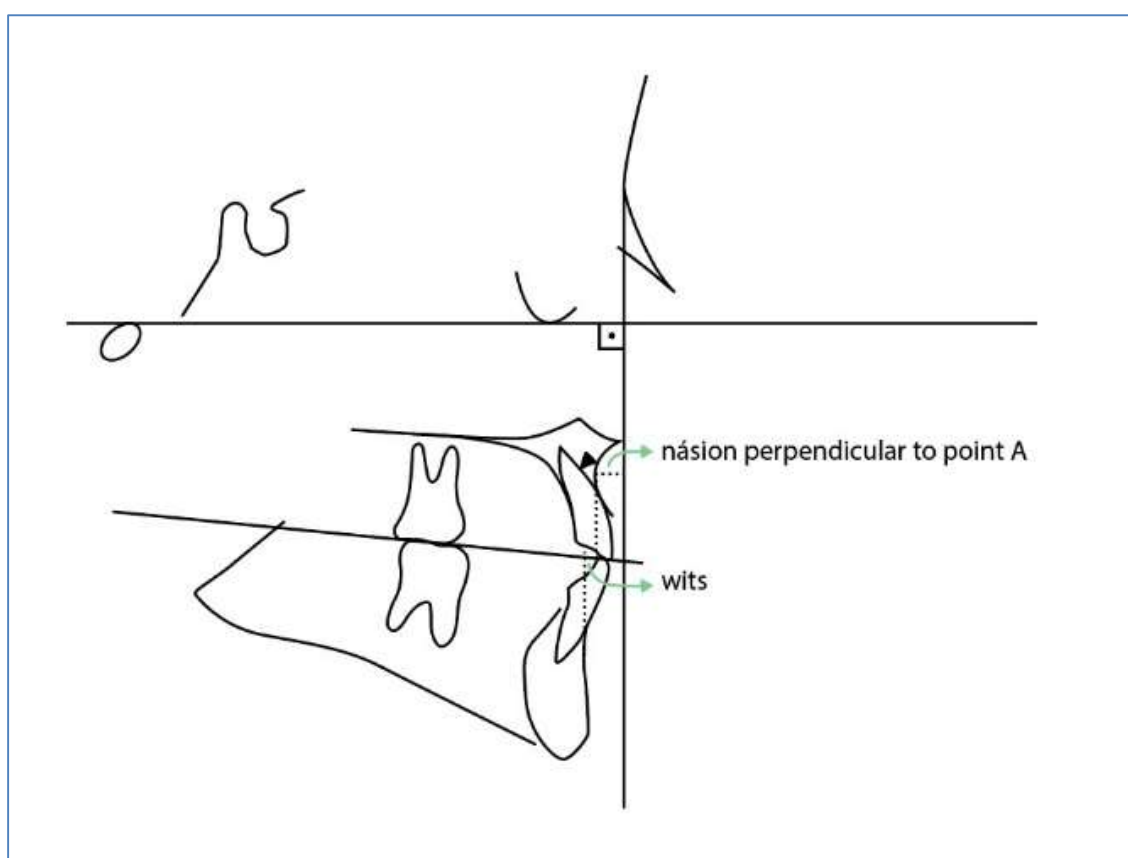


Figure 6- The 'Wits appraisal' draws perpendicular lines from points A and B onto the occlusal plane. The points of contact on the occlusal plane from points A and B are labeled AO and BO, respectively, and the linear distance from AO to BO were measured (Jacobson, 1975). The maxillary position was defined in the cephalogram through the distance between point A to the nasion perpendicular line (Mc Namara Jr, 1984).

These cephalometric measurements were done twice in 40 radiographs, within 2 months, to determine intra-rater reliability.

Independent variables

- GENETIC VARIATION

DNA extraction, SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Selection, and Genotyping

Genomic DNA was obtained from the saliva of 537 individuals from the initial sample and genotyped by polymerase chain reactions (PCR). Taqman chemistry (Ranade et al. 2001) and end-point analysis were used. A QuantStudio 6 Flex automatic instrument and pre-designed probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used. Polymorphisms were selected based on previous evidence of association with variation in skeletal maxillo-mandibular phenotypes (Vieira et al. 2005; da Fontoura et al. 2015; Cruz et al. 2017; Marañón-Vásquez et al. 2019; Jiang et al. 2019). Allelic frequency of at least 10% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) was used as a criterion for selection of SNPs. SNPs selected were *MMP2* rs9923304, *TGFa* rs2166975, *GLI2* rs227874, *GLI2* rs3738880, *FGFR2* rs11200014, and *FGFR2* rs10736303. Minor allele frequency and relationship with orofacial clefts and maxillary position of the SNPs selected are summarized in **Table 1**.

The frequency of genotypes and alleles were analyzed according to the outcomes studied by cleft types. Gene-gene interactions were tested comparing the frequency of genotypes according to prognosis based on occlusal scores (1+2= good prognosis versus 4+5= poor prognosis).

Table 1- Summary of genes/SNPs studied.

Gene	Locus	SNP	Base Change	Reason to be selected (reference)	Global Minor Allele Frequency
<i>MMP2</i>	16q12	rs9923304	C/T	<i>MMP2</i> was associated to developmental defects in enamel in individuals born with cleft lip and palate (Lavôr et al., 2020)	0.4
<i>GLI2</i>	2q14	rs3738880	G/T	Evidence for association or linkage with cleft lip and palate (Vieira et al., 2005), class III malocclusion, and tooth agenesis (Marañón- Vasques et al., 2019).	0.29
		rs2278741	C/G		0.45

<i>TGFA</i>	2p13	rs2166975	A/G	<i>TGFA</i> was associated with tooth agenesis and nonsyndromic cleft lip/palate (Vieira and Orioli, 2001; Letra et al., 2012)	0.25
<i>FGFR2</i>	10q26	rs11200014	A/G	<i>FGFR2</i> was associated with maxillary hypoplasia in class III malocclusion (da Fontoura et al., 2015; Jiang et al. 2019) and cleft lip and palate (Leslie et al., 2015)	0.39
		rs10736303	A/G		0.47

Bold letters indicate the polymorphic allele. Source <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

• DENTAL ANOMALIES

Dental anomalies were diagnosed through clinical examination, intraoral photographs, and panoramic radiographs by the same investigator (R.H.W.L.). In case of discrepancy between the clinical and photographic records, the individual was called for re-examination to confirm the diagnosis. Dental anomalies outside and inside of the cleft area were considered separately in this study and were divided into quantitative (tooth agenesis and supernumerary teeth), dimensional (macrodonia, microdonia/peg-shaped), structural (enamel hypomineralization and hypoplasia), irruptive/topographic (impaction, transposition, ectopic teeth), and morphological (root fusion, gemination, root dilaceration, taurodontism, accessory cusps, enamel pearls, talon cusp, *dens in dente*, and incisal alterations) (Figure 7). Third molars were excluded from the analysis.

Forty panoramic radiographs and photographs were revisited 2 months after the initial assessment to check for intra-observer reliability. The frequency of dental anomalies was used to test for association between the numbers and types of dental anomalies and the outcomes studied (Wits appraisal, Nperp to point A, and occlusal index).

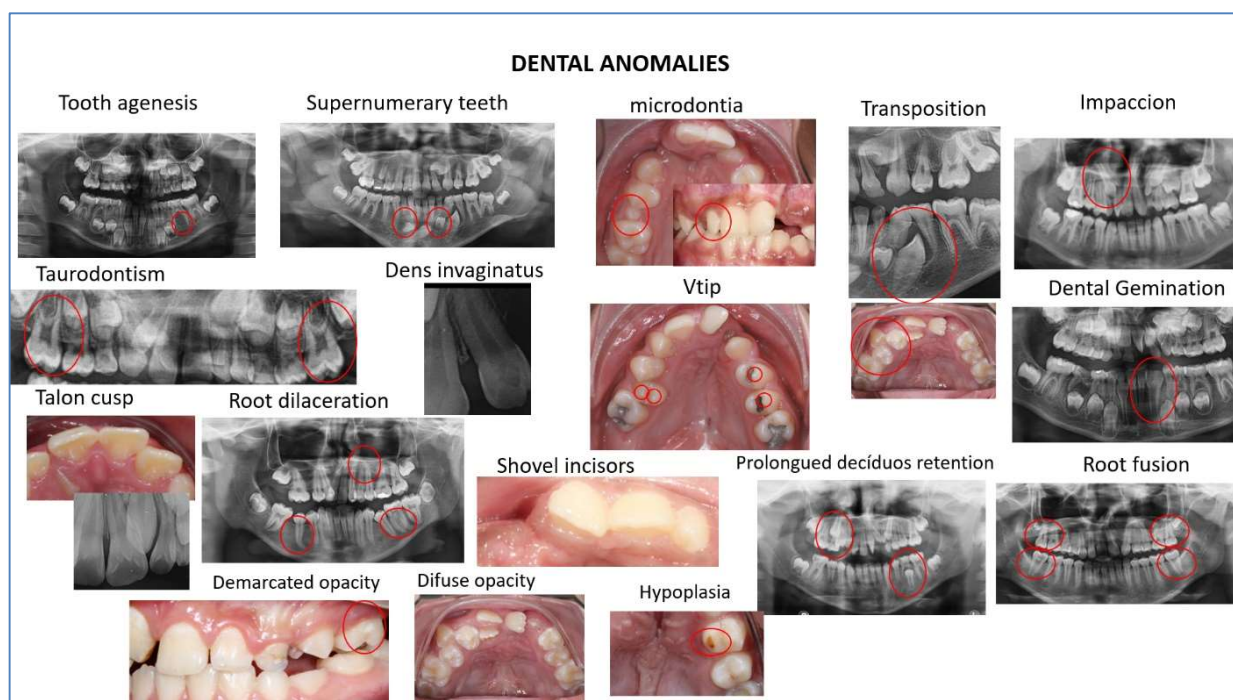


Figure 7- Dental anomalies scored in the study.

- **CLEFT SEVERITY**

Nasal Deformity

The extension of the affection of the nose and pronounced separation of the segments at the alveolar level (Botticelli et al. 2020) were considered. Pre-surgical cleft lip repair photographs of patients who had undergone cleft repair between 3 to 24 months of age, with well-positioned and good quality photographs, born with cleft lip and palate were included. There was a total of 193 individuals, 126 born with unilateral cleft lip and palate and 67 born with bilateral cleft lip and palate.

For unilateral cleft lip and palate cases, the nostril width ratio (cleft side – noncleft side) measured according to the Fisher's method (Fisher et al. 2008) was used (Figure 8). For bilateral cleft lip and palate cases, the ratio of nasal tip height and nasal width (Chang et al. 2014) was used (Figure 9). The lateral photographs were used in case there was a need for confirmation, cases that the nasal tip height was not possible to measure, was excluded from this variable sample. The Image J program was used to obtain all measurements. The measurements were repeated twice within 2 weeks to test for intra-rater reproducibility.



Figure 8- Nostril width ratio (cleft side – noncleft side) according to the Fisher's method (Fisher et al., 2008), using the Image J program. The ratio of measure of nostril cleft side width and nostril of noncleft side width was calculate, the higher the value found, the higher the severity of the nasal deformity.

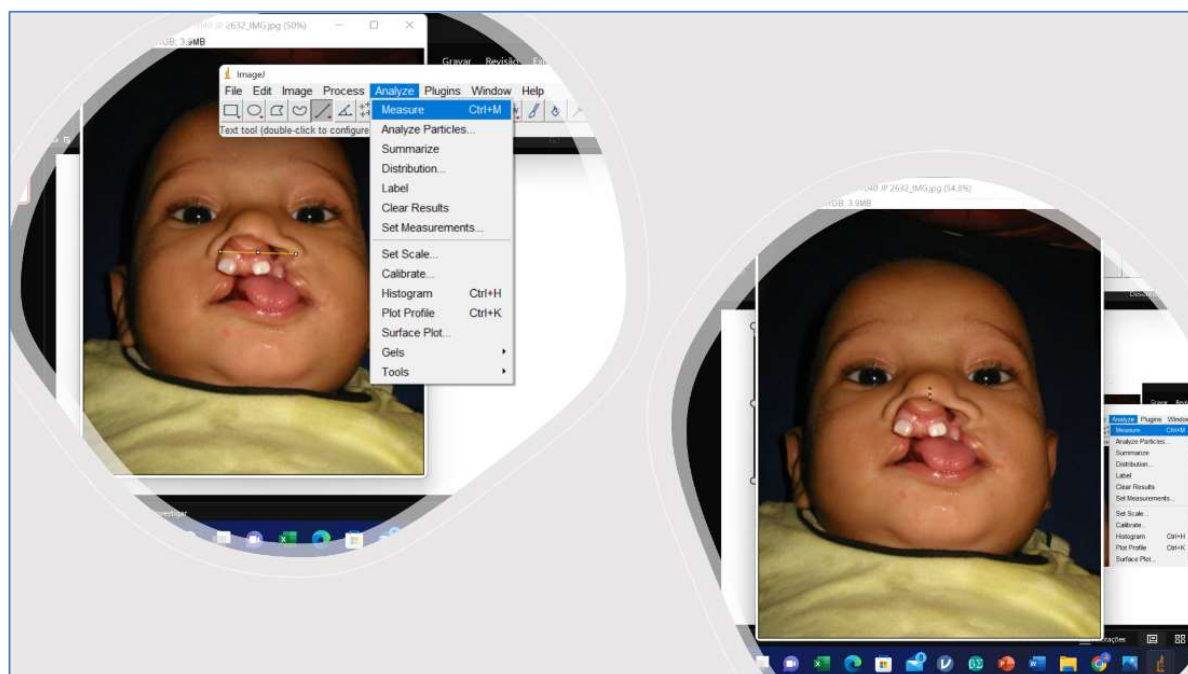


Figure 9- Ratio of nasal tip height and nasal width (Chang et al., 2014) assessed by using the Image J program. The height of the nasal tip is divided by the nasal width, smaller values indicates high severities.

Alveolar Defect

The alveolar defect was measured by determining the distance between maxillary segments. In cases born with a bilateral cleft, the side of the biggest defect was considered (Figure 10). Eighty pre-surgical dental casts were included for this analysis (40 unilateral cleft lip and palate cases and 40 bilateral cleft lip and palate cases).

Palatal Defect Width

Palatal defect width was measured by the distance between points located on either side at the ends of the edges of the soft palate, at the height of the maxillar tuberosity (Figure10). Eighty pre surgical dental casts were used (40 unilateral cleft lip and palate cases and 40 bilateral cleft lip and palate cases)

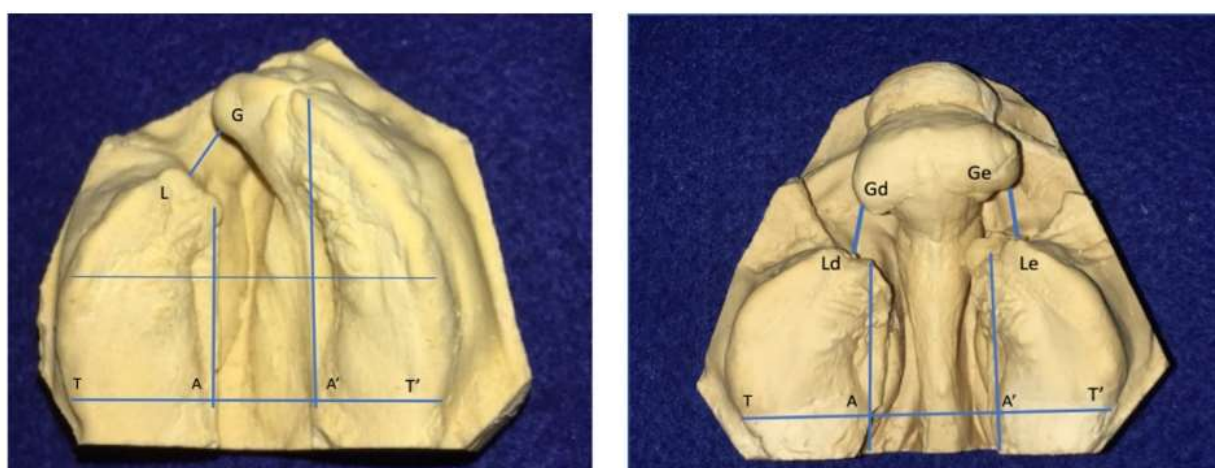


Figure 8. Alveolar defect width of an unilateral cleft lip and palate was defined by the distance between points G to L (maxillary alveolar segments). In cases born with a bilateral cleft lip and palate, the biggest defect side was considered for the statistical

Confounding Variables

- AGE AT PRIMARY SURGICAL TREATMENTS

Age when primary surgeries were done (lip repair and palate repair) and technique used were collected from the medical records. All the individuals included in the sample were operated on using the same technique (one stage palate repair using Von Langenbeck, and, for lip repair, Millard II technique for unilateral clefts, and one stage bilateral Spina technique for bilateral clefts).

Although the cleft center surgical protocol was that cleft lip repair is done at three to six months of age and primary palate repair is done at 12 to 18 months of age, treatment protocols of the cleft center and what was found was described at table 2. We found a relevant difference at the age of treatment (due to cases arriving at the center at older ages), and for this reason, this variable was statistically treated as covariate in the analysis.

Table 2- Surgical Protocol for patients with cleft lip and palate at the Lauro Wanderley University Hospital – Federal University of Paraiba- Brazil cleft center.

Ideal timing (months)	Procedure	minimum- maximum (months)	mean/sd
Unilateral cleft lip and palate			
3-6	Millard cleft lip repair	3-62	9.57±10.9
12-18	Von Langenbeck palate repair	11-96	27.8±19.7
Bilateral cleft lip and palate			
3-6	Bilateral Spina cleft lip repair	3-96	13±19.3
12-18	Von Langenbeck palate repair	10-120	31.3± 23.4

- SEX AND CLEFT LATERALITY

It is well known that the frequency of cleft types differs according to sex, as well as to cleft laterality.

The frequency of sex and cleft laterality, according to cleft type of the study sample was described in table 4. All analyzes were adjusted by sex and laterality.

- AGE

The inclusion criteria for this study included age from 7 to 14 years, pre orthodontic examination, radiographs, and photos. All analyzes were adjusted by age (the descriptive analysis of age was described in table 4).

Statistical Methods

Hardy-Weinberg equilibrium was accessed for each polymorphism by chi-square (wpcalc.com/em/equilibrium-hardy-Weinberg).

Reliability intra-rater was tested using intraclass correlation for Wits appraisal, nasion-perpendicular to point A, dental anomalies frequencies, and cleft severity measurements. Weighted Kappa statistics was used for the GOSLON and Bilateral Yardsticks. Wilcoxon test was used to compare the first and second evaluation in follow-up.

The predictors (genetic variation, dental anomalies, cleft severity, age of primary surgical treatment) were tested for association or correlation with the outcome (Wits appraisal, nasion-perpendicular to point A and occlusal scores) for the total sample and according to cleft type.

The association between genetic variation of all SNPs with Wits and nasion-perpendicular to point A was tested using multivariate test (MANCOVA) considering the age when radiographs and dental casts were taken as covariable. For differences in occlusal scores (combined in three subgroups: 1+2, scores 3, and 4+5), chi-square test was used, considering the genotype and allele frequency distributions within each group.

The total number of dental anomalies within each cleft type was compared using ANOVA with Bonferroni correction and dental anomalies frequency according to cleft types was compared using a multivariate test. To test the correlation of dental anomalies with Wits and nasion perpendicular to point A, Pearson's correlation and linear regression were performed. Variables included in the linear regression were those showing statistically significant differences in group comparisons adjusted for age, sex, cleft laterality, and age at the primary surgical treatments. Multiple logistic regression was used to test the correlation between occlusal scores and dental anomalies, and these comparisons were also adjusted by the confound variables.

The correlation between cleft severity (nasal defect, alveolar defect, and palatal defect width) and Wits and nasion-perpendicular to point A, was obtained using linear regression. The correlation between cleft severity and occlusal scores was obtained using multiple logistic regression. Age at the primary surgical treatments was used as a covariate in all the analysis but was also analyzed by type of clefts in correlation with

the outcome measures, Wits appraisal, and nasion- perpendicular to point A, using linear regression. Age at the primary surgical treatments was analyzed by type of clefts with occlusal scores by logistic regression.

Gene-gene interactions were tested using chi-square, comparing the frequency of genotypes between cases with good prognosis (occlusal scores 1+2) and cases with poor prognosis (4+5).

Values of $p < 0.05$ indicated statistically significant differences. All analyzes were performed with Jamovi software version 1.8.

Intra-observer variability

Intra- observer variability was accessed using the tests according to the variable type, as described below:

- OCCLUSAL INDEX

For the GOSLON yardstick score, *Kappa agreement* was $K=0.96$. For bilateral cleft lip and palate, Kappa agreement was $K=0.91$.

- CEPHALOMETRIC MEASURES

Intra-class correlation (ICC) was performed to test the reliability for Wits appraisal and nasion perpendicular to point A measurements. ICC for Wits appraisal was 0.97 (95% confidence interval 0.95 to 0.98). For nasion-perp to point A, concordance correlation was 0.98 (95% confidence interval 0.96 to 0.99).

- DENTAL ANOMALIES

Total anomalies outside and inside of the cleft area were analyzed separately. High level of agreement was found in all dental anomalies varying from 0.94 to 0.99 outside of cleft area. Similar results were found for anomalies in the cleft area. Concordance correlation plots are found in figures 11 and 12.

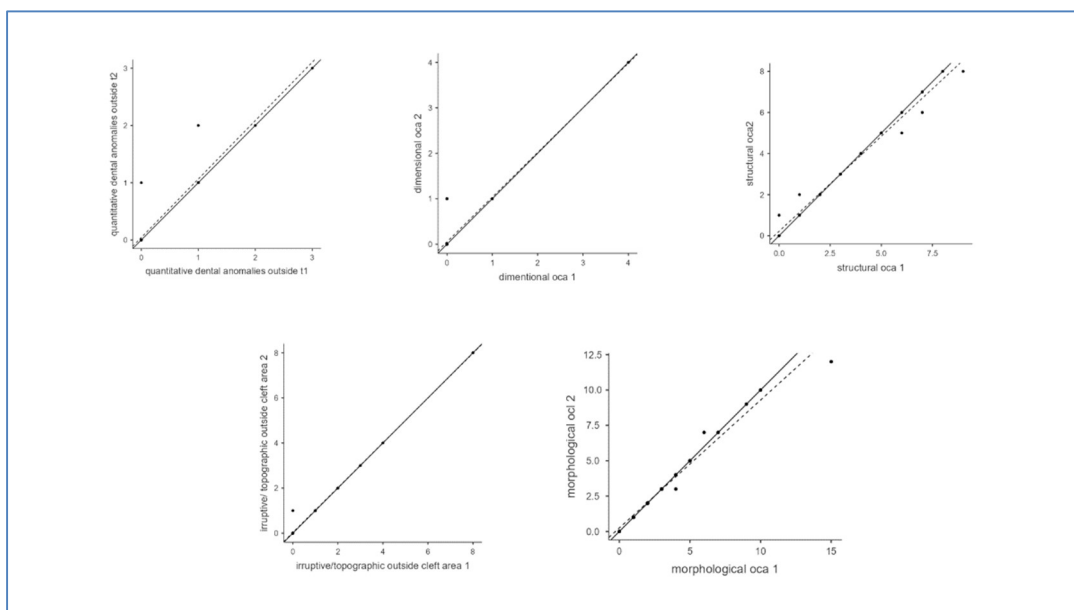


Figure 9. Dental anomalies outside of the cleft area, intra-rater concordance correlation graphic. Quantitative (0.94 irruptive/topographic (0.88 95% confidence interval 0.78 to 0.93), and morphological anomalies 0.85, confidence interval 0.74 to 0.92).

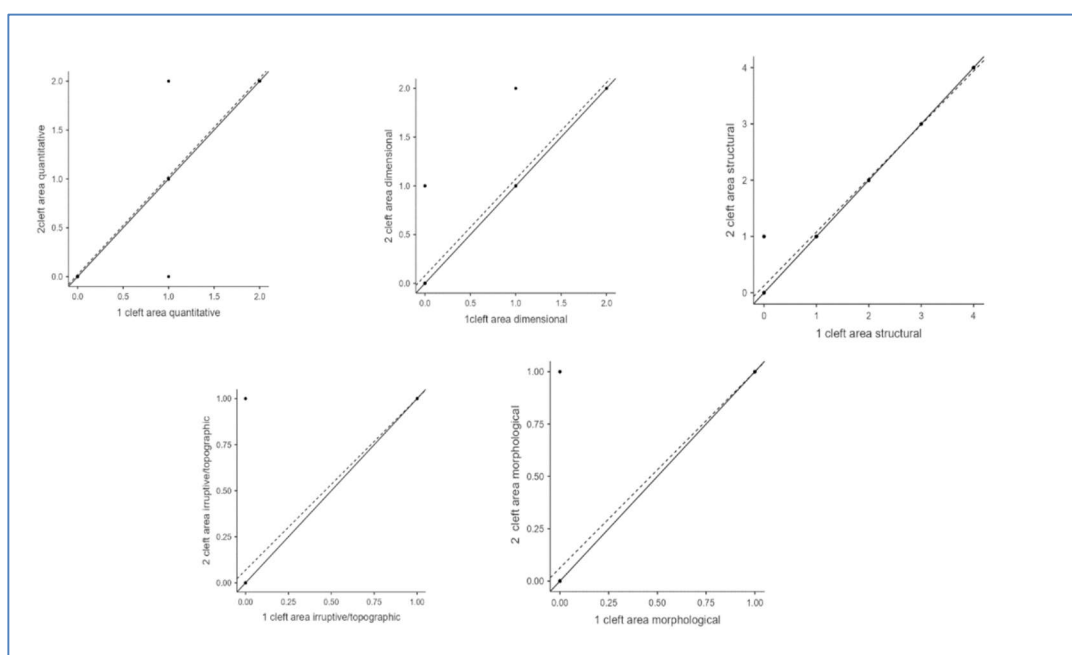


Figure 10. Dental anomalies inside of the cleft area, intra-rater concordance correlation graphics. Quantitative (0.91, 95% confidence interval 0.85 to 0.95), dimensional (0.89 95% confidence interval 0.81 to 0.94), enamel structural (0.98, confidence interval 0.97 to 0.99), irruptive/topographic (0.88, 95% confidence interval 0.78 to 0.93), and morphological anomalies 0.85, confidence interval 0.74 to 0.92).

- CLEFT SEVERITY

Intra-class correlation (ICC) was performed to test the reliability for cleft severity and the results for unilateral clefts (0.97; 95% confidence interval 0.94 to 0.98), bilateral clefts (0.94; 95% confidence interval 0.92 to 0.97), and alveolar defects and posterior defect (0.97; 95% confidence intervals 0.94 to 0.99) suggested good reliability.

RESULTS

Longitudinal evaluations

Occlusal relationships of 121 patients born with cleft lip and palate were analyzed two times with at least 4 years of interval.

Seventy-seven individuals that were born with unilateral cleft lip and palate (39 were female) had on average 10 years of age at the first evaluation (varying from 7 to 14 years) and were 15 years old on average at the second evaluation (varying from 11 to 25 years). The medium interval between evaluations was five years (from 4 to 17 years of follow-up). Scores at first and second evaluations and ages are described in Table 2. No correlation was found between age and GOSLON scores at the first ($p=0.68$, *Pearson's* $r=0.04$) or second ($p=0.76$, *Pearson's* $r=0.03$) evaluations. The changes in the trajectory of the scores are shown in **Figure 13A**.

Forty-four individuals were born with bilateral cleft lip and palate (18 were females) and they were 8 years old on average at the time of the first evaluation (varying from 7 to 13 years) and 14 years old at the second evaluation (varying from 11 to 23 years). The mean follow-up period was five years varying from 4 to 13 years. No correlation was found between age and occlusal scores at the first ($p=0.12$, *Pearson's* $r=0.23$) or second ($p=0.73$, *Pearson's* $r=0.05$) evaluations. The changes in the trajectory of the scores and ages are shown in **Figure 13B** and Table 2.

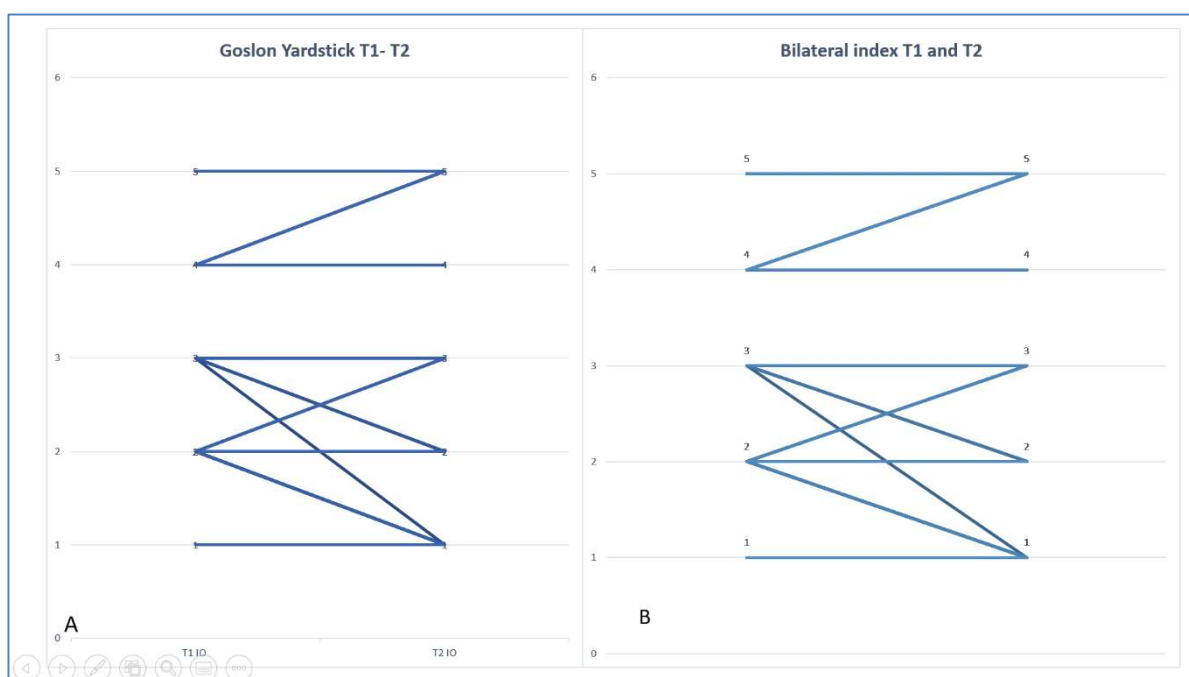


Figure 11. 13A- The trajectory of the maxillo-mandibular relationship using GOSLON yardstick (scores 1, 2, 3, 4, and 5) for unilateral cleft lip and palate, from four to seventeen years of follow-up ($p=0.06$ W Wilcoxon -test). 13B- We used the bilateral yardstick index (1 to 5) for bilateral cleft lip and palate from 4 to fourteen years of follow-up ($p=0.08$, W Wilcoxon test). Analyzing the cases individually, 32 in unilateral cases and 15 in bilateral changed the scores between T1 and T2. Cases that improved, changed from score 3 to 1 or 2, or 2 to 1. Cases that have orthognathic prognosis scores (4 and 5) did not improve to 3,2 or 1. The cases in scores 2 that got worse, changed to 3, but not to 4 or 5.

Table 2- Distribution of occlusal scores, at the first and second evaluation for unilateral and bilateral cleft lip and palate. Mean, minimum, and maximum age when scores were obtained, and number of individuals per score at each evaluation.

	First evaluation (absolute and percentiles numbers of cases distributed by scores)	Mean age (minimum and maximum age)	Second evaluation (absolute and percentiles numbers of cases distributed by scores)	Mean age (minimum and maximum age)
GOSLON yardstick				
Score 1	10 (12.3%)	9.3 (7-11)	30 (38.9%)	15.7 (12-25)
Score 2	32 (41.5%)	9.8 (7-12)	18 (23.3%)	14.6 (12-20)
Score 3	12 (15.5%)	9.0 (7-14)	6 (7.7%)	13.8 (12-16)
Score 4	17 (22.0%)	10.0 (7-14)	11 (14.2%)	15.4 (11-18)
Score 5	6 (7.7%)	9.6 (7-14)	12 (15.5%)	16.2 (11-25)
Bilateral yardstick				
Score 1	2 (4.5%)	9.5 (8-11)	14 (31%)	15.8 (12-22)
Score 2	23 (52.2%)	8.0 (7-13)	12 (27.2%)	14.1 (11-19)
Score 3	6 (13.6%)	11.3 (8-13)	5 (11.3%)	14.0 (11-17)
Score 4	8 (18.1%)	8.12 (7-12)	5 (11.3%)	12.6 (11-16)
Score 5	5 (11.36%)	11.6 (10-11)	8 (18.1%)	17.2 (12-23)

Predictors of maxillary growth trajectories

Three hundred and sixty individuals born with cleft lip with or without palate were included in this experiment. The description of the sample is found in **Table 3**.

Table 3 -Total sample descriptive analysis, cleft laterality, age of radiograph and dental casts access (mean and standard deviation), age of lip and palate repair (mean and standard deviation) and, number of individuals with at least one dental anomaly outside and inside of the cleft area.

	Unilateral cleft lip and palate (203)				Bilateral cleft lip and palate (117)		Unilateral cleft lip (40)			
Sex	Male		Female		Male	Female	Male		Female	
	106		97		69	48	23		17	
Cleft laterality	right	left	right	left	NA	NA	right	left	right	left
	35	71	25	72	NA		7	16	5	12
Age	11.3 ± 4.4		10.9 ± 4.37		11± 4.4	13± 5.64	9.36± 2.4		11.1± 4.7	
Number of individuals with at least one dental anomaly outside of the cleft area										
Tooth agenesis	46				18		2			
Supranumerary teeth	8				3		0			
Microdontia/peg shaped	9				4		6			
Structural enamel anomalies	182				104		33			
Irruptive/topographic dental anomalies	56				23		6			
Morphological dental anomalies	180				91		33			
At least one dental anomalies	203				117		40			
Number of individuals with at least one dental anomaly inside of the cleft area										
Tooth agenesis	95				62		15			
Supernumerary teeth	43				30		10			
Microdontia/peg shaped	81				60		16			
Structural enamel anomalies	162				110		32			
Irruptive/topographic dental anomalies	69				58		4			
Morphological dental anomalies	121				91		24			
At least one dental anomalies	200				115		39			

*NA= Not applicable

*Third molars were not considered.

Outcome measures according to cleft type are described in **Table 4 and 5**, and according to sex and cleft side in **tables 6 and 7**. Multivariate analysis showed no association between cleft laterality and sex with Wits and Nasion perpendicular to point A in unilateral cleft lip and palate ($p=0.93$) and unilateral cleft lip ($p=0.73$). Also, for bilateral cleft lip and palate, no association was found between sex and these outcome

measures ($p=0.12$). For occlusal scores, logistic regression showed that sex and laterality were not associated to GOSLON or Bilateral Yardsticks ($r^2= 0.02$ for GOSLON and $r^2= 0.01$). Age of cleft lip repair and cleft palate repair was described according to occlusal scores (Table 8) and Wits and Nasion perpendicular to point A (Table 9), no correlation was found between age of lip or palate repair with Wits, Nasion perpendicular to point A, or occlusal scores in cases born with unilateral or bilateral cleft lip and palate. Independent variables were tested for association or correlation with the outcome measures and the results were summarized in **Table 10**.

Table 4- Descriptive analysis (mean, standard deviation and confidence interval) of the outcome measures (Wits and Nasion perpendicular to point A) according to cleft type.

OUTCOME MEASURES

UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE			
	mean	Standard deviation	Confidence interval (95%)
Wits	- 0.76 mm	± 3.65	-1.26 to -0.259
Nasion Perp to point A	-0.47mm	± 3.26	-0.95 to 0.00
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE			
Wits	1.33 mm	± 4.93	0.41 a 2.25
Nasion Perp to point A	1.77 mm	± 4.16	0.97 a 2.58
UNILATERAL CLEFT LIP			
Wits	1.55 mm	±2.76	0.67 a 2.43
Nasion Perp to point A	2.70 mm	± 2.26	1.97 a 3.44

Table 5- Descriptive analysis (median, interquartile range, maximum and minimum) of the outcome measure (occlusal scores) according to cleft type.

OUTCOME MEASURES

UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE				
	median	Interquartile range	minimun	maximun
GOSLON YARDSTICK	3	2	1	5
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE				
BILATERAL YARDSTICK	2	2	1	5

Table 6- Outcome measures (Wits Appraisal and Nasion perpendicular to point A), descriptive analysis (mean, standard deviation and 95% confidence interval), according to cleft laterality and sex.

OUTCOME MEASURE

UNILATERAL RIGHT CLEFT LIP AND PALATE						
	Male			Female		
	Mean	Standard deviation	Confidence interval (95%)	Mean	Standard deviation	Confidence interval (95%)
Wits Appraisal	-0.78	±3.12	-1.91 to 0.34	-0.91	±4.39	-2.77 to 0.93
Nasion perpendicular to point A	-0.42	±3.25	-1.59 to 0.75	-0.66	±3.77	-2.26 to -0.92
UNILATERAL LEFT CLEFT LIP AND PALATE						
Wits Appraisal	-1.21	± 4.75	-2.40 to -0.02	- 0.69	±3.63	-1.59 to 0.20
Nasion perpendicular to point A	-0.68	± 3.01	-1.43 to 0.07	-0.17	±4.39	-2.77 to 0.93
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE						
Wits Appraisal	2.25	±4.84	1.01 to 3.49	0.40	±5.24	-1.27 to 2.07
Nasion perpendicular to point A	2.03	±4.40	0.90 to 3.16	1.59	±3.67	0.42 to 2.45
UNILATERAL RIGHT CLEFT LIP						
Wits Appraisal	2.71	± 3.73	- 0.73 to 6.16	0.25	± 3.77	-5.76 to 6.26
Nasion perpendicular to point A	4.83	± 2.48	2.23 to 7.44	0.75	± 0.95	-0.77 to 2.27
UNILATERAL LEFT CLEFT LIP						
Wits Appraisal	1.40	± 2.64	-0.06 to 2.86	1.50	±1.93	-0.27 to 2.73
Nasion perpendicular to point A	2.07	± 1.98	0.97 to 3.96	3.14	± 1.98	1.81 to 4.46

Table 7- Outcome measure (Occlusal scores), descriptive analysis (median, interquartile range maximum and minimum), according to cleft laterality and sex.

OUTCOME MEASURE

UNILATERAL RIGHT CLEFT LIP AND PALATE						
	MALE			FEMALE		
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum
GOSLON Yardstick	2.5	1	4	2	2	4
UNILATERAL LEFT CLEFT LIP AND PALATE						
GOSLON Yardstick	3	1	5	2	1	4
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE						
BILATERAL Yardstick	2	1	5	3	1	5

Table 8- Descriptive analysis (median, interquartile range, maximum and minimum) of age of submission of lip repair and palate repair (**in months**), according to cleft type and distributed according to occlusal scores (GOSLON scores for unilateral cleft lip and palate and Bilateral yardstick for bilateral cleft lip and palate).

	Unilateral cleft lip and palate				Bilateral cleft lip and palate				Unilateral cleft lip			
LIP REPAIR	Median	Interquartile range	min	max	median	Interquartile range	min	max	median	Interquartile range	min	max
Total sample descriptive	6	5	3	62	6	6	3	96	4	3	3	71
Occlusal score 1	6	4	3	23	6	9.5	3	92	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 2	5.5	4.7	3	62	6	4	3	67	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 3	6	4	3	41	6	6	3	96	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 4	6	5.5	3	62	6	7.5	3	58	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 5	10	9,8	3	54	6	9	3	60	NA	NA	NA	NA
PALATE REPAIR												
Total sample descriptive	21	22	11	96	24	14	10	120	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 1	19	12	12	56	34	64.8	12	96	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 2	18	21	12	96	21	21.8	10	96	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 3	22	24.8	12	96	24	41	12	120	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 4	21	27	11	96	24	13.5	12	84	NA	NA	NA	NA
Occlusal score 5	24	12	12	90	24	26	11	65	NA	NA	NA	NA

*NA= Not applicable

Table 9- Descriptive analysis (mean, standard deviation and 95% confidence interval of Wits and Nasion perpendicular to point A, according to age of cleft lip and cleft surgery grouped, in months in different cleft types .

UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE							
CLEFT LIP REPAIR							
		Wits			Nasio perpendicular ao ponto A		
	number of individuals	mean	Standard deviation	95% Confidence interval	mean	Standard deviation	95% Confidence interval
3 a 6 months	120	-0.63	±3.89	-1.37 to -0.09	-0.31	±3.22	-0.92 to 0.29
7 a 12 months	46	-1.31	±4.17	-2.57 to 0.03	-0.96	±3.17	-1.93 to -0.94
13 a 18 months	9	-0.16	±4.62	-5.02 to 4.65	-0.08	±3.23	-3.47 to 3.31
18 a 24 months	9	-1.38	±4.53	-5.17 to 2.42	-0.5	±3.38	-3.33 to 2.33
More than 24 months	19	-1.76	±4.58	-4.12 to 0.58	-0.17	±3.83	-2.14 to 1.79
CLEFT PALATE REPAIR							
		Wits			Nasio perpendicular ao ponto A		
	number of individuals	mean	Standard deviation	95% Confidence interval	mean	Standard deviation	95% Confidence interval
12 to 18 months	93	-0.39	±3.91	-1.21 to 0.42	-0.10	±3.26	-0.78 to 0.57
19 to 24 months	35	-1.28	±4.59	-3.02 to 0.47	-0.55	±3.46	-1.87 to 0.76
25 to 36 months	20	-1.39	±3.52	-3.14 to 0.36	-1.19	±2.37	-2.37 to -0.01
More than 36	55	-1.51	±4.15	-2.71 to -0.29	-0.78	±3.40	-1.79 to 0.21
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE							
CLEFT LIP REPAIR							
		Wits			Nasio perpendicular ao ponto A		
	number of individuals	mean	Standard deviation	95% Confidence interval	mean	Standard deviation	95% Confidence interval
3 a 6 months	67	1.85	±4.78	0.63 to 3.06	1.90	±4.23	0.83 to 2.97
7 a 12 months	29	2.25	±5.14	-0.15 to 4.66	2.80	±5.0	0.45 to 5.14

13 a 18 months	5	0.20	±4.60	-5.52 to 5.92	-1.0	±3.16	-4.93 to 2.93
18 a 24 months	1	-2.0	NA	NA	-1.00	NA	NA
More than 24 months	15	-0;79	±6.35	-4.45 to 2.88	0;92	±2.20	-0.34 to 2.20

CLEFT PALATE REPAIR

12 to 18 months	52	0.66	±4.46	-0.82 to 4.46	1.54	±4.04	0.19 to 2.89
19 to 24 months	27	2.65	±5.53	-0.19 to 5.53	1.18	±4.41	-1.09 to 3.44
25 to 36 months	9	1.44	±3.75	-1.43 to 3.75	1.78	±5.26	-2.27 to 5.89
More than 36	29	0;72	±5.62	-1.42 to 5.62	1.72	±4.34	0.07 to 3.38

UNILATERAL CLEFT LIP

CLEFT LIP REPAIR

		Wits			Nasio perpendicular ao ponto A		
	number of individuals	mean	Standard deviation	95% Confidence interval	mean	Standard deviation	95% Confidence interval
3 a 6 months	34	1.24	±2.56	0.30 to 2.18	2.47	±2.26	1.62 to 3.31
7 a 12 months	3	4.67	±4.62	-6.81 to 4.62	4.50	±2.18	-4.60 to 3.60
13 a 18 months	0						
18 a 24 months	0						
More than 24 months	3	1.33	±2.31	-4.40 to 7.07	4.33	±2.08	-0.83 to 2.18

Table 10- Analysis of correlation and association. Between outcome measures (Wits appraisal, nasion-perpendicular to point A, and occlusal index), and predictors (genetic variation, dental anomalies, cleft severity and age at primary surgeries treatments). The mean and standard deviations of Wits appraisal and nasion perpendicular to point A was described per SNPs, multivariate analysis with age at the radiographs, age of lip and palate repair, sex and cleft laterality as covariable, was used to test the association between outcome measures and genotype in all the genes studied, in total sample and by cleft type. For occlusal index, chi-square test was performed to test the association of the frequency of genotype and occlusal scores according to cleft type. Linear regression was performed to test the correlation between dental anomalies and Wits and nasion-perpendicular to point A, and logistic regression to test the occlusal scores with the dental anomalies according to cleft type. Cleft severity and age of primary surgeries treatment were tested in correlation to Wits, nasion -perpendicular to point A, and occlusal scores using linear regression, and with occlusal scores using multiple logistic regression.

Predictors Outcomes

	Anteroposterior relationship of jaws (“Wits” Appraisal)			Maxillary position (Nasion perpendicular to point A)			Occlusal index (GOSLON Yardstick and Atack index to unilateral cleft lip and palate. Bilateral Index to bilateral cleft lip and palate)									
GENETIC VARIATION		p-value			p-value			p value								
MMP2 rs9923304 (C/T)	<0.001* #			0.002* #			<0.001* X ²									
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC			CT			TT			
	1.55 ±4.20	0.40 ±4.10	-2.05 ±3.88	1.56 ±3.77	0.06 ±3.44	-1.62 ±3.77	Index 1+2 104	Index 3 14	Index 4+5 14	Index 1+2 66	Index 3 22	Index 4+5 43	Index 1+2 13	Index 3 6	Index 4+5 38	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate						Bilateral cleft lip and palate			
	0.01*	0.03*	0.06	0.02*	0.04*	0.16	<0.0001*						<0.0001*			
	GLI2 rs3738880 (G/T)	0.015*#			0.001*#			0.077 X ²								
GG		GT	TT	GG	GT	TT	GG			GT			TT			
-1.22 ±3.91		-0.03 ±4.22	-0.92 ±4.05	-1.26 ±4.63	0.48 ±3.46	1.12 ±3.44	Index 1+2 24	Index 3 7	Index 4+5 20	Index 1+2 81	Index 3 25	Index 4+5 42	Index 1+2 72	Index 3 8	Index 4+5 32	
Unilateral cleft lip and palate		Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate						Bilateral cleft lip and palate			
0.003*		0.11	0.49	0.005*	0.72	0.94	0.35						0.11			
GLI2 rs2278741 (C/G)		0.691 #			0.583 #			0.07 X ²								
	CC	CG	GG	CC	CG	GG	CC			CG			GG			
	0.30 ±4.25	0.06 ±4.42	-0.38 ±5.03	0.92 ±3.75	0.30 ±4.10	0.71 ±4.05	Index 1+2 67	Index 3 14	Index 4+5 29	Index 1+2 66	Index 3 8	Index 4+5 40	Index 1+2 23	Index 3 10	Index 4+5 15	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate						Bilateral cleft lip and palate			
	0.58	0.33	0.21	0.83	0.79	0.48	0.22						0.11			
	TGFA rs2166975 (A/G)	0.156 #			0.449 #			0.009* X ²								
AA		AG	GG	AA	AG	GG	AA			AG			GG			
-0.78 ±4.57		-0.12 ±4.16	0.55 ±4.10	-0.021 ±4.12	0.54 ±3.94	0.60 ±3.60	Index 1+2 47	Index 3 12	Index 4+5 49	Index 1+2 75	Index 3 22	Index 4+5 31	Index 1+2 39	Index 3 18	Index 4+5 8	
Unilateral cleft lip and palate		Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate						Bilateral cleft lip and palate			
0.003*		0.41	0.70	0.38	0.93	0.92	0.006*						0.26			
FGFR2 rs11200014 (A/G)		0.005* #			<0.001*#			0.01* X ²								
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA			AG			GG			
	1.16 ±4.65	- 0.094 ±4.36	-2.30 ±2.37	1.25 ±3.82	1.15 ±3.94	-2.00 ±1.62	Index 1+2 8	Index 3 2	Index 4+5 23	Index 1+2 27	Index 3 8	Index 4+5 54	Index 1+2 16	Index 3 4	Index 4+5 7	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate						Bilateral cleft lip and palate			
	0.46	0.28	0.72	0.09	0.12	0.97	0.44						0.65			
	FGFR2 rs10736303 (A/G)	0.20 #			0.15 #			0.13 X ²								
AA		AG	GG	AA	AG	GG	AA			AG			GG			
0.45 ±3.70		0.50 ±4.53	0.26 ±4.07	-0.27 ±3.38	0.70 ±1.49	0.85 ±3.44	Index 1+2 43	Index 3 12	Index 4+5 29	Index 1+2 67	Index 3 22	Index 4+5 35	Index 1+2 52	Index 3 6	Index 4+5 19	
Unilateral cleft lip and palate		Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate						Bilateral cleft lip and palate			

	0.43	0.78	0.001	0.29	0.57	0.76	0.23	0.11
DENTAL ANOMALIES								
	<i>p-value</i>			<i>p-value</i>			<i>p value</i>	
Tooth agenesis	0.014* §			0.22 §			0.04* °	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate
	0.03*	0.89	0.81	0.14	0.65	0.03*	0.31	0.57
Supernumerary teeth	0.23 §			0.42 §			0.42 °	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate
	0.10	0.81	0.15	0.19	0.94	0.32	0.26	0.55
Microdontia (peg-shaped)	0.06 §			0.02* §			0.17 °	
	Unilateral complete cleft lip	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate
	0.21	0.57	0.76	0.03*	0.93	0.16	0.19	0.18
Enamel Structural anomalies	<0.001* §			0.01* §			<0.001* °	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate
	<0.0001*	0.52	0.11	0.005*	0.02*	0.24	<0.001*	0.012*
Irruptive and Topographic anomalies	0.03* §			0.34 §			0.002* °	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate
	0.17	0.08	0.60	0.41	0.04*	0.40	0.18	0.03*
Morphological anomalies	<0.001* §			0.008* §			<0.001* °	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate
	<0.001*	0.12	0.69	0.08	0.05	0.57	<0.001*	0.01*
Total anomalies	<0.001* §			<0.001*§			<0.001* °	
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral complete cleft lip	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate
	<0.001*	0.08	0.15	0.001*	0.03*	0.12	<0.001*	< 0.001*
CLEFT SEVERITY								
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate		
Nasal deformity	0.89 §	0.05 §	0.16 §	0.47 §	0.16 °	0.32 °		
Alveolar Defect.	0.68 §	0.17 §	0.13 §	0.77 §	0.17 °	0.44 °		
Posterior Defect.. width	0.20 §	0.12 §	0.08 §	0.94 §	0.75 °	0.76 °		
AGE AT PRIMARY SURGERIES TREATMENTS								
	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate	Unilateral cleft lip and palate	Bilateral cleft lip and palate		
Cleft lip primary surgery	0.24 §	0.43 §	0.05 §	0.75 §	0.92 °	0.77 °		
Cleft palate primary surgery	0.05 §	0.81 §	0.27 §	0.78 §	0.87 °	0.53 °		

multivariate test (MANCOVA); X²- Chi-square Test; § linear regression; ° logistic regression

• Genetic variation and outcomes

The frequency of genotypes according to cleft type and the total sample is shown in Figure 14. All genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. The distribution of genotypes according to cleft types showed differences in *FGFR2* rs10736303 with a higher frequency of rare homozygous in unilateral cleft lip and palate, and a higher frequency of rare homozygous in bilateral cleft lip and palate in *FGFR2* rs11200014.

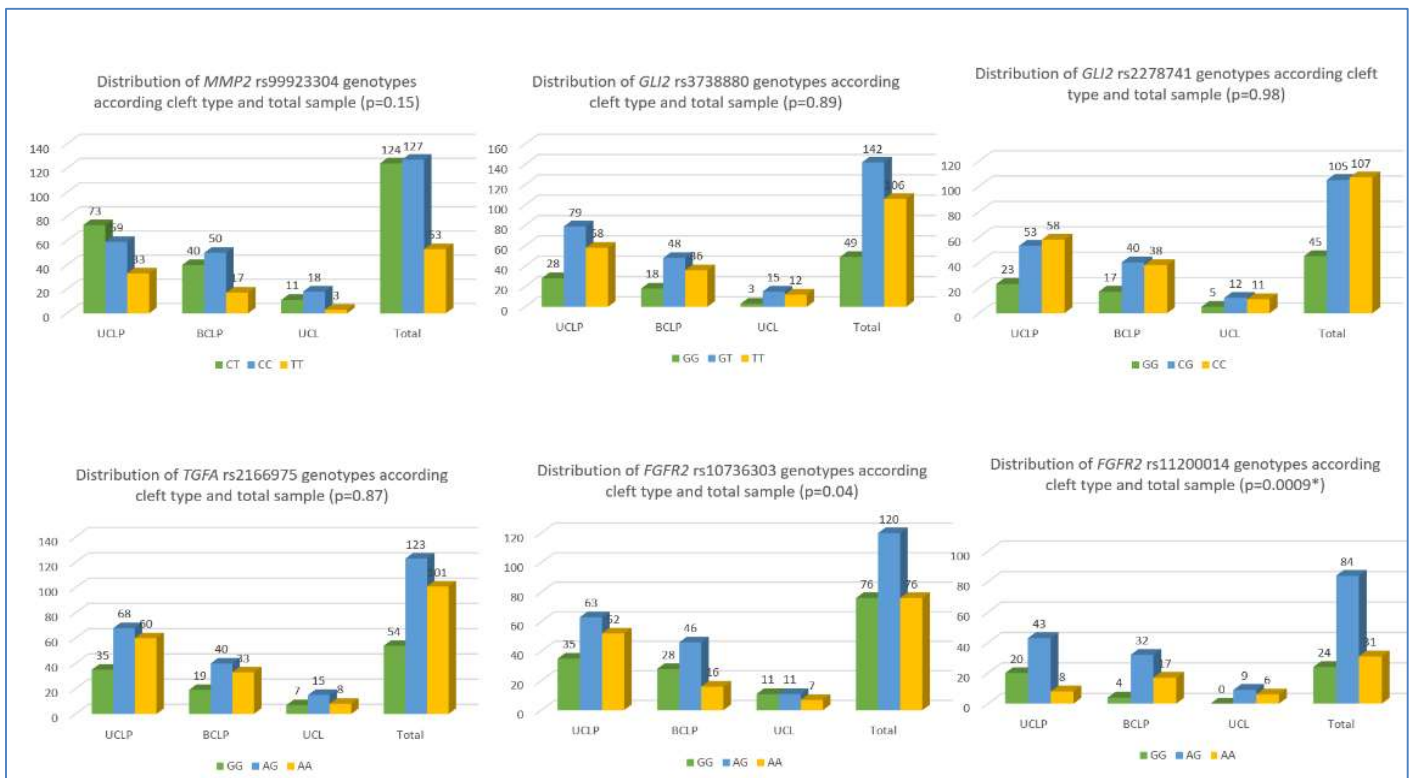
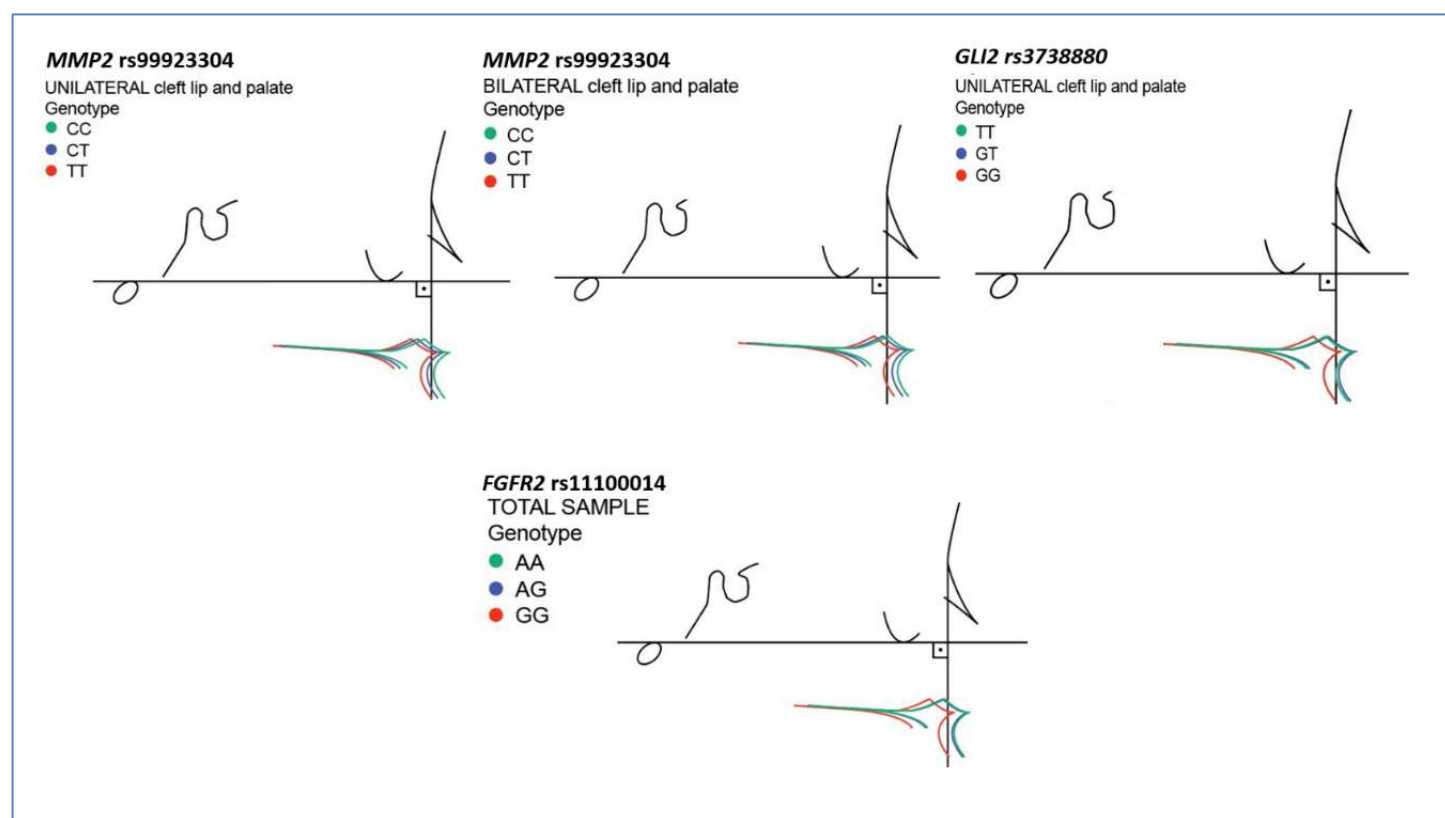


Figure 12. Genotypes distribution MMP2 rs99923304, GLI2 rs3738880 and rs2278741, TGFA rs2166975, and FGFR2 rs10736303 and rs11200014 in the total sample and according to cleft types unilateral cleft lip and palate (UCLP), bilateral cleft lip and palate (BCLP) and unilateral cleft lip (UCL). Chi-square was used to test the difference in genotyping frequencies.

Polymorphisms in *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880 and rs2278741, *TGFa* rs2166975, *FGFR2* rs10736303, and rs11200014 were tested for association with facial growth outcomes using multivariate analysis for Wits and nasion perpendicular to point A, (**Table 10 and 11**) and using chi square to test for association with occlusal scores prognosis (**Table 10 and Tables 13 to 18**). Cephalometric measures distributed by SNPs, according to cleft type, were described in **Table 11**. We found association for cases born with unilateral cleft lip and palate between Wits and *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880, and *TGFa* rs2166975; and nasion perpendicular to point A and *MMP2* rs9923304 and *GLI2* rs3738880. In bilateral cleft lip and palate cases, *MMP2* rs9923304 showed an association with both maxillo-mandibular position and maxillary position. Among the unilateral cleft lip cases, *FGFR2* rs10736303 was associated with Wits appraisal (**Table 11**). *FGFR2* rs11200014 was associated with all the outcome measures in the total sample, but no association was found when each cleft phenotype was considered (**Table 10**, Figures 15 and 16).

Figure 13. SNPs that showed association with maxillary position (nasion perpendicular to point A), according to cleft types.



(MMP2 rs9993304, GLI2 rs3738880, and FGFR2 rs11100014).

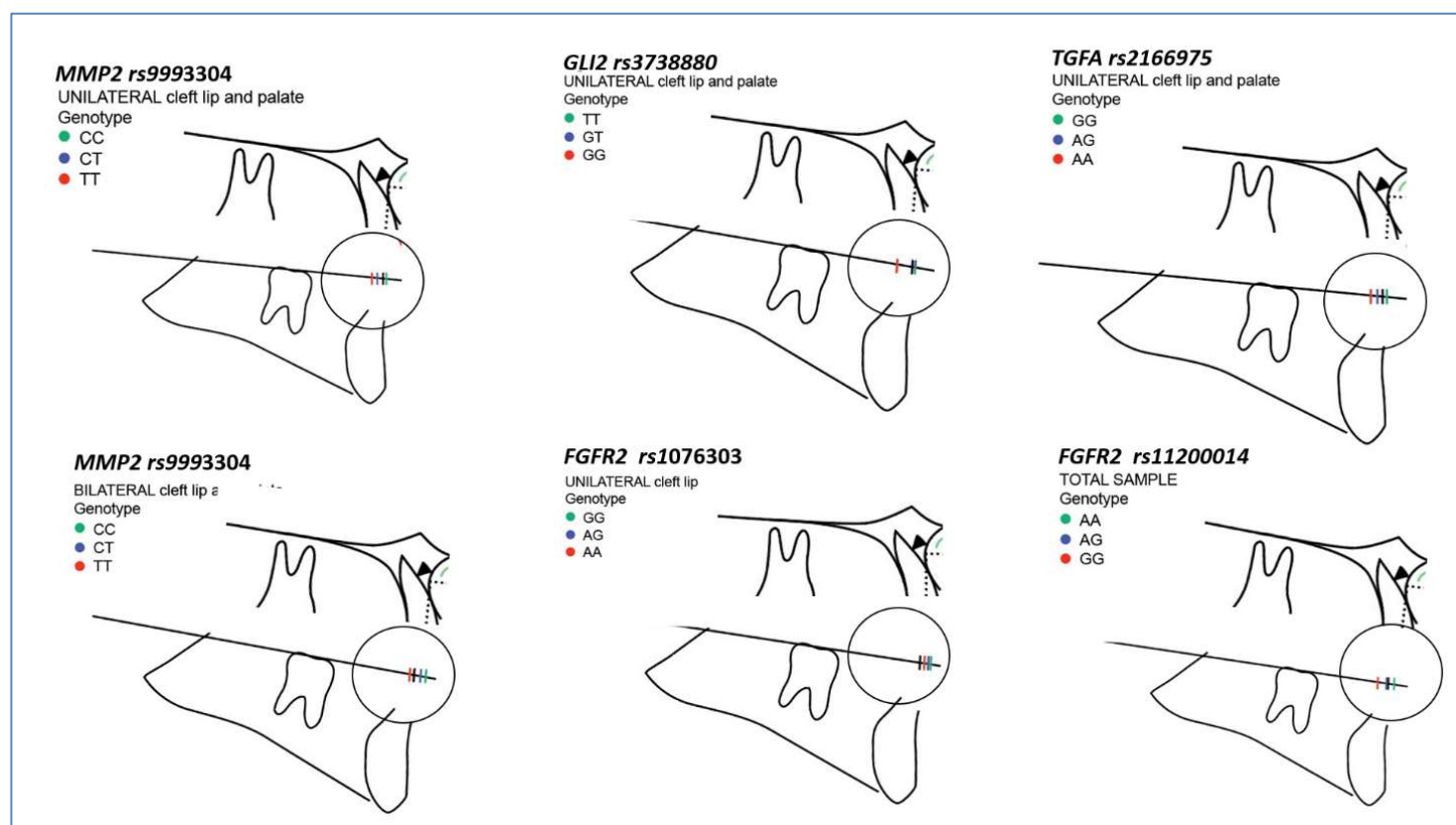


Figure 14- SNPs that showed association with maxillo-mandibular relationship (Wits appraisal) according to cleft types. (MMP2 rs9993304, GLI2 rs3738880, TGFa rs2166975, and FGFR2 rs1076303 and rs11200014).

Table 11- Descriptive analyzes of cephalometric measures (Wits and nasion- perpendicular to point A) in *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880, rs2278741, *TGFa* rs2166975, *FGFR2* rs11200014 and, rs10736303 genotype, according to cleft type. Multivariate analysis with age in the data of cephalometric radiograph, age of lip and palate repair submission as a covariate as a covariate was performed by cleft type.

MMP2											
rs9923304	CC			CT			TT				
	mean	Standard deviation	Confidence interval (95%)	mean	Standard deviation	Confidence interval (95%)	Mean	Standard deviation	Confidence interval (95%)	p	p#
UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	0.46	± 3.22	-0.37 to 1.30	-1.07	± 3.86	-1.98 to -.016	-2.39	± 4.03	-3.77 to -1.02	0.01*	0.01
Nperp-A	0.29	± 2.81	-0.47 to 1.07	-0.73	± 3.16	-1.53 to 0.05	-2.11	± 3.41	-3.37 to -0.84	0.02*	
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	2.28	± 4.98	0.79 to 3.77	1.16	± 4.34	-0.23 to 2.56	-1.13	± 2.56	-3.03 to 0.78	0.03*	0.04
Nperp-A	2.52	±4.66	1.08 to 3.97	1.31	± 3.64	0.05 to 2.57	- 0.56	± 3.12	-2.09 to 0.96	0.04*	
UNILATERAL CLEFT LIP											
Wits	2.0	± 2.94	-0.88 to 4.88	1.0	±1.77	-0.22 to 2.23	0.21	±2.55	-1.67 to 2.10	0.06	0.15
Nperp-A	1.33	±2.31	-1.28 to 3.95	2.50	± 2.56	0.72 to 4.28	3.57	±1.62	2.37 to 4.77	0.16	
GLI2											
rs3738880	GG			GT			TT				
UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											

Wits	-2.89	± 3.49	-4.21 to 1.57	-0.49	± 3.86	-1.36 to 0.37	0.25	± 3.23	-0.59 to 1.10	0.003*	0.005
Nperp-A	-2.50	± 3.23	-3.83 to -1.29	0.26	± 3.16	-1.01 to 0.48	-0.02	± 2.90	- 0.87 to 0.82	0.005*	
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	1.22	± 3.49	-0.39 to 2.83	0.43	± 5.03	-1.06 to 1.92	1.45	± 4.73	-0.27 to 3.17	0.11	0.34
Nperp-A	0.77	± 4.60	-1.35 to 2.90	-0.50	± 3.73	-0.50 to 1.81	2.52	± 4.01	-0.94 to 4.09	0.72	
UNILATERAL CLEFT LIP											
Wits	1.00	± 0.00	1.0 to 1.0	1.13	± 2.92	0.34 to 2.61	2.40	± 3.07	0.68 to 1.40	0.49	0.82
Nperp-A	3.50	±2.12	0.56 to 6.44	2.40	± 2.32	1.22 to 3.58	2.80	± 2.25	1.22 to 3.58	0.94	
GLI2											
rs2278741	CC			CG			GG				
UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	-1.12	± 3.70	-2.07 to -0.16	-0.58	± 3.90	-1.67 to 0.50	-0.59	± 4.24	-2.36 to 1.18	0.58	0.63
Nperp-A	-0.56	± 3.35	1.49 to 0.36	-0.38	± 3.25	-1.36 to 0.60	-0.8	±3.14	-2.18 to 0.57	0.83	
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	2.29	±4.88	0.65 to 3.93	0.60	± 4.38	0.85 to 2.05	0.06	±6.67	-3.31 to 3.44	0.33	0.50
Nperp-A	2.20	± 3.60	0.91 to 3.49	1.38	± 4.24	-0.04 to 0.28	2.31	± 5.15	-0.49 to 5.11	0.79	
UNILATERAL CLEFT LIP											
Wits	1.44	±1.24	0.63 to 1.24	3.01	±3.86	0.81 to 5.18	-0.25	± 3.40	-3.59 to 3.09	0.21	0.15
Nperp-A	3.11	± 1.96	1.83 to 4.39	2.09	± 2.39	0.68 to 3.50	2.01	±2.16	-0.11 to 4.12	0.48	
TGFa											
rs2166975	GG			AG			AA				
UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	0.54	± 3.30	-0.58 to 1.67	-.074	±3.43	-1.57 to 0.07	-2.10	±4.25	-3.20 to -0.99	0.003*	0.04
Nperp-A	-0.10	±3.47	-1.34 to 1.14	-0.96	±3.44	-1.86 to -0.06	-0.78	±3.28	-1.68 to 0.11	0.38	
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	0.22	± 6.11	-2.60 to 3.05	0.77	±5.20	-0.95 to 2.49	1.60	±3.94	0.25 to 3.12	0.41	0.74
Nperp-A	0.93	± 4.42	-1.30 to 3.17	1.83	±4.01	0.39 to 3.27	1.69	±4.25	0.14 to 3.24	0.91	
UNILATERAL CLEFT LIP											
Wits	1.0	±2.58	-0.91 to 2.91	0.66	±2.23	-0.59 to 1.53	0.93	±1.52	-0.11 to 1.99	0.70	0.93
Nperp-A	3.0	±1.55	1.76 to 4.24	2.50	±2.35	1.17 to 3.83	2.13	±2.17	0.62 to 3.63	0.93	
FGFR2											
rs11200014	GG			AG			AA				
UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	-2.40	± 1.85	-3.21 to 1.59	-1.28	±4.34	-2.58 to 0.01	-0.83	±3.68	-3.43 to 1.68	0.46	0.05
Nperp-A	-2.30	± 1.66	-3.03 to -1.57	-0.42	±3.65	-1.58 to 0.74	-0.33	±4.37	-3.83 to 3.16	0.09	
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	-1.25	±4.11	-5.28 to 2.78	1.37	± 3.88	-0.02 to 2.76	2.43	±5.09	-0.24 to 5.10	0.28	0.09
Nperp-A	-1.50	±1.29	-2.77 to -0.23	2.71	±4.08	1.20 to 4.23	1.15	±4.16	-1.11 to 3.42	0.12	
UNILATERAL CLEFT LIP											
Wits	-	± -	-	0.16	±2.26	-1.31 to 1.65	0.50	±1.38	-0.60 to 1.60	0.72	0.94
Nperp-A	-	± -	-	2.22	±2.11	0.84 to 3.60	2.17	± 2.14	0.45 to 3.60	0.97	
FGFR2											
rs10736303	GG			AG			AA				
UNILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	-0.50	± 3.33	- 1.62 to 0.62	-0.27	± 4.44	-1.31 to 0.84	-1.18	± 3.28	-2.10 to -0.26	0.43	0.71
Nperp-A	-0.56	± 2.85	-1.55 to 0.42	0.05	± 3.41	-0.85 to 0.96	-1.12	± 2.78	-1.97 to -0.27	0.29	
BILATERAL CLEFT LIP AND PALATE											
Wits	0.69	± 4.56	-1.06 to 2.44	1.43	± 4.47	0.14 to 2.73	1.14	± 3.98	-0.94 to 3.23	0.78	0.82
Nperp-A	1.00	±3.29	-0.34 to 2.34	2.02	±4.48	0.66 to 3.38	1.00	±4.31	-1.26 to 3.26	0.57	
UNILATERAL CLEFT LIP											
Wits	2.00	±4.52	0.66 to 4.67	1.45	±2.03	0.18 to 2.71	0.60	± 1.14	-0.39 to 1.60	0.01*	0.01
Nperp-A	4.09	±1.79	3.05 to 5.13	1.56	±1.74	-0.41 to 2.69	0.60	±0.89	-0.18 to 1.38	0.76	

p#- multivariate test (Pillai trace p-value) adjusted by age of cephalometric analysis, age of cleft lip and cleft palate submission (as covariable)

Occlusal scores were grouped and classified as good prognosis (scores 1 + 2), moderate prognosis (score 3), and poor prognosis (scores 4 + 5). The distributions of genotypes and alleles of the selected SNPs according to prognosis based on occlusal scores and its association with dental anomalies according to cleft type were analyzed. Polymorphisms in *MMP2* rs9923304 showed an association with grouped scores (scores 1+2 = good prognosis; score 3= moderate prognosis; score 4+5= poor prognosis) in unilateral and bilateral cleft lip and palate, and *TGFa* rs2166975 and unilateral cleft lip and palate occlusal scores (Tables 12 to 17).

Distribution of occlusal scores in the genotypes of the studied SNPs of unilateral and bilateral cleft lip and palate can be found in **Figures 17 to 28**. Statistical evidence for gene-gene interaction was found between *MMP2* rs9923394 and *GLI2* 3733888 (**Table 12**). People with two copies of both rare variants have a higher chance of developing maxillary retrognathism ($p < 0.001$, odds ratio= 78, 95% CI: 6.93 >78> 877.9) than those who have two copies of both common alleles. People who are heterozygous for both markers have a higher chance of having poor outcomes related to maxillary growth ($p = 0.008$, odds ratio=7.56, 95% CI: 2.04 >7.621> 28.4) compared to those with two copies of common alleles in the total sample.

Table 12-*MMP2* rs99203304 and *GLI2* rs3738880 gene interaction in the total sample. Chi-square test and odds ratio calculations were performed to compare the frequency of good and poor prognosis according to genotype). Being heterozygous for both markers was compared to being homozygous common ($p = 0.008$, odds ratio= 7.56, 95% CI: 2.04 >7.621> 28.474). Being heterozygous for both markers was compared to being homozygous rare for both markers ($p = 0.01$ odds ratio 0.97, CI: 0.011 >0.098> 0.882) and being homozygous rare for both markers was compared with being homozygous common for both markers ($p < 0.0001$, odds ratio= 78, 95% CI: 6.93 >78> 877.9).

Total sample		<i>GLI2</i> rs3738880							
<i>MMP2</i> rs99203304	CC	TT		55	GT		21	GG	
		45	PROGNOSIS		55	PROGNOSIS		21	PROGNOSIS
			GOOD 39			GOOD 43			GOOD 13
	CT	43	MODERATE 3		61	MODERATE 6		20	MODERATE 5
			POOR 3			POOR 6			POOR 3
			PROGNOSIS			PROGNOSIS			PROGNOSIS
	TT	18	GOOD 26		27	GOOD 29		7	GOOD 7
			MODERATE 3			MODERATE 15			MODERATE 3
			POOR 14			POOR 17			POOR 10
			PROGNOSIS			PROGNOSIS			PROGNOSIS
			GOOD 4			GOOD 6			GOOD 1
			MODERATE 2			MODERATE 4			MODERATE 0
			POOR 12			POOR 17			POOR 6

Table 13- a. *MMP2* rs9923304 genotype and allele frequency according to prognosis based on occlusal scores (GOSLON yardstick for unilateral cleft lip and palate and Bilateral yardstick for bilateral cleft lip and palate), classified as good prognosis (index 1 and 2), moderate (index 3) and severe prognosis (index 4 and 5). Chi-square or Fisher's exact tests were used. **b.** Association between dental anomalies and *MMP2* rs9923304, according to cleft type, multivariate analysis was used.

<i>MMP2</i> rs9923304	Unilateral cleft lip and palate			Bilateral cleft lip and palate			Unilateral cleft lip
Genotype and allele frequency according to prognosis (based on occlusal scores)							
PROGNOSIS	C	T		C	T		
GOOD	121	47		91	25		NA
MODERATE	28	18		19	13		NA
POOR	42	74		23	35		NA
X ² Test	p<0.0001			p<0.0001			NA
	CC	CT	CC	CT	TT	TT	NA
GOOD	44	33	17	11	2	3	NA
MODERATE	8	12	1	0	1	2	NA
POOR	7	28	-	-	-	12	NA
X ² or Fisher's exact test#	p<0.001*			p<0.001*			NA
Association between dental anomalies and <i>MMP2</i> rs9923304 according to cleft type (Multivariate test)							
Morphological	0.004*			0.003*			0.35
Enamel structural	0.03*			0.15			0.59
Irruptives/ topographic	0.47			0.43			0.23
Dimensional	0.775			0.45			0.69
Hypodontia	0.413			0.63			0.846
Total anomalies	<0.001*			0.003*			0.259

*Genotypes in *MMP2* rs9923304 are CC- common homozygous, TT- rare homozygous, and CT- heterozygous. The number of *MMP2* rs9923304 genotypes differs from the number of total sample for PCR failure.

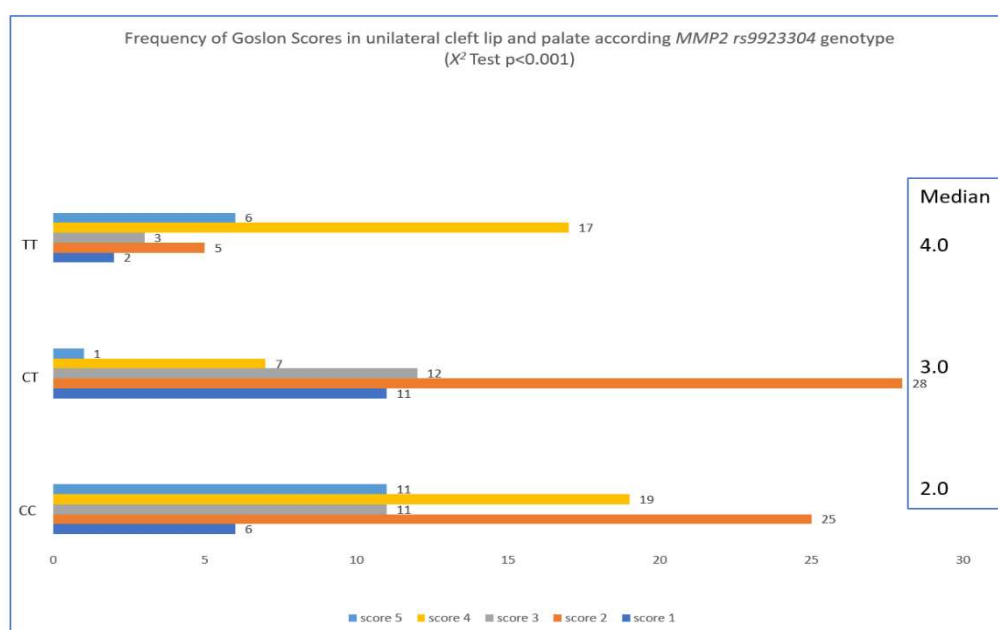


Figure 17- Frequency of GOSLON scores in unilateral cleft lip and palate according to *MMP2* rs9923304 genotype. Chi-square test and median scores were calculated.

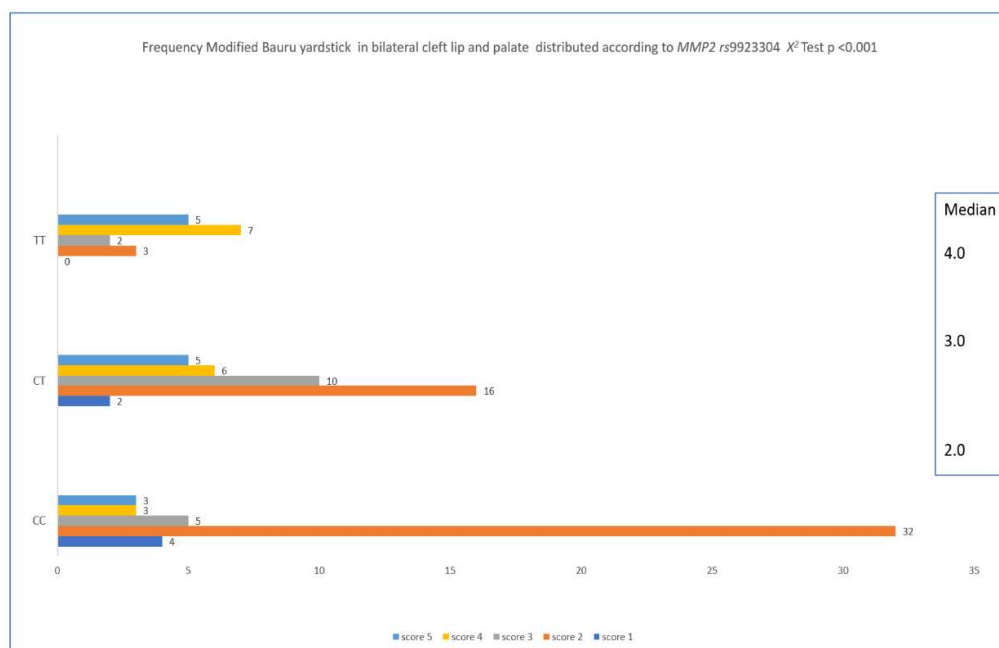


Figure 18- Frequency of Bilateral yardstick, according to *MMP2* rs9923304 genotype. Chi-square test and median scores.

Table 14- a. *GLI2* rs3738880 genotype and allele frequency according to prognosis based on occlusal scores (GOSLON yardstick for unilateral cleft lip and palate and Bilateral yardstick for bilateral cleft lip and palate), classified as good prognosis (scores 1 + 2), moderate prognosis (score 3) and poor prognosis (scores 4 + 5). Chi-square or Fisher's exact tests were used. **b.** Association between dental anomalies and *GLI2* rs3738880 according to cleft type, multivariate analysis was used.

<i>GLI2</i> rs3738880	Unilateral cleft lip and palate			Bilateral cleft lip and palate		Unilateral cleft lip	
Genotype and allele frequency according to prognosis (based on occlusal scores)							
PROGNOSIS	G	T		G	T		NA
<i>GOOD</i>	62	110		43	63		NA
<i>MODERATE</i>	23	23		12	14		NA
<i>POOR</i>	50	62		26	36		NA
X ²	p= 0.14			p= 0.874			NA
PROGNOSIS	GG	GT	TT	GG	GT	TT	NA
<i>GOOD</i>	10	42	34	11	21	21	NA
<i>MODERATE</i>	6	11	6	1	10	12	NA
<i>POOR</i>	12	26	18	6	14	11	NA
X ²	p= 0.352			p= 0.209			NA
Association between dental anomalies and <i>GLI2</i> rs3738880 according to cleft type (Multivariate test)							
Morphological	p= 0.65			p=0.91			p= 0.85
Enamel structural	p=0.37			p=0.91			p= 0.70
Irruptives/ topographic	p=0.39			p=0.69			p=0.09
Dimensional	p=0.13			p=0.27			p=0.55
Hypodontia	p=0.94			p=0.64			p=0.45
Total anomalies	p=0.67			p=0.98			p=0.84

*Genotypes in *GLI2* rs3738889 are TT- common homozygous, GG- rare homozygous, and, GT- heterozygous. The number of *GLI2* rs3738889 genotypes differs from the number of total sample for pcr failure.

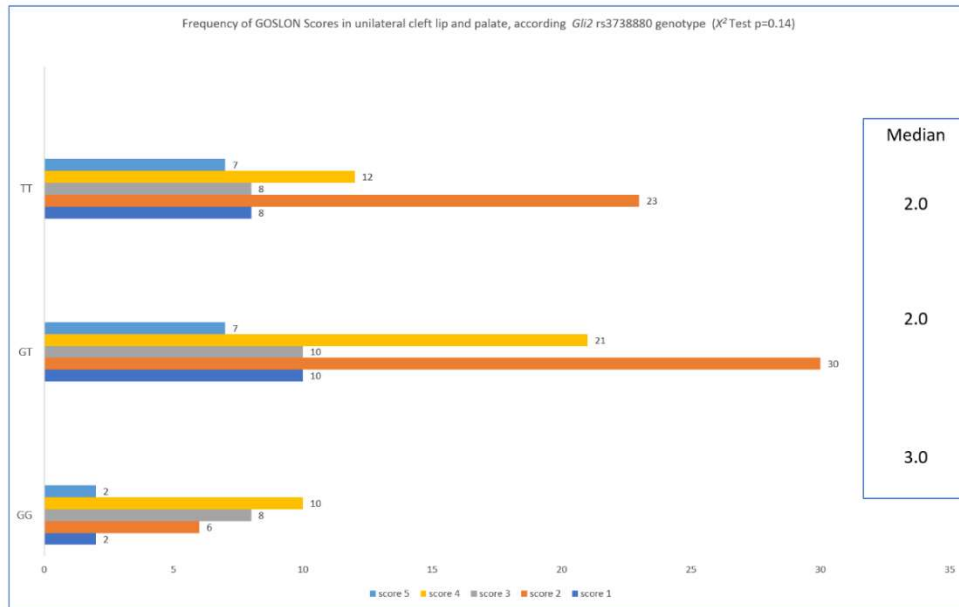


Figure 19- Frequency of Goslon scores according to *GLI2* rs3738880 genotype. Chi-square test and median

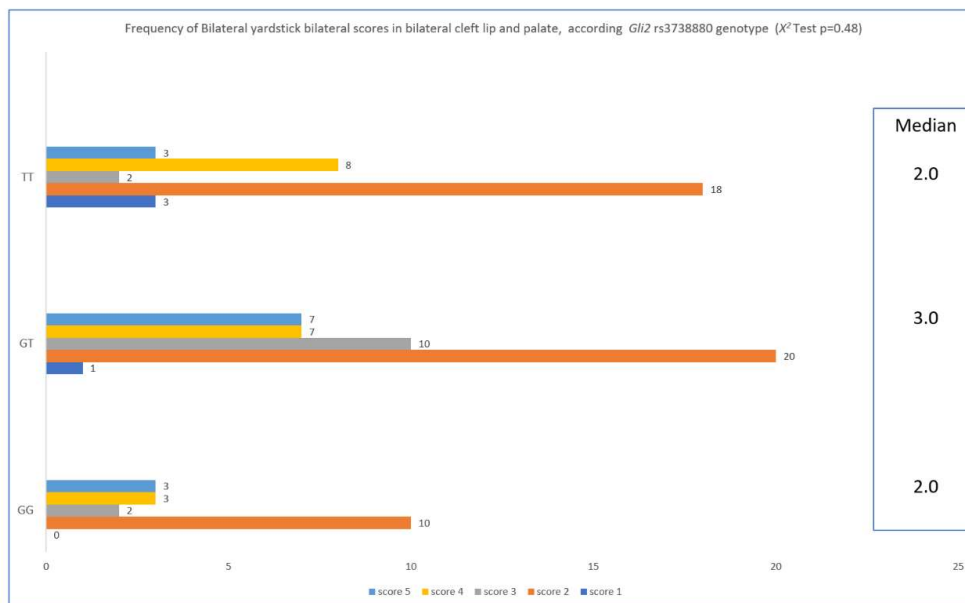


Figure 20- Frequency of Bilateral scores according to *GLI2* rs3738880 genotype. Chi-square test and median scores.

Table 15- a. *GLI2* rs2278741 genotype and allele frequency according to prognosis basing in occlusal scores (GOSLON yardstick for unilateral cleft lip and palate and Bilateral yardstick for bilateral cleft lip and palate), classified as good prognosis (scores 1 and 2), moderate prognosis (score 3) and poor prognosis (score 4 and 5). Chi-square or Fisher's exact tests were performed.

b. Association between dental anomalies and *GLI2* rs2278741 according to cleft type, multivariate analysis was used.

GLI2 rs2278741	Unilateral cleft lip and palate			Bilateral cleft lip and palate			Unilateral cleft lip
Genotype and allele frequency according to prognosis (based on occlusal scores)							
PROGNOSIS	C		G	C		G	NA
GOOD	56		46	80		50	NA
MODERATE	23		13	15		21	NA
POOR	53		35	35		21	NA
X ²	p= 0.58			p= 0.07			NA
	CC	CG	GG	CC	CG	GG	NA
GOOD	30	26	10	28	24	13	NA
MODERATE	10	3	5	6	3	9	NA
POOR	16	21	7	13	9	6	NA
X ²	p= 0.22			p= 0.11			NA
Association between dental anomalies and GLI2 rs2278741 according to cleft type (Multivariate test (MANOVA)).							
Morphological	p=0.34			p=0.88			p=0.29
Enamel structural	p=0.81			p=0.18			p=0.03
Irruptives/ topographic	p=0.71			p=0.75			p=0.35
Dimensional	p=0.97			p=0.27			p=0.25
Hypodontia	p=0.34			p=0.06			p=0.98
Total anomalies	p=0.44			p=0.47			p=0.02

*Genotypes in *GLI2* rs2278741 are CC- common homozygous, GG- rare homozygous, and, CG- heterozygous. The number of *GLI2* rs2278741 genotypes differs from the number of total sample for pcr failure.

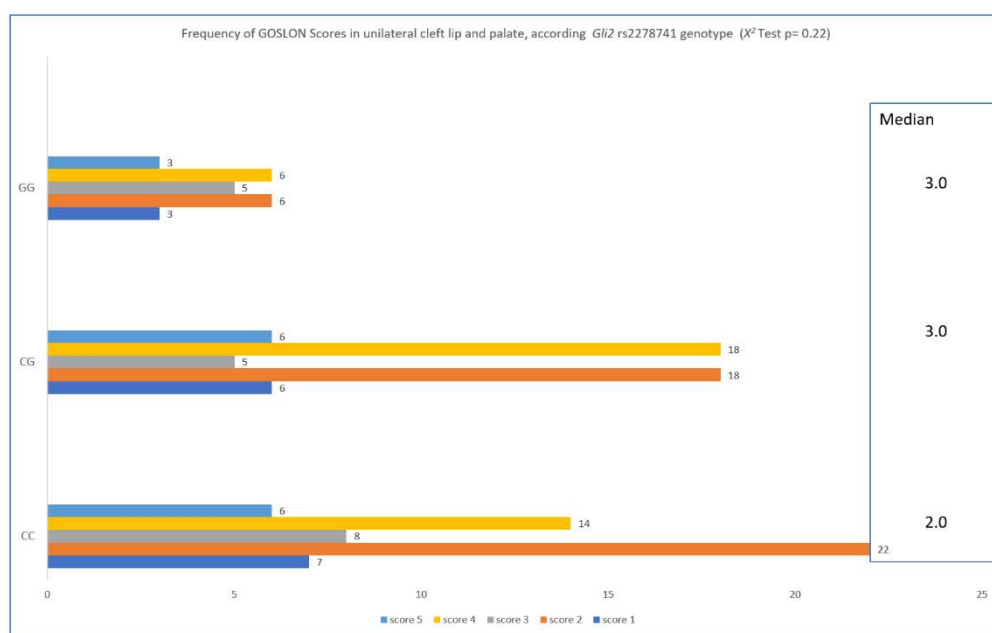


Figure 21- Frequency of GOSLON scores according to *GLI2* rs2278741. Chi-square test and median was performed.

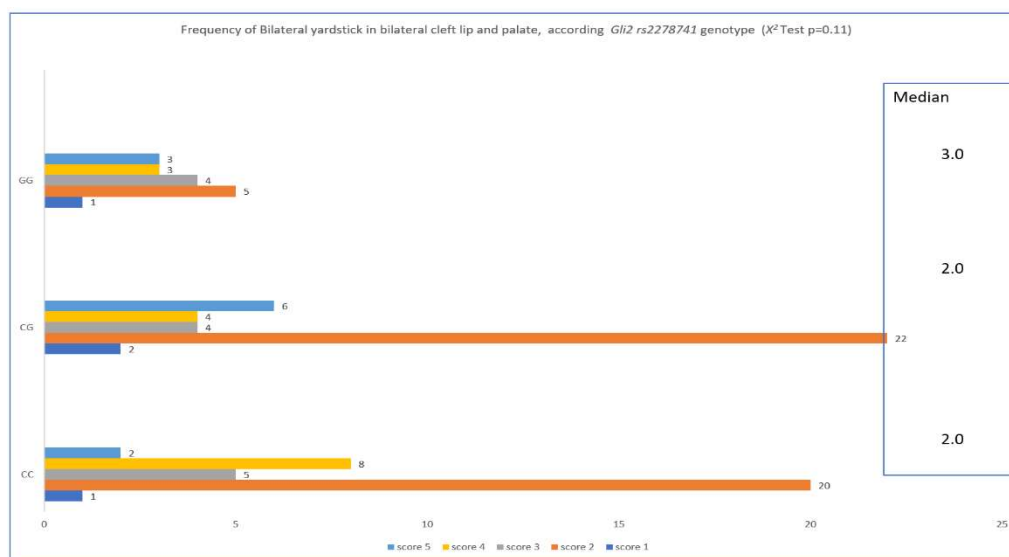


Figure 22- Frequency of Bilateral scores according to *GLI2* rs2278741. Chi-square test and median was performed.

Table 16- a. *TGFa* rs2166975 genotype and allele frequency according to prognosis based on occlusal scores (GOSLON yardstick for unilateral cleft lip and palate and Bilateral yardstick for bilateral cleft lip and palate), classified as good prognosis (scores 1 + 2), moderate prognosis (score 3) and poor prognosis (scores 4 + 5). Chi-square or Fisher's exact tests were used. **b.** Association between dental anomalies and *TGFa* rs2166975, according to cleft type, multivariate analysis was used.

<i>TGFa</i> rs2166975		Unilateral Cleft lip and palate		Bilateral cleft lip and palate			Unilateral cleft lip	
Genotype and allele frequency according to prognosis (based on occlusal scores)								
<i>PROGNOSIS</i>		A	G	A	G	NA		
<i>GOOD</i>		77	79	54	31	NA		
<i>MODERATE</i>		25	21	15	15	NA		
<i>POOR</i>		86	38	32	24	NA		
X² or exact#	Fisher	p=0.031*			p=0.40			
		AA	AG	GG	AA	AG	GG	NA
<i>GOOD</i>		20	37	21	17	20	7	NA
<i>MODERATE</i>		7	11	5	3	9	3	NA
<i>POOR</i>		33	20	9	12	8	8	NA
X²		p= 0.01*			p= 0.26			
Association between dental anomalies and according to cleft type (Multivariate test, MANOVA)					<i>TGFa</i> rs2166975			
Morphological		p=0.049*			p=0.252		p=0.49	
Enamel structural		p=0.387			p=0.268		p=0.81	
Irruptives/ topographic		p=0.16			p=0.83		p=0.05	
Dimensional		p=0.07			p=0.169		p=.99	
Hypodontia		p=0.62			p=0.04*		p=0.62	
Total anomalies		p=0.039*			p=0.03*		p=0.386	
*Genotypes in <i>TGFa</i> rs2166975 are GG- common homozygous, AA- rare homozygous,and AG- heterozygous.The number of <i>TGFa</i> rs2166975 genotypes differs from the number of total sample for pcr failure.								

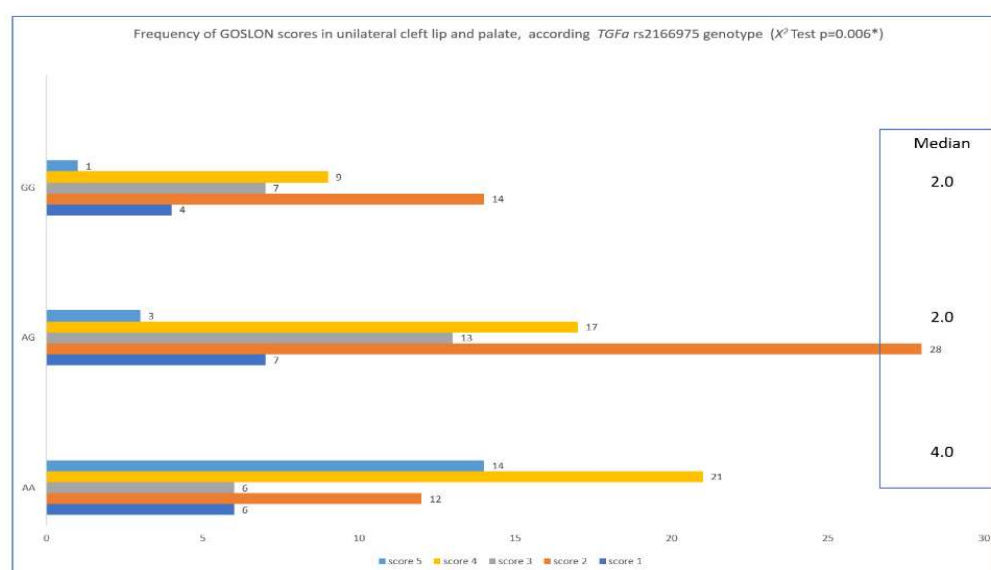


Figure 23- Frequency of GOSLON scores according to *TGFa* rs2166975. Chi-square test and median was performed.

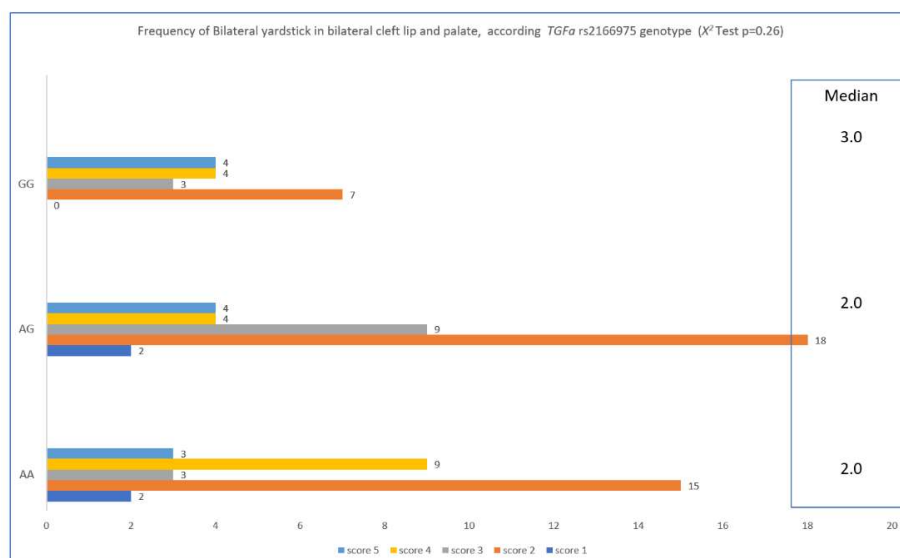


Figure 24- Frequency of Bilateral scores according to *TGFα* rs2166975. Chi-square test and median was performed.

Table 17- a. *FGFR2* rs11200014 genotype and allele frequency according to prognosis based on occlusal scores (GOSLON yardstick for unilateral cleft lip and palate and Bilateral yardstick for bilateral cleft lip and palate), classified as good prognosis (scores 1 + 2), moderate prognosis (score 3) and poor prognosis (scores 4 + 5). Chi-square or Fisher's exact tests were used. b-association between dental anomalies and *FGFR2* rs11200014 according to cleft type, multivariate analysis was used.

<i>FGFR2</i> rs11200014	Unilateral cleft lip and palate			Bilateral cleft lip and palate			Unilateral cleft lip
Genotype and allele frequency according to prognosis (based on occlusal scores)							
PROGNOSIS	A		G	A		G	
GOOD	29		33	39		23	NA
MODERATE	7		9	5		5	NA
POOR	23		41	16		10	NA
X ² or Fisher exact#	p= 0.45			p=0.73			NA
	AA	A G	G G	A A	A G	GG	
GOOD	4	21	6	9	21	1	NA
MODERATE	1	5	2	1	3	1	NA
POOR	3	17	12	4	8	1	NA
X ²	p=0.623			p=0.594			
Association between dental anomalies and <i>FGFR2</i> rs11200014 according to cleft type (Multivariate test)							
Morphological	p=0.02*			p=0.64			p=0.75
Enamel structural	p=0.16			p=0.42			p=0.76
Irruptives/ topographic	p=0.01*			p=0.65			p=0.43
Dimensional	p=0.16			p=0.89			p=0.81
Hypodontia	p=0.775			p=0.014*			p=0.71
Total anomalies	p=0.282			p=0.66			p=0.93

*Genotypes in *FGFR2* rs11200014 are GG- common homozygous, AA- rare homozygous, and AG- heterozygous. The number of *FGFR2* rs11200014 genotypes differs from the number of total sample for pcr failure.

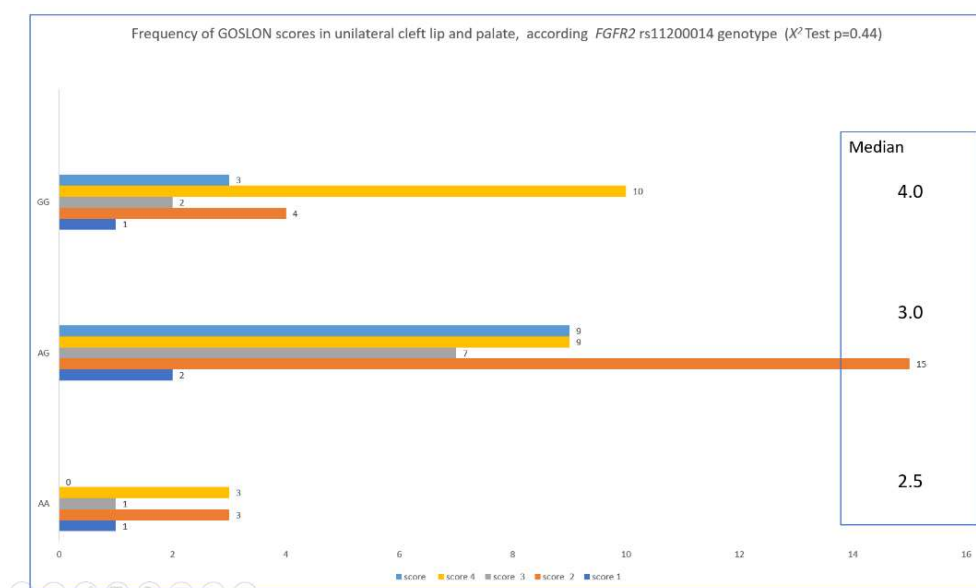


Figure 25- Frequency of GOSLON scores according to *FGFR2* rs11200014. Chi-square test and median was performed.

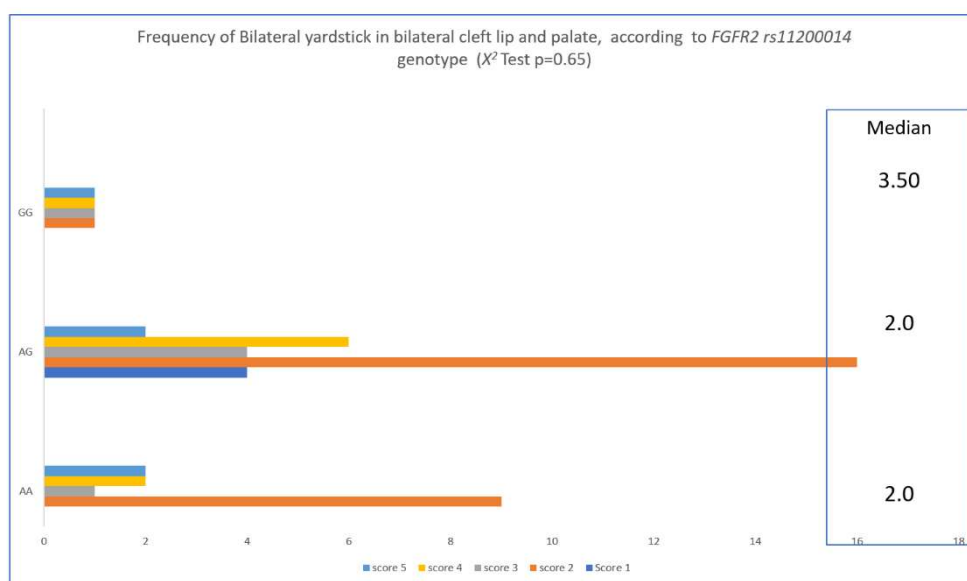


Figure 26- Frequency of Bilateral scores according to *FGFR2* rs11200014. Chi-square test and median was performed.

Table 18 a. *FGFR2* rs10736303 genotype and allele frequency according to prognosis based on occlusal scores (GOSLON yardstick for unilateral cleft lip and palate and Bilateral yardstick for bilateral cleft lip and palate), classified as good prognosis (scores 1 + 2), moderate prognosis (score 3) and poor prognosis (scores 4 + 5). Chi-square or Fisher's exact tests were used. **b.** Association between dental anomalies and *FGFR2* rs10736303 according to cleft type, multivariate analysis was used.

<i>FGFR2</i> rs10736303	Unilateral cleft lip and palate			Bilateral cleft lip and palate			Unilateral cleft lip
Genotype and allele frequency according to prognosis (based on occlusal scores)							
PROGNOSIS	A		G	A		G	NA
GOOD	81		77	36		58	NA
MODERATE	24		18	19		13	NA
POOR	62		38	23		31	NA
X ²	p=0.23			p=0.11			NA
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	NA
GOOD	23	35	21	8	20	19	NA
MODERATE	7	10	4	4	11	1	NA
POOR	22	18	10	4	15	8	NA
X ²	p= 0.491			p=0.142			NA
Association between dental anomalies and <i>FGFR2</i> rs10736303 according to cleft type (Multivariate test)							
Morphological	p=0.02*			p=0.52			p=0.49
Enamel structural	p=0.46			p=0.90			p=0.81
Irruptives/ topographic	p=0.71			p=0.39			p=0.05
Dimensional	p=0.28			p=0.42			p=0.99
Hypodontia	p=0.40			p=0.73			p=0.23
Total anomalies	p=0.48			p=0.945			p=0.39
Genotypes in <i>FGFR2</i> rs10736303 are GG- common homozygous, AA- rare homozygous, and AG- heterozygous. The number of <i>FGFR2</i> rs10736303 genotypes differs from the number of total sample for pcr failure							

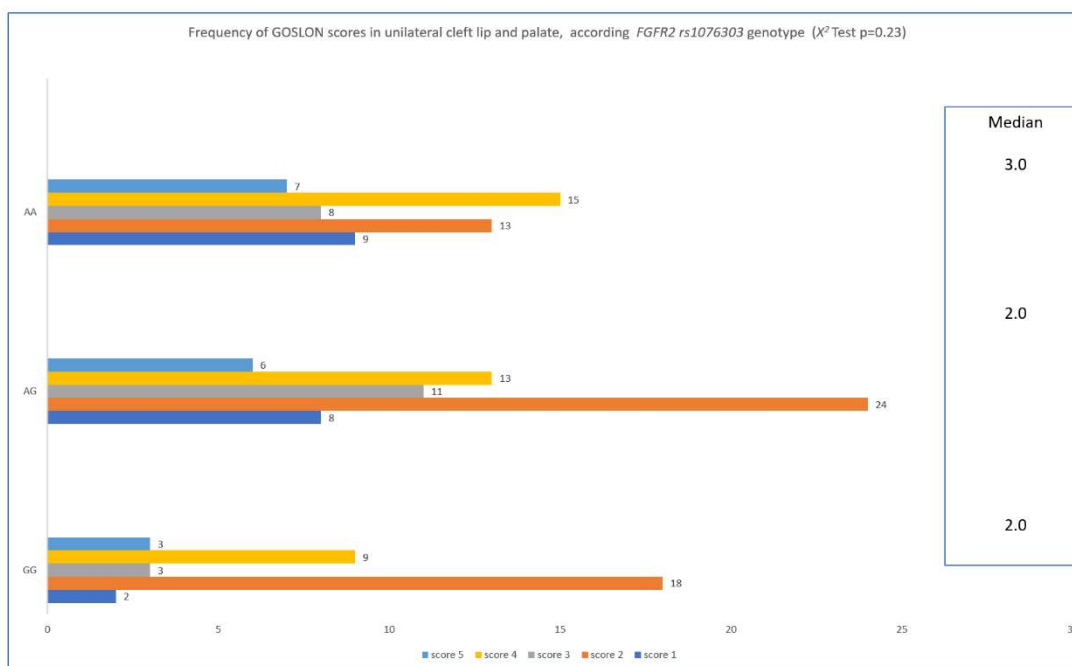


Figure 27- Frequency of GOSLON scores. according to *FGFR2* 1076303 genotype. Chi-square test and median occlusal scores were calculated.

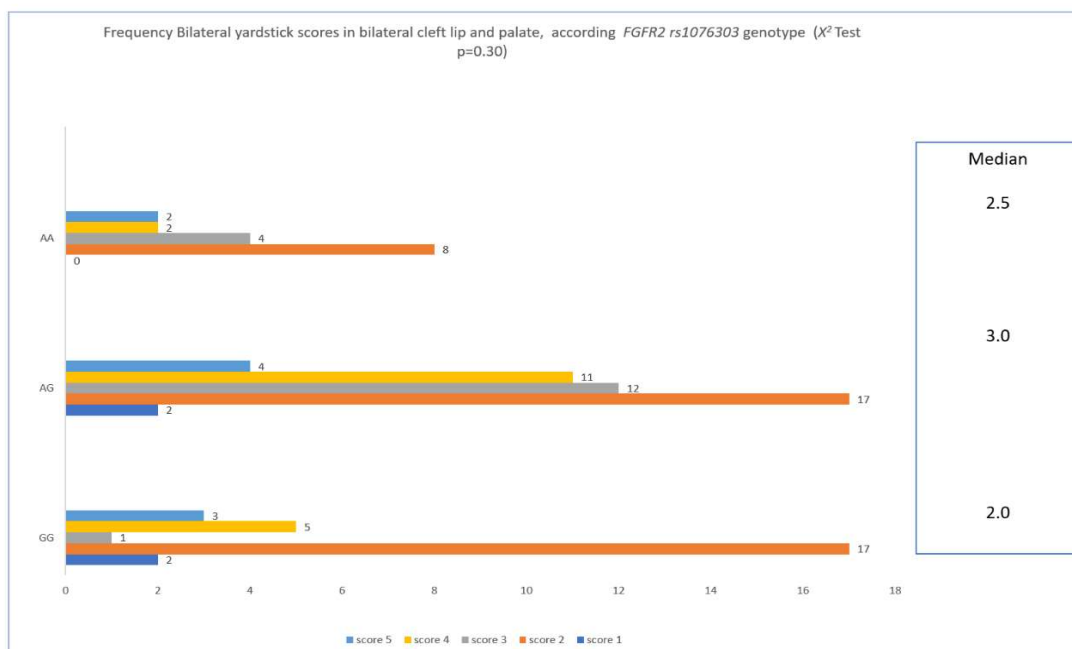


Figure 28- Frequency of Bilateral scores. according to *FGFR2* 1076303 genotype. Chi-square test and median occlusal scores were calculated.

• Dental anomalies and outcomes

The presence of dental anomalies outside the cleft area was determined and we found that all the individuals had at least one dental anomaly. The number of anomalies ranged from one to 38 (mean number of anomalies 9, confidence interval 9.09 to 10.02) (Tables 10 and 19). Comparing the dental abnormalities frequency, according to the cleft type, we found a difference in structural enamel anomalies between unilateral cleft lip and unilateral cleft lip and palate ($p=0.001$), and bilateral cleft lip and palate ($p=0.01$), Multivariate statistics (Pillai's trace, $p=0.005$), Figures 29 and 30.

Table 19 - Dental anomalies frequency per individual (median, minimum, maximum) in the total sample and in cleft type.

Cleft type	Dental anomaly		median (dental anomalies/in individual)	Minimum (dental anomalies/individ ual)	Maximum (dental anomalies/individ ual)
Total sample	Total anomalies		9	1	38
Unilateral cleft lip and Palate	Total anomalies		9	1	38
	Morphologic al anomalies	Total	3	1	15
		Taurodontism	0	0	8
		Dens invaginatus	0	0	2
		Talon Cusp	0	0	4
		Root dilaceration	0	0	4
		Root fusion	0	0	5
		Gemination	0	0	1
		Enamel pearl	0	0	3
		"Vtip"	0	0	7
		Shovel incisors	0	0	6
	Enamel Structural anomalies	Total	5	0	25
		Hypoplasia	0	0	10
		Diffuse opacities	0	0	23
		Demarcated opacities	0	0	16
	Irruptive/ Topographic	Total	0	0	5
		Transposition	0	0	1
		Dental Impaction	0	0	4
		Deciduos prolonged retention	0	0	5
	Dimensional anomalies	Total	0	0	2
		Microdontia	0	0	2
		Macrodontia	0	0	0
	Dental number anomalies	Total	0	0	6
		Hypodontia	0	0	7
		Supernumerary teeth	0	0	3
Bilateral Cleft lip and palate	Total anomalies		8	0	28
	Morphologic al anomalies	Total	3	0	13
		Taurodontism	0	0	8
		Dens invaginatus	0	0	1
		Talon Cusp	0	0	2
		Root dilaceration	0	0	9
		Root fusion	0	0	4
		Gemination	0	0	0
		Enamel pearl	0	0	4
		"Vtip"	0	0	6
		Shovel incisors	0	0	2

UNILATERAL CLEFT LIP	Enamel Structural anomalies	Total	5	0	19
		Hypoplasia	0	0	11
		Diffuse opacities	0	0	18
		Demarcated opacities	0	0	8
	Irruptive/ Topographic	Total	0	0	8
		Transposition	0	0	1
		Dental Impaction	0	0	4
		Deciduos prolonged retention	0	0	1
	Dimensional anomalies	Total	0	0	1
		Microdontia	0	0	1
		Macrodontia	0	0	0
	Dental number anomalies	Total	0	0	5
		Hypodontia	0	0	5
		Supernumerary teeth	0	0	2
	TOTAL ANOMALIES		6.5	0	16
	Morphologic al anomalies	Total	3	0	8
		Taurodontism	0	0	5
		Dens invaginatus	0	0	2
		Talon Cusp	0	0	3
		Root dilaceration	0	0	4
		Root fusion	0	0	2
		Gemination	0	0	0
		Enamel pearl	0	0	5
		"Vtip"	0	0	4
		Shovel incisors	0	0	2
	Enamel Structural anomalies	Total	3.5	0	11
		Hypoplasia	0	0	5
		Diffuse opacities	0	0	10
		Demarcated opacities	0	0	5
	Irruptive/ Topographic	Total	0	0	1
		Transposition		0	0
		Dental Impaction	0	0	2
		Deciduos prolonged retention	0	0	1
	Dimensional anomalies	Total	0	0	1
		Microdontia	0	0	1
		Macrodontia	0	0	0
	Dental number anomalies	Total	0	0	1
		Hypodontia	0	0	1
		Supernumerary teeth	0	0	0

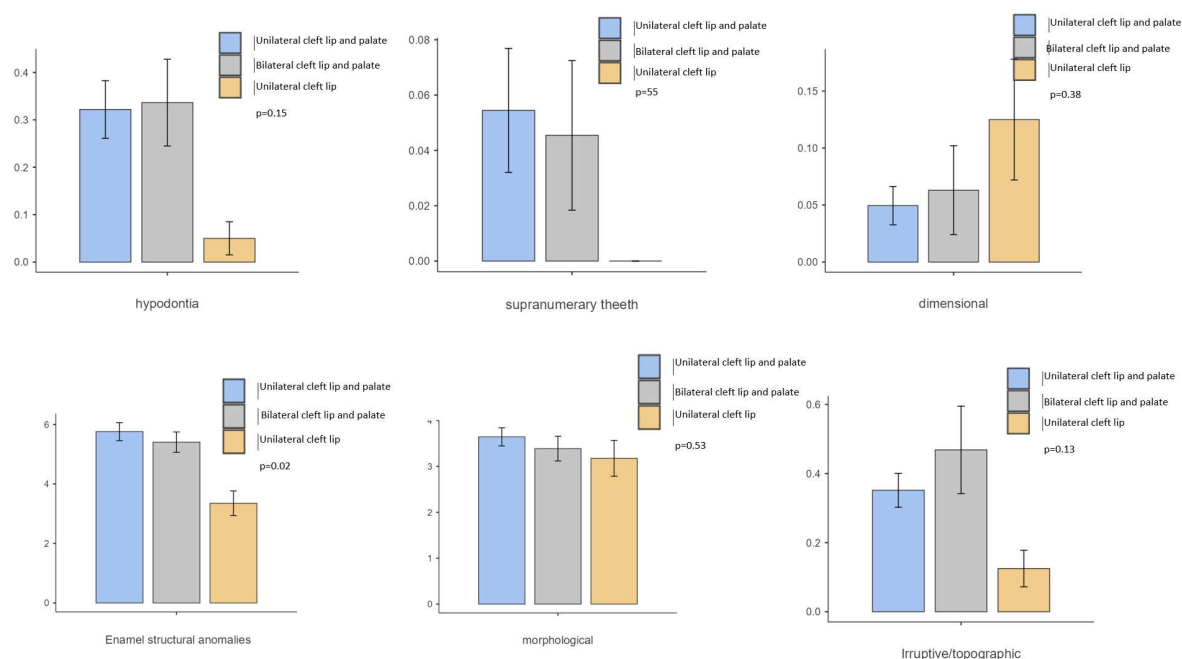


Figure 29. Frequency of dental anomalies according to cleft type. Multivariate statistics (Pillai's trace, $p=0.005$)

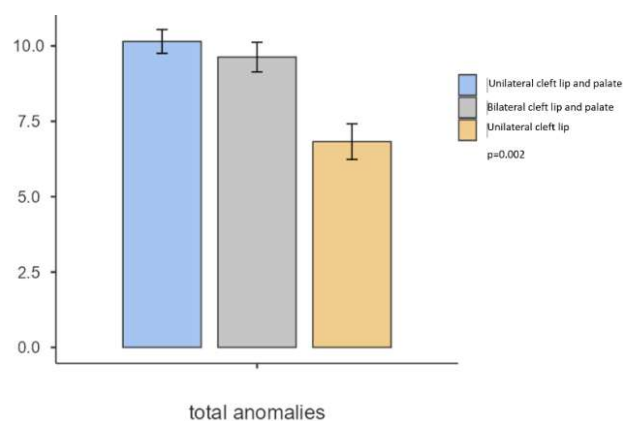


Figure30.Total dental anomalies according to cleft type. ANOVA test $p= 0.002$, Bonferroni post- hoc: unilateral cleft lip and palate compared with bilateral cleft lip and palate $p=1.00$, unilateral cleft lip compared to unilateral cleft lip and palate.

We found a negative correlation between the number of dental anomalies and the Wits appraisal ($p<0.001$, Pearson's $r=-0.31$) and nasion perpendicular to point A ($p<0.001$, Pearson's $r=-0.24$). A positive correlation between occlusal scores and the number of dental anomalies was found ($p<0.001$, Pearson's $r=0.56$) (**Figure 31**).

Difference was found in the number of total dental anomalies (**Figure 31**) and the correlation between frequency of total dental anomalies and Wits, Nasion perpendicular to point A and occlusal scores between cleft types (**Figure 32**), descriptive analysis of dental anomaly types according to cleft type and occlusal scores were found in table 20.

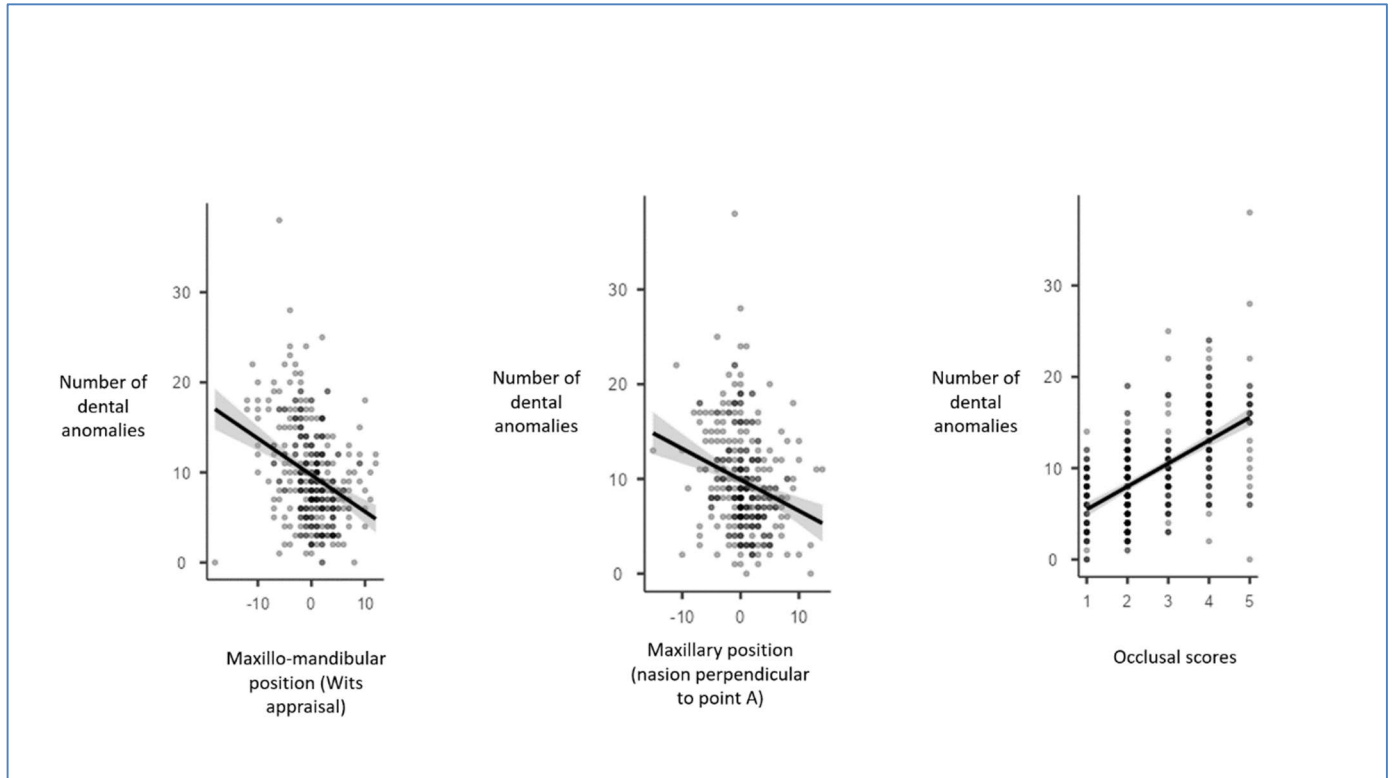


Figure 31. Correlation plots of the number of dental anomalies and maxillo-mandibular relationship (left), maxillary position (middle) and occlusal scores (right).

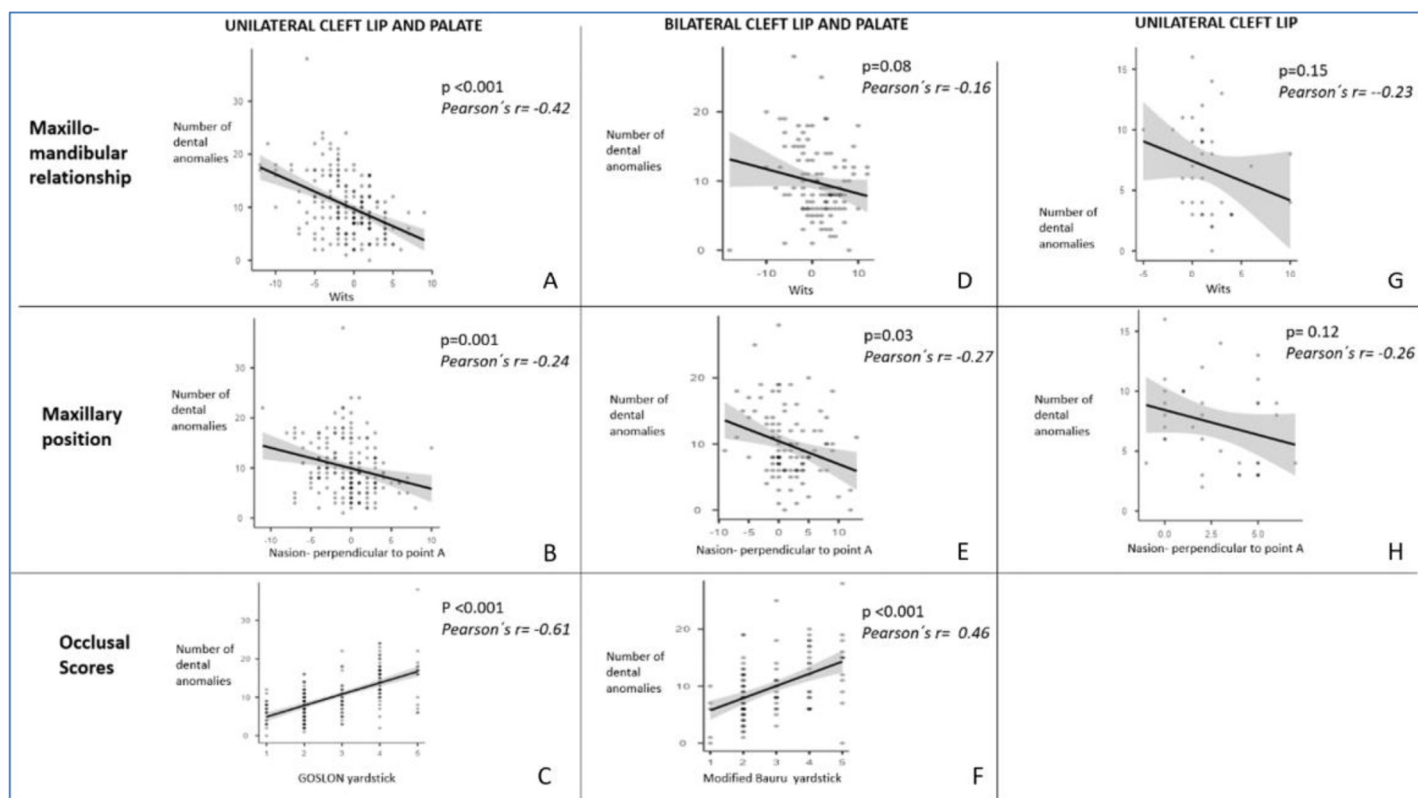


Figure 32- Correlation matrix and Pearson correlation coefficient between the number of total dental anomalies and outcome measures (Wits, Nasion perpendicular to point A, and occlusal scores) according to cleft type, $p < 0.05$ was considered. The number of dental anomalies in individuals born with unilateral cleft lip and palate and its correlation with Wits (A), Nasion-perpendicular to point A (B) and GOSLON scores (C). The number of dental anomalies and correlation between Wits (D), Nasion-perpendicular to point A, and bilateral yardstick (F) in individuals born with bilateral cleft lip and palate. The number of dental anomalies in individuals born with unilateral cleft lip correlation with Wits (G) and Nasion-perpendicular to point A (H).

Table 20- Descriptive analysis (minimum, maximum and median) of dental anomalies (morphological, enamel structural, irruptive/topographic, dimensional, hypodontia, supernumerary teeth and total number of dental anomalies) per individual, according to occlusal scores.

Occlusal scores	Dental anomalies																				
	Morphological			Enamel structural			Irruptive/ Topographic			Dimensional			Hypodontia			Supranumerary teeth			Total anomalies		
GOSLON YARDSTICK																					
	Min	Max	median	min	max	media n	min	max	Media n	min	max	Median	min	max	median	min	ma x	median	mi n	ma x	media n
1+2	0	8	2	0	11	3	0	5	0	0	1	0	0	6	0	0	3	0	1	16	7
3	0	10	4	0	13	4	0	3	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0	1	22	9
4+5	0	15	5	0	25	9.5	0	4	0	0	2	0	0	7	0	0	1	0	1	38	17
BILATERAL YARDSTICK																					
1+2	0	9	2	0	12	4	0	4	0	0	1	0	0	4	0	0	2	0	1	19	8
3	0	8	4	0	19	5	0	3	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	25	9.5
4+5	0	13	4	0	18	6	0	8	0	0	4	0	0	5	0	0	0	0	1	28	14

In cases born with unilateral cleft lip and palate, dental agenesis ($p=0.02$), enamel structural defects, and morphological dental anomalies were correlated with Wits appraisal ($p<0.001$ for both dental anomalies) and Nasion-perpendicular to point A ($p=0.02$ for both dental anomalies).

For occlusal scores, using logistic regression, we found that cases born with unilateral cleft lip and palate showed a correlation between GOSLON scores and enamel structural anomalies ($p<0.001$). Individuals with 4 or more structural enamel defects have a 12.9 more chance of worse results (GOSLON 4+5) ($p<0.001$, odds ratio 12.9, 95% confidence interval 4.82 to 34.7), compared to individuals that have 0 to 3 enamel structural defects. For morphological defects, individuals with 4 or more morphological anomalies have 2.62 more chance to have GOSLON 4+5 ($p=0.003$, odds ratio 2.65, 95% confidence interval 1.39 to 4.95). Considering total dental anomalies, individuals with more than 9 dental anomalies have 20.5 more chance to have results that indicate orthognathic surgery need (GOSLON 4+5), comparing to 0 to 8 total dental anomalies ($p<0.001$, odds ratio 20.5, 95% confidence interval 8.92 to 47.3).

In cases born with unilateral cleft lip only, nasion-perpendicular to point A was correlated with hypodontia ($p=0.03$).

For cases born with bilateral cleft lip and palate, a correlation was found between maxillary position and enamel structural defects ($p=0.02$) and irruptive/topographic anomalies ($p=0.04$). The bilateral yardstick was correlated with enamel structural anomalies ($p=0.001$),

irruptive/topographic anomalies ($p=0.01$), and morphological dental anomalies ($p=0.006$). Individuals with more than 4 irruptive/topographic dental anomalies have 14.9 more chance ($p=0.01$, odds=14.9, confidence interval- 0.74 to 29.7) to have worse results (Bilateral yardsticks 4+5); regard to morphological dental anomalies, more than 7 anomalies per individual signalize to 10.1 more chance to have bilateral scores 4 and 5, ($p=0.001$, odds 10.2, confidence interval- 1.99 to 51.1), more than 4 structural enamel defects increase the chance to have worse results in 4.48 times ($p=0.002$, odds 4.48, confidence interval- 1.67 to 12.0), and considering total number of anomalies of 11 dental anomalies or more, would increase the chance to worse results in 7.27 times, ($p<0.001$, odds=7.27, confidence interval 2.76 to 19.2).

- **Cleft severity and outcomes**

The cleft severity descriptive analysis (mean, standard deviation and 95% confidence interval) according to cleft type was described on table 21.

For either cases born with unilateral or bilateral cleft lip and palate, no association was found between nasal deformity, alveolar defect, or palate defect width and Wits, nasion perpendicular to point A, or occlusal scores. These measures were analyzed using the age of dental casts and surgery as covariate.

We found a correlation between nasal deformity and alveolar defect. ($r=0.52$, $p=0.003$) and palatal defect width ($r=0.77$ $p=0.005$) in unilateral cleft lip and palate individuals. In bilateral cleft lip and palate nasal deformity correlation between nasal deformity and alveolar or palatal defects was not found ($p=0.61$ and $p=0.63$).

Table 21- Descriptive analysis (mean, standard deviation, confidence interval), of cleft severity variables (nasal deformity, alveolar defect, palatal defect), according to cleft type.

Cleft Severity

Unilateral cleft lip and palate		
	Mean $\pm$ Standard Deviation	95% Confidence Interval

Nasal deformity (nostril width ratio -cleft side / noncleft side)	1.55± 0.3	1.49 to 1.61
Alveolar defect	8.95 mm ± 3.9	7.06 to 10.3
Posterior defect width	10.1mm ±2.5	9.23 to 10.9
Bilateral cleft lip and palate		
Nasal deformity (ratio of nasal tip height and nasal width)	0.14 ±0.07	0.12 to 0.16
Alveolar defect	4.71mm ±3.8	1.53 to 7.89
Posterior defect width	10.4 mm ±3.0	7.8 to 12.9

* The nasal deformity was analyzed in unilateral cleft lip and palate according to the Fisher method (Fisher 2008), the higher the value found, the higher the severity of the nasal deformity, in bilateral cleft lip and palate, the nasal deformity was measured according to Chang (Chang et al, 2014), the ratio of nasal tip height and nasal width the height of the nasal tip is divided by the nasal width, smaller values indicates high severities. Alveolar defect. for unilateral and bilateral was measured the distance of maxillary segments at the alveolar area and posterior defects were measured by the transversal distance of the palatal defect at the tuberosity region.

DISCUSSION

The first experiment was designed to confirm if the individuals that have occlusal scores evaluated in mixed dentition will have the same prognosis after the facial growth, although the efficiency of predicting occlusal scores is clear, some studies report changes in a percentage of cases from moderate prognoses for the need for orthognathic surgery (Molsted et al., 2005, Buj-Acosta et al. 2017). The long-term analysis in this study sample was important to understanding the growth trajectories and investigating biological mechanisms considering these scores in individuals born with unilateral and bilateral cleft lip and palate operated by the same surgeon.

We found that the individuals that had a good prognosis (scores 1, 2 and 3) at the first evaluation stayed with the same prognosis at the second evaluation, as well as the cases with orthognathic surgical prognosis (scores 4 and 5) did not change that indication, even with orthodontic intervention. In unilateral cleft lip and palate 26 individuals change in scores between 1 to 3, and 6 individuals change from 4 to 5; in bilateral cleft lip and palate from 11

individuals moved into scores 1 to 3, and 3 individuals change from 4 to 5. This result motivated us to investigate which factors may be predictors of these maxillo-mandibular growth outcomes.

It is well-known that surgical procedures may interfere in the maxillary growth (Molsted et al. 2005; Long et al. 2011; Latief et al. 2020), studies have pointed out the great importance of the surgeon's experience in outcomes, strongly than the surgical protocols (Hataway et al., 2011; Ozawa et al., 2021).

The high frequency of class III malocclusion in individuals born with cleft lip and or palate compared to the general population and a frequency of poor results in all cleft centers (Molsted et al., 2005; Hataway et al., 2011; Fudalej et al., 2019; do Vale et al., 2022) may be also caused by intrinsic factors. To look for this answer we developed a subsequent step, in patients operated on by the same surgeon with the same techniques (Table 2), aiming to investigate if genetic polymorphisms and dental anomalies frequency could be predictors of maxillo-facial growth outcomes.

The cohort individuals did not include anyone born with isolated cleft palate, due to the differences in embryology when compared to cases born with cleft lip and palate (Murray 2002). The 360 cohort of individuals included in this study, born with cleft lip with or without cleft palate was studied to test if variation in genes related to maxillary growth and orofacial clefts (*MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880 and rs2278741, *TGFA* rs2166975 and *FGFR2* rs11200014 and rs10736303), presence of dental anomalies and cleft severity, could be predictors for maxillofacial growth, due to adjust the results and reducing the heterogeneity, age of surgery submissions (cleft lip repair and cleft palate repair), age, sex, and cleft laterality.

The maxillary growth outcomes were analyzed with cephalometric measures and occlusal scores, we decided to use Nasio- perpendicular to point A to access maxillary position to avoid the interference in variation of cranial base inclination in unilateral cleft lip and palate (Meazzini et al., 2011, Latief et al., 2020) and Wits appraisal, because this measure do not have interference from cranial base. The enlargement factors of the radiographs were checked in all cases.

This is the first study that investigate genetic polymorphisms as predictors of growth outcomes in individuals born with cleft lip and palate, the choice of the polymorphisms was based on the gene functions and its involvement with craniofacial and dental development as well in cleft lip and palate aetiology.

MMP2 rs9923304 was associated with the studied outcome variables. Individuals that had the variant allele (T) had an increased chance of 4.53 times to have a poor prognosis in maxillofacial growth and the need for orthognathic surgery. The mechanism explaining this association is probably related to the role of *MMP2* in bone loss. It was reported that hypoactivity of *MMP2* leads to bone loss and osteolysis during skeletal growth and development (Li et al. 2020; Jiang et al. 2021) and, could explain the magnitude of maxillofacial deficiency. *MMP2* rs9923304 was also associated with enamel structural defects and morphological dental anomalies, which is also not surprising due to the role of the *MMP2* in tooth formation and mineralization (Bourd-Boittin et al., 2005). Our group has previously reported the association of *MMP2* rs9923304 with talon cusp (Cavalcante et al. 2021) and enamel defects in cases born with cleft lip and palate (Lavôr et al. 2020). These finds may suggest that maxillary growth, enamel defects, and dental shape anomalies in individuals born with cleft lip and palate are the result of alterations of the same genetic pathway.

The maxillo-mandibular growth outcomes were also associated with *GLI2* rs3738880 in cases born with unilateral cleft lip and palate. These individuals had 1.43 times higher chance to have retrognathic maxilla when carrying the rare variant G allele. *GLI2* is a transcription factor that mediates the SHH signalling pathway and was previously associated with cleft lip and palate (Vieira et al. 2005), polydactyly with or without midline defects, holoprosencephaly associated with orofacial clefts, class III malocclusion, and tooth agenesis (Maranõn Vasques et al. 2019). The role of *GLI2* in osteoblastic differentiation and skeletal development (Zhao et al. 2006) support the results found in the present study. We found statistical evidence for gene-gene interaction between *MMP2* rs9923304 and *GLI2* rs3738880, when individuals born with clefts were homozygous rare for both variants. When compared with individuals not carrying any copies of rare alleles of these two markers, the chance to have midfacial hypoplasia was 78 times higher. This interaction may be correlated with the fact that *GLI2* is a regulator of *BMP* gene expression (Zhao et al. 2006) and *BMP2* increases the expression of *MMP2* (Luo et al. 2020).

TGFa was the first gene associated with clefts (Ardinger et al. 1989), and it is thought as a modifier of cleft lip and palate phenotypes (Vieira 2006). The gene encodes a growth factor that can affect craniofacial bone growth (Jiang et al. 2019). *TGFa* has been associated with cleft lip and palate (Vieira and Orioli 2001), and tooth agenesis (Vieira et al. 2004; Vieira et al. 2008; Letra et al. 2012). In this study, we found the rare rs2166975 variant A overrepresented in individuals born with unilateral cleft lip and palate with retrognathic maxillary position. Carrying the rare allele increased 2.32 times the chance for a retrognathic maxilla. No association was found between bilateral cleft lip and palate maxillary growth. The growth in bilateral cleft lip and palate is distinct in direction with apparent better results as we found in this study (Tables 4 and 5). The reasons might include the pre-maxilla having an anterior position regarding the maxilla, or different gene contributions and interactions. In our study, *TGFa* rs2166975 was associated with morphological dental anomalies in cases born with unilateral cleft lip and palate, and hypodontia in cases born with bilateral cleft lip and palate, which is an association that has been already found (Letra et al., 2012). *TGFa* rs2166975 was also associated with left unilateral cleft lip and palate and tooth agenesis in Letra et al. (2012). For the total sample, *FGFR2* rs11200014 was associated with maxillo-mandibular growth outcomes. This gene was previously associated with class III malocclusion in individuals born without orofacial clefts and is essential during the intramembranous bone formation (da Fontoura et al. 2015; Jiang et al. 2019). No association was found when cleft types were analyzed separately.

A high frequency of dental anomalies, with at least one anomaly per individual, found in this study, was previously reported (Letra et al. 2007; Cavalcante et al. 2021) and reinforces the thesis that dental anomalies can be considered an extended phenotype for orofacial clefts (Koruyucu et al. 2018, Cavalcante et al. 2021).

We found an association between the total number of dental anomalies and poor prognosis related to maxillary hypoplasia in all outcome measures. These associations were found for both unilateral and bilateral cleft lip and palate cases, in unilateral cleft lip and palate, individuals that have more than 9 total dental anomalies have 20.5 more chance to have worse outcomes in maxillofacial growth and in bilateral cleft lip and palate, 11 dental anomalies or more, would increase the chance to worse results.

Enamel structural defects followed by morphological anomalies presented the stronger correlation with maxillofacial growth outcomes, especially in individual born with unilateral cleft lip and palate, in this cleft type, a presence of 4 or more enamel structural defects increase the chance to poor results in growth outcomes (GOSLON 4+5) in 12.9 times, and in individuals born with bilateral cleft lip and palate, in 4.48 times to have bilateral yardstick scores 4 and 5. The number of morphological dental anomalies could also be used as a predictor, in unilateral and bilateral cleft lip and palate. Four or more morphological dental anomalies is associated with 2.62 more chance to have worse maxillofacial growth in individuals with unilateral cleft lip and palate and, in bilateral cases, 11 dental anomalies increase the risk in 10.1 times.

In bilateral cleft lip and palate, a presence of 4 or more irruptive and topographic anomalies, increases the risk in 14.9 times orthognathic surgery needed (table 10).

Tooth agenesis was the only anomaly previously reported to be associated with worse maxillofacial growth (Meazzini et al. 2008; Meazzini et al. 2011, Lai et al. 2015; Hardwicke et al. 2015, Antonakaris et al. 2015, Rizel et al, 2021) the studies between 2008 to 2011 evaluated the relation of cleft lateral tooth agenesis, and they found no association with maxillary hypoplasia. In 2021, Scandcleft multicenter study evaluated the maxillary dental agenesis, including another dental agenesis in the maxillary arch, they found an association of two or more agenesis and GOSLON 4 and 5, they report that the analysis of cleft lateral agenesis does not show association with GOSLON scores.

In our study we found an association between Wits and tooth agenesis in unilateral cleft lip and palate (Table10), we did not consider the cleft lateral agenesis in this analysis and, we included tooth agenesis in both dental arches. Tooth agenesis and other dental anomalies in the cleft area are a consequence of developmental lack of structures on the cleft area (de Lima Pedro et al.2012), is important to consider that tooth agenesis in the maxilla could be related to a shorter length in the maxillary arch, and not to biological mechanisms that could explain maxillary hypoplasia in individuals born with cleft lip and palate. This association has been also reported in individuals born without cleft lip and palate (Tavajohi-Kermani et al. 2002) and need to be cautiously interpreted.

Different associations between type of cleft and different dental anomalies, had not been reported before and confirm the difference in biological mechanisms between clefts,

reinforcing the need of investigations in all cleft types and well-established phenotypes including dental anomalies.

In our unilateral cleft lip and palate sample, we found that 35 individuals have any dental anomaly in the region of incisor region opposite the cleft side, it was found in 24 left clefts and 11 right clefts, and it could indicate a subphenotype as a microform of bilateral cleft that has been first described in 2007 (Letra et al. 2007; Vieira et al. 2012), the results from this cases related to outcome measures and dental anomalies do not differ from other cases of unilateral cleft lip and palate, this analysis was limited because of the number of cases.

Cleft severity at birth and the suggestion that causes interference in maxillary and dento-occlusal growth is controversial (Meazzini et al., 2011; Antonarakis et al. 2015; Botticelli et al. 2019). In the present study, cleft dimensions were assessed using nasal deformities, alveolar defect, and posterior width defect, and no association was found with the maxillo-facial outcomes measured. This result must be cautiously interpreted due to the relatively small number of dental casts analyzed per cleft type and differences between age at the first dental casts, a methodology using digital models measuring the cleft area in proportion to cleft palate must be more adequate, to reduce this bias, we use the ages as a covariate. Age at primary surgery was either not associated with better or worse outcomes. We found an association between nasal deformity and alveolar and palate defect in unilateral cleft lip and palate.

The interval of the age of the participants, as well as the age of surgical procedures of the patients included in the study, was a limitation that was controlled using this variable as a covariable in the statistical methods. Another limitation of the study is the small number of patients with an isolated cleft lip, which limited the interpretations of the results that involved this cleft type. Important points of heterogeneity regard to studies involving clefts are the difference in the labial and palatal musculature that we do not register or controlled in the analysis and should be a factor that may impact the surgery approach and results, the symmetry and volume of these structures are affected by the presence of the clefts (Marazita and Mooney, 2004)

Our findings suggest that genetic variation interferes in maxillofacial growth in individuals born with cleft lip and palate. *MMP2* rs9923304, *GLI2* rs3738880 *TGFa* rs2166975, and *FGFR2* rs11200014 may be used as markers of prognosis of

maxillofacial growth of individuals born with cleft lip and palate. Dental anomalies may be useful and a higher number of dental anomalies may serve as a predictor of poorer maxillofacial growth outcomes in individuals born with cleft lip and palate. Future studies must be developed to explain the interaction of these variables and confirm our results.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to the participants of the study and Kathleen Deeley to performed DNA extraction. The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: was financial supported by Smile Train Foundation (grant 190450) and of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Level Code 001. The funder of the study had no role in the study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of this report This article is based on a thesis submitted to the graduate faculty, Federal University of Paraiba in partial fulfilment of the requirements for the PhD degree.

Author Contributions

R.H.W. Lacerda contributed to conception, data acquisition and interpretation, performed statistical analyzes, drafted and critically revised the manuscript; A.R.Vieira, contributed to conception, design, data acquisition and interpretation, drafted and critically revised the manuscript. All authors gave their final approval and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Declaration of Conflicting Interests

The author declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Reference

- 1- Antonarakis GS, Adibfar A, Thompson BD, Daskalogiannakis J, Fisher DM. 2015a. Presurgical cleft lip anthropometrics and dental arch relationships in

- patients with complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 52(3):269-76.
- 2- Antonarakis GS, Fisher DM. 2015b. Permanent Tooth Agenesis and Maxillary Hypoplasia in Patients with Unilateral Cleft Lip and Palate. *Plast Reconstr Surg.* 136(5):648e-656e.
 - 3- Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. 1998. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet.* 45(3):348-53.
 - 4- Botticelli S, Küseler A, Marcusson A, Mølsted K, N rholt SE, Cattaneo PM, Pedersen TK. 2020. Do Infant Cleft Dimensions Have an Influence on Occlusal Relations? A Subgroup Analysis Within an RCT of Primary Surgery in Patients With Unilateral Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 57(3):378-388.
 - 5- Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. 2005. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Exp Cell Res.* 304(2):493-505.
 - 6- Buj-Acosta C, Paredes-Gallardo V, Montiel-Company JM, Albaladejo A, Bellot-Arc s C. Predictive validity of the GOSLON Yardstick index in patients with unilateral cleft lip and palate: A systematic review. *PLoS One.* 2017 Jun 1;12(6):e0178497. doi: 10.1371/journal.pone
 - 7- Cavalcante BGN, Lacerda RHW, Assis IO, Bezamat M, Modesto A, Vieira AR. 2021. Talon Cusp Associates With MMP2 in a Cohort of Individuals Born With Oral Clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 58(5):597-602.
 - 8- Chang CS, Liao YF, Wallace CG, Chan FC, Liou EJ, Chen PK, Noordhoff MS. 2014. Long-term comparison of the results of four techniques used for bilateral cleft nose repair: a single surgeon's experience. *Plast Reconstr Surg.* 134(6):926e-936e.
 - 9- Cruz CV, Mattos CT, Maia JC, Granjeiro JM, Reis MF, Mucha JN, Vilella B, Ruellas AC, Luiz RR, Costa MC et al. 2017. Genetic polymorphisms underlying the skeletal Class III phenotype. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 151(4):700-707.

- 10-da Fontoura CS, Miller SF, Wehby GL, Amendt BA, Holton NE, Southard TE, Allareddy V, Moreno Uribe LM. 2015. Candidate Gene Analyzes of Skeletal Variation in Malocclusion. *J Dent Res.* 94(7):913-20.
- 11-de Lima Pedro R, Faria MD, Costa MC, Vieira AR. 2012. Dental anomalies in children born with clefts: a case-control study. *Cleft Palate Craniofac J.* 49:64–68.
- 12-Fisher DM, Tse R, Marcus JR. 2008. Objective measurements for grading the primary unilateral cleft lip nasal deformity. *Plast Reconstr Surg.* 122(3):874-880.
- 13-Jacobson A. The “Wits” appraisal of jaw disharmony.1975. *Am J Orthod.* 67(2):125-138.
- 14-Jiang Q, Mei L, Zou Y, Ding Q, Cannon RD, Chen H, Li H. 2019. Genetic Polymorphisms in *FGFR2* Underlie Skeletal Malocclusion. *J Dent Res.* 98(12):1340-1347.
- 15-Jiang L, Sheng K, Wang C, Xue D, Pan Z. 2021. The Effect of MMP-2 Inhibitor 1 on Osteogenesis and Angiogenesis During Bone Regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 22(8):596783e.
- 16-Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. 2009. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 15(7):437-53.
- 17-Koruyucu M, Kasimoğlu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergöz, N, Tuna EB, Gencay K, Deeley K, Bussaneli D, et al. 2018. Rethinking isolated cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology.* 125(4):307–312.
- 18-Küseler A, Heliövaara A, Mølsted K, Marcusson A, Karsten A, Bellardie H, Sæle P, Brinck E, Skaare P, Rizell S, et al. 2021. Scandcleft trial of primary surgery for unilateral cleft lip and palate: Craniofacial cephalometrics at 8 years. *Eur J Orthod.* 43(4):374-380.
- 19-Latief BS, Kuijpers MAR, Stebel A, Kuijpers-Jagtman AM, Fudalej PS. 2020. Pattern of Morphological Variability in Unrepaired Unilateral Clefts With and Without Cleft Palate May Suggest Intrinsic Growth Deficiency. *Front Cell Dev Biol.* 11(8):587859e.

- 20-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.
- 21-Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. 2007. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res*. 86(10):986–91.
- 22-Leslie EJ, Taub MA, Liu H, Steinberg KM, Koboldt DC, Zhang Q, Carlson JC, Hetmanski JB, Wang H, Larson DE, et al. 2015. Identification of functional variants for cleft lip with or without cleft palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by targeted sequencing of GWAS loci. *Am J Hum Genet*. 96(3):397-411.
- 23-Li X, Jin L, Tan Y. 2020. Different roles of matrix metalloproteinase 2 in osteolysis of skeletal dysplasia and bone metastasis (Review). *Mol Med Rep*. 23(1):70.
- 24-Long RE JR, Hathaway R, Daskalogiannakis J, Mercado A, Russell K, Cohen M, Semb G, Shaw W. 2011. The Americleft study: an inter-center study of treatment outcomes for patients with unilateral cleft lip and palate part 1. Principles and study design. *Cleft Palate Craniofac J*. 48(3):239-243.
- 25-Luo J, Zhu H, Chang HM, Lin YM, Yang J, Leung PCK. 2020.The regulation of IGFBP3 by BMP2 has a role in human endometrial remodeling. *FASEB J*.34(11):15462-15479
- 26-Marañón-Vásquez GA, Dantas B, Kirschneck C, Arid J, Cunha A, Ramos AGC, Omori MA, Rodrigues AS, Teixeira EC, Levy SC, et al. 2019. Tooth agenesis-related GLI2 and GLI3 genes may contribute to craniofacial skeletal morphology in humans. *Arch Oral Biol*. 103:12-18.
- 27-Mars M, Plint DA, Houston WJ, Bergland O, Semb G. 1987. The Goslon Yardstick: a new system of assessing dental arch relationships in children with unilateral clefts of the lip and palate. *Cleft Palate J*. 24(4):314-22.
- 28-McNamara Jr JA. 1984. A method of cephalometric evaluation. *Am J Orthod*. 86(6):449-69.
- 29-Meazzini MA, Tortora C, Morabito A, Garattini G, Brusati R. 2011. Factors that affect variability in impairment of maxillary growth in patients with cleft lip and palate treated using the same surgical protocols. *J Plast Surg Hand Surg*. 45(4-5):188-193.

- 30-Molsted K, Brattström V, Prah Andersen B, Shaw W, Semb G. 2005. The Eurocleft study: Intercenter Study of treatment outcome in patients with complete cleft lip and palate. Part 3: Dental arch relationships. *Cleft palate-craniofacial J.* 42(1):78-82.
- 31-Murray JC. 2002. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 61(4):248–56.
- 32-Ozawa TO, Shaw WC, Katsaros C, Kuijpers-Jagtman AM, Hagberg C, Ronning E, Semb G. 2011. A new yardstick for rating dental arch relationship in patients with complete bilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 48(2):167-172.
- 33-Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Xsiao CF, Olivier M, Pesich R, Hebert J, Chen YD, Dzau VJ, et al. 2001. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 2001; 11(7):1262-1268.
- 34-Rizell S, Küseler A, Heliövaara A, Skaare P, Brinck E, Bellardie H, Mooney J, Mølsted K, Karsten A, Sæle P, et al. 2021. Scandcleft randomized trials of primary surgery for unilateral cleft lip and palate: impact of maxillary dental agenesis on craniofacial growth and dental arch relationship in 8 year olds. *Eur J Orthod.* 43(4):381-386.
- 35- Sandy JR, Williams AC, Bearn D, Midinhall S, Murphy T, Sell D, Murray J, Shaw WC. 2001. Cleft lip and palate care in the United Kingdom- The clinical Standards Advisory Group (CSAG) Study, Part 1: Background and methodology. *Cleft Palate Craniofac J.* 38:20-23.
- 36-Tavajohi-Kermani H, Kapur R, Sciote JJ. 2002. Tooth agenesis and craniofacial morphology in an orthodontic population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*;122(1):39-47.
- 37-Vieira AR, Orioli IM. 2001. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *ASDC J Dent Child.* 68(4):272-279.
- 38-Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, et al. 2005. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 1(6):e64.

- 39-Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review.2006. *Am J Epidemiol*.163(9):790-810.
- 40-Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. 2008. *J Dent Res*. 87(2):119-125.
- 41-Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. 2008. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A*. 146A(11):1406-1413.
- 42-Zhao M, Qiao M, Harris SE, Chen D, Oyajobi BO, Mundy GR. 2006. The zinc finger transcription factor Gli2 mediates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts in response to hedgehog signaling. *Mol Cell Biol*.26(16):6197-208.

CONCLUSÕES

- Foi observada associação entre os resultados de crescimento facial e os SNPs *MMP2* rs9923304 (nas fissuras labiopalatinas unilaterais e bilaterais), *GLI2* rs3738880 e *TGFa* rs2169975 (nas fissuras labiopalatinas unilaterais), e *FGFR2* rs11200014 (na amostra total, sem diferenciação por tipo de fissura).
- Foi encontrada associação entre a frequência total de anomalias dentárias e os resultados de crescimento maxilo facial. Quanto maior o número total de anomalias, pior o resultado de crescimento. Em relação ao tipo de anomalias dentárias e tipo de fissura, concluímos que os resultados de crescimento maxilo facial apresentaram as seguintes correlações:
 - ❖ Nos casos de fissuras labiais unilaterais, com agenesia dentária
 - ❖ Nos casos de fissuras labiopalatinas unilaterais: agenesia dentária, anomalias de estrutura do esmalte e anomalias de forma.
 - ❖ Nos casos de fissuras labiopalatinas bilaterais, com anomalias irruptivas/ topográficas, anomalias de estrutura de esmalte e anomalias de forma.
- Não houve diferença no comportamento do crescimento maxilo facial, avaliado pelos índices oclusais, em longo prazo, em fissuras labiopalatinas unilaterais e bilaterais na amostra estudada.
- Não houve correlação entre a gravidade da fissura e os resultados de crescimento facial em nenhum dos parâmetros avaliados (defeito alveolar, deformidade nasal e distância do defeito palatino), nas fissuras labiopalatinas unilaterais e bilaterais.

Os resultados apresentados trazem uma nova perspectiva de análise dos fatores clínicos que podem ser utilizados como “sinalizadores” de prognóstico de crescimento maxilo facial em pacientes com fissuras labiopalatinas, ressaltando a importância da avaliação cuidadosa da frequência das anomalias dentárias na prática clínica, contribuindo para o entendimento do envolvimento genético nos resultados de tratamento.

5. REFERÊNCIAS

- Abbott MA. Cleft lip and palate. *Pediatr Rev.* 2014 May;35(5):177-81. doi: 10.1542/pir.35-5-177. PMID: 24790071.
- Aduss H. Craniofacial growth in complete unilateral cleft lip and palate. *Angle Orthod.* 1971;41(3):202-213. doi:10.1043/00033219.
- Almoammar KA, Almarhoon HA, Batwa W, Alqahtani N, Al-Jewair T, Albarakati S. Cephalometric Soft Tissue Characteristics of Unilateral Cleft Lip and Palate Patients in Relation to Missing Teeth. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2392808. doi:10.1155/2017/2392808.
- Alonso N, Lacerda RHW, do Vale DM, Viegas A, Nóbrega E, Ritz Filho G, et al., Brazilian National Multicenter Study: evaluation of comprehensive cleft care. 14th International Cleft Congress, 2022, Scotland, UK.
- Alves-Ferreira M, Pinho T, Sousa A, Sequeiros J, Lemos C, Alonso I. Identification of genetic risk factors for maxillary lateral incisor agenesis. *J Dent Res.* 2014;93(5):452-8. doi:10.1177/0022034514523986.
- Antonarakis GS, Fisher DM. Permanent Tooth Agenesis and Maxillary Hypoplasia in Patients with Unilateral Cleft Lip and Palate. *Plast Reconstr Surg.* 2015;136(5):648e-656e. doi:10.1097/PRS.0000000000001694.
- Antunes LS, Küchler EC, Tannure PN, Costa MC, Gouvêa CV, Olej B, et al. BMP4 Polymorphism is Associated With Nonsyndromic Oral Cleft in a Brazilian Population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2013;50(6):633-8. doi: 10.1597/12-048
- Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet.* 1989;45(3):348-53.
- Aşlar D, Özdiler E, Altuğ AT, Taştan H. Determination of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene polymorphism in Turkish patients with nonsyndromic cleft lip and palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013 Jul;77(7):1143-6. doi: 10.1016/j.ijporl.2013.04.022
- Atack NE, Hathorn IS, Semb G, Dowell T, Sandy JR. A new index for assessing surgical outcome in unilateral cleft lip and palate subjects aged five: reproducibility and validity. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997;34(3):242-6. doi:10.1597/1545-1569_1997_034_0242_anifas_2.3.co_2.
- Avasthi KK, Agarwal A, Agarwal S. Association of *MTHFR*, *BMP4*, *TGFA* and *IRF6* Polymorphisms with Non-Syndromic Cleft lip and Palate in North Indian Patients. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2022 Apr-Jun;14(2):175-180. doi: 10.18502/ajmb.v14i2.8879

Bartzela T, Katsaros C, Shaw WC, Rønning E, Rizell S, Bronkhorst E, et al. A longitudinal three-center study of dental arch relationship in patients with bilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010a;47(2):167-74. doi:10.1597/08-249_1.

Bartzela TN, Carels CE, Bronkhorst EM, Rønning E, Rizell S, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth agenesis patterns in bilateral cleft lip and palate. *Eur J Oral Sci*. 2010b;118(1):47-52. doi:10.1111/j.1600-0722.2009.00698.x.

Bartzela T, Leenarts C, Bronkhorst E, Borstlap W, Katsaros C, Kuijpers-Jagtman AM. Comparison of two scoring systems for evaluation of treatment outcome in patients with complete bilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011;48(4):455-61. doi:10.1597/09-208.

Batra P, Annavarapu GK, Chopra A, Srivastava A, Sadhu P, Mevda K. Use of Bauru Yardstick in Patients With Complete Bilateral Cleft Lip and Palate at an Indian Center. *Cleft Palate Craniofac J*. 2018;55(4):602-606. doi:10.1177/1055665617730360.

Batwa W, Almarhoon HA, Almoammar KA, Alqahtani N, Albarakati SF, Al-Jewair T. Dento-skeletal characteristics of cleft patients with missing teeth. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2018;8(10):237-244. doi:10.2147/CCIDE.S170717.

Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*. 2010 Jun;42(6):525-9. doi: 10.1038/ng.580. Epub 2010 May 2. Erratum in: *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):727

Bittermann GKP, de Ruiter AP, Bittermann AJ, Mink van de Molen AB, van Es RJ, Koole R, et al. Midfacial growth and dental arch relationships in bilateral cleft palate following secondary alveolar bone grafting and orthodontic intervention: Factors predicting a Le Fort I osteotomy at age 18. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018;46(10):1764-1771. doi:10.1016/j.jcms.2018.07.014.

Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, et al., Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 2009 Apr;41(4):473-7. doi: 10.1038/ng.333.

Bonczek O, Krejci P, Izakovicova-Holla L, Cernochova P, Kiss I, Vojtesek B. Tooth agenesis: What do we know and is there a connection to cancer? *Clin Genet*. 2021; 99(4):493-502. doi: 10.1111/cge.13892.

Bongaarts CA, van't Hof MA, Prahl-Andersen B, Kuijpers-Jagtman AM. Identification of cephalometric landmarks in unilateral cleft lip and palate patients: are there alternatives for point A, ANS, and PNS? *Cleft Palate Craniofac J*. 2008;45(1):81-6. doi:10.1597/06-236.1.

Botticelli S, Küseler A, Marcusson A, Mølsted K, Nørholt SE, Cattaneo PM, et al. Do Infant Cleft Dimensions Have an Influence on Occlusal Relations? A Subgroup Analysis Within an RCT of Primary Surgery in Patients With Unilateral Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2020;57(3):378-388. doi:10.1177/1055665619875320.

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.

Brown NL, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res*. 2002;81(12):826-30. doi:10.1177/154405910208101206.

Callahan N, Modesto A, Deeley K, Meira R, Vieira AR. Transforming growth factor- α gene (TGFA), human tooth agenesis, and evidence of segmental uniparental isodisomy. *Eur J Oral Sci*. 2009;117(1):20-6. doi:10.1111/j.1600-0722.2008.00593.x.

Campbell A, Restrepo C, Park E, Navas G, Deshpande G, Swanson J, et al. Influence of Severity on Aesthetic Outcomes of Unilateral Cleft Lip Repair in 1,823 Patients. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2019;7(1):e2083. doi:10.1097/GOX.0000000000002083.

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):1660-1664. doi:10.1177/00220345010800071201.

Carlson, J. C., Standley, J., Petrin, A., Shaffer, J. R., Butali, A., Buxo, C. J., et al. Identification of 16q21 as a modifier of nonsyndromic orofacial cleft phenotypes HHS Public Access Author manuscript. *Genet Epidemiol*, 2017;41(8); 887–897. <https://doi.org/10.1002/gepi.22090>

Carstens MH. Development of the facial midline. *J Craniofac Surg*. 2002 Jan;13(1):129-87; discussion 188-90. doi: 10.1097/00001665-200201000-00032

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*. 2021;58(5):597-602. doi: 10.1177/1055665620958569.

Chiu YT, Liao YF. Is cleft severity related to maxillary growth in patients with unilateral cleft lip and palate? *Cleft Palate Craniofac J*. 2012;49(5):535-40. doi:10.1597/10-044)

Choudhary S, Cadier MA, Shinn DL, Shekhar K, McDowall RA. Effect of Veau-Wardill-Kilner type of cleft palate repair on long-term midfacial growth. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111(2):576-82. doi:10.1097/01.PRS.0000041945.51785.58

Cunha AS, Dos Santos LV, Marañón-Vásquez GA, Kirschneck C, Gerber JT, Stuari MB, et al.. Genetic variants in tooth agenesis-related genes might be also involved in tooth size variations. *Clin Oral Investig*. 2021;25(3):1307-1318. doi:10.1007/s00784-020-03437-8.

da Fontoura CS, Miller SF, Wehby GL, Amendt BA, Holton NE, Southard TE, et al. Candidate Gene Analyses of Skeletal Variation in Malocclusion. *J Dent Res*. 2015;94(7):913-20. doi: 10.1177/0022034515581643.

da Silva Filho OG, Carvalho Lauris RC, Capelozza Filho L, Semb G. Craniofacial morphology in adult patients with unoperated complete bilateral cleft lip and palate.

Cleft Palate Craniofac J. 1998;35:111-9. doi:10.1597/1545-1569_1998_035_0111_cmiapw_2.3.co_2.

das Neves LT, de Carvalho IMM, Cobourne MT, Gomide MR. Dental anomalies in non-syndromic orofacial clefts: A clinical approach. Oral Dis. 2022;28(5):1351-1368. doi: 10.1111/odi.14226.

Daskalogiannakis J, Mercado A, Russell K, Hathaway R, Dugas G, et al.. The Americleft study: an inter-center study of treatment outcomes for patients with unilateral cleft lip and palate part 3. Analysis of craniofacial form. Cleft Palate Craniofac J. 2011;48(3):252-8. doi:10.1597/09-185.1.

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(6):e64-8. doi:10.1597/10-067.

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. doi: 10.1038/nrg2933. PMID:

Dixon MJ, Ferguson MW. The effects of epidermal growth factor, transforming growth factors alpha and beta and platelet-derived growth factor on murine palatal shelves in organ culture. Arch Oral Biol. 1992;37(5):395-410. doi:10.1016/0003-9969(92)90024-3.

do Vale DM, Lacerda RHW, Araújo CCM, Melo EC, Coelli JC, Wilhemsen NCVG, et al, Brazilian National Multicenter Study: Growth Outcomes from UCLP. 14th International Cleft Congress, 2022, Scotland, UK.

Doberschütz PH, Schwahn C, Krey KF. Cephalometric analyzes for cleft patients: a statistical approach to compare the variables of Delaire's craniofacial analysis to Bergen analysis. Clin Oral Investig. 2022;26(1):353-364. doi:10.1007/s00784-021-04006.

Doğan S, Onçağ G, Akin Y. Craniofacial development in children with unilateral cleft lip and palate. Br J Oral Maxillofac Surg. 2006;44(1):28-33. doi:10.1016/j.bjoms.2005.07.023.

Dogan E, Çınarcık H, Doğan S, Dindaroğlu F. Is Cephalometric Analysis Reliable in Cases with Cleft Lip and Palate? Journal of Ege University School of Dentistry. 41(1):27-37, 2020.

Eerens K, Vlietinck R, Heidbüchel K, Van Olmen A, Derom C, Willems G, et al. Hypodontia and tooth formation in groups of children with cleft, siblings without cleft, and nonrelated controls. Cleft Palate Craniofac J. 2001;38(4):374-8. doi:10.1597/1545-1569_2001_038_0374_hatfig_2.0.co_2.

Fernandez CCA, Pereira CVCA, Ferreira FFCF, Maciel JVB, Modesto A, Costa MC, Vieira AR. IRF6, MSX1, TGFA, dental anomalies, and skeletal malocclusion. *Eur J Orthod*. 2021;43(4):478-485

Fowler PV, Keall H, Kennedy D, Healey D, Thompson JMD. Dental arch relationship outcomes for children with complete unilateral and complete bilateral cleft lip and palate in New Zealand. *Orthod Craniofac Res*. 2019;22(3):147-152. doi:10.1111/ocr.12300.

Freitas JA, das Neves LT, de Almeida AL, Garib DG, Trindade-Suedam IK, Yaedú RY, Lauris Rde C, Soares S, Oliveira TM, Pinto JH. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP)-Part 1: overall aspects. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(1):9-15. doi:10.1590/s1678-77572012000100003

Fudalej PS, Urbanova W, Klimova I, Dubovska I, Brudnicki A, Polackova P, et al. The Slavcleft: A three-center study of the outcome of treatment of cleft lip and palate. Part 2: Dental arch relationships. *J Craniomaxillofac Surg*. 2019;47(7):1092-1095. doi: 10.1016/j.jcms.2019.03.023.

Gershater E, Li C, Ha P, Chung CH, Tanna N, Zou M, et al. Genes and Pathways Associated with Skeletal Sagittal Malocclusions: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):13037. doi: 10.3390/ijms222313037.

Gupta P, Chaturvedi TP, Sharma V. Expressional Analysis of MSX1 (Human) Revealed its Role in Sagittal Jaw Relationship. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(8):ZC71-ZC77. doi:10.7860/JCDR/2017/26755.10441.

Hao J, Gao R, Wu W, Hua L, Chen Y, Li F, Liu J, Luo D, Han J, Wang H. Association between BMP4 gene polymorphisms and cleft lip with or without cleft palate in a population from South China. *Arch Oral Biol*. 2018;93:95-99. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.015.

Haque S, Alam MK, Khamis MF. The effect of various factors on the dental arch relationship in non-syndromic unilateral cleft lip and palate children assessed by new approach: a retrospective study. *BMC Pediatr*. 2017;17(1):119. doi:10.1186/s12887-017-0870-4.

Hardwicke J, Chhabra P, Richard B. Absent maxillary lateral incisor as evidence of poor midfacial growth in unilateral cleft lip and palate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;119(4):392–395. doi: 10.1016/j.oooo.2014.12.011.

Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development*. 1998;125(15):2803-11. doi:10.1242/dev.125.15.2803.

Hathaway R, Daskalogiannakis J, Mercado A, Russell K, Long RE Jr, Cohen M, Semb G, Shaw W. The Americleft study: an inter-center study of treatment outcomes for patients with unilateral cleft lip and palate part 2. Dental arch relationships. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011;48(3):244-51. doi: 10.1597/09-181.1.

Heliövaara A, Küsseler A, Skaare P, Shaw W, Mølsted K, Karsten A, et al. Scandcleft randomised trials of primary surgery for unilateral cleft lip and palate: 6. Dental arch relationships in 5 year-olds. *J Plast Surg Hand Surg*. 2017;51(1):52-57. doi: 10.1080/2000656X.2016.1221352.

Heliövaara A, Küsseler A, Skaare P, Bellardie H, Mølsted K, Karsten A, et al. Scandcleft randomized trials of primary surgery for unilateral cleft lip and palate: comparison of dental arch relationships and dental indices at 5, 8, and 10 years. *Eur J Orthod*. 2022; 24;44(3):258-267.

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

Honda Y, Suzuki A, Ohishi M, Tashiro H. Longitudinal study on the changes of maxillary arch dimensions in Japanese children with cleft lip and/or palate: infancy to 4 years of age. *Cleft Palate Craniofac J*. 1995;32(2):149-55. doi: 10.1597/1545-1569_1995_032_0149_Isotco_2.3.co_2.

Howe BJ, Cooper ME, Vieira AR, Weinberg SM, Resick JM, Nidey NL, et al. Spectrum of Dental Phenotypes in Nonsyndromic Orofacial Clefting. *J Dent Res*. 2015;94(7):905-12. doi:10.1177/0022034515588281.

Iwasaki K, Yamamoto YS, Masuda M, Nalabothu P, Ohkubo F, Kadomatsu K, et al. Longitudinal Follow-Up of Facial Growth of Patients With Unilateral Cleft Lip and Palate Following Modified Veau-Wardill-Kilner Palatoplasty. *Cleft Palate Craniofac J*. 2022;59(3):291-298. doi:10.1177/10556656211004852.

Jamilian A, Sarkarat F, Jafari M, Neshandar M, Amini E, Khosravi S, Ghassemi A. Family history and risk factors for cleft lip and palate patients and their associated anomalies. *Stomatologija*. 2017;19(3):78-83.

Jagomägi T, Nikopensius T, Krjutskov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M, et al. MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci*. 2010 Jun;118(3):213-20. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00729.x

Jena AK, Duggal R, Roychoudhury A, Parkash H. Effects of timing and number of palate repair on maxillary growth in complete unilateral cleft lip and palate patients. *J Clin Pediatr Dent*. 2004;28(3):225-32. doi: 10.17796/jcpd. 28.3.f554814810 71 30 2g.

Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, et al.. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2003 Jun;40(6):399-407. doi: 10.1136/jmg.40.6.399

Jiannan L, Zeqiang G, Yongjuan C, Kaihong D, Bing D, Rongsheng L. Analysis of interactions between genetic variants of BMP4 and environmental factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate susceptibility. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(1):50-6. doi: 10.1016/j.ijom.2009.10.010.

Jin M, Du X, Chen L. Cross-talk between FGF and other cytokine signalling pathways during endochondral bone development. *Cell Biol Int*. 2012;36(8):691-6. doi:10.1042/CBI20110352.

Jiang Q, Mei L, Zou Y, Ding Q, Cannon RD, Chen H, Li H. Genetic Polymorphisms in *FGFR2* Underlie Skeletal Malocclusion. *J Dent Res*. 2019; 98(12):1340-1347. doi:10.1177/0022034519872951.

Johnson N, Williams A, Singer S, Southall P, Sandy J. Initial cleft size does not correlate with outcome in unilateral cleft lip and palate. *Eur J Orthod*. 2000;22(1):93-100. doi: 10.1093/ejo/22.1.93.

Jorge PK, Gnoinski W, Vaz Laskos K, Felício Carvalho Carrara C, Gamba Garib D, Okada Ozawa T, et al. Comparison of two treatment protocols in children with unilateral complete cleft lip and palate: Tridimensional evaluation of the maxillary dental arch. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016 ;44(9):1117-22. doi:10.1016/j.jcms.2016.06.032.

Kappen IFPM, Bittermann GKP, Schouten RM, Bittermann D, Etty E, Koole R, et al. Long-term mid-facial growth of patients with a unilateral complete cleft of lip, alveolus and palate treated by two-stage palatoplasty: cephalometric analysis. *Clin Oral Investig*. 2017;21(5):1801-1810. doi:10.1007/s00784-016-1949-2.

Kennedy TJ, Miller SH, Tooze FM, Harding RL, Davis TS, Graham WP 3rd. The team approach to treatment of the cleft lip and palate. *Am Fam Physician*. 1978;18(1):74-84.

Kuang W, Aarts M, Kuijpers-Jagtman AM, He H, Ongkosuwito EM. Treatment Outcome in Bilateral Cleft lip and Palate Patients Evaluated With the Huddart-Bodenham Scoring System and the Bilateral Cleft lip and Palate Yardstick: A Systematic Review. *Cleft Palate Craniofac J*. 2021; 18: 10556656211041883. doi:10.1177/10556656211041883.

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.

Küchler EC, Lips A, Tannure PN, Ho B, Costa MC, Granjeiro JM, et al. Tooth agenesis association with self-reported family history of cancer. *J Dent Res*. 2013;92(2):149-55. doi:10.1177/0022034512468750.

Küchler EC, Sabóia TM, Vieira TC, Lips A, Tannure PN, Deeley K, Studies of genes involved in craniofacial development and tumorigenesis: FGF3 contributes to isolated oral clefts and may interact with PAX9. *Acta Odontol Scand*. 2014;72(8):1070-8. doi: 10.3109/00016357.2014.903514.

Kumari P, Singh SK, Raman R. TGFβ3, MSX1, and MMP3 as Candidates for NSCL±P in an Indian Population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2019;56(3):363-372. doi: 10.1177/1055665618775727.

Koruyucu M, Kasimoğlu Y, Seymen F, Bayram M, Patir A, Ergöz N, et al. Rethinking isolated cleft lip and palate as a syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 ;125(4):307-312. doi:10.1016/j.oooo.2018.01.007.

Lai LH, Hui BK, Nguyen PD, Yee KS, Martz MG, Bradley JP, et al. Lateral incisor agenesis predicts maxillary hypoplasia and Le Fort I advancement surgery in cleft patients. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(1):142e-148e. doi:10.1097/PRS.0000000000000779.

Latief BS, Lekkas C, Kuijpers Jagtman AM. Maxillary arch width in unoperated adult of the unilateral cleft lip and alveolus patients. *J Maxillofac Oral Surg*. 2009;8(3):218-20. doi:10.1007/s12663-009-0053-4.

Latif A, Kuijpers MAR, Rachwalski M, Latief BS, Kuijpers-Jagtman AM, Fudalej PS. Morphological variability in unrepaired bilateral clefts with and without cleft palate evaluated with geometric morphometrics. *J Anat*. 2020a;236(3):425-433. doi:10.1111/joa.13118.

Latief BS, Kuijpers MAR, Stebel A, Kuijpers-Jagtman AM, Fudalej PS. Pattern of Morphological Variability in Unrepaired Unilateral Clefts With and Without Cleft Palate May Suggest Intrinsic Growth Deficiency. *Front Cell Dev Biol*. 2020b;11(8):587-859. doi:10.3389/fcell.2020.587859.

Lavôr JR, Lacerda RHW, Modesto A, Vieira AR. Maxillary incisor enamel defects in individuals born with cleft lip/palate. *PLoS One*. 2020;15(12):e0244506.

Leenarts CM, Bartzela TN, Bronkhorst EM, Semb G, Shaw WC, Katsaros C, et al. Photographs of dental casts or digital models: rating dental arch relationships in bilateral cleft lip and palate. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(2):180-5. doi:10.1016/j.ijom.2011.11.004.

Leslie EJ, Taub MA, Liu H, Steinberg KM, Koboldt DC, Zhang Q et al. Identification of functional variants for cleft lip with or without cleft palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by targeted sequencing of GWAS loci. *Am J Hum Genet*. 2015;96(3):397-411. doi:10.1016/j.ajhg.2015.01.004.

Leslie, E. J., & Marazita, M. L. . Genetics of Cleft Lip and Cleft Palate. *Am J Genetic Sem Med Genet*. 2013;163(4), 246–258. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31381>

Leslie, E. J., Carlson, J. C., Shaffer, J. R., Feingold, E., Wehby, G., Laurie, C. A, et al. A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p 24.2, 17q23 and 19q13. *Human Molecular Genetics*. 2016; *i* 2862–2872. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDW104>

Leslie EJ, Carlson JC, Shaffer JR, Butali A, Buxó CJ, Castilla EE, et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic orofacial clefts identify novel associations between FOXE1 and all orofacial clefts, and TP63 and cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet*. 2017 Mar;136(3):275-286.doi: 10.1007/s00439-016-1754-7

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.

Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009;85(2):169-73. doi: 10.1002/bdra.20489.

Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, Menezes R, Kempa I, Prasad JL, et al. Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One*. 2012;7(9):e45441. doi: 10.1371/journal.pone.0045441.

Letra A, Silva RM, Motta LG, Blanton SH, Hecht JT, Granjeiro JM, et al. Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012a;94(7):540-548. doi: 10.1002/bdra.23026.

Liao YF, Mars M. Long-term effects of clefts on craniofacial morphology in patients with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2005;42(6):601-9. doi:10.1597/04-163r.1.

Liberton DK, Verma P, Almpani K, Fung PW, Mishra R, Oberoi S, et al. Craniofacial Analysis May Indicate Co-Occurrence of Skeletal Malocclusions and Associated Risks in Development of Cleft Lip and Palate. *J Dev Biol*. 2020;28;8(1):2. doi:10.3390/jdb8010002.

Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. Genetic Factors and Orofacial Clefing. *Semin Orthod*. 2008 Jun;14(2):103-114. doi: 10.1053/j.sodo.2008.02.002.

Lilja J, Mars M, Elander A, Enocson L, Hagberg C, Worrell E, et al. Analysis of dental arch relationships in Swedish unilateral cleft lip and palate subjects: 20-year longitudinal consecutive series treated with delayed hard palate closure. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006;43(5):606-11. doi:10.1597/05-069.

Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ*. 2004 ;82(3):213-8

Liu H, Han D, Wong S, Nan X, Zhao H, Feng H. rs929387 of GLI3 is involved in tooth agenesis in Chinese Han population. *PLoS One*. 2013;8(11):e80860. doi:10.1371/journal.pone.0080860.

Lu XC, Yu W, Tao Y, Zhao PL, Li K, Tang LJ, et al. Contribution of transforming growth factor α polymorphisms to nonsyndromic orofacial clefts: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2014;179(3):267-81. doi:10.1093/aje/kwt262.

Lu Y, Liu Q, Xu W, Li Z, Jiang M, Li X, Zhao N, Liu W, Sui Y, Ma C, Feng W, Han W, Li J. TGFA and IRF6 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in northeast China. *PLoS One*. 2013 Aug 6;8(8):e70754. doi: 10.1371/journal.pone.0070754

Luz CLF, Ozawa TO, Arouca R, Ohashi A, Broll D. Evaluation of dental arch relationship of patients with bilateral cleft lip and palate applying bilateral yardstick. *J of Cleft Lip Palate and Craniofac Anom.* 2017; 4(3):167-172.

Maulina I, Urtane I, Jakobsone G. The craniofacial morphology of the parents of children with cleft lip and/or palate: a review of cephalometric studies. *Stomatologija.* 2006;8(1):16-20.

Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T, et al. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet.* 2004^a;75(2):161-73. doi: 10.1086/422475.

Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. *Clin Plast Surg.* 2004;31(2):125-40. doi: 10.1016/S0094-1298(03)00138-X.

Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:263-83. doi:10.1146/annurev-genom-090711-163729.

Marañón-Vásquez GA, Dantas B, Kirschneck C, Arid J, Cunha A, Ramos AGC, et al. Tooth agenesis-related GLI2 and GLI3 genes may contribute to craniofacial skeletal morphology in humans. *Arch Oral Biol.* 2019;103:12-18. doi:10.1016/j.archoralbio.2019.05.008.

Mars M, Asher-McDade C, Brattström V, Dahl E, McWilliam J, Mølsted K, et al. A six-center international study of treatment outcome in patients with clefts of the lip and palate: Part 3. Dental arch relationships. *Cleft Palate Craniofac J.* 1992;29(5):405-8. doi:10.1597/1545-1569_1992_029_0405_asciso_2.3.co_2.

McIntyre GT, Mossey PA. Parental craniofacial morphology in orofacial clefting. *Eur J Orthod.* 2004;26(4):375-84. doi:10.1093/ejo/26.4.375.

Meazzini MC, Donati V, Garattini G, Brusati R. Maxillary growth impairment in cleft lip and palate patients: a simplified approach in the search for a cause. *J Craniofac Surg.* 2008;19(5):1302-7. doi:10.1097/SCS.0b013e31814fb711.

Meazzini MC, Tortora C, Morabito A, Garattini G, Brusati R. Factors that affect variability in impairment of maxillary growth in patients with cleft lip and palate treated using the same surgical protocol. *J Plast Surg Hand Surg.* 2011;45(4-5):188-93. doi:10.3109/2000656X.2011.583493.

Menezes R, Vieira AR. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008 Jul;45(4):414-9. doi:10.1597/07-064.1.

Miao D, Liu H, Plut P, Niu M, Huo R, Goltzman D, et al. Impaired endochondral bone development and osteopenia in Gli2-deficient mice. *Exp Cell Res*. 2004;294(1):210-22. doi:10.1016/j.yexcr.2003.10.021.

Mo R, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HH, et al. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development*. 1997;124(1):113-23. doi:10.1242/dev.124.1.113.

Mooney MP, Siegel MI, Kimes KR, Todhunter J. Development of the orbicularis oris muscle in normal and cleft lip and palate human fetuses using three-dimensional computer reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1988 Mar;81(3):336-45. doi: 10.1097/00006534-198803000-00004.

Molsted K, Asher-McDade C, Brattstrom V, Dahl E, Mars M, McWilliam J et al. A six-center international study of treatment outcome in patients with clefts of the lip and palate: Part 2. Craniofacial form and soft tissue profile. *Cleft Palate Craniofac J* 1992;29:398-404. doi:10.1597/1545-1569_1992_029_0398_asciso_2.3.co_2.

Mølsted K, Brattström V, Prahl-Andersen B, Shaw WC, Semb G. The Eurocleft study: intercenter study of treatment outcome in patients with complete cleft lip and palate. Part 3: dental arch relationships. *Cleft Palate Craniofac J*. 2005;42(1):78-82. doi:10.1597/02-119.3.1. PMID: 15643920.

Mossey PA, McColl J, O'Hara M. Cephalometric features in the parents of children with orofacial clefting. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998;36(3):202-12. doi:10.1016/s0266-4356(98)90498-3.

Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009;374(9703):1773-85. doi:10.1016/S0140-6736(09)60695-4.

Mossey PA, Batra P, McIntyre GT. The parental dentocraniofacial phenotype-an orofacial clefting microform. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010;47(1):22-34. doi:10.1597/08-158.1.

Nie X, Luukko K, Kettunen P. FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders. *Oral Dis*. 2006;12(2):102-11. doi:10.1111/j.1601-0825.2005.01176.x

Niktabar SM, Aarafi H, Dastgheib SA, Noorishadkam M, Mirjalili SR, Lookzadeh MH, et al. Association of MTHFR 1298A > C Polymorphism with Susceptibility to Non-Syndromic Cleft Lip with or without Palate: A Case-Control Study and Meta-Analysis. *Fetal Pediatr Pathol*. 2021 Feb;40(1):1-17. doi: 10.1080/15513815.2019.1683918.

Normando AD, da Silva Filho OG, Capelozza Filho L. Influence of surgery on maxillary growth in cleft lip and/or palate patients. *J Craniomaxillofac Surg* 1992;20:111-118.

Osoegawa K, Vessere GM, Utami KH, Mansilla MA, Johnson MK, Riley BM, et al. Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array

comparative genomic hybridisation. *J Med Genet.*2008;45(2):81-6.
doi:10.1136/jmg.2007.052191.

Ozawa TO. Avaliação dos efeitos da queiloplastia e palatoplastia primária sobre o crescimento dos arcos dentários de crianças com fissura transforame incisivo unilateral aos 5-6 anos de idade. Araraquara, 2001. Ortodontia (tese), UNESP.

Ozawa TO, Santos AC, Costa GC, Silva Filho OG, Semb G, Sanchez JF. Baurú yardstick, a method to assess the dental arches relationship of children and adolescents with complete bilateral cleft lip and palate. *Rev Esp Ortodoncia.*2005;35:209-216.

Ozawa TO, Shaw WC, Katsaros C, Kuijpers-Jagtman AM, Hagberg C, Rønning E, et al. A new yardstick for rating dental arch relationship in patients with complete bilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011;48(2):167-72. doi:10.1597/09-122.

Ozawa TO, Dutka JCR, Garib D, Lauris RCMC, Almeida AM, Brosco TVS, et al. Influence of surgical technique and timing of primary repair on interarch relationship in UCLP: A randomized clinical trial. *Orthod Craniofac Res.* 2021;24(2):288-295. doi:10.1111/ocr.12435.

Ozawa TO, Calvo M, Lauris RCM, Sathler R, Almeida A, Cardoso G, et al. Longitudinal evaluation of the maxillomandibular relationship of individuals with complete unilateral cleft lip and palate (CUCLP). 14th International Cleft Congress, 2022, Scotland, UK.

Paixão-Côrtes VR, Braga T, Salzano FM, Mundstock K, Mundstock CA, Bortolini MC. PAX9 and MSX1 transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. *Arch Oral Biol.* 2011 ;56(4):337-44. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.10.020

Pan X, Wang P, Yin X, Liu X, Li D, Li X, et al. Association between Maternal MTHFR Polymorphisms and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in Offspring, A Meta-Analysis Based on 15 Case-Control Studies. *Int J Fertil Steril.* 2015 Jan-Mar;8(4):463-80. doi: 10.22074/ijfs.2015.4186.

Peltomaki T, Vendittelli BL, Grayson BH, Cutting CB, Brecht LE. Associations between severity of clefting and maxillary growth in patients with unilateral cleft lip and palate treated with infant orthopedics. *Cleft Palate Craniofac J.* 2001;38:582–586.

Peterson P, Mars M, Gowans A, Larson O, Neovius E, Henningsson G, Andlin-Sobocki A, Pegelow M, Lemberger M, Raud-Westberg LM, Karsten AL. Mean GOSLON Yardstick Scores After 3 Different Treatment Protocols-A Long-term Study of Patients With Unilateral Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2019;56(2):236-247. doi:10.1177/1055665618774010.

Pereira, RMR. Avaliação do crescimento facial em dois protocolos para cirurgias primárias em pacientes com fissura labiopalatina unilateral: ensaio clínico randomizado. São Paulo, 2016, clínica cirúrgica (tese). USP.

Pereira RMR, Siqueira N, Costa E, Vale DD, Alonso N. Unilateral Cleft Lip and Palate Surgical Protocols and Facial Growth Outcomes. *J Craniofac Surg*. 2018;29(6):1562-1568. doi:10.1097/SCS.00000000000004810.

Pruzansky S. The multidiscipline approach to the treatment of cleft palate in children; integration of multiprofessional resources through a program of basic research. *J Int Coll Surg*. 1955 Sep;24(3 Part 1):370-379.

Queiroz PM, Nascimento EHL, Santaella GM, Campos PSF, Haitar Neto F. Anomalias Dentárias e alterações adquiridas. In: Haitar Neto G, Kurita LM, Campos PSF, Organizadores. *Diagnóstico por imagem em odontologia*. São Paulo: editora Napoleão; 2019. p.352-89.

Raghavan R, Sidhu SS, Kharbanda OP. Craniofacial pattern of parents of children having cleft lip and/or cleft palate anomaly. *Angle Orthod*. 1994;64(2):137-44. doi:10.1043/0003-3219(1994)064<0137:CPOPOC>2.0.CO;2.

Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J*. 2012 Jan;49(1):73-91. doi: 10.1597/10-178.

Ranta R. Asymmetric tooth formation in the permanent dentition of cleft-affected children. An orthopantomographic study. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1973;7(1):59-63

Ranta R. Hypodontia and delayed development of the second premolars in cleft palate children. *Eur J Orthod*. 1983;5(2):145-8. doi: 10.1093/ejo/5.2.145. PMID: 6574920.

Ranta R. A review of tooth formation in children with cleft lip/palate. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1986;90(1):11-8.

Riis LC, Kjær I, Mølsted K. Dental anomalies in different cleft groups related to neural crest developmental fields contributes to the understanding of cleft aetiology. *J Plast Surg Hand Surg*. 2014;48(2):126-31. doi:10.3109/2000656X.2013.831767.

Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4512-7. doi:10.1073/pnas.0607956104.

Riley BM, Murray JC. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases. *Am J Med Genet A*. 2007a;143A(24):3228-34. doi:10.1002/ajmg.a.31965.

Rizell S, Bellardie H, Karsten A, Sæle P, Mooney J, Heliövaara A, et al. Scandcleft randomized trials of primary surgery for unilateral cleft lip and palate: dental anomalies in 8-year olds. *Eur J Orthod*. 2020;42(1):8-14. doi:10.1093/ejo/cjz070.

Rizell S, Küseler A, Heliövaara A, Skaare P, Brinck E, Bellardie H, et al. Scandcleft randomized trials of primary surgery for unilateral cleft lip and palate: impact of maxillary dental agenesis on craniofacial growth and dental arch relationship in 8 year olds. *Eur J Orthod*. 2021;43(4):381-386. doi:10.1093/ejo/cjab007.

Rohrich RJ, Rowsell AR, Johns DF, Drury MA, Grieg G, Watson DJ, et al. Timing of hard palatal closure: a critical long-term analysis. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98(2):236-46. doi:10.1097/00006534-199608000-00005.

Rohrich RJ, Love EJ, Byrd HS, Johns DF. Optimal timing of cleft palate closure. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(2):413-21. doi:10.1097/00006534-200008000-00026.

Rossell-Perry P, Cotrina-Rabanal O, Figallo-Hudtwalcker O, Gonzalez-Vereau A. Effect of Relaxing Incisions on the Maxillary Growth after Primary Unilateral Cleft Palate Repair in Mild and Moderate Cases: A Randomized Clinical Trial. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2017;5:e1201. doi:10.1097/GOX.0000000000001201.

Ross RB. Treatment Variables Affecting Facial Growth in Complete Unilateral Cleft Lip and Palate. Part 7: An Overview of Treatment and Facial Growth. *Cleft Palat J*. 1987;24(1):71-77

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.

Russell LM, Long RE Jr, Romberg E. The Effect of Cleft Size in Infants With Unilateral Cleft Lip and Palate on Mixed Dentition Dental Arch Relationship. *Cleft Palate Craniofac J*. 2015;52(5):605-13. doi:10.1597/13-325.

Sabóia TM, Reis MF, Martins ÂM, Romanos HF, Tannure PN, Granjeiro JM, Vieira AR, et al. DLX1 and MMP3 contribute to oral clefts with and without positive family history of cancer. *Arch Oral Biol*. 2015 Feb;60(2):223-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.10.002

Sampaio FC, Silva FD, Silva AC, Machado AT, de Araújo DA, de Sousa EM. Natural fluoride levels in the drinking water, water fluoridation and estimated risk of dental fluorosis in a tropical region of Brazil. *Oral Health Prev Dent*. 2010;8(1):71-5.

Saket M, Saliminejad K, Kamali K, Moghadam FA, Anvar NE, Khorram Khorshid HR. BMP2 and BMP4 variations and risk of non-syndromic cleft lip and palate. *Arch Oral Biol*. 2016 Dec;72:134-137. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.019.

Schliekelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J Hum Genet*. 2002;71(6):1369-85. doi 10.1086/344779.

Semb G. A study of facial growth in patients with unilateral cleft lip and palate treated by the Oslo CLP Team. *Cleft Palate Craniofac J*. 1991;28(1):1-21; discussion 46-8. doi:10.1597/1545-1569_1991_028_0001_asofgi_2.3.co_2.

Shaw WC. Problems of accuracy and reliability in cephalometric studies with implants in infants with cleft lip and palate. *Br J Orthod*. 1977;4(2):93-100. doi:10.1179/bjo.4.2.93.

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

Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A, et al. Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *Am J Hum Genet.* 2007 Jan;80(1):76-90. doi: 10.1086/510518.

Sinko K, Caacbay E, Jagsch R, Turhani D, Baumann A, Mars M. The GOSLON yardstick in patients with unilateral cleft lip and palate: review of a Vienna sample. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008;45(1):87-92. doi: 10.1597/06-118.1.

Smane L, Pilmane M, Akota I. Apoptosis and MMP-2, TIMP-2 expression in cleft lip and palate. *Stomatologija.* 2013;15(4):129-34.

Smane-Filipova L, Pilmane M, Akota I. MMPs and TIMPs expression in facial tissue of children with cleft lip and palate. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2016;160(4):538-542. doi:10.5507/bp.2016.055.

Sousa ET, Alves VF, Maia FBM, Nobre-Dos-Santos M, Forte FDS, Sampaio FC. Influence of Fluoridated Groundwater and 1,100 Ppm Fluoride Dentifrice on Biomarkers of Exposure to Fluoride. *Braz Dent J.* 2018;29(5):475-482. doi:10.1590/0103-6440201801959.

Susami T, Ogihara Y, Matsuzaki M, Sakiyama M, Takato T, Shaw WC, et al. Assessment of dental arch relationships in Japanese patients with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006;43(1):96-102. doi:10.1597/04-117r.1.

Sullivan ZC, Van Eeden S, May J, Flannigan N, Seshu M, Dominguez-Gonzalez S. Identifying associations between dental arch relationship scores, relative deprivation and other cleft audit outcomes. Part 2. *Orthod Craniofac Res.* 2022;25(1):103-111. doi:10.1111/ocr.12504.

Suzuki A, Mukai Y, Ohishi M, Miyanoshita Y, Tashiro H. Relationship between cleft severity and dentocraniofacial morphology in Japanese subjects with isolated cleft palate and complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 1993;30(2):175-81. doi:10.1597/1545-1569_1993_030_0175_rbc sad_2.3.co_2.

Sweat YY, Sweat M, Mansaray M, Cao H, Eliason S, Adeyemo WL, et al. Six2 regulates Pax9 expression, palatogenesis and craniofacial bone formation. *Dev Biol.* 2020;15;458(2):246-256. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.11.010.

Tannure PN, Oliveira CA, Maia LC, Vieira AR, Granjeiro JM, Costa Mde C. Prevalence of dental anomalies in nonsyndromic individuals with cleft lip and palate: a systematic review and meta-analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 2012;49(2):194-200. doi:10.1597/10-043.

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. doi: 10.1111/odi.13127.

Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 9):1647-8. doi:10.1242/jcs.00410.

Tortora C, Meazzini MC, Garattini G, Brusati R. Prevalence of abnormalities in dental structure, position, and eruption pattern in a population of unilateral and bilateral cleft lip and palate patients. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008;45(2):154-62. doi:10.1597/06-218.1.

Vaivads M, Akota I, Pilmane M. *PAX7*, *PAX9* and *RYK* Expression in Cleft Affected Tissue. *Medicina (Kaunas).* 2021;8;57(10):1075. doi: 10.3390/medicina57101075.

Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res.* 2003;82(3):162-5. doi: 10.1177/154405910308200303

Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res.* 2004;83(9):723-7. doi:10.1177/154405910408300913.

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;(6):e64. doi:10.1371/journal.pgen.0010064.

Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006;163(9):790-810. doi:10.1093/aje/kwj103.

Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(6):538-45. doi:10.1002/ajmg.a.31620.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genet Med.* 2008a;10(9):668-74 doi: 10.1097/gim.0b013e3181833793.

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A.* 2008b;146A(11):1406-13. doi:10.1002/ajmg.a.32295.

Vieira AR, Seymen F, Patir A, Menezes R. Evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and isolate tooth agenesis, in a Turkish population. *Arch Oral Biol.* 2008c;53(8):780-4. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.03.006.

Vieira AR. Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate. *Front Oral Biol.* 2012;16:19-31. doi:10.1159/000337521.

Vieira AR, D'Souza RN, Mues G, Deeley K, Hsin HY, Küchler EC, et al. Candidate gene studies in hypodontia suggest role for FGF3. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013;14(6):405-10. doi:10.1007/s40368-013-0010-2.

Weinberg SM, Maher BS, Marazita ML. Parental craniofacial morphology in cleft lip with or without cleft palate as determined by cephalometry: a meta-analysis. *Orthod Craniofac Res.* 2006;9(1):18-30. doi:10.1111/j.1601-6343.2006.00339.x.

Williams WN, Seagle MB, Pegoraro-Krook MI, Souza TV, Garla L, Silva ML, et al. Prospective clinical trial comparing outcome measures between Furlow and von Langenbeck Palatoplasties for UCLP. *Ann Plast Surg.* 2011;66(2):154-63. doi:10.1097/SAP.0b013e3181d60763.

Wlodarczyk JR, Brannon B, Munabi NCO, Wolfswinkel EM, Nagengast ES, Yao CA, et al. A Meta-Analysis of Palatal Repair Timing. *J Craniofac Surg.* 2021;32(2):647-651. doi:10.1097/SCS.00000000000007029.

Wong LS, Lu TC, Hang DTD, Chen PK. The Impact of Facial Growth in Unilateral Cleft Lip and Palate Treated With 2 Different Protocols. *Ann Plast Surg.* 2020;84(5):541-544. doi:10.1097/SAP.0000000000002232.

Wu TT, Ko EW, Chen PK, Huang CS. Craniofacial characteristics in unilateral complete cleft lip and palate patients with congenitally missing teeth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;144(3):381-90. doi:10.1016/j.ajodo.2013.04.019.

Ye B, Wu Y, Zhou Y, Jing H, Hu J, Zhang G. A comparative cephalometric study for adult operated cleft palate and unoperated cleft palate patients. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(7):1218-23. doi:10.1016/j.jcms.2015.04.015.

Yao CA, Vartanian ED, Nagengast E, McCullough M, Auslander A, Magee WP 3rd. The Smile Index: Part 3. A Simple, Prognostic Severity Scale for Unilateral Cleft Palate. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2021;9(10):e3870. doi:10.1097/GOX.0000000000003870.

Ye B, Wu Y, Zhou Y, Jing H, Hu J, Zhang G. A comparative cephalometric study for adult operated cleft palate and unoperated cleft palate patients. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(7):1218-23. doi:10.1016/j.jcms.2015.04.015.

Yin X, Zhang H, Zhu Z, Wang H, Du Y, Li S, Zhang Z, Fan W, Pan Y. FOXE1 polymorphisms and non-syndromic orofacial cleft susceptibility in a Chinese Han population. *Oral Dis.* 2016 May;22(4):274-9. doi: 10.1111/odi.12435.

Zeiger JS, Hetmanski JB, Beaty TH, VanderKolk CA, Wyszynski DF, Bailey-Wilson JE, et al. Evidence for linkage of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate to a

region on chromosome 2. Eur J Hum Genet. 2003 Nov;11(11):835-9. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201052.

Zhao M, Qiao M, Harris SE, Chen D, Oyajobi BO, Mundy GR. The zinc finger transcription factor Gli2 mediates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts in response to hedgehog signaling. Mol Cell Biol. 2006;26(16):6197-208. doi:10.1128/MCB.02214-05.

Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. N Engl J Med. 2004 Aug 19;351(8):769-80. doi: 10.1056/NEJMoa032909.

* 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*.

APÊNDICES

APÊNDICE 1- DESCRIÇÃO METODOLÓGICA DA PESQUISA

1. Design do Estudo

Foi realizado um estudo de coorte observacional realizado no serviço de fissuras labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba.

O estudo foi estabelecido em dois momentos, um primeiro, com seguimento mínimo de 4 anos, seguido de uma análise dos indivíduos na fase pré ortodôntica. As descrições metodológicas, por etapa serão descritas nos tópicos que seguem.

2. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley (parecer número 5410456), todos os participantes e responsáveis assinaram os termos de consentimento e assentimento.

3. Universo e amostra

O universo amostral foi composto por todos os indivíduos nascidos com fissuras labiais e palatinas cadastrados no serviço de fissuras labiopalatinas do hospital universitário Lauro Wanderley.

Foram incluídos na amostra os indivíduos com fissuras labiais ou fissura labiopalatinas unilateral ou bilateral não sindrômicas que tivessem sido operados por um único cirurgião (PGCF), pelas mesmas técnicas cirúrgicas (tabela 1), no período de 2003 a 2015.

Tabela apêndice1- protocolos cirúrgicos de cirurgias primárias adotados pelo serviço de fissuras labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley.

Fissuras labiopalatinas unilaterais

	Técnica cirúrgica	Idade ideal
Queiloplastia	Millard	3 a 6 meses
Palatoplastia	Von Langembeck	12 a 18 meses

Fissuras labiopalatinas bilaterais

Queiloplastia	Spina bilateral	3 a 6 meses (tempo único)
Palatoplastia	Von Langembeck	12 a 18 meses

Fissuras labiais unilaterais

Queiloplastia	Millard	3 a 6 meses
----------------------	---------	-------------

Fissuras labiais bilaterais

Queiloplastia	Spina bilateral	3 a 6 meses
----------------------	-----------------	-------------

Uma coorte inicial foi estabelecida com 537 indivíduos, dos quais dados de anamnese, fotos e coleta de DNA, foram realizados. Para a realização do estudo, foram então adotados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Idade mínima de 7 anos
- Não terem sido submetidos a nenhum tipo de tratamento cirúrgico em outro centro
- Não terem sido submetidos a enxerto ósseo alveolar
- Não terem sido submetidos a nenhum tipo de manobra ortopédica ou ortodôntica.

Critérios de exclusão:

- Fissuras labiais incompletas, sem comprometimento alveolar
- Não possuírem modelos de gesso ou não aceitarem a realização de moldagem ou escaneamento intraoral.
- Não possuírem imagens radiográficas panorâmicas e cefalométricas ou não aceitarem a realização de radiografias.

Dos critérios estabelecidos, inicialmente, 366 indivíduos foram incluídos na amostra, no entanto, por apenas 6 indivíduos apresentarem fissuras labiais bilaterais, esses casos foram excluídos devido à falta de poder estatístico para análise das variáveis neste tipo de fissura, ficando estabelecido um número amostral de 360 indivíduos. É válido ressaltar que os indivíduos da coorte inicial (537 indivíduos) que não apresentavam, no momento deste estudo, as idades adequadas seguem em acompanhamento para continuidade do estudo, conforme autorizado pelo comitê de ética, até o ano de 2024 (ANEXO 2).

O primeiro experimento realizado, teve o objetivo de analisar o comportamento do índice oclusal a longo prazo nos indivíduos dessa coorte da qual foram incluídos apenas aqueles com fissuras labiopalatinas unilaterais e bilaterais que pudessem ter seguimento de pelo menos 4 anos após a data dos modelos pré ortodônticos iniciais.

Os sujeitos da pesquisa que apresentavam exames complementares prévios nos arquivos do serviço de fissuras labiopalatinas, foram recrutados e avaliados aos resultados de relação oclusal por meio de modelos de gesso.

Foram incluídos 121 modelos pré ortodônticos (T1), 77 com fissuras labiopalatinas unilaterais e 44 com fissuras labiopalatinas bilaterais) e, dos mesmos indivíduos, modelos pós ortodontia, com intervalo mínimo de 4 anos (T2). Os modelos foram avaliados utilizando os scores do índice de GOSLON (para fissuras labiopalatinas unilaterais) e do índice Bilateral (para fissuras labiopalatinas bilaterais), cujas metodologias estão descritas no item relativo às variáveis desfecho, neste apêndice. Após a avaliação dos mesmos em T1 e T2, foram avaliadas as modificações de crescimento e analisadas por meio de estatística descritiva e inferencial, conforme descritos no artigo.

Após a realização da primeira análise, seguiu-se com o segundo momento, com o objetivo de avaliar os preditores do crescimento maxilo facial em indivíduos com fissuras labiais, fissuras labiopalatinas unilaterais e fissuras labiopalatinas bilaterais.

Foram avaliadas como variáveis desfecho (crescimento maxilo facial) índices oclusais e medidas cefalométricas, como variáveis preditoras, o polimorfismo genético nos genes *MMP2*, *GLI2*, *TGFa*, e *FGFR2*, a presença de anomalias dentárias e severidade da fissura e, como variáveis de confusão, para ajuste dos resultados, a idade da avaliação do exames pré-ortodônticos, idade de submissão das cirurgias, sexo e, para as fissuras unilaterais, a lateralidade da fissura.

4. Metodologia de análise das variáveis estudadas:

O número de indivíduos por variável analisada e a razão para ausência do número total de indivíduos em algumas das variáveis pode ser visualizada na tabela 2 deste apêndice.

Tabela apêndice 2- Descrição das variáveis analisadas, número de participantes por etapa e razão da ausência do número total de indivíduos.

VARIÁVEIS DESFECHO		
Variável	Número de participantes	Razão de ausência da amostra total
Análise Cefalométrica	360	-
Análise dos modelos de gesso (índice oclusal)	320	Os índices oclusais não se aplicam para fissuras labiais, por esta razão, os 40 indivíduos nascidos

		com fissuras labiais foram excluídos desta etapa
Etapa longitudinal (avaliação com intervalo mínimo de 4 anos – modelos de gesso)	121	Follow-up inferior a 4 anos foram excluídos
VARIÁVEIS PREDITORAS		
MMP2 rs9923304	181	Falha no PCR
GLI2 rs3738880	272	Falha no PCR
GLI2 rs2278741	239	Falha no PCR
TGFa rs2166975	250	Falha no PCR
FGFR2 rs11200014	120	Falha no PCR
FGFR2 rs10736303	240	Falha no PCR
Avaliação das anomalias dentárias (fotografias, radiografias panorâmicas e avaliação clínica)	360	-
Fotografias pré cirúrgicas	193	Excluídos dos casos de fissuras labiais e aqueles com fissuras labiopalatinas cujo posicionamento não estava adequado para a para análise.
Modelos pré cirúrgicos	80	ausência de modelos pré cirúrgicos prévios à queiloplastia ou cirurgias realizadas com mais de 8 meses de idade

VARIÁVEIS DESFECHO

O crescimento maxilo facial foi analisado por meio de índices oclusais em modelos de gesso e medidas cefalométricas em radiografias cefalométricas de perfil da face.

- **ÍNDICES OCLUSAIS**

Para análise dos índices oclusais foram utilizados o índice de GOSLON, para as fissuras labiopalatinas unilaterais e o índice Bilateral para as fissuras labiopalatinas bilaterais, a avaliação foi realizada por um único examinador. Foi realizada a repetição de medidas para cálculo da concordância intra-examinador com elevado índice de concordância.

Fissura Labiopalatina Unilateral

Para a análise da oclusão e do prognóstico do crescimento maxilar dos pacientes, foi utilizado o índice de GOSLON (Mars et al., 1987. Este índice é definido como índice de sistematização para avaliação quantitativa e qualitativa da morfologia da oclusão em pacientes com fissura labiopalatina unilateral, compreendendo uma escala de 1 a 5, com grau crescente de gravidade, considerando a relação anteroposterior, trespasse vertical e relação transversal dos arcos dentários, conforme tabela 3 deste apêndice. Figuras ilustrativas do índice de GOSLON estão demonstradas no capítulo revisão de literatura (Figura 1) e na figura 1 do artigo.

Tabela apêndice 3- Características oclusais- GOSLON.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS OCLUSAIS	PROGNÓSTICO A LONGO PRAZO
1	Trespasse horizontal positivo, com inclinação normal ou lingual dos incisivos superiores Ausência de mordidas cruzadas e mordidas abertas Morfologia da arcada superior satisfatória	Excelente
2	Trespasse horizontal positivo, com inclinação normal ou vestibular dos incisivos superiores' Mordida cruzada unilateral/ tendência à mordida cruzada; Tendência à mordida aberta adjacente à fissura	Bom
3	Relação de topo anterior com inclinação normal ou vestibular dos incisivos superiores, ou Trespasse horizontal negativo, com incisivos inclinados para lingual; Tendência à mordida aberta adjacente à fissura	Regular
4	Trespasse horizontal negativo, com inclinação normal ou para vestibular dos incisivos superiores. Tendência à mordida cruzada uni/bilateral Tendência à mordida aberta na área da fissura	Ruim
5	Trespasse horizontal negativo, com inclinação para vestibular dos incisivos superiores. Mordida cruzada bilateral Morfologia da arcada dentária superior muito alterada	Muito Ruim

Fissura Labiopalatina Bilateral:

Para a análise da oclusão e do prognóstico do crescimento maxilar dos pacientes com fissura labiopalatina bilateral, os modelos foram avaliados por meio do índice Bauru (Ozawa et al., 2005), desenvolvido no Hospital de Reabilitação de Anomalias Crânio Faciais/ USP- Bauru, denominado posteriormente, de índice bilateral, compreendendo uma escala de 1 a 5, com grau crescente de gravidade. De mesmo modo que o índice de GOSLON, o índice bilateral considera a relação anteroposterior, trespasse vertical e relação transversal dos arcos dentários. Este índice apresenta adequações para as idades de 6, 9 e 12. Figuras ilustrativas do índice bilateral encontram-se no capítulo revisão de literatura (Figuras 2,3 e 4) e na figura 2 do artigo.

• MEDIDAS CEFALOMÉTRICAS

Para avaliação das imagens radiográficas cefalométricas, foram obtidos desenhos anatômicos de todas as imagens dos indivíduos incluídos no estudo, em papel vegetal, em ambiente escuro por um examinador, com lapiseira grafite pentel, ponta 0,3. Para o desenho do cefalograma foram traçadas as seguintes estruturas anatômicas: sela túrcica, ossos próprios do nariz, porção basal do osso occipital, órbita, meato acústico externo, maxila com incisivos e molares, mandíbula com incisivos e molares e fissura pterigomaxilar e plano oclusal.

No cefalograma, foram marcados os pontos e a medição de grandezas cefalométricas relativas ao posicionamento da maxila em relação à base do crânio e relação maxilo mandibular foram realizadas. Duas medidas cefalométricas foram selecionadas para análise dos resultados de crescimento maxilo facial no presente estudo, as medidas Wits e Násio perpendicular ao ponto A.

A avaliação da concordância foi realizada com a repetição de medidas com intervalo de 2 meses e os testes de correlação intraclassa foi realizado para avaliação da concordância intra-examinador, com elevado índice de concordância.

A medida **Wits**, proposta por Jacobson em 1975 (Jacobson, 1975), avalia a relação maxilo mandibular, sem a interferência da base craniana, por meio da transferência do ponto B (localizado na porção mais profunda da curvatura anterior da mandíbula) e do ponto A (localizado na porção mais profunda da curvatura anterior da maxila), para o

plano oclusal (pontos BO e AO, respectivamente), a medida de Wits é definida pela distância entre os pontos AO e BO, sendo que medidas negativas significam que o ponto da mandíbula encontra-se a frente do ponto da maxila, portanto representando overjet negativo, a medida de referência para mulheres é de 0 e para os homens de até -1mm (esta medida está ilustrada na figura 6 do artigo).

A medida de **násio perpendicular ao ponto A**, proposta por Mc Namara Jr em 1984, foi a segunda medida selecionada para este estudo. Essa medida traz como informação a posição da maxila em relação a base craniana, a medida foi selecionada em função de evitar a interferência das alterações de angulação da base craniana, reportada em pacientes com fissuras labiopalatinas. A medida é definida como a distância entre o ponto A e uma linha que parte do ponto násio, perpendicular ao plano de Frankfurt, o valor de referência médio é de 1mm e, existem parâmetros sugeridos pelo autor para interpretação de acordo com sexo e idade, a considerou estas variáveis como variáveis de ajuste.

A medida de Násio perpendicular ao ponto A traz a mesma informação da medida de SNA, utilizada em outros estudos, o SNA não foi incluído na análise no presente estudo devido a um valor elevado de colinearidade e em função do SNA sofrer alteração da angulação da base craniana. A medida está ilustrada na figura 6 do artigo.

Ambas as medidas selecionadas, Wits e Násio perpendicular ao ponto A são medidas lineares, portanto, poderiam sofrer interferência da magnificação das imagens, a magnificação não foi considerada um viés visto que mais de 90% das imagens analisadas foram realizadas em uma mesma clínica, em um mesmo equipamento.

VARIÁVEIS PREDITORAS

Como variáveis preditoras, foram avaliados polimorfismos genéticos nos genes *MMP2*, *GLI2*, *TGFa* e *FGFR2*, frequência das anomalias dentárias e severidade da fissura.

• POLIMORFISMO GENÉTICO

Para análise do polimorfismo genético foram coletadas amostras de saliva dos participantes da pesquisa, as amostras foram codificadas e congeladas em freezer com temperatura de -20°. Previamente à extração do DNA, as amostras foram descongeladas e incubadas com 100ng/ml Proteinase K, em banho-maria à 56° C overnight e então submetidas a processos de precipitação, utilizando-se solução de acetato de amônio a 10 M e purificação com etanol/isopropanol, seguindo o protocolo de Deeley et al., 2016.

O DNA genômico foi extraído e os marcadores genéticos avaliados foram genotipados por reações de PCR.

Os polimorfismos foram selecionados com base em evidências anteriores de associação com variação nos fenótipos maxilo-mandibulares esqueléticos (Vieira et al. 2005; da Fontoura et al. 2015; Cruz et al. 2017; Marañón-Vásquez et al. 2019; Jiang et al. 2019). A frequência alélica de pelo menos 10% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) foi utilizada como critério para seleção dos SNPs. Os SNPs selecionados foram *MMP2* rs9923304, *TGFa* rs2166975, *GLI2* rs227874, *GLI2* rs3738880, *FGFR2* rs11200014 e *FGFR2* rs10736303. A frequência de alelos menores e a relação com fissuras orofaciais e posição maxilar dos SNPs selecionados estão resumidas na Tabela 1 do artigo.

A análise do polimorfismo considera os dois alelos e a combinação deles nos três genótipos (dois homozigotos e um heterozigoto, compostos pela combinação do alelo comum e alelo raro, podendo ser então, homozigoto comum, quando dois alelos comuns estão presentes, homozigoto raro, quando dois alelos raros estão presentes e heterozigoto, quando um alelo comum e um alelo raro estão presentes).

• ANOMALIAS DENTÁRIAS

A presença de anomalias dentárias foi avaliada por meio de exame clínico, na cadeira odontológica, fotografias intrabucais (frente, laterais esquerda e direita e oclusais superiores e inferiores) e de imagens radiográficas panorâmicas. As imagens fotográficas eram avaliadas na tela do computador, com o uso de ferramentas de zoom e, sempre que alguma divergência ocorria entre as fotos e o exame clínico, o indivíduo era novamente contactado para avaliação e definição do diagnóstico correto em relação

àquela anomalia. As radiografias panorâmicas também foram avaliadas digitalmente, com o uso das ferramentas de zoom quando necessário.

As anomalias dentárias de número, de tamanho, defeitos de estrutura do esmalte, de erupção/ topográficas e de forma foram avaliadas em todos os pacientes, a relação das anomalias analisadas está descrita na revisão de literatura (tabela 1) e ilustradas nas figuras 5 a 9 da revisão de literatura e figura 7 do artigo.

Para a avaliação de cada indivíduo, a lista de anomalias dentárias investigadas foi sistematicamente seguida, para evitar que alguma delas não fosse devidamente registrada. As anomalias dentárias foram então registradas e, as anomalias dentárias localizadas na área da fissura foram registradas separadamente.

Assim como para as outras variáveis, para avaliar a concordância intra examinador, as imagens foram selecionadas por meio do código do indivíduo, a lista do código de todos os participantes do estudo foi colocada no site randomization.com e definidos quais seriam reavaliados para este fim.

As anomalias dentárias foram testadas quanto à associação com as variáveis desfecho, que representam os resultados de tratamento, e, em relação aos polimorfismos genéticos selecionados para este estudo.

• SEVERIDADE DA FISSURA

A severidade da fissura foi avaliada por meio da análise de fotografias e modelos de gesso pré cirúrgicos. Seguindo metodologias encontradas na literatura, utilizadas para indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas unilaterais e fissuras labiopalatinas bilaterais.

As variáveis selecionadas para avaliação da severidade da fissura foram deformidade nasal, distância do defeito alveolar e distância transversal do defeito palatino.

Deformidade nasal

A análise da deformidade nasal foi realizada por diferentes metodologias para as fissuras labiopalatinas unilaterais e bilaterais. Considerando a impossibilidade de fotos com padronização de distância, as medidas escolhidas foram aquelas reportadas na literatura, como medidas de proporção e não medidas lineares absolutas. Em ambas

as metodologias, as medições de proporção foram realizadas utilizando o programa Image J e repetidas com intervalo de 2 semanas para testar a reprodutibilidade.

Para as fissuras labiopalatinas unilaterais foi utilizado o método proposto por Fisher (Fisher et al., 2008) denominado proporção da largura da narina. Neste método a largura da narina do lado afetado é medida e dividida pela largura da narina do lado não afetado, a proporção é então definida, números maiores indicam defeitos mais graves (a figura 8 do artigo, ilustra a medida realizada no programa image J).

Para as fissuras labiopalatinas bilaterais, utilizamos a metodologia descrita por Chang em 2014, que considera a proporção entre a altura nasal e a largura nasal, valores menores indicam maior complexidade, quando a altura nasal é pequena em relação à largura. A figura 9 do artigo é ilustrativa desta medida. Para esta medida, muitas das fotos foram excluídas, pela dificuldade de avaliação da altura nasal e, algumas das fotos de perfil foram acessadas para esclarecimento de dúvidas. Para a avaliação da severidade da fissura, a angulação e implantação da cartilagem nasal ou mesmo parâmetros de qualidade e espessura muscular dos músculos envolvidos na fissura não foram avaliados.

Largura do defeito alveolar

A largura inicial do defeito alveolar, foi medida por meio de paquímetro digital, por um único examinador de acordo com a descrição abaixo:

Nos casos de fissuras labiopalatinas unilaterais, conforme descrito por Pereira em 2016. Corresponde à distância entre o ponto G, localizado na extremidade anterior da crista alveolar do segmento maior do arco e, o ponto L, localizado na extremidade anterior da crista alveolar do segmento menor do arco, (variável quantitativa, expressa em milímetros), figura ilustrativa no artigo desta tese, figura 10).

Nos casos de fissuras labiopalatinas bilaterais, foi realizada uma adaptação da análise descrita para unilaterais, sendo medida de ambos os lados e considerada para a análise a medida de maior distância, ilustrada na figura 10 do artigo

Largura do defeito palatino

A largura do defeito palatino foi avaliada nos mesmos modelos pré cirúrgicos nos quais foram realizadas as medidas alveolares, para ambos os tipos de fissuras (labiopalatinas unilaterais e bilaterais), utilizou-se a metodologia descrita por Pereira

em 2016. Corresponde à distância entre os pontos A e A', localizados em ambos os lados nas extremidades dos rebordos do palato mole, na altura de T e T' (intertuberosidade), a figura 10 do artigo ilustra esta medição.

VARIÁVEIS DE CONFUSÃO

Diante da natureza do estudo, as variáveis idade da submissão das cirurgias, a idade dos exames pré ortodônticos (modelos e radiografias), bem como o sexo e a lateralidade da fissura foram tratados como variáveis de confusão, ajustando os resultados das análises estatísticas empregadas.

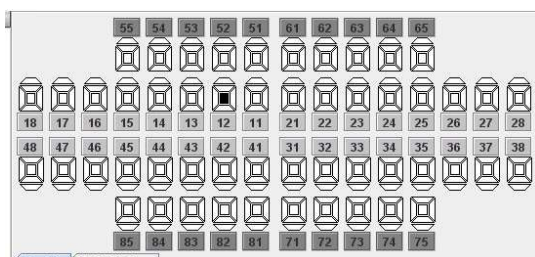
APÊNDICE 2-FORMULÁRIO DADOS DO EXAME DE CAVIDADE ORAL E EXAME ODONTOLÓGICO

CÓDIGO-

Tipo Fissura: ()

Observação- _____

- Comprometimento alveolar- () direito () esquerdo
- fase de desenvolvimento dentário: _____
- extensão da fissura: largura anterior _____ mm largura posterior _____ mm



fonte google

Deverá ser marcado no odontograma a área da fissura e as regiões que apresentem

() defeitos de esmalte (hipoplasia, opacidades) fora da área da fissura () sim () não –(descrever quais e em quais dentes:

() anomalias de forma dental _____ fora da área da fissura () sim () não –(descrever quais e em quais dentes:

() hipodontia _____ fora da área da fissura () sim () não (descrever quais e em quais dentes

() Dentes supranumerários _____ fora da área da fissura () sim () não (descrever quais e em quais dentes:

() Anomalias irruptivas _____ fora da área da fissura () sim () não (descrever quais e quais os dentes afetados)

• Más oclusões

Transversal: () mordida cruzada unilateral () mordida cruzada bilateral () mordida cruzada reversa

Sagital: () classe I () classe II () classe III

Vertical: () mord aberta ant () Mord aberta post () mord aberta área da fissura

Más posições dentárias individuais: _____

- **Classificação do índice oclusal** - ()FYOI () GOSLON () Bilateral

() 1 () 2 () 3 () 4 () 5

]

APÊNDICE 3- ANÁLISE DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS PANORÂMICAS

CÓDIGO- idade-

CÓDIGO-idade-

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PANORÂMICA

() Anomalias de forma dental _____ fora da área da fissura () sim () não

Descrever quais e em quais dentes

() Hipodontia _____ fora da área da fissura () sim () não

Descrever quais e em quais dentes

() Dentes supranumerários _____ fora da área da fissura () sim () não

Descrever quais e em quais dentes

() Anomalias de erupção ou topografia_____ fora da área da fissura
() sim () não

Descrever quais e em quais dentes

() transposição dentária _____ fora da área da fissura () sim () não

Descrever quais e em quais dentes

APÊNDICE 4- ANÁLISE CEFALOMÉTRICA
CÓDIGO

Grandeza	Norma clínica	Desvio clínico
S-N	71 mm	
SNA	82°	2
SNB	80°	2
ANB	2°	2
A-N.perp	1mm	---
P-N.perp	-4/+2mm	---
Co-A	---	---
Co-Gn	---	---
ENA-Me	---	---
Convexidade do ponto A	2,0 mm	---
N-ENA:ENA-Me	1:1	---
Ângulo Goniaco (Ar.Goc.Me)	130°	7
S-N: Go-Me	1:1	---
Projeção nasal	16-20mm	--
Sn perp-LS	2-4mm	--
Sn perp- LI	0-2mm	--
Sn perp- pog	0/ -4mm	--

CONCLUSÕES CEFALOMÉTRICAS:
CVM:
idade:

	BEM POSICIONADA	RETROGNATA	PROGNATA
Posicionamento maxilar			
Posicionamento mandibular			
Relação maxilo-mandibular			

APÊNDICE 5- RESPOSTA A BANCA DE QUALIFICAÇÃO

1- Respostas à arguição da professora Dra Daniela Tanikawa (membro externo da PPGO):

- O título deve expressar com exatidão aquilo que foi realizado no estudo.

O estudo analisou anomalias dentárias e alterações genéticas como possíveis preditores. Assim sendo, sugiro: “Possíveis preditores intrínsecos do crescimento maxilo facial em pacientes portadores de fissuras labiopalatinas”; “Análise de possíveis preditores intrínsecos para o crescimento maxilo facial de pacientes portadores de fissuras labiopalatinas”; “Anomalias dentárias e polimorfismos genéticos como preditores intrínsecos do crescimento maxilo facial em pacientes portadores de fissuras labiopalatinas”:

O título foi modificado, conforme sugestão para:

“Anomalias dentárias e polimorfismos genéticos como preditores do crescimento maxilo facial em indivíduos nascidos com fissuras labiopalatinas”.

- Pág. 6, houve financiamento CAPES? Se sim, descrever financiamento recebido:
Houve financiamento com recurso do PROAP, para deslocamento para pesquisa de campo, a informação foi acrescentada em página após os agradecimentos, com o código fornecido pela CAPES, conforme sugestão.
- No Resumo: sugiro ser mais objetiva, e modificar a escrita na parte introdução para: “Introdução: O efeito iatrogênico do tratamento cirúrgico sobre o padrão de crescimento ósseo facial em pacientes portadores de FLP é bem estabelecido na literatura. Diversos estudos longitudinais evidenciaram que experiência do cirurgião mais do que protocolo cirúrgico em si permanece como o único preditor de bons resultados ao longo do tempo. No entanto, mesmo para estes cirurgões experientes, existem também resultados desfavoráveis. Por isso, a busca por fatores preditores intrínsecos. Neste estudo realizou-se a análise do polimorfismo genético e da frequência de anomalias dentárias.”
A parte introdutória do resumo foi alterada, seguindo a linha de pensamento sugerida.
- Sugiro no resumo o Método: Estudo de coorte:
Por tratar-se do resumo do trabalho da tese, e não do artigo, optamos pela manutenção de maiores detalhes que são solicitados pelo repositório de teses onde ela ficará indexada.
- Trocar nomenclatura FL+P por pré ou trans uni ou bi:
A classificação sugerida, apesar de muito utilizada no Brasil, não é amplamente utilizada internacionalmente, por esta razão, para mantermos o padrão utilizado no artigo produzido como parte principal da tese, não realizamos a modificação sugerida.
- Incluir com idade entre _ e _ anos:
A idade e mais detalhes da amostra foi incluída no resumo
- Análise das variáveis genéticas, modelos, fotos não é homogênea para toda a amostra. Redefinir isso.
As análises foram realizadas nos mesmos indivíduos, de uma mesma amostra, de acordo com a disponibilidade dos dados, conforme descrito

no artigo, para tratar desta diferença de números de indivíduos por variável, foram utilizadas análises estatísticas multivariadas e de regressão logística e linear.

Quanto à falta de homogeneidade das fotos, de fato é uma limitação do estudo, e o uso de metodologias que utilizassem análise de proporção e não comparação de medidas exatas foi a estratégia utilizada para tratar deste viés, no entanto, consideramos legítima a cautela na interpretação dos resultados encontrados (não correlação entre a severidade da fissura e os resultados de crescimento) e esta informação encontra-se descrita.

- Desfecho primário: avaliar frequência de anomalias dentárias e os polimorfismos MMP2, GLI2, TGFa, FGFR2 como preditores intrínsecos do crescimento maxilo facial em pacientes portadores de fissura transforame uni e bilateral, e pré-forame unilateral. Desfecho secundário: tamanho inicial da fissura labial (a ser revisto), idade na realização das cirurgias primárias.

Foi incluída a informação de que o tamanho inicial da fissura foi investigado como desfecho secundário. Em relação à solicitação de revisão dela, retomamos a resposta do questionamento anterior acerca da metodologia utilizada e da cautela na interpretação dos resultados encontrados.

- Estatística: remover do resumo:
Nosso entendimento é de que é boa prática descrever a análise estatística realizada na pesquisa, no resumo.
- Resultados e conclusões do resumo: ajustar para a nomenclatura pré e transforame.
Mantemos o posicionamento mencionado anteriormente e optamos por manter o padrão de classificação adotado.
- No sumário: Deve ser organizado, sugestão para incluir os subitens, deve ser em português. No HC: manual com 90 páginas, rigor na formatação, seguindo a ordem
1. Introdução; 2. Objetivos; 3. Revisão da Literatura 4. Método 5. Resultados 6. Discussão, 7. Conclusão 8. Referências, 9. Apêndices, 10. Anexos.

Assim como a professora menciona a organização do sumário de acordo com as normas do HC (manual de 90 páginas), o Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, também possui normas que regulamentam o formato e apresentação dos trabalhos de tese. O trabalho hora apresentado segue a organização e determinação da resolução 01/2022, estabelecida por este programa, não sendo viável, nem razoável a sugestão de seguir normas de outra instituição. Para esclarecimentos, incluí nos anexos norma determinada pela resolução 01/2022.

- **NA INTRODUÇÃO :**
- 2º parágrafo: O objetivo do tratamento baseia-se no equilíbrio entre boa estética facial, fala inteligível, ausência de comprometimento auditivos, oclusão dentária normal, bem-estar psicossocial e crescimento craniofacial adequado (sugestão mudar considerando ordem cronológica do tratamento; crescimento é importante,

mas não é o fator central, mencionar que mesmo em centros de excelência existem resultados desfavoráveis de crescimento facial):

A sequência foi ajustada de acordo com a sugestão de cronologia de tratamento, bem como a menção sugerida acerca de resultados desfavoráveis em centros considerados como de excelência.

- 3º parágrafo: Mencionar os estudos longitudinais realizados, mencionar que experiência do cirurgião permanece como único fator prognóstico de bom resultado a longo prazo. Descrever a não correlação com protocolos e cronograma de tratamento cirúrgico.

Foram mencionados os estudos e os resultados que trazem o peso do papel do cirurgião.

- Sequência pág. 2 descrevendo aspectos genéticos está excelente!

Mantido

- Pág.3: Severidade da fissura: eu tiraria (descrito adiante):

Não achamos pertinente remover o dado analisado. Explicamos os detalhes em respostas anteriores, ressaltando que a avaliação da severidade da fissura, além da metodologia fotográfica, foi realizada em modelos de gesso, com paquímetro digital e com resultados consistentes de reprodutibilidade, nos modelos pré cirúrgicos. Mas uma vez ressaltamos que deixamos claras as limitações e cautela em relação à interpretação destes dados.

- Mudar a última frase: “a idéia foi” este estudo teve como objetivo avaliar:

A frase foi reformulada.

- Revisão de literatura e objetivos: Tanto faz a ordem. Mas é minha preferência pessoal uma introdução objetiva que demonstre a importância do estudo, seguida por objetivos que dão ideia de método, e então a revisão da literatura, esmiuçando as diferentes facetas da tese.

A ordem foi seguida de acordo com a resolução 01/2022 do programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba.

- Revisão da literatura deve ser extensa, para o avaliador leigo deve introduzir todos os conceitos envolvidos no estudo. Por isso em revisão de literatura eu consideraria:

Fissuras lábio palatinas

Crescimento facial em pacientes com FLP:

Fatores extrínsecos e crescimento facial em pacientes com FLP:

custos e reabilitação, SUS, citar índices de diferentes centros: americanos, escandinavos, no Brasil etc., descrever um a um dos estudos longitudinais, com resultados

Fatores intrínsecos: por quê? o que já foi feito, descrever com resultados, está muito sucinto.

A revisão de literatura foi ampliada seguindo alguns dos pontos sugeridos

- Índice de Bauru: considerar “Bilateral Yardstick” como é citado na literatura, referência na pág. 5

Ambas as denominações podem ser utilizadas, e ambas são citadas na literatura, no entanto, acatamos a sugestão, modificando a denominação por ser uma terminologia mais clara.

- Aumentar tamanho, devem ser nítidas:
As imagens foram aumentadas para melhorar a nitidez
- Pág 9, 2º parágrafo: “deve-se considerar a presença de anomalias fora da área da fissura”. Pergunta: dentro da área da fissura não está relacionada ao tamanho do segmento menor? Isso não pode ser preditor?

A anomalia dentária dentro da área da fissura está relacionada a própria ruptura e deslocamento dos germes dentários ou agenesias, a investigação das anomalias dentro desta área poderia gerar um viés de hiper dimensão da quantidade de anomalias interpretação equivocada dos mecanismos que poderiam melhorar ou piorar o prognóstico de crescimento maxilar. Esta explicação encontra-se no segundo parágrafo da página 16.

- 4º parágrafo: incidência de anomalias dentárias em FLP é 3-4x maior, correlacionou-se isso com tamanho do segmento menor?
O tamanho do segmento menor não foi analisado.
- Referência do Scandcleft (correlação + com agenesia de 2 dentes maxilares). Pág. 10: descrever os estudos, N, tipo de paciente, protocolo.

Os estudos foram descritos em mais detalhes na revisão de literatura

- Gravidade inicial da fissura: descrever melhor os estudos realizados e seus resultados

Os estudos foram descritos em mais detalhes na revisão de literatura

- Objetivos devem ser claros. Considerar dividi-los em primários e secundários
Sugestão: primário: Avaliar a frequência de anomalias dentárias e polimorfismo genético como possíveis preditores intrínsecos do crescimento maxilo facial em FLP (considerar retirar tamanho inicial da FLP, rever amostra mais adiante); Secundários: Avaliar a correlação entre idade nas cirurgias primárias de queiloplastia e palatoplastia com o padrão de crescimento facial.
Pela norma da instituição os objetivos devem ser descritos como geral e específicos, as amostras foram descritas em mais detalhes por meio de uma tabela., de qualquer modo, modificamos a descrição dos objetivos.
- Método: Foi apresentado como artigo em inglês, está incorreto. O artigo publicado pode ser apresentado com anexo ou apêndice.

A afirmação da professora de que está incorreto apresentar o artigo em inglês está equivocada, conforme a resolução 01/2022, já citada, que normatiza os trabalhos de defesa de tese, após a introdução e objetivos, deve ser apresentado o artigo na língua e formato da revista a qual se pretende submeter, não sendo permitido que o artigo seja apresentado como apêndice. Para esclarecer qualquer possível dúvida, escrevemos a metodologia em português e incluímos como um apêndice, já que o capítulo metodologia, fora

do artigo, não pode ser acrescentado em outro ponto do documento. Incluimos também o modelo definido na resolução como anexo.

- Desenho do estudo: Estudo de coorte retrospectivo, envolvendo pacientes portadores de FLP, com idade entre _ e _, tratados no Hospital Lauro Wanderley, no período de _ e _, por um mesmo cirurgião, através do mesmo protocolo cirúrgico.

As informações estão no artigo e na metodologia em português, acrescentamos uma tabela sobre os protocolos

- Se período é muito amplo: experiência do cirurgião ao longo dos anos pode ser viés, ele pode ter melhorado ao longo do tempo do mesmo modo que incluído pequenas modificações em técnicas operatórias.

Este viés pode ter sido reduzido pelo fato de que os casos mais antigos incluídos, o cirurgião já tinha mais de 20 anos de experiência na época.

- Idade dentição decídua e permanente, influência nos índices oclusais
A dentição decídua não foi incluída, mas incluimos dentadura mista e permanente, a idade na época do exame foi incluída como variável de ajuste ou co variável, na estatística, para eliminar esse viés
- Protocolo cirúrgico: deve ser apresentado como Quadro, incluindo cronograma e técnica utilizada.

O quadro foi incluído

- Considerações éticas: citar que Aprovação local do CEP está apresentada como anexo

O número da aprovação encontra-se na metodologia do artigo e na metodologia em português, além da cópia como anexo dos pareceres.

- Amostra: achei bastante confuso a descrição da amostra

Foi incluído um quadro na metodologia, a fim de deixar mais claro

- São 537 pacientes, “nascidos com fissura isolada de lábio e ou palato?”
A Coorte a que nos referimos é um grupo de indivíduos que seguimos desde o nascimento, e estamos acompanhando todas as variáveis citadas no estudo, bem como realizamos a coleta de DNA. No presente estudo, das 537, 366 enquadravam-se nos critérios de inclusão, que teriam que apresentar, fissuras labiais completas, fissuras labiopalatinas e ter idade mínima de 7 anos de idade. Os demais, serão avaliados quando completarem as idades adequadas para cada variável, dando sequência ao coorte que daremos seguimento. Os casos de fissura labial bilateral, completa, com idade adequada, eram apenas 6 e foram excluídos da amostra porque não teríamos poder estatístico para qualquer conclusão neste tipo de fissura. As figuras sobre desenho do estudo, tentaram esclarecer, mas foi incluído também na metodologia em português esta explicação.

- Trocar por pré- e trans-, uni e bilateral:

Explicamos anteriormente a razão de não termos selecionado esta classificação

- Especificar possíveis critérios de inclusão: fissuras incompletas, pré e pós, houve restrição quanto à idade da cirurgia? Por exemplo queilo entre 3m e 1

ano, palato entre 1 e 3 anos? Queilo com 5 anos por exemplo entrou? Não está claro.

As fissuras incluídas foram fissuras completas, a idade da cirurgia não foi um critério restritivo, porque gostaríamos de analisar também o impacto dela, apesar de não termos verificado a diferença na frequência dos resultados quando operados mais tardiamente, esta variável foi tratada como variável de confundimento ou covariável em todas as análises estatísticas.

- “Na 1ª parte do estudo, pacientes entre 7-14 anos, com fissura trans, cujas cirurgias primárias foram realizadas no centro de tratamento foram avaliados.”: Dúvidas: A amostra não inclui só pacientes tratados por vocês?

Todos os pacientes, tinham as documentações iniciais entre 7 a 14 anos de idade, os casos da primeira parte, deveriam ter o seguimento de pelo menos 4 anos com imagens radiográficas. Aqueles com seguimentos menores, foram excluídos desta fase, e por esta razão, 121 estão na primeira etapa.

Apenas os pacientes operados pelo mesmo cirurgião e operados pela mesma técnica cirúrgica foram incluídos.

- Crescimento: toda a amostra não foi avaliada da mesma forma, na mesma faixa etária?

Nas idades entre 7 e 14, apesar da média de idade ser a mesma, a idade foi tratada como uma variável de ajuste ou covariável de todos os resultados encontrados nas análises estatísticas. Deixamos mais claro no artigo e na metodologia em português quais foram as variáveis de confusão.

- De 537 ficou 121 com fissura trans, é isso?

Na primeira etapa do estudo todas as fissuras eram fissuras completas de lábio e palato e foram avaliadas separadamente as unilaterais, das bilaterais

- Pág. 24: retirar gráficos com resultados, essa sessão deve se restringir a método

“Baseado nos resultados de crescimento, um segundo estudo foi realizado para avaliar preditores”

Optamos por manter na figura para deixarmos mais claro o entendimento do desenho do estudo, no entanto a descrição do resultado está no capítulo “resultados” do artigo.

- Pág. 25: fenda labial isolada com ou sem fenda de palato: confuso a nomenclatura, retirar isolado

360 de 537? Foi modificado para não sindrômicas, 360 de 537 seguiram os critérios de inclusão e exclusão já mencionados

- Para esses: índice oclusal, Cefalometria, variáveis genéticas, anomalias dentárias, idade nas cirurgias e gravidade da deformidade. Para os outros não foi feito a mesma coisa? Se não precisa alterar, a descrição dá a entender que todos os 537 receberam o mesmo estudo.

Foi incluído um quadro que descreve para cada variável o número de indivíduos (na metodologia em inglês incluída como apêndice)

- Avaliação de resultados:

Subdividir em:

1) Índice Oclusal:

320 de 360 tem FLP, em que idade foi feita avaliação de Goslon?

Quantos uni e quantos bi?

40 de 360 com fissura labial isolada foram excluídos

Não seria melhor então colocar como inclusão somente os com fissura transforame uni ou bilateral?

Foram 320 então e não 537?

2) efalometria:

3) Estudo genético

4) Anomalias dentárias: 320 foram submetidos à esta análise?

Os resultados estão subdivididos por variáveis, as variáveis de desfecho, independentes e de confusão, foram mais claramente evidenciadas, o número de indivíduos por análise e foi inserido em uma tabela na metodologia em português (apêndice 1)

5) Gravidade da deformidade

a. Deformidade nasal: eu tiraria

i. Faixa etária fotos 3m a 24m, muito ampla

ii. 193 pacientes (126 FTU, 67 FTB)

Foi realizada análise estatística com a idade da moldagem pré cirúrgica como covariável

iii. Pág 22: experimento 1 com 121 pacientes transforame

Optamos por não retirar o experimento deste artigo, devido a importância de evidenciarmos se o índice inicial se manteria, ou quantos poderiam modificar de cirúrgico para não cirúrgico e vice-versa, na amostra estudada, da nossa região. A modificação, caso tivesse ocorrido, poderia ser um fator de confusão, especialmente porque o trabalho busca mecanismos biológicos e não descrição de resultados. Por esta razão, mantivemos as variáveis, considerando a importância das mesmas como fatores de confusão, que precisavam ser claros e controlados.

b. Defeito alveolar, defeito palatal: eu tiraria também

i. Idade dos modelos: 3m-24m? se sim, muito ampla, distância em mm não diz muito

ii. 80 modelos (40 FTU, 40 FTB)

iii. 80 de 320, 80 de 537, é pouco

iv. Método deve representar totalidade ou quase totalidade da amostra, assim enfraquece seu estudo.

As medidas em milímetro foram realizadas e ajustadas de acordo com a idade, conforme descrito acima, de fato, achamos que medidas de proporção poderiam ser mais adequadas, no entanto, julgamos mais adequado não eliminá-las, mas colocamos esta informação como limitação do estudo e sugerimos cautela na interpretação deste dado.

Em relação as diferenças dos tamanhos amostrais em relação às variáveis estudadas, em estudos desta natureza, os métodos estatísticos permitem e validam a análise desta forma, como utilizados no presente estudo, como análises de regressão, análises multivariadas e cálculo de risco., lembrando que todas as análises utilizaram as variáveis de confusão como análises de ajuste.

- c. Idade: pág 32, se mencionou antes não precisa repetir que foi mesmo cirurgião,
Retirada a informação
- d. mas precisa especificar faixa etária em estudo, ou é aberta sem restrição?
Esta variável foi tratada como variável de confusão, e portanto, sem restrição
Técnica: Spina em tempo único sempre?
Em todos os casos incluídos
Mesmo nas pré-maxilas projetadas?
Sim, todas em tempo único
- Resultados:

- Variabilidade intra-avaliador: no fim dos resultados, não é seu objetivo primário- **foi incluída na metodologia e retirada dos resultados**
- Avaliação longitudinal: 121 transforame, avaliados com 10 e 15 anos
Eu removeria essa subdivisão da amostra: e juntaria a avaliação de 10 anos com a dos outros 320 com fissura transforame:
Fazem parte da mesma amostra, dos 121 da etapa longitudinal, tem seu exame inicial (pré ortodôntico) dentro dos 320 incluídos.
- Removeria também os com fissura labial isolada, isso só deixa sua amostra quebrada.
É importante a descrição dos dados de fissuras labiopalatinas unilaterais, o objetivo da investigação traz um contexto de investigação de mecanismos biológicos, por esta razão identificar diferenças entre fissuras labiais e fissuras labiopalatinas, é um dado importante.
- Na segunda parte do estudo vc incluiu 360, não eram 320 que foram avaliados?
320 com fissuras labiopalatinas (unilaterais e bilaterais) 40 indivíduos com fissura labial unilateral (descrito na figura de design do estudo e ao longo do texto), foi incluído também na descrição da metodologia em português.
- Se correlação com idade de cirurgia é seu objetivo secundário, além das tabelas gerais da pág 37, tem que incluir a distribuição dos índices oclusais para FTU e FTB, por faixa de idade das primárias e a frequência de pacientes em cada faixa.
A idade de submissão às cirurgias foi tratada como variável de confusão e foi analisada como variável contínua. Não foi analisada como objetivo secundário, embora tenhamos realizado análises estatísticas nas quais nenhuma associação tenha sido encontrada com os resultados encontrados e a idade de submissão dos procedimentos cirúrgicos, tratar as mesmas como variáveis nominais poderia prejudicar a análise como fator de confusão. De qualquer modo, foi incluída uma tabela da análise descritiva da idade de submissão das cirurgias, por índices oclusais.

- Tabela 2: incluir % também nas anomalias dentárias, descrever concomitância de anomalias.

A tabela descritiva de frequência das anomalias dentárias mediana por indivíduo, bem como o mínimo e máximo encontra-se no artigo (tabelas 19 e 20), foi realizado também o cálculo das razões de chance (página 74) de modo que inserimos o número de anomalias que poderia indicar o aumento do risco, o que está descrito nos resultados do artigo, bem como nas conclusões.

- Polimorfismo genético:

Descrever de maneira mais simplificada

Pág 42, por exemplo, o que significa CC, CT, TT? Pág 42 a 57

Tabelas são complexas, fazer a leitura descritiva desses resultados e seu significado de maneira simples-

Inserimos em cada uma das tabelas, uma nota descrevendo os alelos raros e comuns, também descrito na metodologia em português.

- Gravidade da deformidade

Eu tiraria

Está descrito somente as medidas lineares dos modelos, a idade dos modelos varia de 3 a 24 meses, crescimento e idade podem ser viés.

Além disso, são 80 de 320.

Já explicado nas respostas dos itens anteriores

E não está descrito as medidas de relação de abertura narinária e altura/largura narina descrita em métodos.

A descrição foi mais bem detalhada nos métodos, a figura mostra a ilustração de como foi feita no programa image J

Se for incluir deve colocar tabela com resultados, principalmente no bilateral se padronização foto não for 100% fiel, isso é viés, eu tiraria

Foi incluída tabela no artigo (tabela 21)

Se tem modelo e foto, poderia correlacionar tamanho modelo com classificação da relação narinária.

Incluimos o teste de correlação, resultados, na página 75

- idade na cirurgia

Tem que apresentar distribuição das idades dos 320 pacientes da amostra por uma faixa pré-estabelecida ou plotagem

E a distribuição dos scores oclusais e cefalométricos divididos por tipo de fenda uni ou bi e faixa etária

Tabelas incluídas (tabelas 8 e 9)

- Discussão
- deve cotejar tudo o que identificou no seu estudo com o que existe na literatura.
- **Foram incluídos os estudos que julgamos pertinentes à temática central do trabalho**

- Posicionar porque seu estudo é importante.
- 1º parágrafo: 1 estudo não é muito conclusivo, já é bem estabelecido que índices de 8 anos tem alta correlação com a maturidade esquelética (isso é um adendo). Seu estudo queria avaliar crescimento e preditores intrínsecos.
A importância da etapa inicial do estudo foi mais bem esclarecida nos primeiros parágrafos
- É melhor colocar 320 transforame, que passaram por toda a análise de maneira homogênea, do que incluir tantos subgrupos, fica confuso.
Achamos pertinente deixarmos os casos de fissuras labiais porque julgamos importante que fique claro o comportamento diferente dos casos de fissura labial em relação aos casos de fissura labiopalatinas unilateral.

2- Respostas à arguição da Professora Dra. Terumi Okada Ozawa:

- Por quê da escolha da medida de Násio-perpendicular ao ponto A, ao invés da medida de SNA, considerando que uma medida linear pode ter mais impacto em relação às diferentes radiografias.

A medida de SNA não foi escolhida em função da literatura ter mostrado a frequência de inclinação da base craniana em indivíduos com fissuras labiopalatinas unilaterais, evitamos de incluir as duas, em função da colinearidade das medidas, que trazem informações semelhantes. A seleção de uma medida linear foi possível porque todos os indivíduos eram documentados no mesmo centro de documentação e tivemos acesso às magnificações do cefalostato, a maioria dos indivíduos incluídos foram radiografados em um mesmo equipamento. O nasion-perpendicular ao ponto A, nos permitiria também, caso fosse necessário, a avaliação de acordo com a idade pelas tabelas propostas pelo autor, embora tenhamos usado a idade como fator de correção nas análises estatísticas.

- Sugiro que o seu artigo seja dividido em partes, considerando a parte longitudinal, anomalias dentárias, variação genética e severidade da fissura.

A ideia de mantê-los juntos foi mantida sob a ótica de termos uma publicação mais robusta.

3- Respostas à arguição do Professor Dr. Ricardo Dias de Castro:

- No resumo fatores intrínsecos como termo genérico no resumo:

Foi eliminado o termo genérico e descritos os termos variação genéticos e frequência de anomalias dentárias.

- Correção no texto do resumo: existe redundância em se colocar $p < 0.05$ e intervalo de confiança de 95%-

Realizada a remoção $p < 0.05$.

- Nos resultados do resumo: Pior ou melhor resultado? Quando você fala dos polimorfismos, apresenta essa situação
Foi incluída a informação de que piores resultados com maior frequência de anomalias dentárias.
- Na conclusão do resumo, colocar na mesma sequência proposta no objetivo e metodologia.

Foi alterada a sequência para que fiquem na mesma ordem.

- Na introdução, sugestão de unir os parágrafos 8 e 9:

Realizada a união e parágrafos e ajuste para evitar repetição de informações

- Na revisão de literatura, colocar por extenso BMP2

Inserido.

- Revisão de literatura, no último parágrafo relacionado à gravidade da fissura, “Como essa variável é medida e por que você a considera subjetiva?”

De fato, a variável pode ser medida, no entanto existem muitos fatores complicadores, no sentido metodológico, especialmente, utilizando recursos fotográficos, além de muitas variáveis associadas à esta gravidade, como quantidade do tecido, proporção entre o tamanho do defeito e o tamanho da maxila, substituímos o termo “subjetividade” pelo termo “complexidade”.

- No objetivo geral, incluir que os pacientes foram submetidos à cirurgia.

A informação foi incluída.

- No artigo: o número do comitê não deve ser o CAAE e sim o número do parecer:

Foi realizada a correção, incluindo o número do parecer.

- Qual (is) motivo (s) para exclusão dos 416 indivíduos na primeira parte do estudo?

Incluimos mais claramente que no critério de inclusão os indivíduos deveriam ter fissura de lábio e palato não sindrômicas e modelos de gesso em dois momentos com intervalo mínimo de 4 anos entre eles.

- Na figura do design do estudo da parte longitudinal, achei muito bom você colocar essas duas figuras com os resultados do desfecho ao longo do tempo. Você esperava que esses resultados?

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores, mas imaginávamos que poderíamos encontrar algum caso de índice moderado (3), migrando para o índice com prognóstico ruim (4), especialmente nos casos de fissuras labiopalatinas unilaterais, no entanto não ocorreu

- Na metodologia do índice oclusal, como foi feita a randomização?

A lista de códigos dos pacientes foi inserida no site “randomization.com” e uma lista de casos a serem avaliados para a calibração foi estabelecida.

- Por que foi tomada a decisão de unir essas categorias (índices 1+2, índice 4+5)?

Os índices são agrupados, quando queremos tratá-los como prognósticos, já que os índices 1 e 2 significam prognósticos bastante favoráveis, com soluções ortodônticas simples e índices 4 e 5, representam prognósticos desfavoráveis com indicação de necessidade de cirurgia ortognática.

- Por que você usou imagens (fotografias) se foi realizado exame clínico, para a análise das anomalias dentárias?

A precisão da análise das anomalias dentárias requer observação cautelosa do examinador, o exame fotográfico nos permite recurso de zoom e avaliação criteriosa, ambas as informações foram unidas (fotografias e avaliação clínica) e, nos casos de dúvidas, o paciente era chamado para verificação.

- Em relação à variável da fissura, você não tinha os dados de todas pessoas?

Não, dos 360 casos incluídos para esta etapa do estudo, tínhamos 193 fotos pré cirúrgicas e 80 modelos de gesso pré cirúrgicos que poderiam ser avaliados, foi realizada análise estatística de regressão linear e logística para avaliar associação entre estas variáveis e as variáveis relacionadas ao crescimento (wits e Nasio-perpendicular ao ponto A) e índices oclusais.

- Para os índices de Goslon e Bilateral por que se aplica reprodutibilidade para prognóstico?

O prognóstico é estabelecido por estes índices que são variáveis ordinais obtidas através avaliações que podem apresentar falha do operador, por esta razão se faz necessária a confirmação estatística da reprodutibilidade intra-examinador.

- Para a etapa longitudinal, por ser a variável categórica, sugiro testes não paramétricos.

Foi refeita a estatística substituindo o test t para amostra pareadas pelo teste W de Wilcoxon.

- Sugiro que os dados de reprodutibilidade dos métodos sejam incluídos na metodologia, e não nos resultados.

Realizada a modificação.

- Na etapa longitudinal, é possível fazer uma análise, independentemente da idade, entre os grupos (antes e depois)?

A idade é um fator importante de ser considerado nesta análise, visto que a medida que há o crescimento e desenvolvimento facial e crescimento mandibular, há uma tendência de diminuição da sobressalência e, de tender a piores scores, por esta razão, não seria pertinente a avaliação independente da idade.

- Na figura que descreve as trajetórias do crescimento, a descritiva não é sustentada pela inferencial, qual a razão?

A parte inferencial foi realizada comparando os índices 1,2,3,4 e 5, na primeira avaliação com a segunda avaliação, a parte descritiva, traz um esclarecimento na análise caso por caso, dos casos que sofreram alguma modificação, do ponto de vista clínico, isso é relevante, porque mostra que aqueles que mudaram de índices, se mantiveram em índices com mesmos prognósticos, sem mudança de indicação de cirurgia ortognática para bom crescimento, ou vice e versa. Para esclarecer melhor, incluímos na legenda uma sentença introdutória a esta frase, alterando então para a seguinte escrita:

“Analyzing the cases individually, 32 in unilateral cases and 15 in bilateral cases changed the scores between T1 and T2. Cases that improved, changed from score 3 to scores 1 or 2, or 2 to 1. Cases with orthognathic prognosis scores (4 and 5) did not improve to 3, 2, or 1. The cases in scores 2 that got worse, changed to 3, but not to scores 4 or 5.”

- Na tabela descritiva dos resultados de tratamento, as medidas de índice oclusais, pela natureza ordinal, deveriam ter as medidas de tendência central expressas por mediana e não por média.

A correção foi realizada, retirando esta variável desta tabela, e acrescentando uma nova tabela descrevendo esta medida.

- Incluir na tabela dos resultados, símbolos que representem abaixo da tabela os testes que foram realizados. Sugiro incluir as categorias dos índices oclusais nas variáveis anomalias dentárias.

Incluídos os símbolos e a nota na tabela. A análise estatística para a frequência de anomalias dentárias e scores do índice oclusal, foi a regressão logística, a frequência poderia gerar uma leitura equivocada como sendo esta variável testada por teste qui-quadrado. Para esclarecimento desta frequência acrescentamos uma tabela nos resultados de anomalias dentárias mostrando a frequência mínima e máxima por scores, por tipo de fissura.

- Não seria mais interessante apresentar esses resultados (tabelas que trazem a frequência de genótipos e alelos por genes) após tabela 3 e só após mostrar os resultados das medidas cefalométricas?

Achamos pertinente mantê-las nesta posição, porque a tabela que antecede trata das variáveis de desfecho cefalométricas relacionadas aos genótipos e estas trazem a outra medida de desfecho por genótipo), seguindo uma sequência de resultados relacionados à variação genética.

- Penso que essas figuras repetem as informações que estão na tabela anterior, com o diferencial de apresentar análise inferencial, que pode ser incluída na tabela

A decisão por manter as figuras e tabela referente às anomalias dentárias foi tomada pelo entendimento de que as figuras ajudam ao leitor a uma visualização da conclusão geral dos números e a tabela esclarece os valores numéricos com mais clareza.

- Sobre a correlação entre os índices oclusais e a frequência de anomalia dentária - O valor de r não é tão expressivo.

A elevada frequência de anomalias dentárias nos indivíduos nascidos com fissuras comparados com indivíduos nascidos sem fissura é ponto comum na literatura, no entanto a sua análise em relação aos resultados de tratamento apenas foi relatada em relação às agenesias dentárias. Os valores de correlação que apresentaram significância estatística, no presente estudo foram moderados Wits e Occlusal scores para fissuras labiopalatinas unilaterais e occlusal scores para fissuras labiopalatinas bilaterais, e fracos para as medidas de nasio perpendicular ao ponto A em ambos os tipos de fissuras, este comportamento de dispersão, provavelmente, deve-se à natureza da variável anomalias dentárias, e aos outros fatores relacionados aos resultados de tratamento, que aqui denominamos de fatores de confusão, que foram incluídos nas análises de regressão linear e logística para ajuste dos modelos.

Incluímos análises de razão de risco para esclarecer o impacto da presença das anomalias dentárias que apresentaram associação.

- Sugestão de discutir na mesma sequência de apresentação dos resultados.

A discussão foi revisada no sentido de alterar a sequência conforme a descrição dos resultados.

ANEXOS

ANEXO 1- STROBE CHECKLIST

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cohort studies*

	Item No	Recommendation	Page number	line
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	2	6
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	2	14-65
Introduction				
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	3	75-97
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	3	98-103
Methods				
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	4	107-153
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	5	131-153
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up	6	145-149
		(b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed		
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	7	156-279
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	7	156-279
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	39	717-718
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	6	145-149

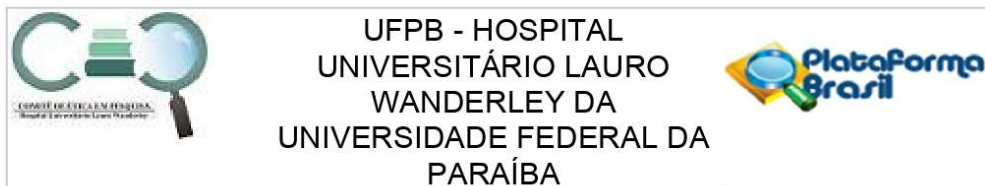
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	13	289-295
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	13	282-319
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	13	299-317
		(c) Explain how missing data were addressed		
		(d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed		
		(e) Describe any sensitivity analyses		
Results				
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	15	355
			16	386
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	16	386
		(c) Consider use of a flow diagram	6	140
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	4	107-122
			7	145-149
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	7	145-149
		(c) Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	15	356,366
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures over time	15	354-371
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	15	356
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized		

		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period		
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	24	468-475
Discussion				
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	37	654-716
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	39	717-720
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	39	718-720
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results		
Other information				
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	39	730-734

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at <http://www.strobe-statement.org>.

ANEXO 2- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Rosa Helena Wanderley Lacerda

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 13450819.6.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.410.456

Apresentação do Projeto:

INFORMAÇÕES PRELIMINARES:

Projeto Original, 5 versão. Trata-se de uma emenda de pesquisa para análise pelo CEP. Esta pesquisa está associada ao produto da disciplina Seminários em Ciências Odontológicas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

(Dados extraídos do arquivo: projetocomite_dadosdaemenda_destacados_2022abril(1).pdf)

Fissuras labiopalatinas são as deformidades craniofaciais de maior prevalência no mundo (ATTACK et al., 1997; BILE et al., 2005). Trazem alterações das estruturas faciais e geram comprometimentos estéticos, funcionais e psicossociais, podendo afetar de modo drástico a qualidade dos indivíduos acometidos. Em função da complexidade, o seu tratamento envolve um grande período de tempo, iniciando nos primeiros meses de vida até a idade adulta, sendo necessário tratamento especializado por equipe multidisciplinar e vários procedimentos cirúrgicos

Endereço: Rua Tabelaão Stanislaw Eloy, 585, 2º andar Castelo Branco

Bairro: Cidade Universitária

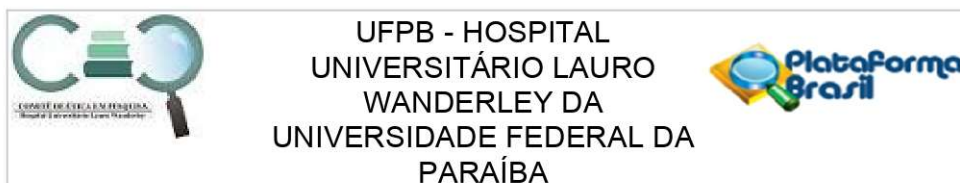
CEP: 58.050-585

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3206-0704

E-mail: cep.hulw@ebserh.gov.br



Continuação do Parecer: 5.410.456

durante esta trajetória.

Os objetivos do tratamento envolvem os parâmetros de crescimento crânio-facial adequado, boa estética facial, fala inteligível, ausência de comprometimentos auditivos e bem estar psicossocial. Os resultados obtidos com longo período de tratamento variam, podendo reabilitar completamente o indivíduo ou permanecer com sequelas importantes na estética ou função que afetem o reestabelecimento de uma boa condição de inserção na sociedade (DOGAN et al., 2005). Segundo a literatura a resposta ao tratamento pode estar relacionada às características iniciais da fissura, à experiência da equipe multidisciplinar, especialmente das especialidades de cirurgia plástica, ortodontia e fonoaudiologia e às técnicas cirúrgicas empregadas (MARS et al., 1992; LACERDA et al., 2011), no entanto, apesar de inúmeros trabalhos comparando técnicas cirúrgicas e protocolos de tratamento tenham sido descritos na literatura, não está claro quais seriam os protocolos ideais ou mesmo que variáveis de fato seriam responsáveis pelo sucesso do tratamento.

Além do estudo dos aspectos etiológicos das fissuras labiopalatinas nos diversos grupos populacionais, a busca por respostas e preditores de resultados de tratamentos pode ser um grande passo para o esclarecimento dessas questões e, o monitoramento adequado das diversas variáveis que envolvem, possivelmente seja a estratégia para o estabelecimento de planejamentos individualizados e adequados já que a capacidade de melhorar a qualidade dos cuidados depende da capacidade de medi-los (Citron et al. 2017).

5

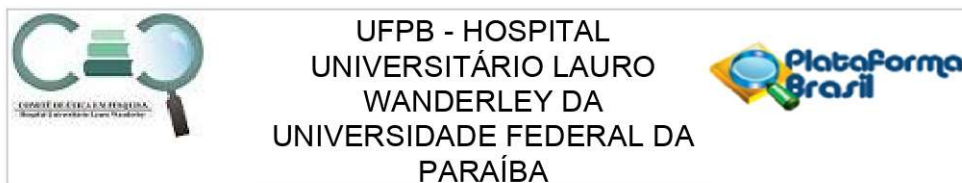
Desse modo, e com a necessidade de toda comunidade científica de buscar os melhores resultados e reabilitar adequadamente os pacientes com fissuras labiopalatinas, a presente pesquisa tem como objetivo definir preditores para resultados de tratamento em pacientes com fissuras labiopalatinas, o que se justifica pela ausência de estudos que englobem as diversas variáveis envolvidas no tratamento e pela lacuna existente na literatura.

Objetivo da Pesquisa:

GERAL:

Definir preditores para resultados de tratamento em pacientes com fissuras labiopalatinas.

Endereço: Rua Tabelaão Stanislaw Eloy, 585, 2º andar Castelo Branco
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.050-585
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3206-0704 **E-mail:** cep.hulw@ebserh.gov.br



Continuação do Parecer: 5.410.456

ESPECIFICOS:

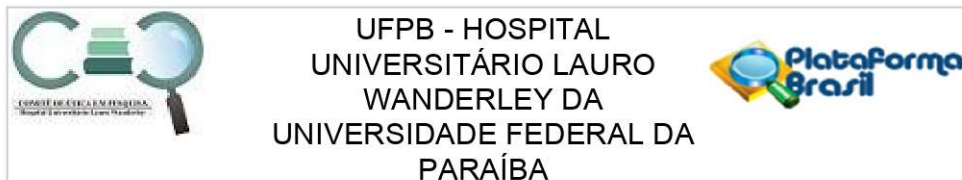
- Verificar a associacao da frequencia das fissuras labial, palatina e labiopalatina ao sexo, local de nascimento e outros fatores de risco.
- Definir as alteracoes dentarias de numero e de forma dentaria nos individuos com fissuras labiais e/ou palatinas como preditores de resultados de tratamento
- Definir em individuos com fissuras labiopalatinas que apresentem outras malformacoes dentarias estruturais associadas se essas malformacoes sao preditores de resultados de tratamento
- Avaliar o crescimento craniofacial como preditor de resultados de tratamento de individuos com fissuras labiopalatinas
- Avaliar os indices oclusais como preditores dos resultados cirurgicos,
- Avaliar as caracteristicas da fala do paciente nascido com fissura labiopalatinas (funcao velo-faringeana) como preditor dos resultados de tratamento dos individuos nascidos com fissura labiopalatinas.
- Avaliar a experiencia de dor dos individuos submetidos as cirurgias de enxerto osseo bem como os resultados de qualidade do enxerto osseo alveolar como preditor dos resultados de tratamento
- Testar variacao genetica e perfil de metilacao como preditores de resultados de tratamento das fissuras labiopalatinas.
- Avaliar, por meio do follow-up a eficiencia dos preditores a longo prazo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De acordo com a Resolucao no 466/12 do Conselho Nacional de Saude do Ministerio da Saude, as pesquisas executadas com seres humanos podem conferir riscos. Esta pesquisa oferece riscos minimos aos participantes. Sero respeitados valores morais, culturais, religiosos, sociais e eticos. Para divulgacao dos resultados deste estudo, nao serao fornecidos imagens, documentos ou qualquer tipo de informacao que permita a identificacao da identidade dos participantes do

Endereço: Rua Tabeião Stanislaw Eloy, 585, 2º andar Castelo Branco
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.050-585
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3206-0704 **E-mail:** cep.hulw@ebserh.gov.br



Continuação do Parecer: 5.410.456

estudo. O principal risco para os pacientes desse trabalho e o fato de ter participado da pesquisa seja sabido por terceiros. Para minimizar essa perda do estado de anonimato, todas as informacoes relativas aos participantes desse trabalho serao guardadas em arquivos eletronicos protegidos por senha em computadores tambem protegidos por senha localizados em escritorios de acesso restrito. Toda documentacao em papel (documentacao de termos de consentimento) sera guardada em armarios trancados a chave localizados em escritorios de acesso restrito. Acesso a toda documentacao dessa pesquisa so sera dado aos membros da equipe diretamente envolvidos nesse projeto e todas essas pessoas terao feito cursos relacionados a participacao de humanos em pesquisa.

Os riscos relacionados ao exame da cavidade oral e moldagem estariam relacionados a possivel contaminacao ou injurias aos tecidos moles, os

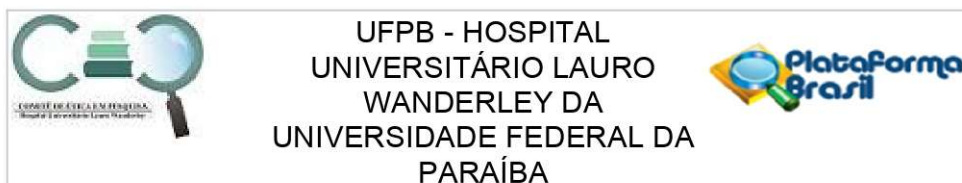
mesmos serao minimizados, utilizando-se todos os cuidados e normas, equipamentos e insumos relativos a biosseguranca, bem como sera realizado por um unico examinador, com experiencia na area, em ambiente adequado a este exame, sem que haja nenhum constrangimento ao individuo.

Os individuos participantes desta pesquisa, ou seus responsaveis, serao apresentados ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e aos individuos menores de idade, que ja tenham condicoes de compreensao, sera apresentado o termo de assentimento e serao esclarecidos sobre os aspectos eticos do estudo. Mediante concordancia com as condicoes do estudo, os voluntarios devem realizar impressao datiloscopica ou assinar o TCLE e termo de assentimento (apendices 6 e 7).

Benefícios:

Apesar dos participantes nao se beneficiarem diretamente de sua participacao nessa pesquisa, como beneficio proporcionado pelo futuro estudo pode-se citar a discussao cientifica e a divulgacao de informacoes que resultarao em um melhor conhecimento sobre os preditores em fissuras labiopalatinas, podendo ser estabelecido tratamentos mais adequados e individualizados. A populacao sera favorecida, visto que este estudo proporcionara profissionais melhor preparados para o enfrentamento de casos desta grandeza, propiciando atendimento e atencao integral adequada aos pacientes com esta anomalia.

Endereço: Rua Tabelião Stanislaw Eloy, 585, 2º andar Castelo Branco
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.050-585
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3206-0704 **E-mail:** cep.hulw@ebserh.gov.br



Continuação do Parecer: 5.410.456

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora solicitou a inclusão de uma emenda ao seu projeto, com a seguinte justificativa:

"A emenda hora incluída, se justifica por uma nova metodologia de avaliação dos resultados dos enxertos ósseos publicada em 2020, em tomografias computadorizadas de face. Como as tomografias constam nos mesmos prontuários dos sujeitos avaliados, solicitamos ao comitê de ética a permissão para inclusão desta avaliação já que a mesma não gerará intervenção adicional aos sujeitos, mas o acesso há mais um dado do prontuário analisado. Acrescento que em resposta ao parecer 4686997, toda a descrição e justificativa relativa a inclusão da variável resultados da fala, bem como a readequação do cronograma foi realizada".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos forma apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Apos análise dos aspectos eticos-metodologicos da pesquisa proposta, constatou-se que o referido projeto encontra-se em consonancia com a Resolucao 466/2012, do CNS/MS. Devendo, portanto, dar seguimento à sua execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO da EMENDA ao protocolo de pesquisa, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em reunião ordinária realizada em 10 de maio de 2022.

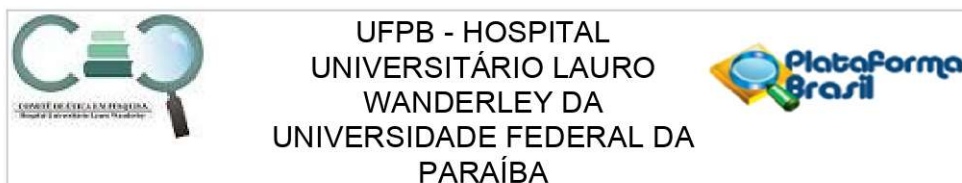
OBSERVAÇÕES IMPORTANTES PARA O(S) PESQUISADORES

. 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.

O protocolo de pesquisa, segundo cronograma apresentado pelo pesquisador responsável, terá vigência até dezembro de 2024.

Ao término do estudo, o pesquisador deverá apresentar, online via Plataforma Brasil, através de

Endereço: Rua Tabelaão Stanislaw Eloy, 585, 2º andar Castelo Branco
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.050-585
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3206-0704 **E-mail:** cep.hulw@ebserh.gov.br



Continuação do Parecer: 5.410.456

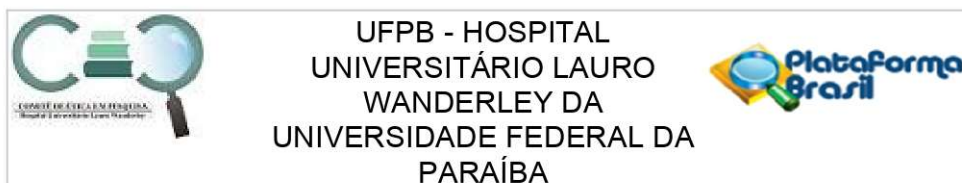
Notificação, o Relatório parcial ou final ao CEP/HULW para apreciação e emissão da Certidão Definitiva por este CEP. Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável 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_1926726_E2.pdf	06/04/2022 11:58:36		Aceito
Cronograma	cronograma_atualizado.pdf	06/04/2022 11:54:42	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Brochura Pesquisa	projeto comite_dados da menta_destaca dos_2022 abril.pdf	06/04/2022 11:51:22	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Outros	carta_resposta_parecer4656997.doc	25/04/2021 17:39:33	Rosa Helena Wanderley Lacerda	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	projeto comite1.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	anuencia institucional.pdf	03/05/2019 19:13:09	Rosa Helena Wanderley Lacerda	Aceito
Outros	anuencia fiss_tese.pdf	03/05/2019 19:10:04	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:

Endereço: Rua Tabelaão Stanislau Eloy, 585, 2º andar Castelo Branco
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.050-585
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3206-0704 **E-mail:** cep.hulw@ebserh.gov.br



Continuação do Parecer: 5.410.456

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 16 de Maio de 2022

Assinado por:
LUCIANA PIMENTEL FERNANDES DE MELO
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tabetião Stanislau Eloy, 585, 2º andar Castelo Branco
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.050-585
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3206-0704 **E-mail:** cep.hulw@ebserh.gov.br

Página 07 de 07